

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

BENKHEDDA Dikra Amani

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Recherche in silico de quelques inhibiteurs des enzymes de la
voie du mévalonate chez candida albicans**

Soutenu le 26/06/2023, devant le jury composé de :

Président	Dr. Benmansour Meriem	Maitre de conférence B	Université TLEMCEN
Encadrant	Sari-Belkherroubi Lamia	Professeur	Université TLEMCEN
Examineur	Mr. Cherrak Sbri	Maitre de conférence A	Université TLEMCEN

Année universitaire 2022/2023

Résumé

La voie de mévalonate de *Candida albicans* est-elle de la biosynthèse de l'ergostérol, qui est un élément vital de la membrane cellulaire. Différentes classes de médicaments antifongiques ciblent cette voie afin d'inhiber sa croissance et traiter les infections. Dans notre étude, nous avons choisi sur la lanostérol 14 alpha-déméthylase, qui est un enzyme clé, il joue un rôle crucial dans la conversion du lanostérol en ergostérol qui est la cible des médicaments antifongiques de la classe des azolés, notamment le voriconazole, notre ligand de référence. L'objectif de notre étude est d'identifier in silico des inhibiteurs potentiels ciblant l'enzyme lanostérol 14-alpha-déméthylase de la voie mévalonate à partir de composés phytochimiques présents dans la nature. Pour ce faire, nous avons effectué un screening moléculaire en utilisant le logiciel PyRx pour évaluer 60 molécules, parmi lesquelles nous avons sélectionné onze composés dont les ΔG est plus faible. Ensuite nous avons réalisé un amarrage moléculaire à l'aide du logiciel UCSF chimera, et nous avons comparé les interactions obtenues avec le voriconazole à l'aide du logiciel Discovery. Par la suite, une analyse des propriétés pharmacologiques par SwissADME a permis de prédire la berbérine comme inhibiteur biodisponibles par voie orale.

Mots clés : inhibiteur, lanostérol 14 alpha- déméthylase, La voie mévalonate, in silico, screening moléculaire

Abstract

the mevalonate pathway of *Candida albicans* involved in the biosynthesis of ergosterol, which is a vital element of the cell membrane. Different classes of antifungal drugs target this pathway to inhibit its growth and treat infections. In our study, we selected lanosterol 14-alpha-demethylase, which is a key enzyme that plays a crucial role in the conversion of lanosterol to ergosterol, the target of antifungal drugs in the azole class, including voriconazole, our reference ligand. The objective of our study is to identify in silico potential inhibitors targeting the lanosterol 14-alpha-demethylase enzyme of the mevalonate pathway from phytochemical compounds found in nature. To do this, we performed molecular screening using PyRx software to evaluate 60 molecules, among which we selected eleven compounds with lower binding affinity. Then, we conducted molecular docking using UCSF Chimera software and compared the obtained interactions with voriconazole using Discovery software. Subsequently, an analysis of pharmacological properties using SwissADME predicted berberine as an orally bioavailable inhibitor.

Keywords : inhibitor, lanosterol 14-alpha-demethylase, The mevalonate pathway, in silico, molecular screening

ملخص

تشارك كنديدا البيكانز في مسار الميفلونات في تخليق ارجستروول و هو عنصر حيوي في غشاء الخلية. فئات مختلفة من الأدوية المضادة للفطريات تستهدف هذا المسار لتثبيط نموه وعلاج العدوى. في دراستنا، قمنا باختيار لانوستروول 14 ألفا-ديميثيليز، وهو إنزيم رئيسي يلعب دورًا حاسمًا في تحويل لانوستروول إلى إرجستروول، وهو هدف الأدوية المضادة للفطريات في فئة الأزول، بما في ذلك فوريكونازول، المركب المرجعي لدينا. هدف دراستنا هو تحديد مثبطات محتملة بالتكنولوجيا الحاسوبية المستهدفة لإنزيم لانوستروول 14 ألفا-ديميثيليز في مسار ميفالونات من المركبات الفيتوكيميائية الموجودة في الطبيعة. للقيام بذلك، قمنا بفحص جزيئي باستخدام برنامج PyRx لتقييم 60 جزيء، حيث قمنا باختيار أحد عشر مركبًا يتمتع بتفاعلية أقل في الربط. بعد ذلك، أجرينا عملية ربط جزيئي باستخدام برنامج UCSF Chimera وقمنا بمقارنة التفاعلات المحصلة مع فوريكونازول باستخدام برنامج Discovery. فيما بعد، قمنا بتحليل الخصائص الدوائية باستخدام SwissADME وتوقعنا أن يكون البربرين مثبطًا قابلاً للاستخدام عن طريق الفم.

الكلمات المفتاحية: فحص جزيئية, 14 ألفا-ديميثيليز, مثبطات, مسار ميفالونات, التكنولوجيا الحاسوبية.

Remerciements

Avant tout je remercie " **Allah**" le tout puissant qui m'a aidé et m'a donnée la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier mon encadrante, **Mme Sari-Belkherroubi Lamia**, pour son soutien, sa grande disponibilité, ses encouragements, ses précieux conseils.

Je tiens également à remercier, **Dr.Benmansour Meriem** d'avoir accepté d'examiner ce travail, leur remarque et critique me seront précieuses et enrichissantes.

Je tiens à exprimer également toute ma reconnaissance à **Mr CHERRAK Sabri** pour m'avoir guidé durant la réalisation du travail avec une disponibilité permanente et de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine de docking moléculaire.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes enseignants du département de biologie à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents les plus proches de mon cœur, pour leur sacrifice et leurs encouragements tout au long de mes études

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, et qui font toujours pour

Éclairer mon chemin, à mon cher père Abdelkader, je dédie ce travail et lui

Souhaite une longue et bonne vie

À la fleur qui adoucit et parfume mes journées, qui soutiennent les nuits jusqu'au sommeil, à ma chère maman Houria, je dédie ce travail et lui

Souhaite une longue et heureuse vie

À mes chères sœurs Sara et Amira mes meilleures, pour leur amour,

Leur soutien moral pendant mes 5 années d'études

À toute ma famille

À ma chère amie : Soumia et à tous mes aimables amis

À toute personne qui a participé de loin ou de près dans la réalisation de ce

Travail

Table des matières

Introduction.....	1
Synthèse Bibliographique.....	4
1. Polyènes	5
2. Les azolés.....	6
3. La fluoropyrimidine	8
4. Les Echinocandines.....	9
5. Les Allylamines	11
6. Mécanisme de résistance	12
6.1. Résistance aux polyènes.....	13
6.2. La résistance aux azolés	13
6.2.1. La déviation de la voie de synthèse des stérols	13
6.2.2. Modification de l'enzyme cible	14
6.2.3. Surexpression de l'enzyme cible	14
6.2.4. Altérations chromosomiques	14
6.2.5. Induction de pompes à efflux.....	14
6.3. Résistance aux fluoropyrimidines	14
6.5. Mécanismes de résistance aux allylamines.....	15
7. L'ergostérol chez Candida albicans	16
Matériel et méthode	20
1. Matériel	21
1.1. Micro-ordinateur	21
1.2. Les logiciels	21
1.2.1. UCSF Chimera	21
1.2.2. AutoDock Vina	21
1.2.3. Dock Prep	21
1.2.4. PyRx	21
1.2.5. Discovery Studio	22
1.2.6. SwissADME :	22
1.3. Banques de données	22
1.3.1. La banque de données protéiques (PDB) :	22
1.3.2. Pubchem.....	22
2. Méthodes :	23
2.1. Préparation d'enzyme :	23
2.2. Préparations des inhibiteurs	24
2.3. Le docking moléculaire	35

2.4. La visualisation tridimensionnelle sur Discovery studio Visualiser se déroule selon les étapes suivant :	36
Résultats et discussion	39
1. Résultat de Docking moléculaire	40
2. Les interactions moléculaires :	42
3. L'évaluation des propriétés pharmacologiques :	55
Conclusion	61
Reference bibliographique	64

Liste des abréviations

AMB : Amphotéricine B

CYP51 : cytochrome P450

CI : candidose invasive

FDA : Food and Drug Administration

5-FC : 5-fluorocytosine

5-FU : 5-fluorouracil

L'UPRT : Uracil Phosphoribosyltransferase

SIDA : Syndrôme d'immunodéficience acquise

MFS : major facilitator superfamily

MDR : Multidrug resistance

ABC : ATP-binding cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

NADP(H) : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

RE : réticulum endoplasmique

HMG-COA: Hydroxyméthylglutaryl-CoA

FCY1 : Cytosine deaminase

FCY2 : Purine-cytosine permease

HS : Hot Spot

RBVI : Resource for Biocomputing Visualisations

SDF : Standard Database Format

DSV : Discovery Studio Visualizer

WEB : World Electronic Base

PDB : Protein Data Bank

DOCK : Docking

EGCG : Epigallocatecine gallate

Liste des figures

Figure 1: Les antifongiques polyéniques	5
Figure 2 : Mode d'actions des polyènes	6
Figure 3: Structure chimique des principaux antifongiques azolés.	7
Figure 4: Mode d'action des azolés	8
Figure 5: Structure chimique de la flucytosine	8
Figure 6: Métabolisation intracellulaire et mode d'action de la 5 fluorocytosine chez <i>Candida albicans</i> et <i>S. Cerevisiae</i>	9
Figure 7: Structure chimique des échinocandines	10
Figure 8: Mode d'action des échinocandines	11
Figure 9 : Structure chimique de la terbinafine.	11
Figure 10: Mode d'action de Chlorhydrate de terbinafine.	12
Figure 11: Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>Candida albicans</i>	17
Figure 12: la Lanosterol-14 Alpha déméthylase	23
Figure 13 : Interface PyRx.	36
Figure 14: interaction récepteur-ligand	37
Figure 15: Les valeurs des paramètres calculés.	38
Figure 16: Interaction de voriconazole avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	43
Figure 17: Interaction de Acide ursolique avec Lanosterol 14-alpha déméthylase	44
Figure 18: interaction de Apigénine-7-O-rutinoside avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	45
Figure 19: interaction de Naringine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	46
Figure 20: Interaction de Rutine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	47
Figure 21: Interaction de Cynaroside avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	48
Figure 22: Interaction de Apigénine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	49
Figure 23: Interaction de isovetexine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	50
Figure 24: Interaction de Diosmétine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	51
Figure 25 : Interaction de Berbérine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	52
Figure 26: Interaction de lutéoline avec Lanosterol 14-alpha déméthylase	53
Figure 27: Interaction de Épigallocatechin Gallate avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.	54
Figure 28: Radar de biodisponibilité de voriconazole	57
Figure 29: Radar de biodisponibilité d'Isorhoifolin (a), Rutine (b) et Naringine (c).	57
Figure 30: Radar de biodisponibilité berbérine.	58
Figure 31: Radar de biodisponibilité épigallocatechin Gallate.	58
Figure 32: Radar de biodisponibilité Acide ursolique.	59
Figure 33: Radar de biodisponibilité Diosmétine (a) et lutéoline (b).	59
Figure 34: Radar de biodisponibilité Apigénine	59
Figure 35: Radar de biodisponibilité cynaroside	60
Figure 36: Radar de biodisponibilité Isovétexine	60

Liste des tableaux

Tableau 1: Les données PDB de la Lanosterol 14-Alpha déméthylase.....	23
Tableau 2 : les analogues et leurs structures chimiques.....	25
Tableau 3: Taille et position du centre de la grille	36
Tableau 4: les résultats de screening moléculaires à l'aide de PyRx.....	40
Tableau 5: screening moléculaire des onze molécules de meilleure affinité avec lanosterol 14-alpha déméthylase (chimera).....	42
Tableau 6: les acides aminés que se répète et leur position.	54
Tableau 7 : Profil ADMET des inhibiteurs sélectionné	56

Introduction

Les levures du genre *Candida*, sont des microorganismes eucaryotes responsables d'un nombre non négligeable d'infections fongiques qui peuvent être superficielles ou invasives **(Chambard., 2009)**.

Les infections à *Candida* sont au premier rang des infections fongiques nosocomiales **(Quindós G., 2014)**. La candidose invasive (CI) représente une complication infectieuse grave et reste associée à un taux de mortalité élevé chez les patients immunodéprimés notamment, variant entre 40 et 60 % **(Thompson., 2001)**. Bien qu'au moins 15 espèces de *Candida* aient été associées à des maladies humaines, plus de 90 % des maladies invasives sont associées à *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. paraglabrata* et *C. krusei* **(Chabasse., 2006)**.

Les candidoses sont un problème de santé publique dans le monde du fait de leur prévalence et de leur gravité. Ce sont des infections sévères principalement acquises à l'hôpital et elles représentent 2,5 à 10% des infections nosocomiales. Toutefois, ces dernières années, une élévation de l'incidence des candidémies communautaires est observée en raison d'une évolution des pratiques médicales avec l'augmentation des hospitalisations à domicile **(Persat., 2009)**.

Face à l'augmentation rapide de l'incidence des candidoses la communauté scientifique est constamment à la recherche de nouvelles molécules à activité antifongique, le nombre de cibles cellulaires utilisables est limité pour satisfaire aux critères de toxicité chez le patient. Ce traitement antifongique est lié principalement à la situation immunitaire, aux maladies que présente le sujet concerné et de l'espèce de *Candida* en cause ainsi que leurs seuils de sensibilité. Les actions exercées par ces médicaments antifongiques représentent des paramètres cliniques essentiels pour la surveillance de ces infections **(Badice et coll., 2017)**.

Ainsi, le traitement des infections fongiques repose à l'heure actuelle sur l'utilisation de cinq types de molécules **(Spampinato et Leonardi., 2013)**. La 5-fluorocytosine, un analogue des bases pyrimidiques, inhibe la Croissance fongique en perturbant la synthèse protéique et la répllication de l'ADN. Les Antifongiques polyéniques et azolés agissent au niveau de l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons, ou de sa voie de biosynthèse. Les allylamines bloque les étapes initial de la synthèse de l'ergostérol Enfin, les echinocandines perturbent la synthèse de la paroi fongique en inhibant une enzyme responsable de la synthèse de certains polysaccharides pariétaux **(Hasim et Coleman., 2019)**.

L'utilisation intensive de ces molécules a malheureusement conduit à une Augmentation de l'incidence des résistances aux antifongiques **(De Oliveira Santos et coll., 2018)**.

L'émergence de la résistance des *Candida spp* aux antifongiques est à l'origine d'échecs thérapeutiques et pose donc des problèmes difficiles de prise en charge de ces infections. Cet échec représente un véritable problème au niveau des hôpitaux **(Morace et coll., 2014 ; Nucci et Perfect., 2008)**.

Les enzymes intervenant dans la voie du mévalonate qui conduit de la biosynthèse de l'ergostérol sont des cibles potentielles des nouvelles molécules antifongiques.

D'autre part, dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules antifongique, les substances phytochimique sont des composés naturels présents dans la nature. Parmi ces composés on trouve les flavonoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols **(Fraga et C.G. Ed., 2018)**. Ces composés peuvent être trouvés à la fois dans les huiles essentielles extraites de plantes et dans les plantes médicinales elles-mêmes **(Chen et coll ., 2016)**. Les flavonoïdes sont des pigments naturels présents dans de nombreuses plantes et sont connus pour leurs propriétés antifongiques et anti-inflammatoires. Par exemple, la rutine est un flavonoïde extrait des parties aériennes des plantes de la famille rutaceae **(Pandey et coll., 2009)**. Les terpénoïdes, quant à eux, sont une classe diverse de composés chimiques présents dans les plantes, et ils peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes et antifongiques **(Tholl, D., 2015)**. Les alcaloïdes sont des composés azotés qui ont souvent des effets pharmacologiques. Certains alcaloïdes comme la berbérine, se trouvent majoritairement dans la famille de plantes Berberidaceae et sont présents dans diverses plantes médicinales **(Rojas-Rutz., 2018)**. Les polyphénols, enfin, sont des composés aromatiques présents dans de nombreuses plantes, et ils peuvent avoir des propriétés antifongiques et antibactériennes **(Pérez-Jiménez., 2010)** Ainsi, les huiles essentielles et les plantes médicinales sont des sources riches en substances phytochimiques bénéfiques pour la santé. Ces composés sont étudiés pour leur potentiel en tant qu'inhibiteurs et pour leur utilisation dans diverses applications thérapeutiques **(Raut, J.S et coll., 2014)**.

Partant de toutes ces données, nous avons envisagé cette étude qui consiste à recherche in silico, des molécules phytochimique pouvant inhiber le 14 alpha-déméthylase une enzyme clé dans les voie de biosynthèse

Synthèse Bibliographique

Candida, comme son hôte humain, est un eucaryote et a donc un nombre limité de cibles thérapeutiques potentielles. Une molécule thérapeutique d'intérêt est caractérisées par un large spectre d'action dans le règne fongique, une action fongicides plutôt que fongistatiques et peu ou pas d'effet sur les cellules hôtes (**leoffler et stevens., 2003**).L'arsenal des médicaments antifongiques s'est considérablement enrichi ces dernières années. Cependant, il n'existe encore que cinq grandes classes de médicaments antifongiques disponibles pour une action systémique contre les cibles fongiques, et leur utilisation accrue a favorisé l'émergence de souches résistantes aux médicaments (**Chen et Sorelle., 2007**).

1. Polyènes

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, isolées pour la plupart à partir de bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité limitée pour permettre leur utilisation clinique: l'amphotéricine B (AmB), la nystatine et la natamycine (figure 1) (**Caffrey et coll., 2001**)

Les polyènes sont des macrolides, des molécules organiques amphiphiles cycliques. La plupart sont constitués d'un cycle macrolide de 20 à 40 atomes de carbone auquel est attaché un groupe d-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié à plusieurs doubles liaisons conjuguées d'un côté du cycle macrolide, qui est donc hydrophobe, tandis que l'autre côté possède un groupement hydroxyle hydrophile (**Lemke et coll., 2005**).

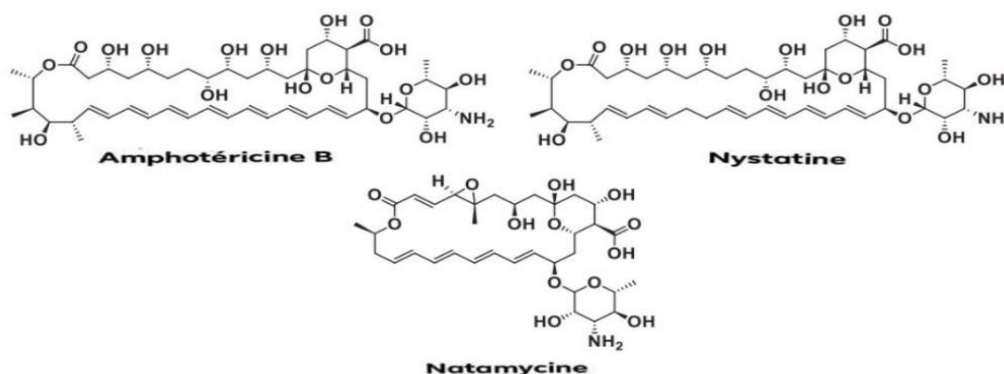


Figure 1: Les antifongiques polyéiniques (**Vardanyan et Hruby., 2016**).

Concernant le mode d'action des polyènes, des études initiales sur l'action biologique des Polyènes ont montrées que ces molécules expriment leurs effets sur les stérols membranaires (**Zotchev., 2003**).

Leur nature amphiphile leur permet de s'associer à la bicouche lipidique des membranes fongiques en formant des pores. Les données de résonance magnétique nucléaire ont révélé que 8 molécules d'AmB se lient à 8 molécules d'ergostérol via leur fraction polyène, tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central d'un diamètre de 70 à 100 nm. La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique, tandis que le canal permet la fuite des composants intracellulaires, et notamment les ions K^+ , lors de l'initiation de la lyse cellulaire (figure 2) (Lemke et coll., 2005).

En effet, des études ont montré que les polyènes sont capables d'induire un stress oxydatif, notamment chez *C. albicans* ; de plus, il semble que leur activité soit diminuée en condition hypoxiques (Ghannoum et Rice., 1999 ; Akins., 2005 ; Carrillo-Munoz et coll., 2006 ; Warn et coll., 2004).

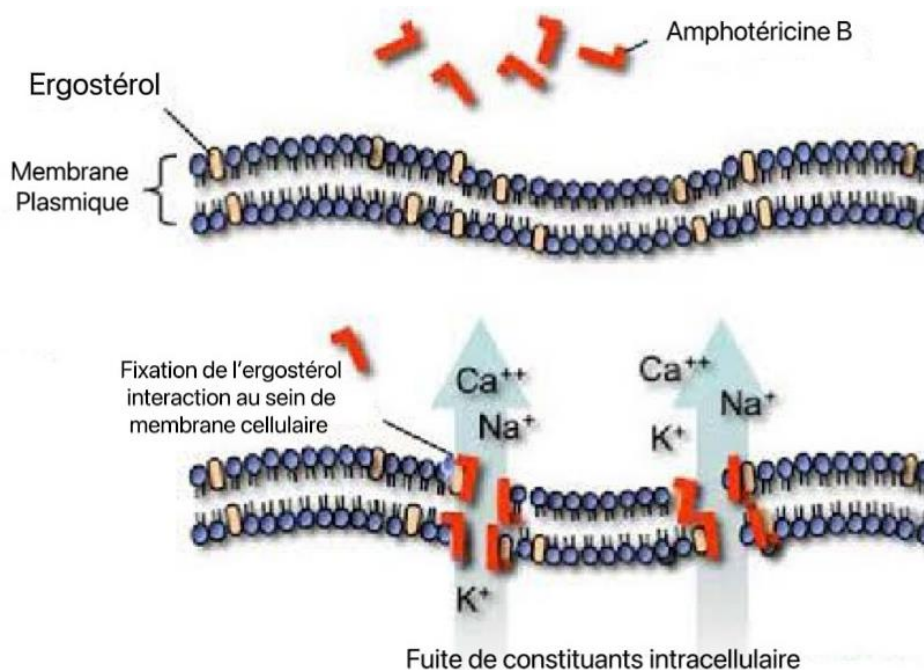


Figure 2 : Mode d'action des polyènes (Desoubeaux et Chandénier, 2010).

2. Les azolés

Les azolés ont été découverts dans les années 1960. Le clotrimazole et le miconazole ont été les premiers azolés à être lancés en 1969, et le voriconazole étant le dernier azolé à être lancé en 2002 après une période de développement. (Asif., 2018).

Les agents antifongiques azolés sont des molécules organiques cycliques qui peuvent être divisées en deux classes en fonction du nombre d'atomes d'azote sur le cycle azolé :

l'imidazole (cycle imidazole : 2 atomes d'azote) et le triazole (cycle triazole : 3 atomes d'azote) (Figure3) (Maertens., 2004).

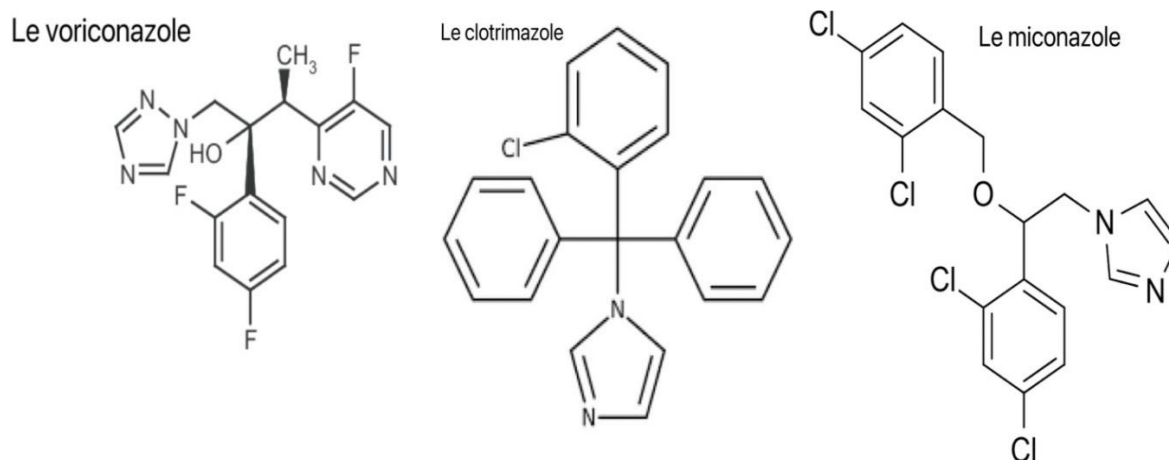


Figure 3: Structure chimique des principaux antifongiques azolés (Morio et Le Pape., 2014).

Ils sont présentés sous forme d'une poudre non soluble dans l'eau mais ont une certaine solubilité dans les solvants organiques dont l'alcool et le chloroforme (Aguilar et coll., 2015). Les imidazoles de première génération (miconazole et clotrimazole) sont plus actifs que la nystatine dans le traitement du muguet (Bortolussi et coll., 2007).

Les antifongiques azolés agissent par liaison et inhibition de la lanostérol 14 alpha-déméthylase (Erg11 ou CYP51), enzyme qui convertit le lanostérol en ergostérol, un composant essentiel des membranes cellulaires fongiques (Figure 4). Il en résulte une altération membranaire, ainsi qu'une accumulation de stérol méthyles toxique pour la cellule fongique parmi lesquels le 14 alpha -méthylergosta-8,24(28)-diène-38,6a-diol (Odds FC et coll., 2003).

Ils inhibent également une autre enzyme du cytochrome P450, impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol (Erg 5). Cependant, sa localisation en aval d'erg11 dans cette voie de biosynthèse en fait une cible secondaire (Guitard J, et coll., 2013).

Ces agents antifongiques ont un effet fongistatique contre *Candida spp.* : Ils permettent d'inhiber la croissance des levures, sans les supprimer.

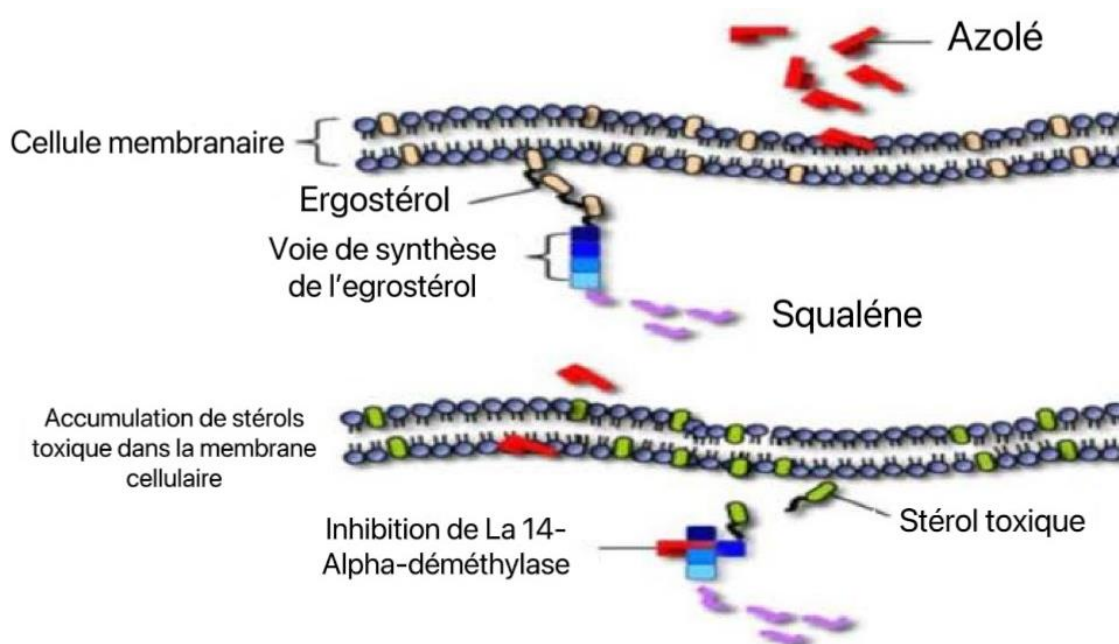


Figure 4: Mode d'action des azolés (Desoubeaux et Chandener., 2010).

3. La fluoropyrimidine

La flucytosine, un médicament anticancéreux potentiel, a été synthétisée pour la première fois en 1957 (Loyse et coll., 2013). En 1971, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé l'utilisation de la flucytosine pour traitement de mycoses (figure 5) (Harsanyi et coll., 2017).

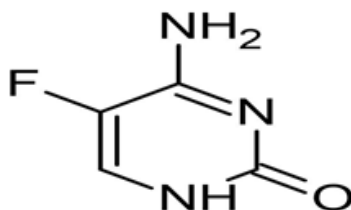


Figure 5: Structure chimique de la flucytosine (Nett et Andes., 2015).

En raison de sa grande hydrosolubilité et de sa petite taille, la 5-FC possède des propriétés pharmacocinétiques intéressantes car il diffuse très rapidement dans l'organisme même après administration orale (Daneshmend et Warnock., 1983). En outre, ses effets secondaires sont le plus souvent négligeables, bien que des effets plus graves, peuvent se traduire par une hépatotoxicité et une atteinte de la moëlle osseuse (Stamm et coll., 1987).

Le mécanisme d'action du 5-FC repose sur sa conversion par les cellules fongiques en 5-FU, qui lui confère son pouvoir fongistatique (Bennett., 1977 ; Polak et Scholer., 1980 ; Benson et Nagata., 1988). En effet, le 5-FC pénètre rapidement à l'intérieur des cellules

fongiques via des transporteurs plus ou moins spécifiques comme la cytosine perméase ou les transporteurs des pyrimidines, puis elle est métabolisée en 5-FU par la cytosine désaminase (Polak et Grenson., 1973 ; Polak et Scholer., 1975).

Le 5-FU est ensuite converti en 5-fluorouracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase. A partir de cette étape, deux voies distinctes permettent d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire. Le 5-fluorouracile monophosphate peut être converti en 5-fluorouracile triphosphate qui s'incorpore dans les ARN à la place de l'uracile triphosphate et bloque ainsi la synthèse protéique. Le 5-fluorouracile monophosphate peut également être converti par l'UPRT en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate, composé qui va inhiber la multiplication cellulaire thymidylate synthétase, une enzyme clé de la biosynthèse de l'ADN (Figure 6) (Scholer., 1980 ; Waldorf et Polak., 1983 ; Bennett., 1996).

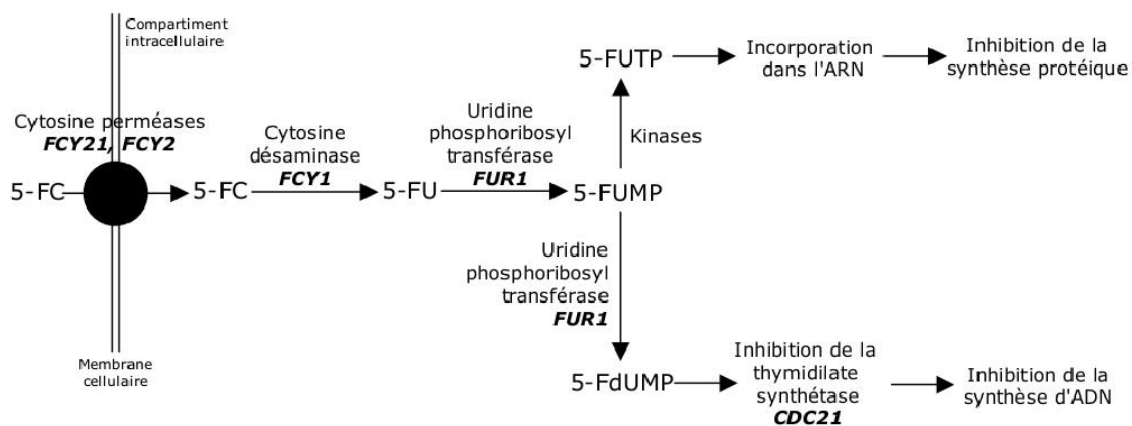


Figure 6: Métabolisation intracellulaire et mode d'action de la 5 fluorocytosine chez *Candida albicans* et *S.Cerevisiae* (Vermes et coll ., 2000a).

4. Les Echinocandines

L'anidulafungine a été la première échinocandine produite en 1974 ensuite la caspofungine en 1989 et la micafungine en 1990. Leur application en pratique médicale a débuté en 2001 pour la caspofungine, 2005 pour la micafungine et 2006 pour l'anidulafungine sur le territoire Américain (Pilmis et coll., 2013).

D'un point de vue structural, les échinocandines sont des hexapeptides cycliques non ribosomaux dotés d'une chaîne latérale lipophile (figure 7) (Hüttel., 2020).

Au cours des 15 dernières années, les échinocandines étaient la seule nouvelle classe de médicaments antifongiques à la disposition des médecins pour lutter contre les infections fongiques invasives (Denning., 2002).

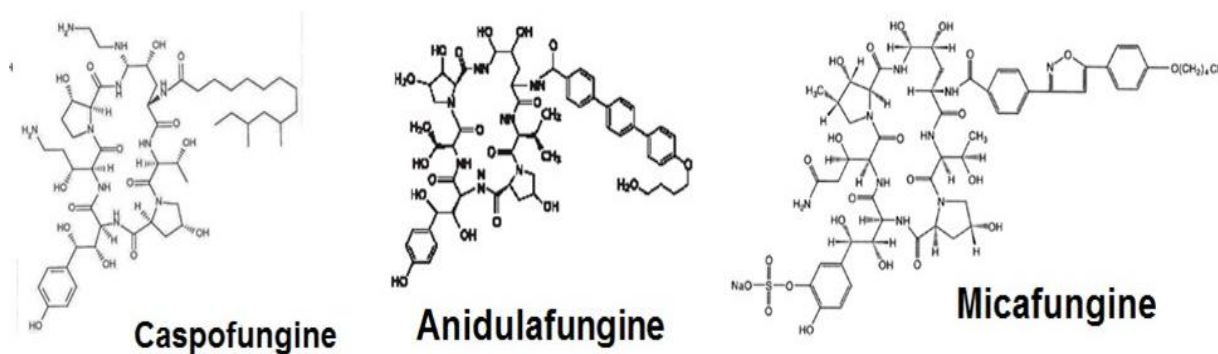


Figure 7: Structure chimique des échinocandines (Aguilar-zapata, et coll., 2015).

Les échinocandines sont des inhibiteurs non compétitifs de la β (1-3)-glucane synthétase, une enzyme qui catalyse la polymérisation de l'uridine diphosphate-glucose en β (1-3) glucane, un des composants structuraux responsables du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique (Kurtz et Douglas, 1997 ; Marco et coll., 1998). La β (1-3)-glucane synthétase est composée d'une sous-unité activatrice et d'une sous-unité catalytique, codée par les gènes FKS. Chez la plupart des champignons, deux gènes FKS sont présents, FKS1 serait exprimé lors de la phase végétative de croissance tandis que FKS2 serait exprimé lors de la sporulation, les échinocandines pouvant inhiber indifféremment les deux formes de l'enzyme (Georgopapadokou et Tkacz, 1995). Le blocage de la β (1-3)- glucane synthétase entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la lyse de la cellule fongique (figure 8) (Stone et coll., 2002).

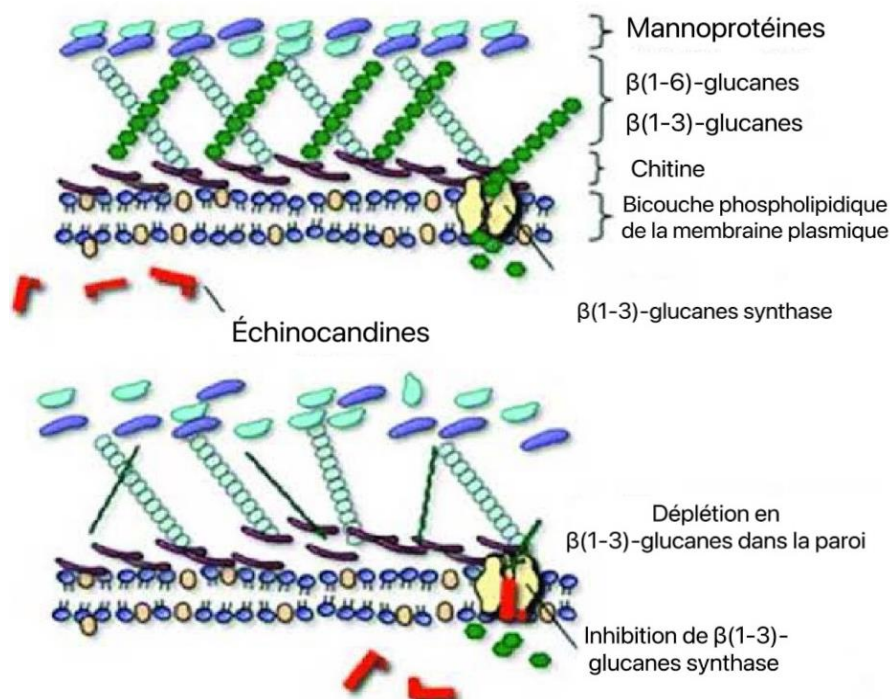


Figure 8: Mode d'action des échinocandines (Desoubbeaux et Chandener., 2010).

5. Les Allylamines

La découverte des allylamines était juste après les imidazoles en 1974. Cette découverte était accidentelle où une réaction chimique imprévue avait produit une molécule dont la structure chimique est nouvelle (Asif., 2018).

Cette classe comprend principalement deux molécules dont la naftifine qui est utilisée pour un traitement topique et la terbinafine dans l'usage peut être à la fois topique et systémique par voie orale (figure 9) (Dupont., 1988).

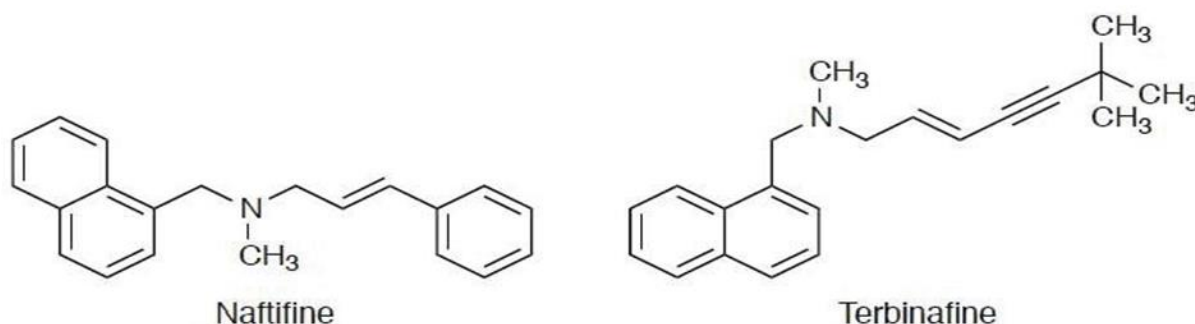


Figure 9 : Structure chimique de la terbinafine (Birnbaum., 1990).

La naftifine et la terbinafine présentent une large activité sur les champignons pathogène notamment pour les levures du genre *Candida* dont l'activité varie d'une espèce à l'autre et d'une souche à l'autre (Ryder et Miet., 1992).

Les allylamines ont un mode d'action représenté par le blocage des étapes initiales de la synthèse de l'ergostérol, cette action s'exprime par le réassemblage de squalène à l'intérieur des cellules et l'inexistence des autres stérols (figure 10) (François et coll., 2005).

Les allylamines possèdent une activité inhibitrice de la squalène époxidase, cet antifongique réagit avec une partie lipophile de l'enzyme (Ryder et Mieth., 1992). Des concentrations élevées de squalène induisent une augmentation de perméabilité membranaire ce qui conduit à une altération de la structure cellulaire. La lyse des cellules fongique est due à l'accumulation du squalène plutôt qu'à l'épuisement d'ergostérol (François et coll., 2005).

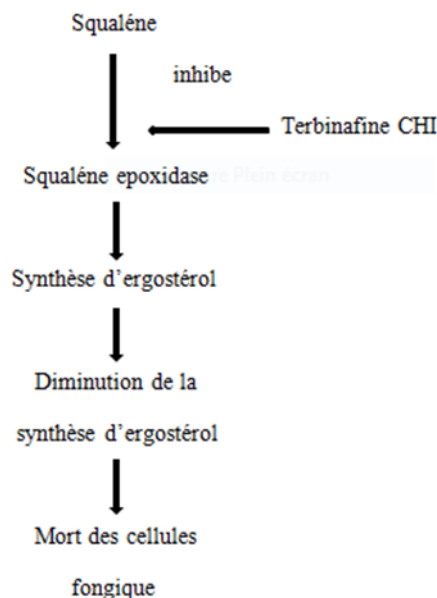


Figure 10: Mode d'action de Chlorhydrate de terbinafine (Gaba et coll., 2015).

6. Mécanisme de résistance

Il existe généralement trois mécanismes conduisant à la résistance aux médicaments antifongiques de *Candida*, notamment : Diminution de la densité antifongique intracellulaire, réduction de la cohésion entre les antifongiques et leurs propres cibles et altérations de certaines étapes de la synthèse de l'ergostérol. De plus, l'expression accrue de la cible et la plasticité du génome chez la levure *Candida* sont également impliquées en parallèle. Il est bien connu que plusieurs mécanismes peuvent coexister, en particulier dans les souches à concentrations minimales inhibitrices élevées (Morio et Maubon., 2018).

6.1. Résistance aux polyènes

La résistance aux polyènes dans les isolats cliniques de champignons pathogènes reste un événement relativement rare (**Kanafani et Perfect., 2008**). Cette observation est tout d'abord la conséquence directe du mode d'action de ces antifongiques, leur cible extracellulaire limitant le nombre de mécanismes permettant d'échapper à leur action.

Bien que rarement décrits, les mécanismes de résistance acquise ou persistante aux polyènes ont été étudiés chez plusieurs espèces fongiques. Il s'agit, à quelques exceptions près, d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale d'ergostérol dans les membranes, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (**Vanden Bossche et coll., 1994**).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux polyènes ont été principalement décrits chez des mutants induits de levures du genre *Candida*. Ainsi, la délétion du gène ERG11 chez *C. albicans* conduisent à l'obtention de colonies présentant une résistance croisée aux antifongiques azolés et polyéniques (**Sanglard et coll., 2003 ; Watson et coll., 1998**). Toutefois, peu de données concernant les mécanismes de résistance aux antifongiques polyéniques sont disponibles pour des isolats cliniques des champignons pathogènes et les études ont essentiellement porté sur l'espèce *C. albicans*. Ainsi, des travaux ont montré qu'un déficit en delta-6 désaturase, codée par le gène ERG3, pouvait être à l'origine de la résistance aux polyènes chez des isolats cliniques de *C. albicans* prélevés chez des patients atteints de leucémie ou du SIDA (**Kelly et coll., 1997 ; Nolte et coll., 1997**).

6.2. La résistance aux azolés

Sur le plan moléculaire, les mécanismes qui entraînent une résistance aux azolés sont nombreux à savoir (Altération dans la composition des stérols, Modification de l'enzyme cible, Surexpression de l'enzyme cible, Altérations chromosomiques)

6.2.1. La déviation de la voie de synthèse des stérols

C'est un mécanisme moins impliqué chez les souches cliniques, il est basé sur l'apparition de mutations qui endommagent l'activité de quelques enzymes intervenant dans la synthèse d'ergostérol. Ces mutations surviennent habituellement sur le gène ERG3 qui code pour l'enzyme C5 désaturase menant à l'agrégation de 14 α -méthyl fecostérol qui est un produit non nocif pour la cellule fongique à la place du produit toxique qui provient du blocage d'Erg11 par ces antifongiques, c'est ce qui a été montré chez de nombreuses espèces du genre *Candida* (**Maubon et Morio., 2018**).

6.2.2. Modification de l'enzyme cible

Un autre mécanisme de résistance est la modification des enzymes cibles azolés. Lanostérol-14- α -stérol déméthylase (Erg11p ou Cyp51) codée par le gène ERG11. ERG11 est un gène hautement polymorphe et certaines mutations n'en sont pas responsables. Ceux-ci modifient l'affinité de l'enzyme pour l'azolé. Ces derniers ne peuvent alors plus jouer leurs rôles d'inhibiteurs. A noter que *C. krusei* présente naturellement ce type de résistance au fluconazole (**cowen et coll., 2014**).

6.2.3. Surexpression de l'enzyme cible

En augmentant la production d'enzymes cibles, les champignons peuvent devenir moins sensibles à l'activité des azolés. Une augmentation du nombre de copies d'ERG11 à la suite de réarrangements chromosomiques est un autre mécanisme qui aboutit aux mêmes effets. Chez certains patients, on trouve ainsi des isolats de *Candida* avec une sensibilité diminuée aux azolés, avec des concentrations d'ERG11 plus importantes que chez des isolats sensibles (**Morio et Le Page., 2014**).

6.2.4. Altérations chromosomiques

Des altérations chromosomiques peuvent entraîner une augmentation du nombre des copies des gènes impliqués dans la résistance aux azolés :

Formation d'isochromosome, pertes d'hétérozygotie, formation de mini-chromosome (**Sanglard D et coll., 2009 ; Coste A et coll., 2007**).

6.2.5. Induction de pompes à efflux

Le principal mécanisme de résistance décrit chez les azolés est l'augmentation du nombre de pompes d'efflux via des mutations « gain de fonction » au sein des gènes des facteurs de transcription régulant leur expression. Cela réduit la concentration de l'azolé au niveau intracellulaire et de l'enzyme cible (**Prasad, et coll., 2014**).

Ces pompes d'efflux sont naturelles chez *Candida* et appartiennent à deux grandes familles de protéines : la Major Facilitator Superfamily (MFS), codée par les gènes MDR (en particulier MDRI), et le groupe des transporteurs ABC (ATP binding cassette). Encodé par les gènes CDR (en particulier CDRI et CDR2) (**cowen et coll., 2014**).

6.3. Résistance aux fluoropyrimidines

Environ 10% des souches cliniques de *C. albicans* ont une résistance primaire envers la 5-Flucytosine même si elles ne sont pas préalablement exposées aux antifongiques (**Scorzoni et Coll., 2017**). En raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC, de nombreux

événements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique. Ces mécanismes de résistance peuvent être regroupés en deux catégories (**Guillot et Dannaoui., 2016**).

Le premier est la diminution de la pénétration intracellulaire de la molécule liée à des mutations dans FCY2, qui code pour la cytosine perméase (**Spampinato et coll., 2013**).

Le deuxième mécanisme est une altération du métabolisme de la molécule ou de son métabolite actif (5-FU) liée à des mutations dans FCY 1 (Codant la cytosine deaminase et responsable de la conversion en 5-FU) ou FUR1 (responsable de la conversion du 5-FU en 5-fluorouridine monophosphate). Ce type de mutations est notamment décrit chez *C. albicans* et *C. lusitaniae* (**Florent, M et coll., 2009**).

L'une des cibles de cette molécule est la thymidylate synthétase. L'augmentation de l'expression du gène codant pour cette enzyme peut compléter l'effet antifongique. Enfin, une résistance intrinsèque au 5-FC est également présente dans certaines sous-populations de *C. krusei* et *C. albicans* (**Polak, 1977**).

6.4.Mécanismes de résistance aux échinocandines

Le principal mécanisme de résistance de *Candida spp.* Aux échinocandines est l'altération de l'enzyme cible : la β -1,3-glucane synthase

Diverses mutations de FKS1 associées à la résistance aux échinocandines ont été décrites chez *C. albicans*. Elles se répartissent au sein de deux régions hot spot définies par les séquences d'acides aminés de la protéine : HS1 (acides aminés 641-649) et HS2 (acides aminés 1345-1365) (**Walker LA et coll., 2013**). Il s'agit de mutations dominantes, homos- ou hétérozygotes, conférant une résistance à l'ensemble des échinocandines (**Walker LA et Gow NAR., 2010**). Les substitutions des sérines en position 641 et 645 sont les modifications les plus fréquentes, et entraînent le phénotype de résistance le plus sévère (**Sanglard D et coll., 2009 ; Perlin DS., 2015**).

6.5.Mécanismes de résistance aux allylamines

La résistance aux allylamines tel que la terbinafine est faiblement observée et est associée habituellement à des mutations ponctuelles au niveau du gène codant l'enzyme squalène epoxidase provoquant ainsi des substitutions d'acides aminés particuliers dans cet enzyme, ceci est également important dans les étapes de biosynthèse d'ergostérol (**Łagowski et coll., 2020**).

Cette résistance est associée aux gènes qui codent pour les transporteurs membranaires de type CAR1, AGP2 et HOL3 chez *C. albicans*. Lorsque ces gènes sont régulés positivement ceci aboutit à l'élimination d'antifongique localisé au niveau intracellulaire. Il semblerait que la résistance aux allylamines est semblable à celle rencontrée dans la résistance aux azolés par les pompes d'efflux (**Bondaryk et coll., 2013**).

7. L'ergostérol chez *Candida albicans*

L'ergostérol est un composant essentiel des membranes cellulaires fongiques qui détermine la fluidité, la perméabilité et l'activité des protéines associées à la membrane (**Dupont S et coll., 2012**). La voie de biosynthèse de l'ergostérol est une voie hautement conservée et complexe et très consommatrice d'énergie qui implique la participation de nombreuses enzymes (**Hu Z et coll., 2017**). Chez la levure, la biosynthèse d'une molécule d'ergostérol nécessite la consommation d'au moins 24 molécules d'ATP et 16 molécules de NADPH.

Zavrel et al en 2013 ont constaté que *C. albicans* n'absorbe les stérols que dans des conditions aérobies pendant la phase de croissance post-exponentielle, en conséquence, la voie de biosynthèse des stéroïdes joue un rôle important dans la gestion du stress environnemental externe (**Bard Met et coll., 2005 ; Zavrel M et coll., 2013**).

Cette voie et les gènes ERG codent pour les enzymes sont présentés dans la figure 11, qui identifie les principaux intermédiaires et les voies de biosynthèse alternatives contournant Cytochrome P450 lanostérol 14 alpha-déméthylase (ERG11) ou C-5 stérol désaturase (ERG3) (**Martel CM., 2010 ; Theesfeld CL et Hampton RY., 2013**). Cette voie comprend deux enzymes limitant la vitesse. L'une est la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui est nécessaire à la régulation de la synthèse du cholestérol chez les mammifères, et l'autre est la lanostérol 14 α -déméthylase, qui est essentielle à la synthèse de l'ergostérol chez les champignons (**Pasrija R et coll., 2005 ; Jia N et coll., 2002**).

La voie de biosynthèse de l'ergostérol dans *C.albicans* est illustrée sur la Fig. 11

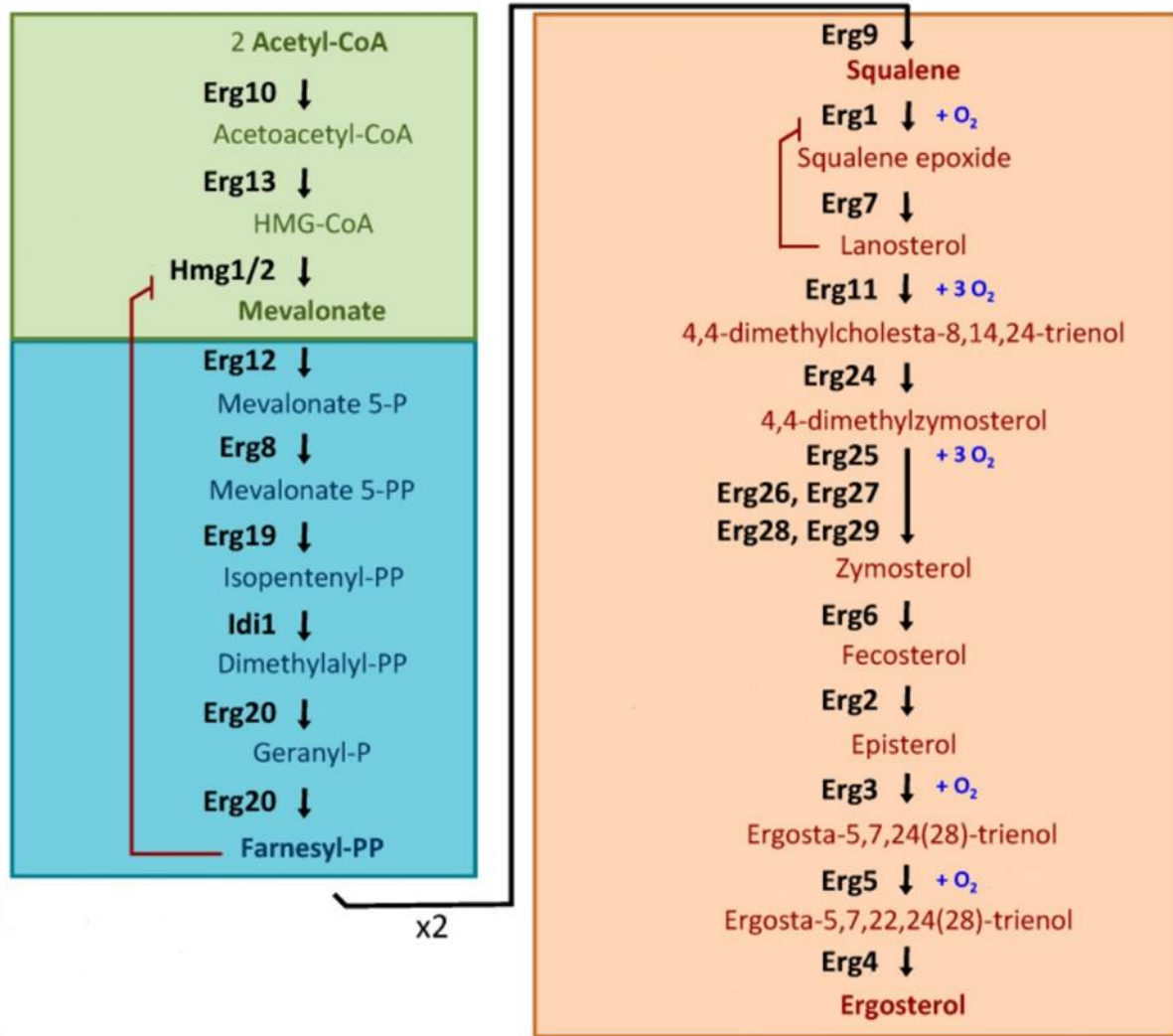


Figure 11: Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *Candida albicans* (Hu Z et coll., 2017).

Sur la base des propriétés des intermédiaires, la voie de biosynthèse peut être divisée en trois étapes : la biosynthèse du mévalonate, la biosynthèse du farnésyl pyrophosphate et la biosynthèse de l'ergostérol.

La première étape concerne la biosynthèse de l'ergostérol commence par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former l'acétoacétyl-CoA. Cette étape est catalysée par l'acétoacétyl-CoA thiolase (ERG10) et se déroule dans la vacuole. La condensation du troisième acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA est catalysée par l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (ERG13) pour produire du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA est ensuite réduite en mévalonate par les HMG-CoA réductases Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase et hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG1 et HMG2) et les deux réactions se produisent dans les mitochondries (Miziorko HM., 2011 ; Klug L et Daum

G., 2014). Le premier module est conservé chez tous les eucaryotes (**Hayakawa H et coll., 2017).**

La deuxième étape concerne la biosynthèse du farnésyl PP à partir du mévalonate. Ce processus implique six réactions qui ont lieu dans la vacuole et sont séquentiellement catalysées par Mévalonate kinase (ERG12), Phosphomévalonate kinase (ERG8), Diphosphomévalonate décarboxylase (ERG19), Isopentenyl diphosphate isomérase (IDI1) et Polyprényl synthétase (ERG20) (**Klug L et Daum G., 2014).** Le farnésyl-PP est un métabolite intermédiaire très important dans les cellules, qui peut être utilisé pour la synthèse de diverses substances dans différentes voies métaboliques catalysées par différentes enzymes (**Hayakawa H et coll., 2017).** L'inhibition de la biosynthèse du farnésyl-PP empêche les cellules de synthétiser de nombreux métabolites clés, entraînant la mort cellulaire (**Lee SH et coll., 2010).**

La troisième étape contient 15 étapes du farnésyl PP à l'ergostérol, et ces réactions se produisent principalement dans le réticulum endoplasmique (RE) (**Hayakawa H et coll., 2017).** La première étape est la conversion du farnésyl PP en squalène, suivie de la cyclisation du squalène pour former du lanostérol, et après une série de réactions, le lanostérol est converti en ergostérol (**Klug L et Daum G., 2014).**

Comparé aux deux premières étapes, la troisième étape est plus complexe et nécessite plus d'enzymes. Selon que le gène de biosynthèse est nécessaire à la survie de la levure, les gènes de biosynthèse de l'ergostérol sont divisés en gènes essentiels et non essentiels (**Kristan K et Rizner TL., 2012).** Certains gènes impliqués dans les premiers stades de la biosynthèse de l'ergostérol, tels que Squalène synthétase (ERG9), Squalène époxydase (ERG1), lanostérol synthase (ERG7), lanostérol 14 alpha-déméthylase (ERG11), Stérol C-14 réductase (ERG24), C-4 méthyl stérol oxydase (ERG25), Stérol C-4 décarboxylases (ERG26) et 3-cétostéroïde réductase (ERG27) sont des gènes essentiels, tandis que d'autres sont considérés comme des gènes non essentiels. Parmi les gènes essentiels, ERG9 code pour la squalène synthase. Cette enzyme est la première molécule structurée en stérol et forme simultanément une molécule de squalène à partir de deux molécules de farnésyl PP, et également le précurseur direct de la biosynthèse de l'ergostérol. ERG1 et ERG7 codent respectivement pour la squalène époxydase et la lanostérol synthase, deux enzymes clés et uniquement essentielles dans la voie de synthèse de l'ergostérol (**Kristan K et Rizner TL., 2012).**

Au cours des étapes suivantes, le lanostérol est transformé en zymostérol par un processus complexe impliquant diverses réactions de déméthylation, de réduction et de désaturation catalysées par la lanostérol 14- α -déméthylase Erg11 (également connue sous le nom de Cyp51), la C-14 réductase (Erg24) et le C-4 complexe de déméthylation Erg25-Erg26-Erg27, Erg28 et Erg29 sont susceptibles de fonctionner dans la réaction du complexe de déméthylation C-4 (**Liu J.F et coll., 2019 ;Ward D.M et coll., 2018**). Le zymostérol est le premier intermédiaire de la voie de biosynthèse qui peut être incorporé dans les membranes cellulaires (**Zinser E., 1993**).

Ensuite, (Erg6) Codant pour le stérol C-24 métyltransferase convertit ensuite le zymostérol en fécostérol, suivi de la formation d'épistérol par Erg2, qui est finalement désaturé et réduit par (Erg3), C-22 stérol désaturase (Erg5) et C24(28) stérol réductase (Erg4) en ergostérol. L'ergostérol est synthétisé dans le RE, mais il est principalement transporté vers la membrane plasmique. Erg1 et Erg11 représentent deux étapes limitantes dans cette partie de la voie (**Zinser E., 1993**).

Bien que les gènes non essentiels ne soient pas indispensables à la survie de la levure, des études ont révélé que ces gènes, notamment C-8 stérol isomérase (ERG2), C-24 stérol méthyl transférase (ERG6) et ERG3-5, régulent également la biosynthèse de l'ergostérol ainsi que la croissance et le développement de la levure. Par exemple, la mutation d'ERG6, qui code pour une C-24 méthyl transférase catalysant la conversion du zymostérol en fécostérol, n'est pas létale, mais entraîne un phénotype de croissance et de développement sévèrement déficient, tandis que la surexpression d'ERG6 augmente la teneur en ergostérol (**Konecna A et Toth Hervay N., 2016**). Les dernières étapes de la biosynthèse de l'ergostérol sont catalysées par ERG3/ERG4/ERG5. Probablement parce que les intermédiaires biosynthétisés précédemment peuvent partiellement remplir les fonctions de l'ergostérol, les mutations de ces gènes n'affectent pas la survie des levures (**Mo C et Bard M., 2005**). Cependant, ils présentent quelques phénotypes intéressants. Par exemple, le mutant erg3 n'est pas létal, mais la souche ne peut pas se développer sur des milieux sans source de carbone fermentable, tandis que d'autres mutants erg3 sont sensibles aux basses températures mais insensibles aux inhibiteurs de la synthèse des stérols, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir une autre branche compensatoire qui peut synthétiser l'ergostérol (**Clay L et coll., 2014**). Si les mutations de gènes non essentiels n'affectent pas la survie de la levure, elles modifient la composition de la membrane cellulaire, ce qui affecte également le potentiel membranaire, la tolérance au sel et la résistance aux médicaments (**Kodedova M et Sychrova H., 2015**).

Matériel et méthodes

1. Matériel

La manipulation du Docking nécessite l'utilisation d'un ordinateur et des logiciels

1.1. Micro-ordinateur

Dans notre étude, nous avons utilisé deux micro-ordinateurs l'un avec une mémoire de 4 Go, un processeur Intel® Core™ i3-1115G4 jusqu'à 4.1 GHz et un système d'exploitation Windows 7 version 2010 et l'autre i5 septième génération système Linux

1.2. Les logiciels

1.2.1. UCSF Chimera

UCSF Chimera version 1.14.1 est un programme pour réaliser l'amarrage moléculaire, développé par le Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics (RBVI) de l'Université de Californie à San Francisco. Il permet de visualiser et d'analyser les cartes de densité, la microscopie 3D, les structures moléculaires et les données associées aux molécules étudiées (**Huang et coll., 2014**).

UCSF Chimera est disponible gratuitement pour une utilisation non commerciale sur :

<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>

1.2.2. AutoDock Vina

AutoDock Vina version 1.12 est un logiciel open-source le plus largement utilisé par la simulation d'amarrage moléculaire, il a été conçu par le *Dr Oleg Trott* de l'Institut de Recherche Scripps aux États-Unis (laboratoire de graphisme moléculaire) (**Trott et coll., 2010**). AutoDock Vina accessible librement sur : <http://vina.scripps.edu>

1.2.3. Dock Prep

Dock Prep est un outil disponible dans Chimera qui sert à préparer les structures des molécules étudiées avant l'amarrage (**Qawoogha & Shahiwala., 2020**).

1.2.4. PyRx

PyRx est un logiciel de criblage virtuel pour la découverte computationnelle de médicaments qui peut être utilisé pour cribler des bibliothèques de composés contre des cibles potentielles de médicaments en calculant leur énergie d'interaction grâce au sous-programme Vina. Il n'accepte que les molécules sous format pdbqt dont les résultats soient enregistrés sous le format Sdf (**Dallakyan et Olson, 2014**).

PyRx est disponible gratuitement pour une utilisation non commerciale sur : <http://pyrx.sourceforge.net/downloads>

1.2.5. Discovery Studio

Discovery Studio Visualiser (DSV) est l'un des meilleurs logiciels de modélisation et de simulation. Ses outils permettent la visualisation des structures et des séquences biomoléculaires, de construction, ainsi que d'alignement multiple de séquences et superposition de structures spatiales. Il est facile à utiliser même s'il contient différentes applications logicielles sophistiquées (De luca et al., 2020).

Discovery Studio Visualiser (DSV) est disponible gratuitement pour une utilisation non commercial sur : <http://discover.3ds.com/discovery-studio>

Dans notre cas, nous l'utiliserons pour déterminer les interactions entre le ligand et le récepteur.

1.2.6. SwissADME :

À l'aide de ce site Web, il est possible calculer non seulement des descripteurs physicochimiques, mais également des paramètres ADME, des propriétés pharmacocinétiques, des propriétés de type médicament, la compatibilité chimique médicinale d'une ou plusieurs petites molécules pour aider au développement de médicaments, l'accès au site via : (<http://www.swissadme.ch/>) (Antoine et Vincent, 2019).

1.3. Banques de données

1.3.1. La banque de données protéiques (PDB) :

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. Les structuralistes du monde entier sont tenus d'y déposer leurs données expérimentales, de cette façon elles appartiennent au domaine public. On peut la consulter via le lien : (www.rcsb.org/pdb) (Burley et al., 2019).

1.3.2. Pubchem

Pubchem est la plus grande collection au monde d'informations chimiques librement accessibles. Cette chimiothèque permet de rechercher des produits chimiques par nom, formule moléculaire, structure ou par d'autres identifiants, elle permet aussi de trouver des propriétés chimiques et physiques, des informations sur la sécurité et la toxicité, des brevets, des citations de la littérature et plus encore (Capecch et al., 2019). On peut la consulter via le lien : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

2. Méthodes :

2.1. Préparation d'enzyme :

Le téléchargement d'enzyme a été fait à partir de la base de données Protein Data Bank

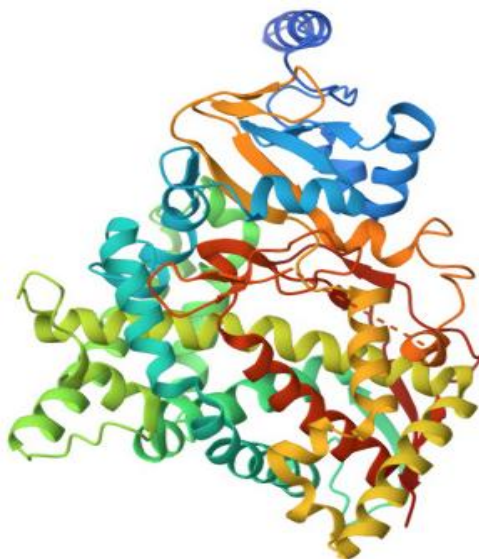


Figure 12: la Lanosterol-14 Alpha déméthylase

La structure tridimensionnelle de la protéine Lanosterol 14-Alpha déméthylase est identifiée par le code 5V5Z a été obtenue par diffraction aux rayons X à haute résolution (2.90Å°).

Tableau 1: Les données PDB de la Lanosterol 14-Alpha déméthylase.

ID PDB	Le poids total (KDa)	Résolution (Å°)	Méthode
5V5Z	63.17	2.90	Diffraction des Rayon X

Après le téléchargement, on observe que la protéine possède uniquement une chaîne A monomérique. Cette dernière doit être modifiée par l'élimination des molécules d'eau et le ligand pour obtenir une structure (5V5Z) simplifiée.

Les étapes de la préparation de la protéine cible :

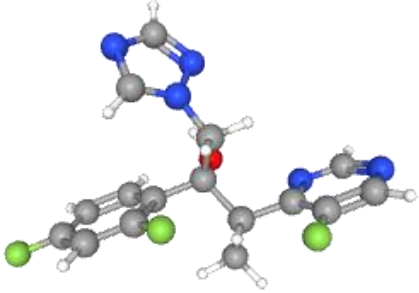
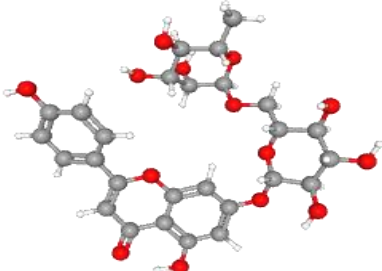
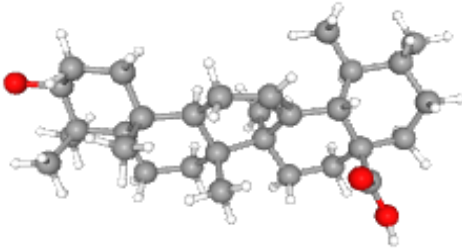
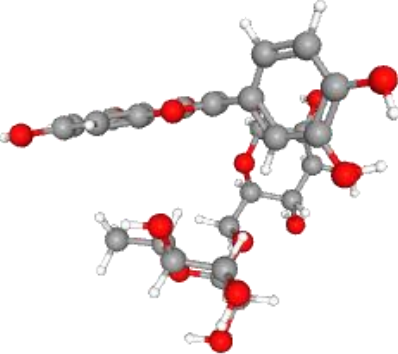
- Tout d'abord, il faut mettre en évidence le site actif pour éliminer l'inhibiteur, puis éliminer les molécules d'eau.
- Ajouter les atomes d'hydrogènes, attribuer des charges partielles à la protéine

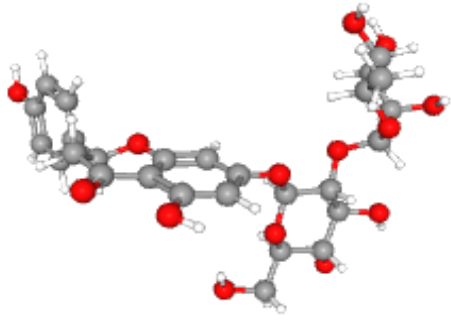
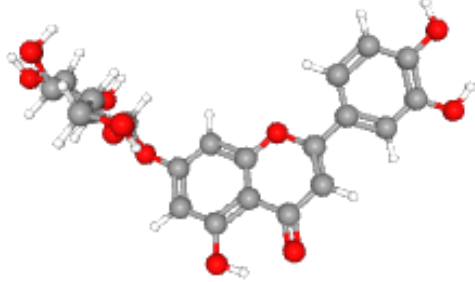
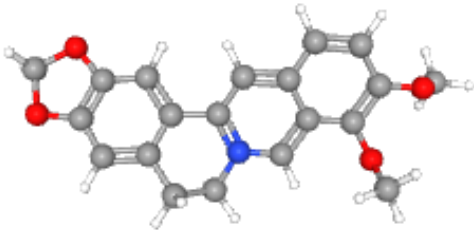
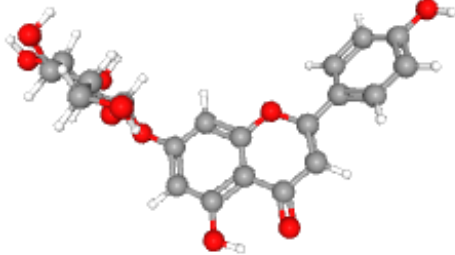
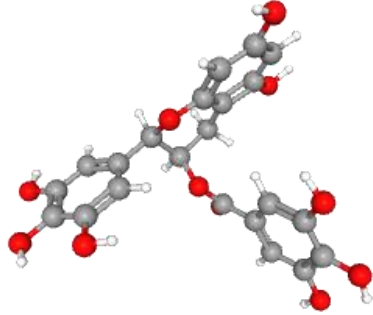
- Enregistrer le fichier sous forme PDB.

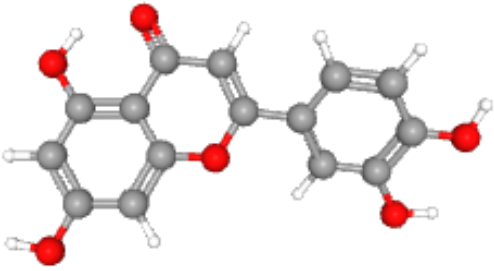
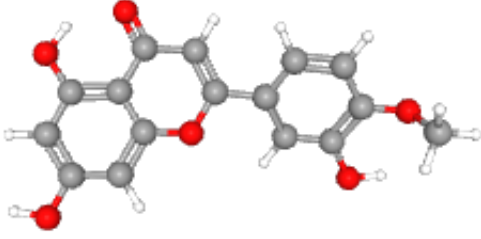
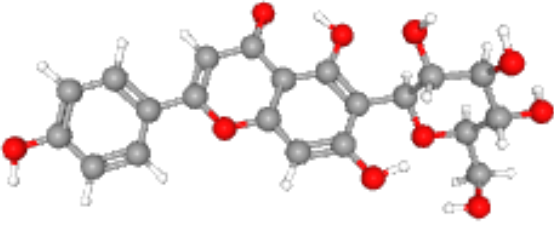
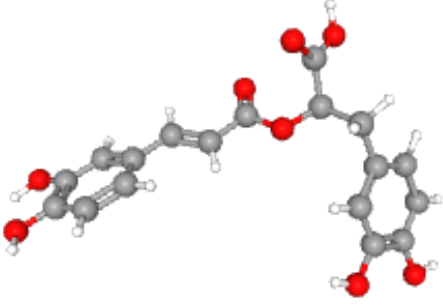
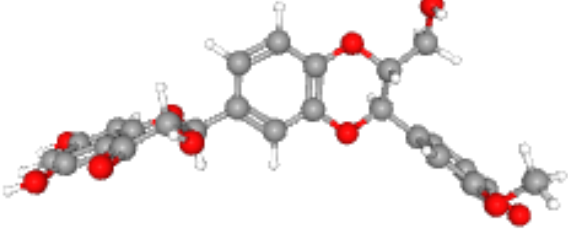
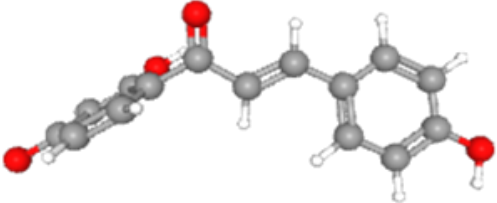
2.2. Préparations des inhibiteurs

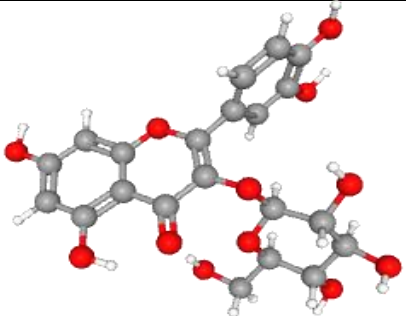
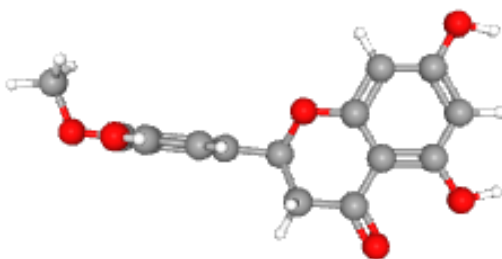
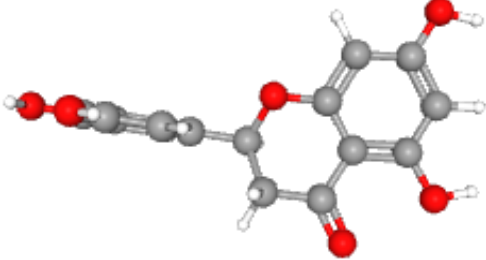
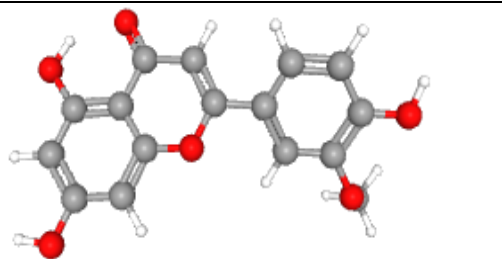
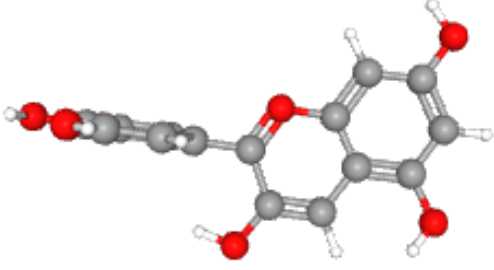
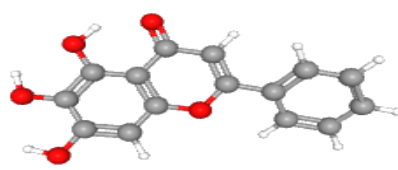
Nous avons sélectionné des molécules phytochimiques pour effectuer un screening moléculaire qui ont une activité pharmacologique. Notre ligand de référence est le voriconazole. La source de tous les inhibiteurs utilisés dans ce travail est de la base de données PubChem (Tableau 2)

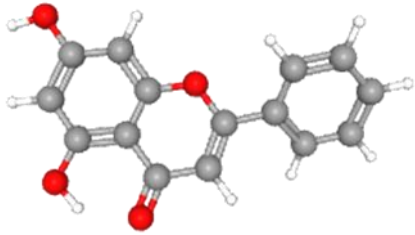
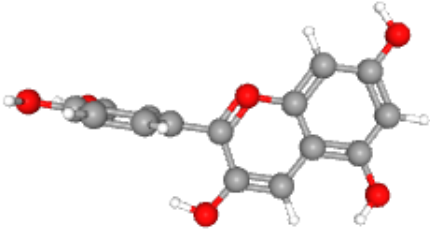
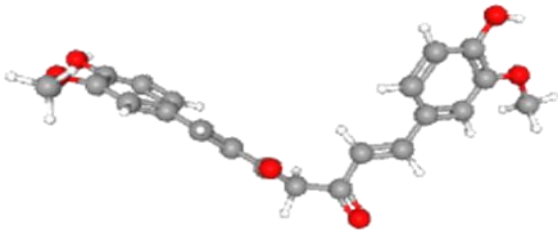
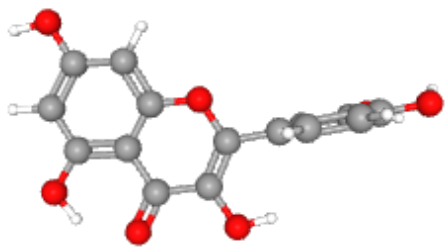
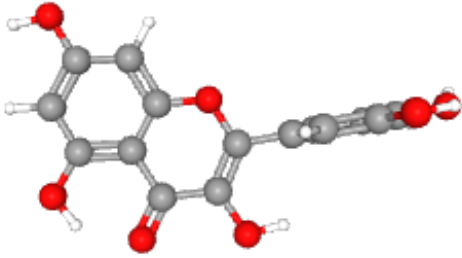
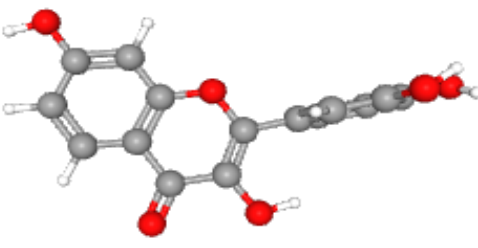
Tableau 2 : les analogues et leurs structures chimiques

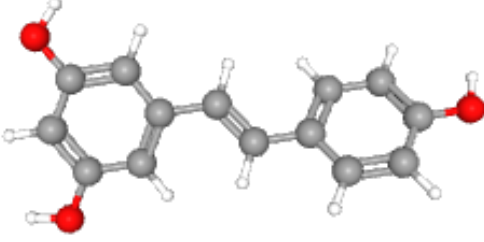
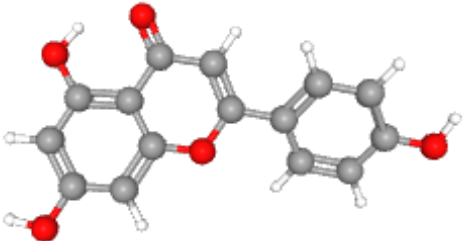
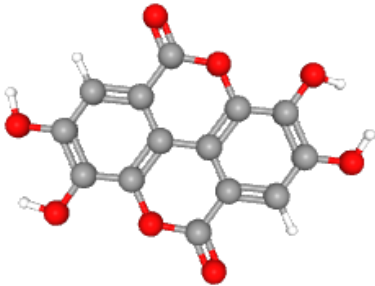
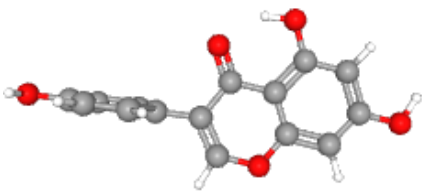
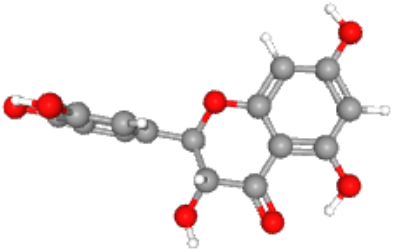
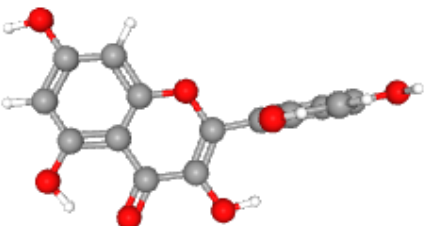
Les Analogues Structuraux	La structure en 3D
Voriconazole CID : 71616	 A 3D ball-and-stick model of Voriconazole. The structure features a central pyridine ring connected to a side chain that includes a methylene group, a carbonyl group, and a 1,2,4-triazole ring. Two chlorine atoms are attached to the side chain. The atoms are color-coded: carbon (grey), oxygen (red), nitrogen (blue), and chlorine (green).
Apigénine-7-O- rutinoside CID : 9851181	 A 3D ball-and-stick model of Apigénine-7-O-rutinoside. It shows a flavone core (apigenin) with a rutinoside sugar moiety attached at the 7-position. The structure is highly complex with many hydroxyl groups. Atoms are color-coded: carbon (grey), oxygen (red), and hydrogen (white).
Acide ursolique CID : 64945	 A 3D ball-and-stick model of Acide ursolique. It is a pentacyclic triterpene with a complex ring system and several hydroxyl groups. Atoms are color-coded: carbon (grey), oxygen (red), and hydrogen (white).
Rutine CID : 5280805	 A 3D ball-and-stick model of Rutine. It consists of a flavone core (quercetin) with a rutinoside sugar moiety attached at the 3-position. The structure is highly complex with many hydroxyl groups. Atoms are color-coded: carbon (grey), oxygen (red), and hydrogen (white).

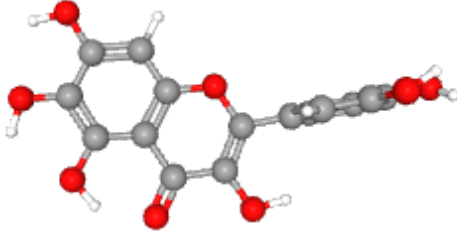
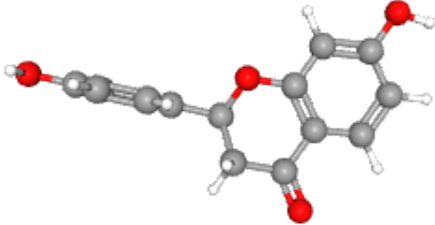
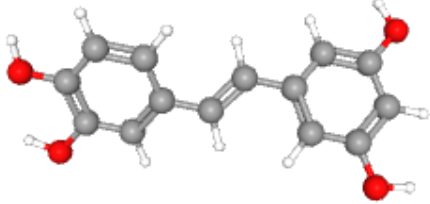
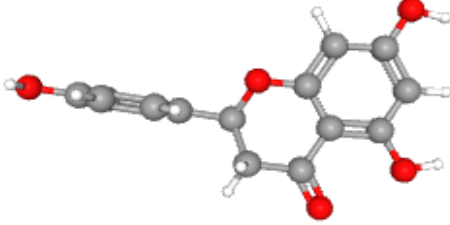
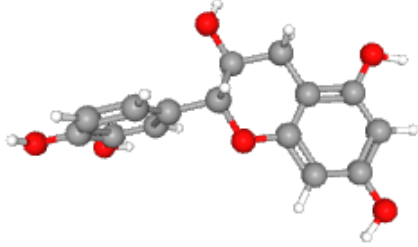
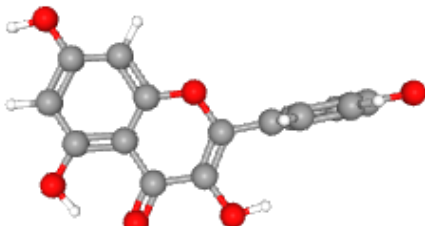
<p>Naringine CID : 442428</p>	
<p>Cynaroside CID : 5280637</p>	
<p>Berbérine CID : 2353</p>	
<p>Apigénine CID : 5280704</p>	
<p>Épigallocatechin Gallate CID : 65064</p>	

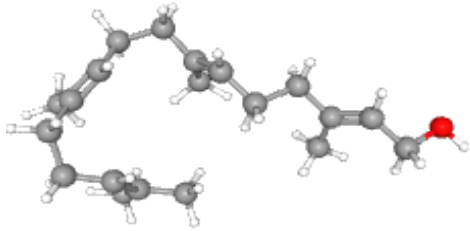
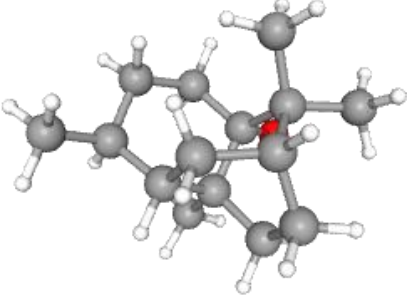
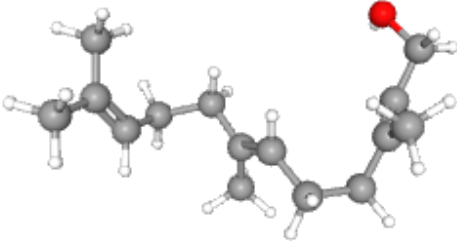
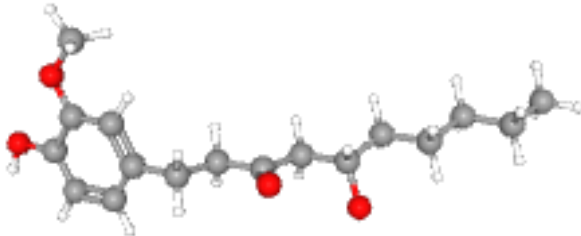
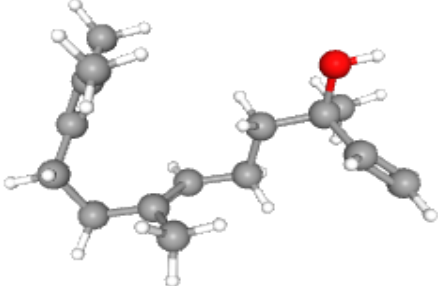
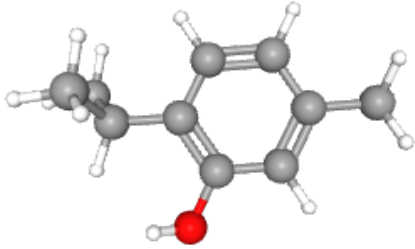
<p>Lutéoline CID : 5280445</p>	
<p>Diosmétine CID : 5281612</p>	
<p>Isovetexine CID : 162350</p>	
<p>L'acide rosmarinique CID : 5281792</p>	
<p>Silymarine CID : 5213</p>	
<p>Isoliquiritigénine CID : 638278</p>	

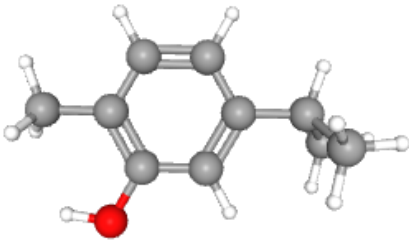
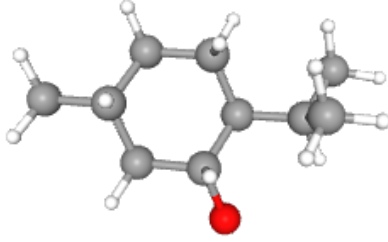
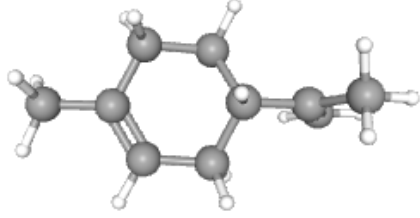
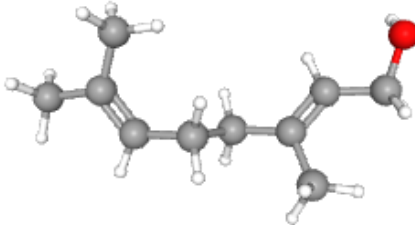
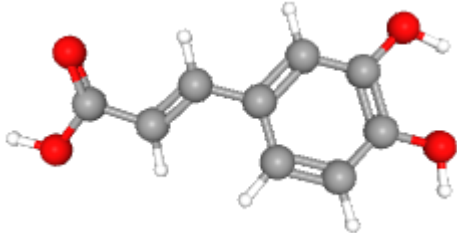
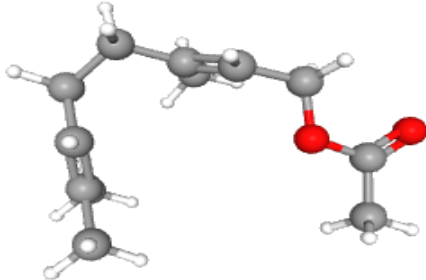
<p>Isoquercétine CID : 5280804</p>	
<p>Hespéritine CID : 72281</p>	
<p>ériodictyol CID : 440735</p>	
<p>Chrysoériol CID : 5280666</p>	
<p>Delphinidin CID : 128853</p>	
<p>Baicaléine CID : 5281605</p>	

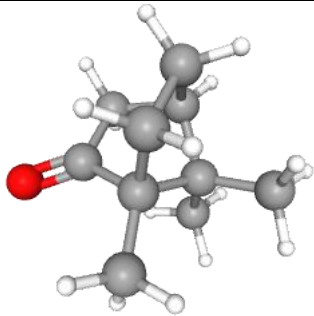
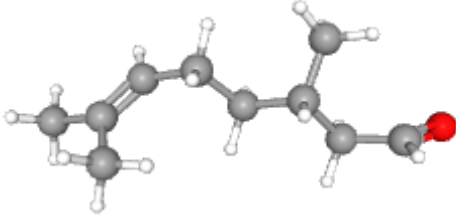
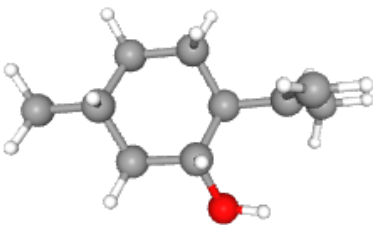
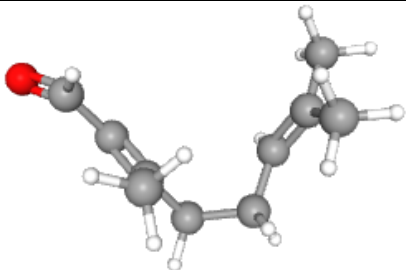
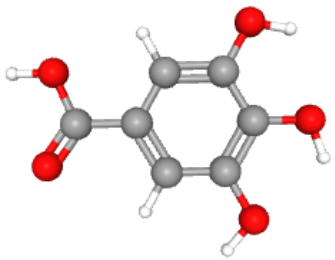
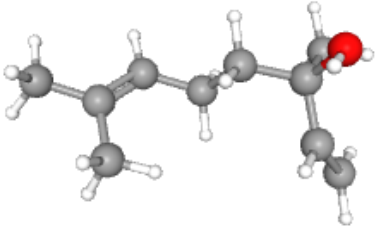
Chrysine CID : 5281607	
Cyanidine CID : 128861	
Curcumine CID : 969516	
Quercétine CID : 5280343	
Myricétine CID : 5281672	
Fisetin CID : 5281614	

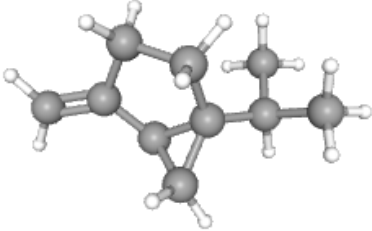
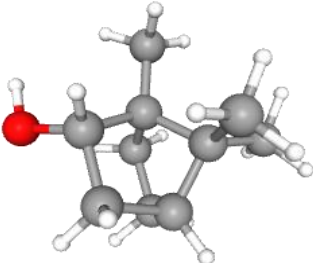
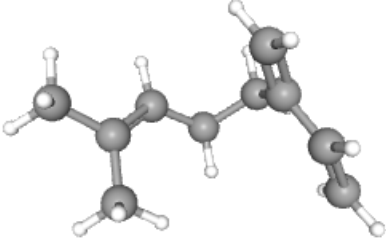
<p>Resvératrol CID : 445154</p>	
<p>Apigénine CID : 5280443</p>	
<p>Acide ellgaic CID : 5281855</p>	
<p>Génistéine CID : 5280961</p>	
<p>Taxifoline CID : 439533</p>	
<p>Morine CID : 5281670</p>	

Quercétagine CID : 5281680	
Liquiritigénine CID : 114829	
Piceatannol CID : 667639	
Naringénine CID : 932	
Cianidanol CID : 9064	
Kaempférol CID : 5280863	

<p>Géranylgeraniol CID : 5281365</p>	
<p>alcool de Patchouli CID : 10955174</p>	
<p>trans,trans- Farnésol CID : 445070</p>	
<p>Gingérol CID : 442793</p>	
<p>Nérolidol CID : 5284507</p>	
<p>Thymol CID : 6989</p>	

<p>Carvacrol CID : 10364</p>	 <p>A ball-and-stick model of Carvacrol, showing a benzene ring with a methoxy group (-OCH3) at the 3-position and an isopropenyl group (-CH=CH-CH3) at the 4-position. Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atom is red.</p>
<p>Menthol CID : 1254</p>	 <p>A ball-and-stick model of Menthol, showing a cyclohexane ring with a hydroxyl group (-OH) at the 1-position, an isopropyl group (-CH2-CH(CH3)2) at the 2-position, and an isopropenyl group (-CH=CH-CH3) at the 5-position. Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atom is red.</p>
<p>Limonène CID : 22311</p>	 <p>A ball-and-stick model of Limonene, showing a cyclohexane ring with two isopropenyl groups (-CH=CH-CH3) at the 1 and 4 positions. Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atoms are red.</p>
<p>Géranol CID : 637566</p>	 <p>A ball-and-stick model of Géranol, showing a long-chain molecule with a terminal hydroxyl group (-OH) and a terminal isopropenyl group (-CH=CH-CH3). Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atom is red.</p>
<p>Acide Caféique CID : 689043</p>	 <p>A ball-and-stick model of Acide Caféique, showing a benzene ring with two carboxylic acid groups (-COOH) at the 1 and 4 positions. Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atoms are red.</p>
<p>acétate de Géranyle CID : 1549026</p>	 <p>A ball-and-stick model of acétate de Géranyle, showing a long-chain molecule with a terminal isopropenyl group (-CH=CH-CH3) and a terminal acetate group (-COOCH3). Carbon atoms are grey, hydrogen atoms are white, and the oxygen atoms are red.</p>

Camphore CID : 2537	
Citronellal CID : 7794	
Isopulégol CID : 170833	
Citral CID : 638011	
Acide Gallique CID : 370	
Linalol CID : 6549	

Sabinène CID : 18818	
Bornéol CID : 64685	
Myrcène CID : 31253	

Les structures tridimensionnelles des inhibiteurs ont été téléchargées à partir de PubChem au format SDF.

2.3. Le docking moléculaire

Afin d'identifier les inhibiteurs des protéines cibles, un criblage virtuel a été effectué à l'aide de PyRx. Les protéines et les molécules de ligand ont été importées dans PyRx et un amarrage virtuel a été effectué, en association avec l'interface AutoDock Vina.

On a commencés par insérer les protéines cibles sur AutoDock, puis les fichiers des ligands sur Open Babel et sélectionner le site actif dans le box qui représente l'espace de la recherche, il faut vérifier le centre et les dimensions sur Vina Search Space.

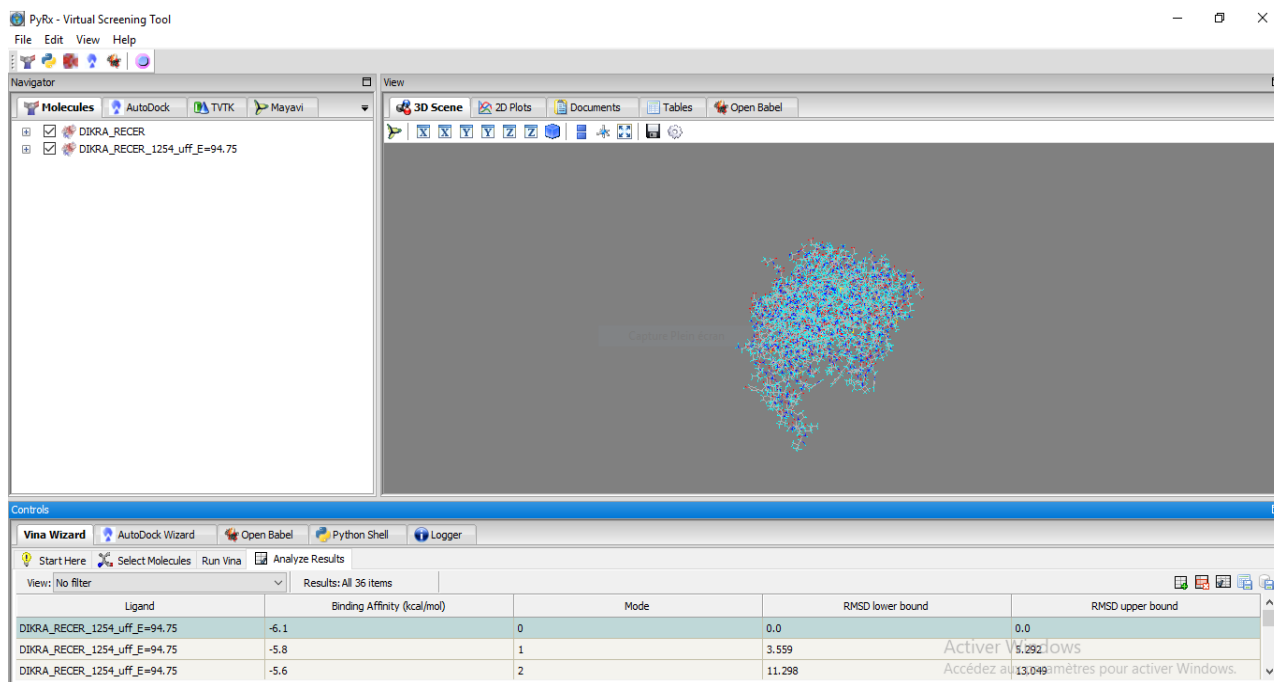


Figure 13 : Interface PyRx

Le Docking moléculaire se poursuit sur Chimera nous avons d'abord commence par la préparation de récepteur sur Dockprep puis préparer les ligands sur Autodock Vina et lancer le docking et enfin enregistrer les résultats obtenus dans un fichier piton puis enregistrer une deuxième fois sous format PDBQT pour la visualisation tridimensionnelle des interactions moléculaires entre la protéine cible et les ligands via le logiciel « Discovery studio Visualiser »

Tableau 3: Taille et position du centre de la grille

Centre	-41.0715	-15.0273	23.4093
Taille	28.621	29.9168	20.0582

2.4. La visualisation tridimensionnelle sur Discovery studio Visualiser

- Sélectionner le fichier PDBQT qui nous avons obtenues via Chimera puis afficher les interactions en ligand interaction 2D

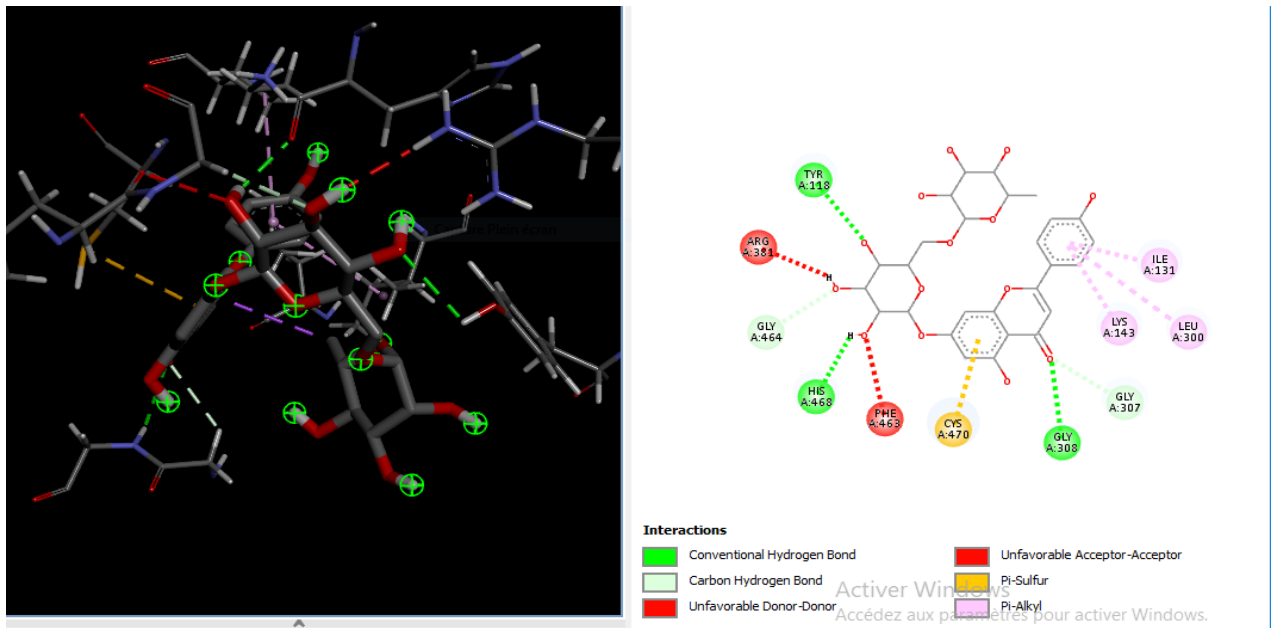


Figure 14: interaction récepteur-ligand

Finalement, nous avons opté pour l'utilisation du serveur swissADME pour faciliter la découverte des médicaments :

- Accéder à swissADME.
- Importation de la molécule : les molécules peuvent être directement collées ou tapées au format SMILES
- Lorsque la liste de molécule est prête à être soumise, cliquer sur le bouton "Run".
- Une fois l'analyse terminée, les résultats seront affichés sur une nouvelle page.

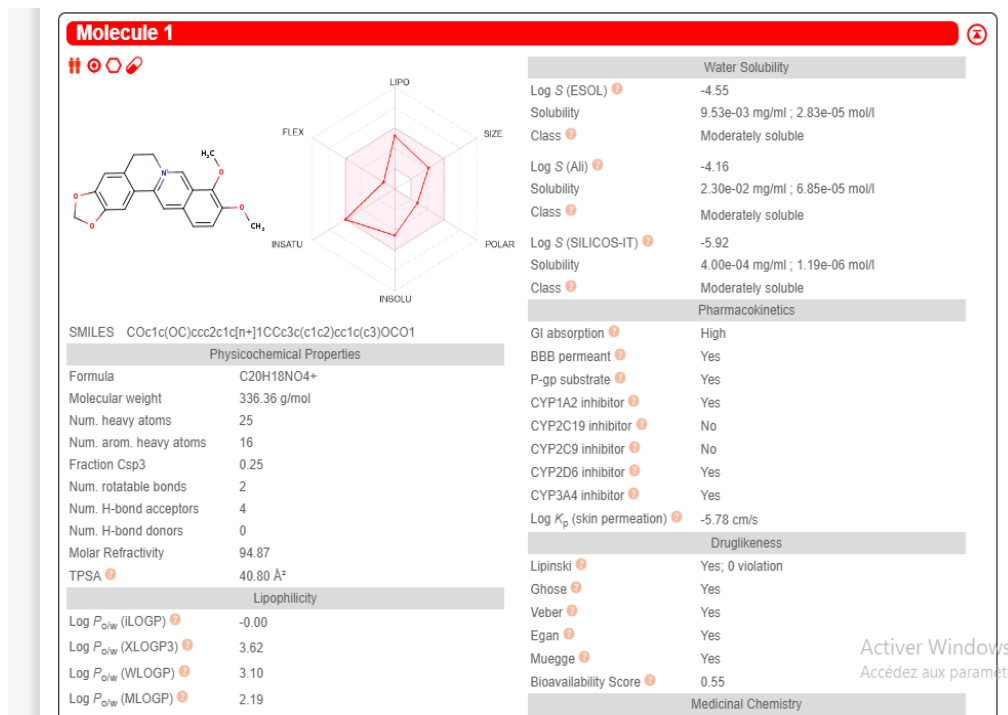


Figure 15: Les valeurs des paramètres calculés.

Résultats et discussion

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à effectuer un screening moléculaires entre la protéine lanosterol 14-alpha déméthylase, ainsi que des inhibiteurs d'origine phytochimique via le Docking moléculaire. Nous avons évalué 60 molécules à l'aide de PyRx, puis Chimera UCSF pour mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de ces molécules. Ensuite, une analyse visuelle de ces composés naturels est réalisée à l'aide de Discovery. Enfin, nous avons étudié la propriété ADME pour déterminer les meilleurs inhibiteurs.

1. Résultat de Docking moléculaire

Le résultat du screening moléculaire en PyRx sont regroupés sur le tableau 4 pour la Lanosterol 14-alpha déméthylase

Tableau 4: les résultats de screening moléculaires à l'aide de PyRx

Nom	ΔG° (Kcal/mol)	L'origine naturelle	Nom	ΔG° (Kcal/mol)
Voriconazole	-7.8			
Apigénine-7-O-rutinoside	-10.0	Flavonoïde	Baicalein	-8.2
Rutine	-9.8		Chrysine	-8.1
Naringine	-9.3		Cyanidine	-8.1
Cynaroside	-9.1		Quercétine	-8.0
Apigénine	-9.0		Myricétin	-8.0
Épigallocatechin Gallate	-8.9		Fisetin	-8.0
Lutéoline	-8.6		Apigénine	-7.9
Diosmétine	-8.6		Génistéine	-7.8
Isovetexine	-8.6		Taxifoline	-7.8
Silymarine	-8.5		Morine	-7.8
Isoliquiritigénine	-8.5		Quercétagetine	-7.8
Isoquercétine	-8.5		Liquiritigénine	-7.8
Hespéretine	-8.3		Naringénine	-7.6
ériodictyol	-8.3		Cianidanol	-7.5
Chrysoériol	-8.2		Kaempférol	-7.4
Delphinidol	8.2			

Acide rosmarinique	-8.5		Picéatannol	-7.7	
Curcumine	-8.0		Thymol	-6.3	
Acide ellagique	-8.0		Carvacrol	-6.3	
Reversétol	-7.9		Acide Caféique	-6.2	
Acide ellagique	-7.9		Acide gallique	-5.9	
Acide ursolique	-10.0	Terpènes	limonène	-6.1	
Géranylgeraniol	-7.4		Acétate de géranyle	-6.1	
Alcool de Patchouli	-7.1		Camphore	-6.0	
trans,trans-Farnésol	-7.0		Citronellal	-6.0	
Gingérol	-7.0		Isopulégol	-6.0	
Nérolidol	-6.8		Citral	-6.0	
Géranol	-6.1		Linalool	-5.7	
Limonène	-6.1		Sabinéne	-5.7	
Menthol	-6.1		Bornéol	-5.6	
			Myrcène	-5.5	
Berbérine	-9.0		Alcaloïde		

Lorsque le ΔG diminue, l'affinité avec l'enzyme augmente car cela indique une plus grande stabilité et une réduction de l'énergie nécessaire pour former le complexe enzyme-substrat (Nelson., 2017). Cette relation entre l'énergie libre du substrat est essentielle pour comprendre la catalyse enzymatique et l'efficacité des relations biochimiques (Berg., 2015).

D'après les valeurs de ΔG° obtenues (tableau 4), l'acide ursolique et Apigénine-7-O-rutinoside présentent une meilleure affinité avec la Lanosterol 14-alpha déméthylase, suivis par la naringine et rutine qui ont la même valeur de ΔG° (-9.8) et expriment une interaction similaire avec la protéine cible. En revanche, la sabinéne, le bornéol et myrcène montrent les affinités les plus élevées avec des valeurs de -5.7, -5.6 et -5.5 respectivement. Plusieurs inhibiteurs ont obtenu la même valeur, ce qui indique qu'ils présentent une interaction similaire avec la protéine cible.

Parmi les 60 molécules testées, nous avons sélectionné onze composés de la lanosterol 14-alpha déméthylase ayant le ΔG le plus faible. Ensuite, nous avons analysé l'interaction moléculaire entre la lanosterol 14-alpha déméthylase et les molécules sélectionnées afin d'indiquer la meilleure confirmation générée par AutoDock Vina. Plus l'énergie de liaison est réduite, plus la force de liaison est élevée, ce qui induit une inhibition accrue.

Tableau 5: screening moléculaire des onze molécules de meilleure affinité avec lanosterol 14-alpha déméthylase (chimera)

Nom	ΔG° (Kcal/mol)
Vorivonazole	-7.3
Acide ursolique	-10.1
Apigénine 7-O-rutinoside	-10
Naringine	-9.8
Rutine	-9.8
cynaroside	-9.2
Apigénine	-9.1
Isovetexine	-9.0
Dioméistine	-8.7
Berbérine	-8.7
Lutéoline	-8.6
épigallocatecin gallate	-8.5

Nous avons remarqué que les ΔG obtenus sont similaires à ceux obtenus avec PyRx

2. Les interactions moléculaires :

Les résultats des interactions obtenus par l'outil DSV lors des expériences docking sont présentés ci-dessous.

Voriconazole est notre ligand de référence, il présente un score de liaison -7.3 Kcal/mol à travers 4 résidus d'acides aminés (figure 16) :

- 3 liaisons Pi-alkyle entre voriconazole et acide amine isoleucine en position 304,131 et lysine en position 143 du récepteur Lanosterol 14-alpha déméthylase

- une liaison halogène entre voriconazole et acide aminé glycine en position 303 du récepteur Lanosterol 14-alpha déméthylase

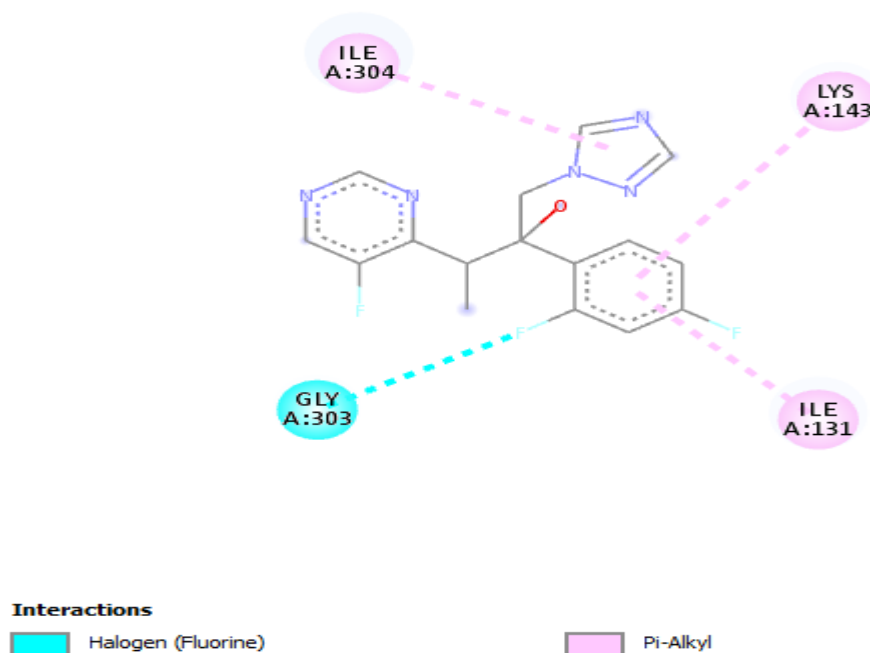


Figure 16: Interaction de voriconazole avec Lanosterol 14-alpha déméthylase

Le composé présente la valeur de score d'interaction la plus élevée de -10.1 Kcal/mol, cela indique que ce composé est bien placé dans le site actif de la Lanosterol 14-alpha déméthylase à travers 11 résidus d'acides aminés (figure 17) :

- 12 liaisons Alkyle entre acide ursolique et acide aminé isoleucine en position 471, 304,131 et leucine en position 300, 121 et phénylalanine en position 126,233 et tyrosine en position 132,118 et méthionine en position 508 du Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison Pi-sigma entre acide ursolique et acide aminé tyrosine en position 118 du Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 3 Liaisons Pi-alkyle entre acide ursolique et acide aminé isoleucine en position 131 méthionine en position 508 et leucine en position 376 et phénylalanine en position 233 du Lanosterol 14-alpha déméthylase

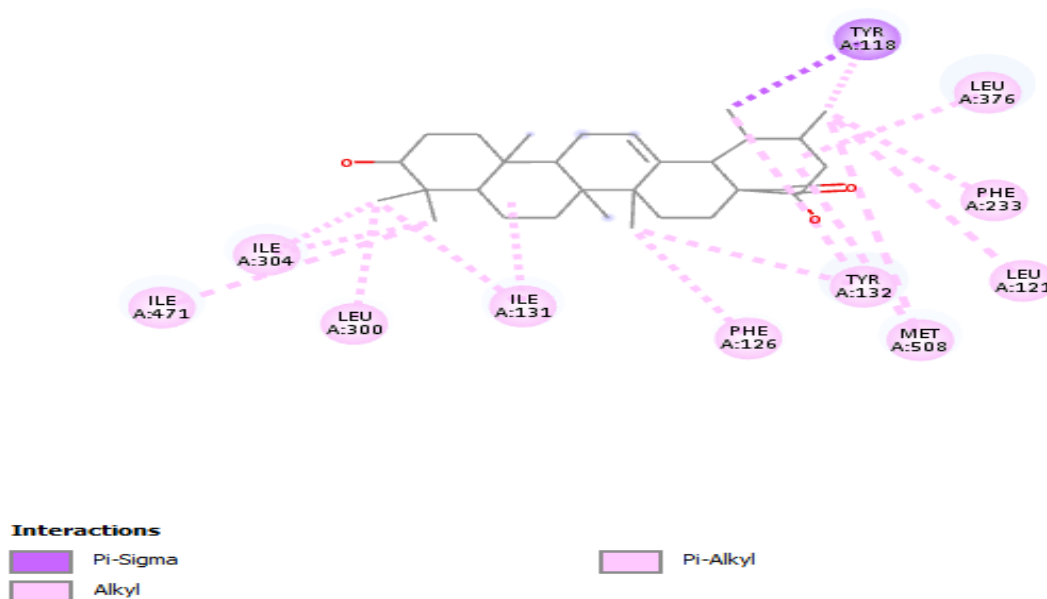


Figure 17: Interaction de Acide ursolique avec Lanosterol 14-alpha déméthylase

Le Apigénine-7-O-rutinoside possède la deuxième score d'interaction le plus élevé de -10 Kcal/mol, cela indique que ce composé est bien placé dans le site actif de la Lanosterol 14-alpha déméthylase à travers 8 résidus d'acides aminés (figure 18) :

- 3 liaisons Pi-alkyle entre le ligand Apigénine-7-O-rutinoside avec acide amine lysine en position 143 et acide amine leucine en position 300 et acide amine isoleucine en position 131 du Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 2 liaisons hydrogène conventionnelle entre ligand Apigénine-7-O-rutinoside et acide amine glycine en position 308 et acide amine tyrosine en position 132 du Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 2 liaisons alkyle entre ligand Apigénine-7-O-rutinoside et acide amine tyrosine en position 132 et isoleucine en position 131 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 2 liaisons carbone hydrogène entre ligand Apigénine-7-O-rutinoside et acide amine glycine en position 307 et acide amine arginine en position 469 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase

- une liaison Pi-sulfur entre ligand Apigénine-7-O-rutinoside et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase

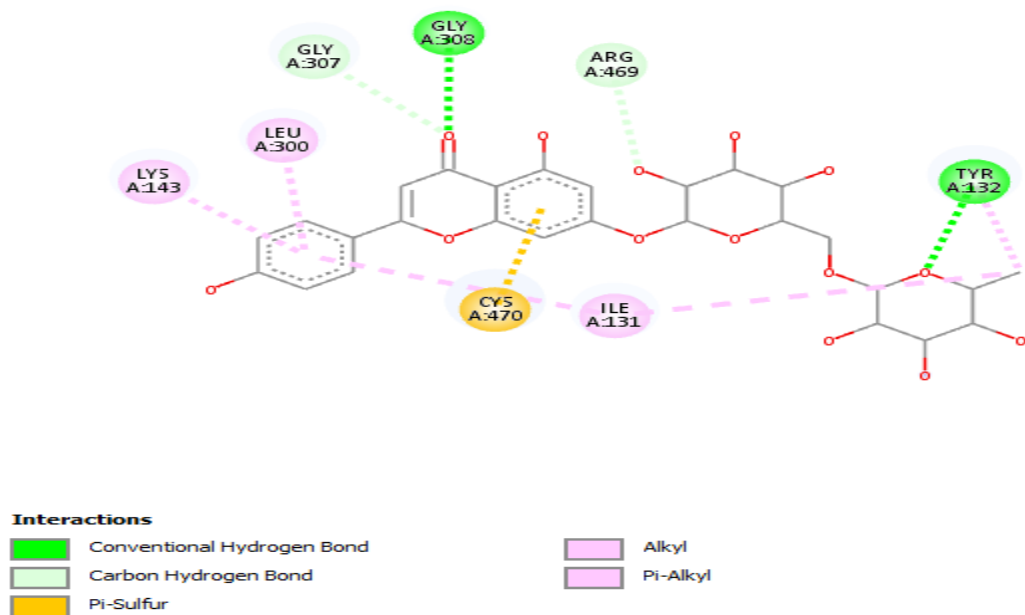


Figure 18: interaction de Apigénine-7-O-rutinoside avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Naringine présente un score de liaisons égale -9.8 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 8 résidus d'acides aminés (Figure 19) :

- 3 liaisons alkyles entre Naringine et acide amine leucine en position 139, isoleucine en position 131 et la tyrosine en position 132 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons conventionnelle hydrogène entre Naringine et acide amine arginine en position 469 et isoleucine en position 471 et thréonine 311 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison Pi-alkyle entre Naringine et acide amine isoleucine en position 379 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison carbone hydrogène entre Naringine et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison Pi-sulfur entre Naringine et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison défavorable Donor-Donor entre Naringine et acide amine entre tyrosine en position 132 récepteurs lanosterol 14-alpha déméthylase

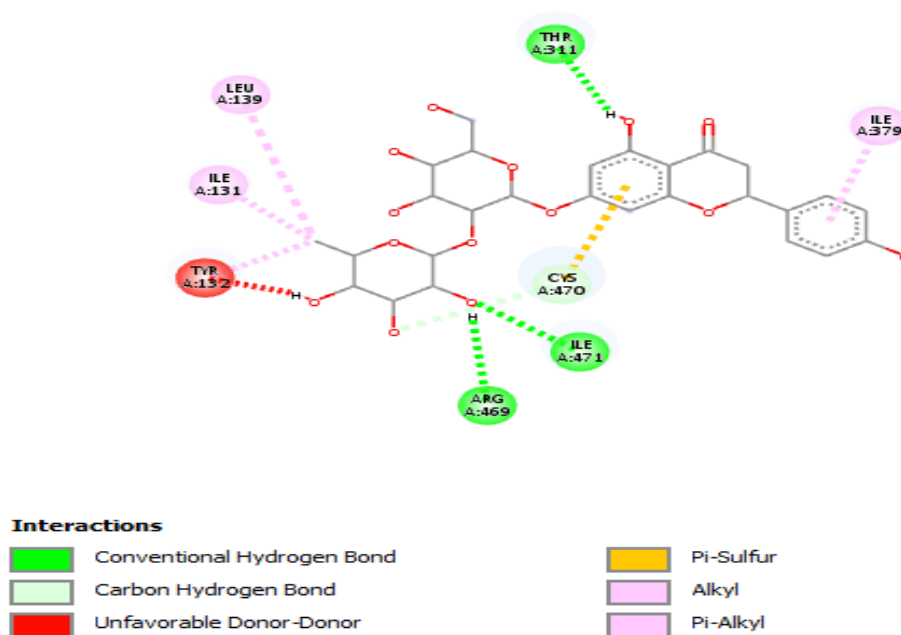


Figure 19: interaction de Naringine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Rutine présente un score de liaison égale -9.8 Kcal/mol similaire à celle de la Naringine, cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14-alpha déméthylase à travers 12 résidus d'acides aminés (Figure 20) :

- 3 liaisons alkyle entre ligand Rutine et acide amine leucine en position 376, tyrosine en position 118 et isoleucine en position 379 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 2 liaisons conventionnelle hydrogène entre Rutine et acide amine cystéine en position 470 et histidine en position 468 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison défavorable donor-donor entre Rutine et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 3 liaisons carbone hydrogène entre Rutine et acide amine glycine en position 307,464 et isoleucine en position 304 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison Pi-Pi T-shaped entre Rutine et acide amine tyrosine en position 132 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 6 liaisons Pi-alkyle entre Rutine et acide amine leucine en position 300, isoleucine en position 131 et 304 et la lysine en position 143 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.

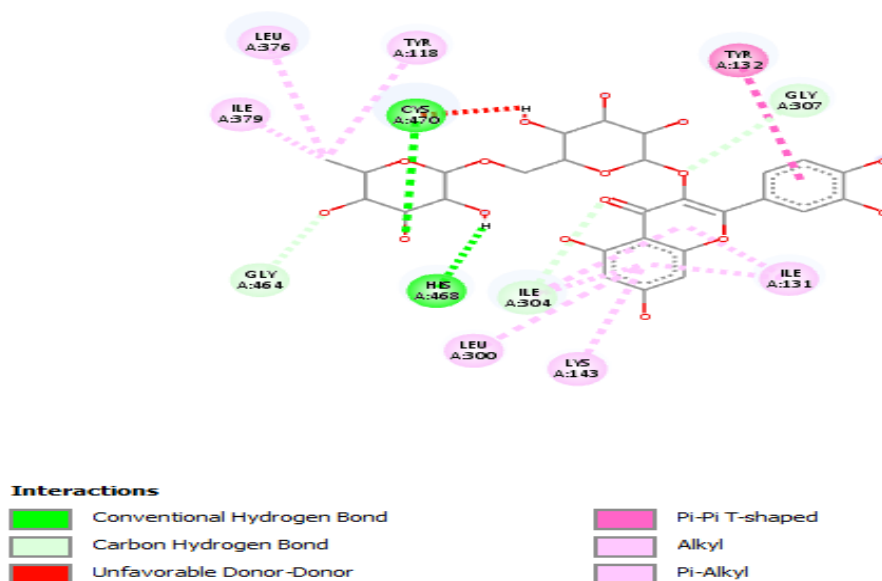


Figure 20: Interaction de Rutine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Cynaroside présente un score de liaisons égale -9.2 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 10 résidu d'acides aminés (Figure 21) :

- 5 liaisons conventionnelle hydrogène entre Cynaroside et acide amine histidine en position 468 et glycine en position 308 et tyrosine en position 118 et glutamine en position 142 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons Pi-alkyle entre Cynaroside et acide amine leucine en position 300, isoleucine en position 131 et lysine en position 143 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison carbone hydrogène entre Cynaroside et acide amine glycine en position 307 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison Pi-sulfur entre Cynaroside et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison défavorable Donor-Donor entre Cynaroside et acide amine arginine en position 381 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.

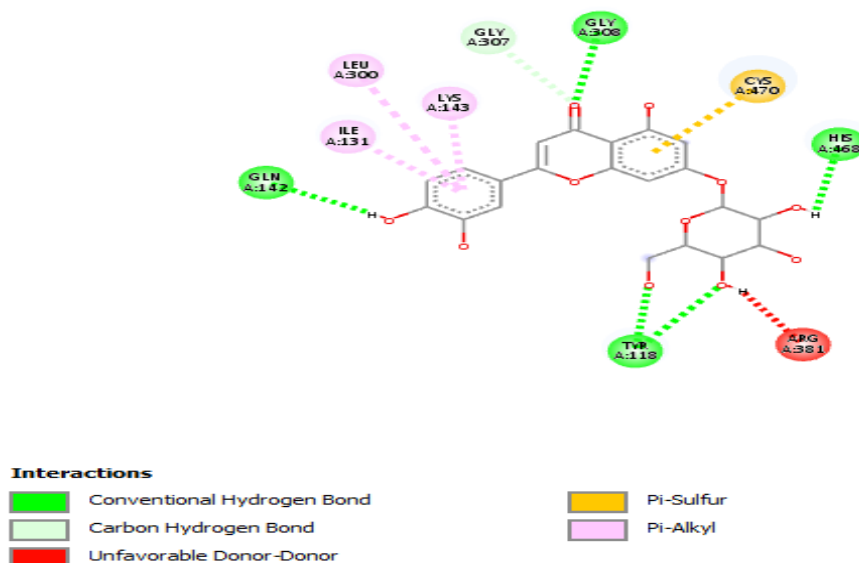


Figure 21: Interaction de Cynaroside avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Apigénine présente un score de liaisons égale -9.1 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 10 résidu d'acides aminés (Figure 22) :

- 3 liaisons pi-alkyl entre Apigénine et acide amine leucine en position 300, lysine en position 143 et isoleucine en position 131 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons conventionnelle hydrogène entre Apigénine et acide amine histidine en position 468 et glycine en position 308 et tyrosine en position 118 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 2 liaisons carbone hydrogène entre Apigénine et acide amine glycine en position 307 et 464 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison Pi-sulfur entre Apigénine et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison défavorable Donor-Donor entre Apigénine et acide amine arginine en position 381 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.

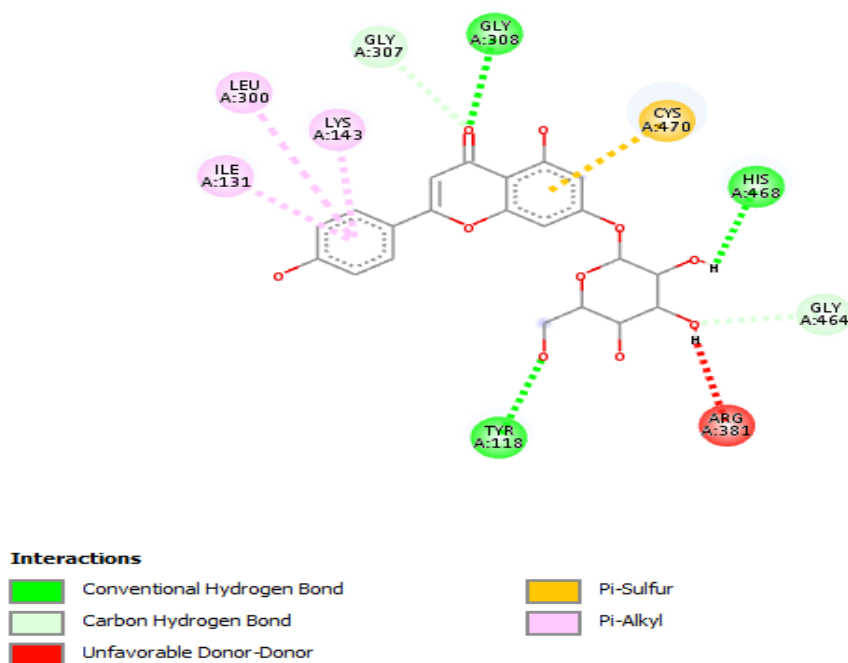


Figure 22: Interaction de Apigénine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Isövetexine présente un score de liaisons égale -9 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 7 résidu d'acides aminés (Figure 23) :

- 4 liaisons conventionnelle hydrogène entre isövetexine et acide amine tyrosine en position 132, histidine en position 468 et cystéine 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 7 liaisons Pi-alkyle entre isövetexine et acide amine isoleucine en position 471,304 et alanine en position 146 et leucine en position 150 et cystéine en 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons carbone hydrogène entre isövetexine et acide amine glycine en position 308 et arginine en position 469 et histidine en position 468 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison Pi-sulfur entre isövetexine et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.

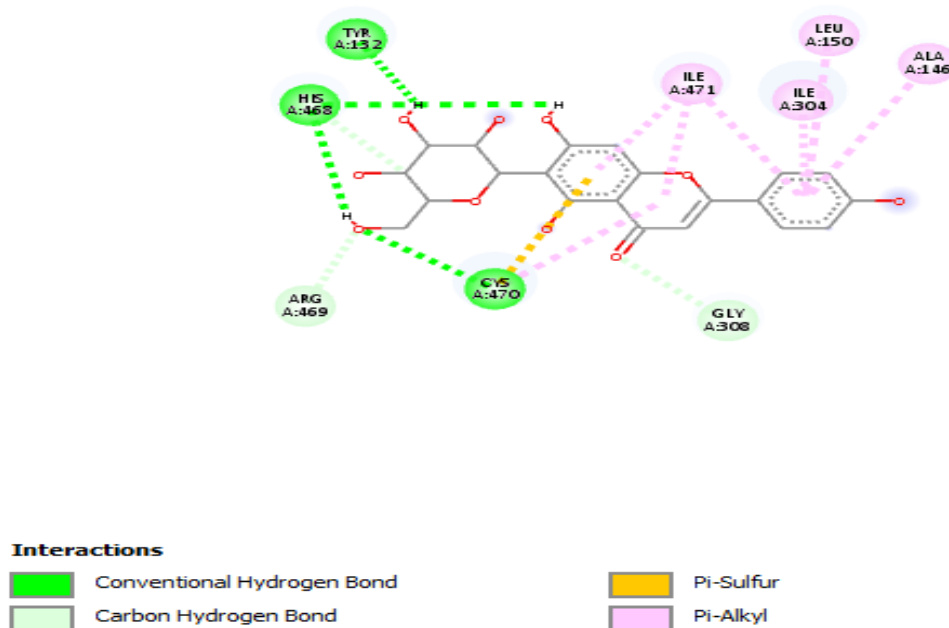


Figure 23: Interaction de isovetexine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Diosmétine présente un score de liaisons égale -8.7 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 7 résidu d'acides aminés (Figure 24) :

- 3 liaisons Pi-Pi T-shaped entre diosmétine et acide amine histidine en position 377, tyrosine en position 118, phénylalanine en position 228 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons Pi-alkyle entre diosmétine et acide amine leucine en position 376 et méthionine en position 508 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 2 liaisons carbone hydrogène entre diosmétine et acide amine glycine en position 307 et serine 378 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- une liaison conventionnelle hydrogène entre diosmétine et acide amine serine en position 378 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.

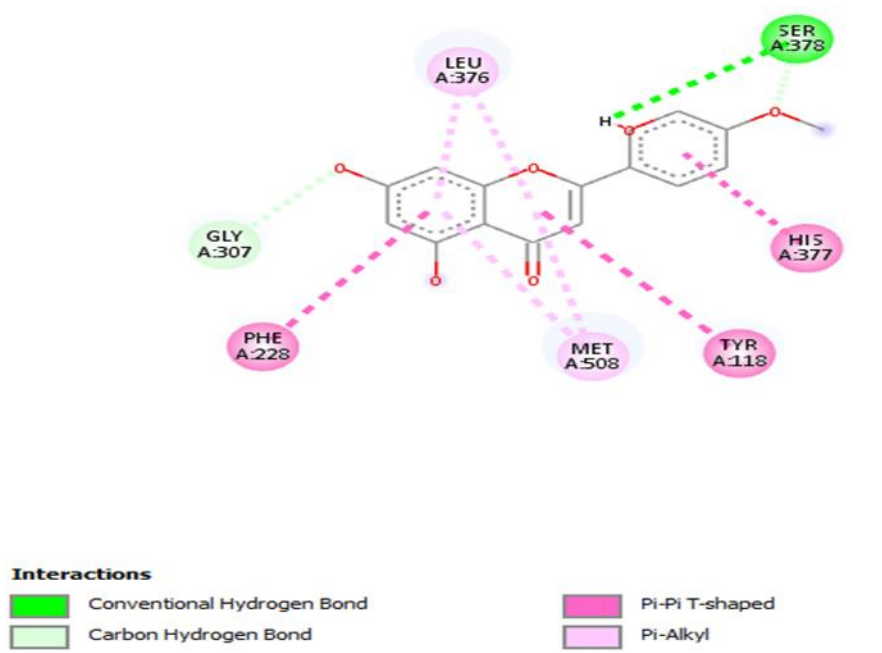


Figure 24: Interaction de Diosmétine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase

Berbérine présente un score de liaisons égale -8.7 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 11 résidu d'acides aminés (Figure 25) :

- Une liaison Pi-Pi T-shaped entre Berbérine et acide amine tyrosine en position 64 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 7 liaisons Pi-alkyle entre Berbérine et acide amine et méthionine en position 508, proline en position 320, tyrosine en position, 118 et leucine en position 376,87 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons Alkyl entre Berbérine et acide amine leucine en position 88,87 et alanine en position 61 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- 3 liaisons carbone hydrogène entre Berbérine et acide amine glycine en position 65, serine en position 507 et tyrosine en position 505 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase.
- Une liaison conventionnelle hydrogène entre Berbérine et acide amine serine en position 378 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase

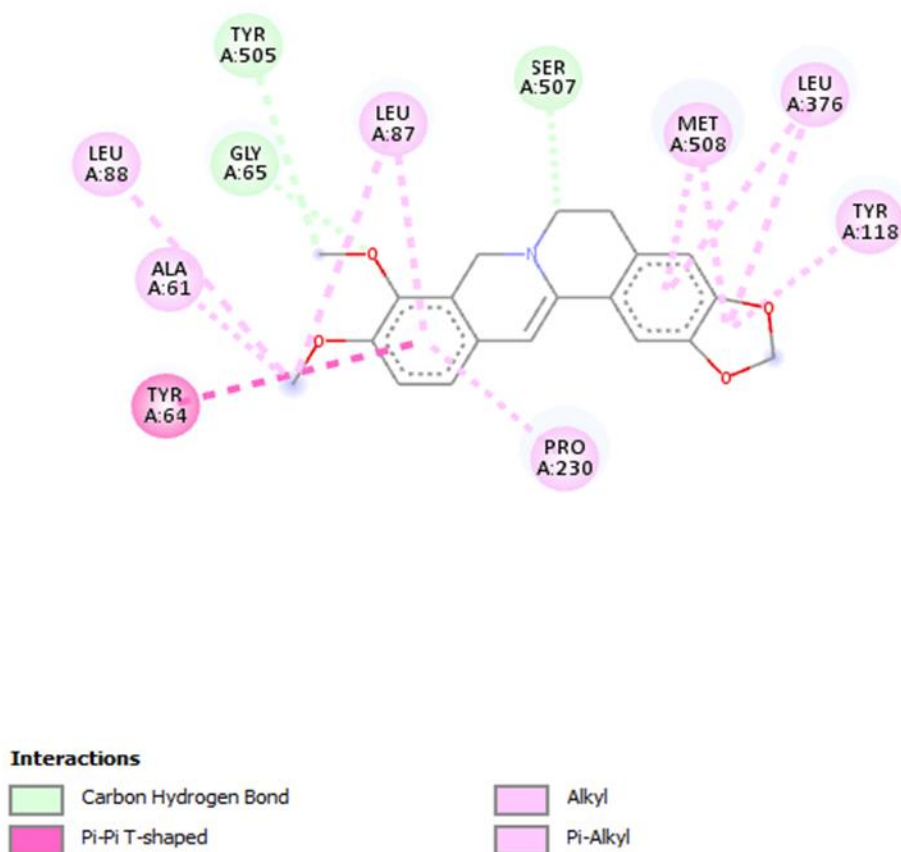


Figure 25 : Interaction de Berbérine avec Lanosterol 14-alpha déméthylase

Lutéoline présente un score de liaisons égale -8.6 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha déméthylase à travers 6 résidu d'acides aminés (Figure 26) :

- 3 liaisons Pi-Pi T-shaped entre lutéoline et acide amine tyrosine en position 118 et histidine en position 377 et phénylalanine en position 228 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- 3 liaisons Pi-alkyle entre lutéoline et acide amine leucine en position 376 et méthionine en position 508 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison conventionnelle hydrogène entre lutéoline et acide amine histidine en position 377 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison carbone hydrogène entre lutéoline et acide amine glycine en position 307 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase

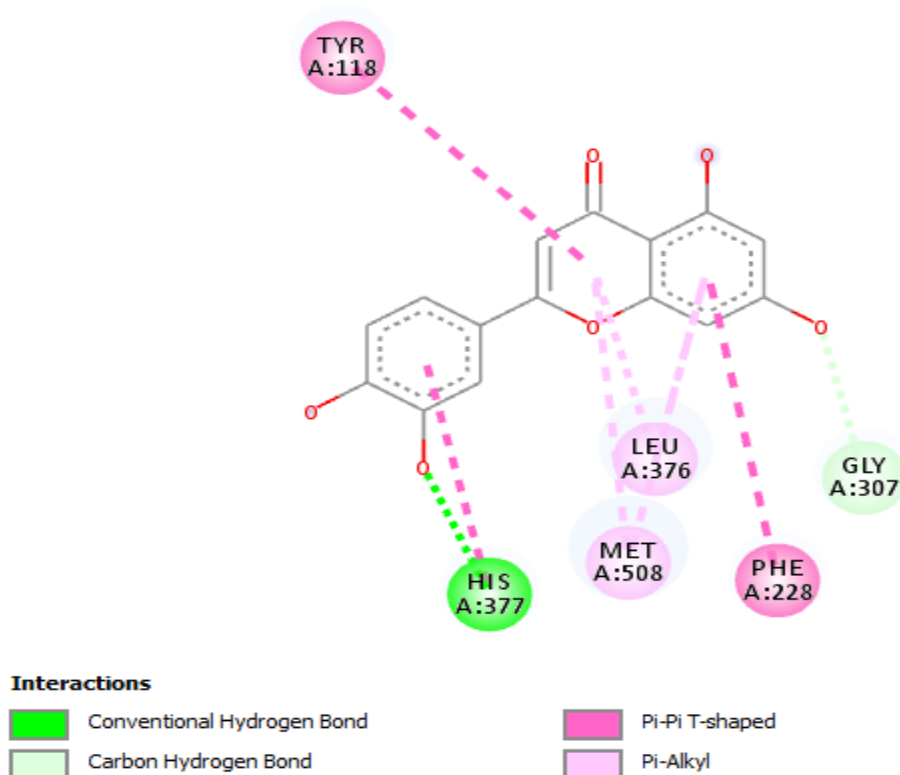


Figure 26: Interaction de lutéoline avec Lanosterol 14-alpha déméthylase

Épigallocatechin Gallate présente un score de liaisons égale -8.5 Kcal/mol cela montre que ce composé est stable dans le site actif de la lanosterol 14- alpha demethylase à travers 4 résidu d'acides aminés (Figure 27)

- 4 liaisons conventionnelle hydrogène entre épigallocatechin Gallate et acide amine histidine en position 468 et tyrosine en position 132 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison Pu-sulfur entre épigallocatechin Gallate et acide amine cystéine en position 470 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase
- une liaison Pi-alkyl entre Epigallocatechin Gallate et acide amine lysine en position 143
- une liaison défavorable Donor-Donor épigallocatechin Gallate et acide amine lysine en position 143 du récepteurs Lanosterol 14-alpha déméthylase

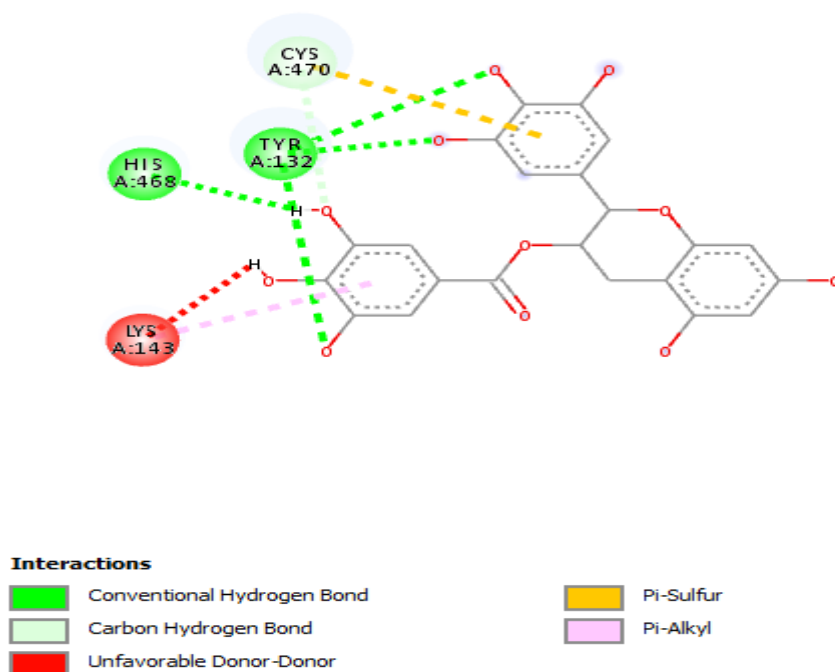


Figure 27: Interaction de Épigallocatéchin Gallate avec Lanosterol 14-alpha déméthylase.

Les résultats obtenus montrent d'une part que le ΔG du ligand de référence, qui est le voriconazole ($\Delta G = -7.3$), est plus élevé que celui des inhibiteurs testés ayant le ΔG les plus faibles. Nous avons également remarqué concernant les acides aminés impliqués dans la liaison du voriconazole à l'enzyme sur (lysine, isoleucine) ces acides aminés sont impliqués à la même position avec les inhibiteurs testés.

Le tableau 6 regroupe ces résultats où il apparaît qu'Acide ursolique, Apigénine-7-O-rutinoside, Naringine, Rutine, Cynaroside, Apigénien, Isovetexine, Épigallocatéchin Gallate, ont les mêmes acides aminés au niveau impliqués dans la liaison que le ligand de référence.

Tableau 6: les acides aminés que se répète et leur position.

Les molécules	Les acides aminés	Positions
voriconazole	isoleucine	131,304
	lysine	143
Acide ursolique	isoleucine	131,304
Apigénine-7-O-rutinoside	Isoleucine	131
	lysine	143
Naringine	Isoleucine	131

Rutine	isoleucine	131,304
	lysine	143
Cynaroside	isoleucine	131
	lysine	143
Apigénien	Isoleucine	131
	lysine	143
Isovetexine	Isoleucine	304
Épigallocatechin Gallate	Lysine	143

3. L'évaluation des propriétés pharmacologiques :

Pour être utilisé en tant que médicament, une molécule doit posséder une activité élevée envers la cible, en plus des propriétés ADMET compatibles avec une application biologique. De ce fait, nous avons évalué les propriétés pharmacocinétique (ADME) des onze principaux composés par le serveur SwissADME en vue de déterminer le potentiel pharmacologique de chacun d'eux selon la règle des cinq de Lipinski.

Le radar de biodisponibilité permet d'avoir une idée précoce sur le « drug-likeness » des structures étudiées en prenant en compte six propriétés physicochimiques respectivement qui sont :

Lipophile : $-0.7 < XLOGP3 < +5$

Polarité : $20 \text{ \AA} < TPSA < 130 \text{ \AA}$

Insolubilité : $-6 < \text{Log S} < 0$

Instauration : $0.25 < \text{Fraction Csp3} < 1$

Flexibilité : $0 < \text{nombre de liaisons rotatoires} < 9$

Poids moléculaires : $-150 \text{ g/mol} < MV < 500 \text{ g/mol}$

Cette schématisation de « drug-likeness » entoure une zone colorée représentative du profil physico-chimique optimal et précise graphiquement les propriétés qui se placent en dehors de cette zone (tableau 7).

Tableau 7 : Profil ADMET des inhibiteurs sélectionné

Les inhibiteurs	Lipophile	Polarité	Flexibilité	Instauration	Insolubilité	Absorption Gastro-intestinal
Voriconazole	1.51	76.72	5	0.25	-3.13	High
Isorhoifolin	0.17	228.97	6	0.44	-3.43	Low
Rutine	-0.33	269.43	6	0.44	-3.30	Low
Naringine	-0.44	225.06	6	0.52	-2.98	Low
Berbérine	3.62	40.80	2	0.25	-4.55	High
épigallocatechin Gallate	1.17	197.37	4	0.14	-3.56	Low
Acide ursolique	7.34	57.53	1	0.90	-7.23	Low
Diosmétine	3.10	100.13	2	0.06	-4.06	High
Lutéoline	2.53	111.13	1	0.00	-3.71	High
Apigénine	1.81	170.05	4	0.29	-3.78	Low
Cynaroside	1.46	190.28	4	0.29	-3.65	Low
Isovetexine	0.21	181.05	3	0.29	-2.84	Low

Le voriconazole désigne un radar de biodisponibilité sans dépasser la gamme optimal. Ce composé répond parfaitement à la règle de cinq de lipiniski (0 violation). C'est pour cela, qui il est utilisé comme inhibiteurs de lanosterol 14-alpha démétylase biodisponible par voie oral.

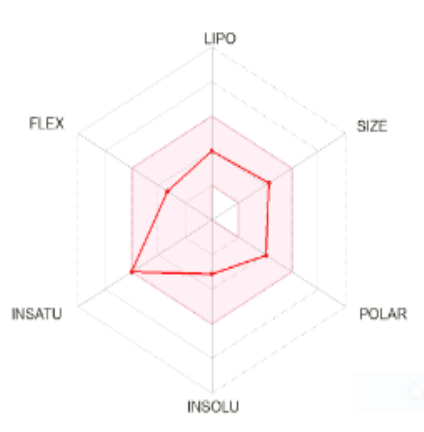


Figure 28: Radar de biodisponibilité de voriconazole

Apigénine-7-O-rutinoside, la rutine et la naringine désignent approximativement le même radar de biodisponibilité, ou ils dépassent la gamme optimale par un taux de polarité plus élevée par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques (tableau 7) donc prédit comme non biodisponible par voie orale suite à la présence de trois violations à la règle de Lipinski (figure 29)

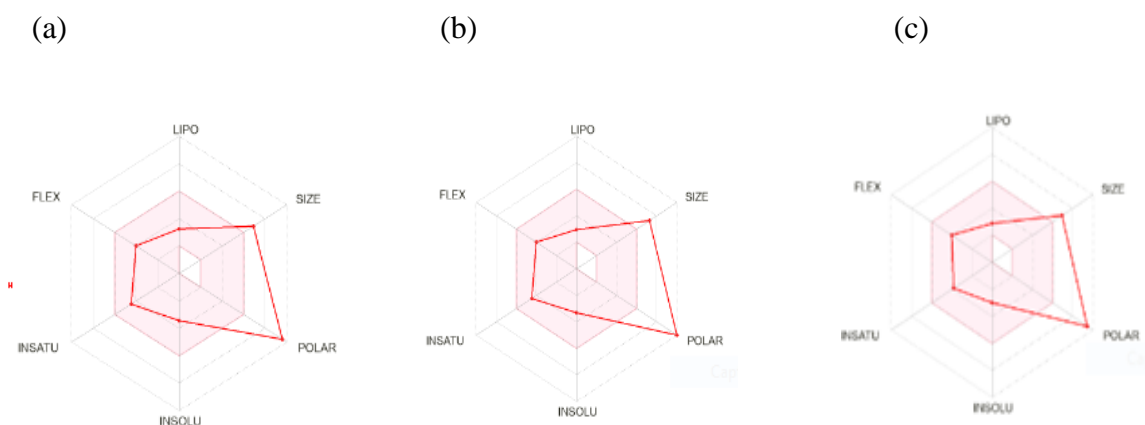


Figure 29: Radar de biodisponibilité d'Apigénine-7-O-rutinoside (a), Rutine (b) et Naringine (c).

Le berbérine désigne un radar de biodisponibilité sans dépasser la gamme optimale. De plus ces composés étudiés répandent parfaitement à la règle de lipinski (0 violation). C'est pour cela il est capable d'utilisé comme inhibiteur de Lanosterol 14-alpha déméthylase biodisponible par voie orale (figure 30)

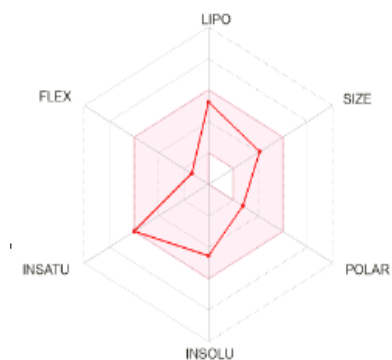


Figure 30: Radar de biodisponibilité berbérine

L'épigallocatechin Gallate dépasse la gamme optimale de radar par un taux de polarité plus élevée par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques est un taux d'instauration plus faible (tableau 7), donc il est non biodisponible par voie orale suite à la présence de deux violations à la règle de cinq de lipinski (figure 31).

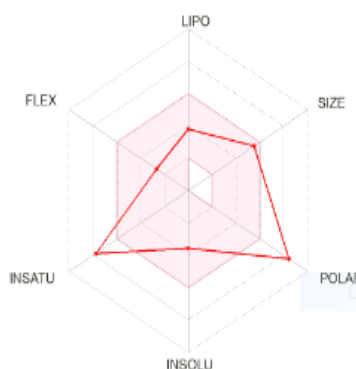


Figure 31: Radar de biodisponibilité épigallocatechin Gallate

L'acide ursolique présente une meilleure affinité pour lanosterol 14-alpha déméthylase parmi tous les inhibiteurs testés, mais reste non biodisponible par voie orale en raison de taux élevée d'insolubilité et lipophile par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques (figure 32) et (tableau 7).

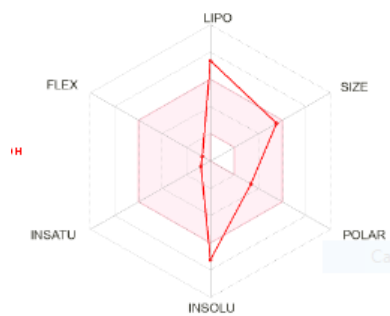
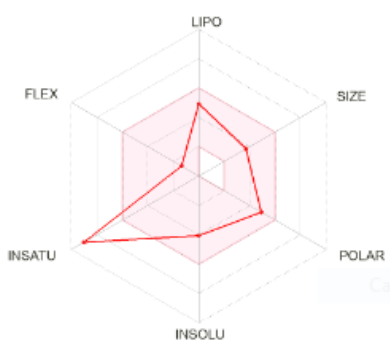


Figure 32: Radar de biodisponibilité Acide ursolique

Diosmétine et lutéoline répondent parfaitement aux règles de cinq de Lipinski mais reste non biodisponible par voie orale en raison de faible taux d'instauration malgré la détection de 0 violation a la règle de cinq de lipinski (figure 33) et (tableau 7).

(a)



(b)

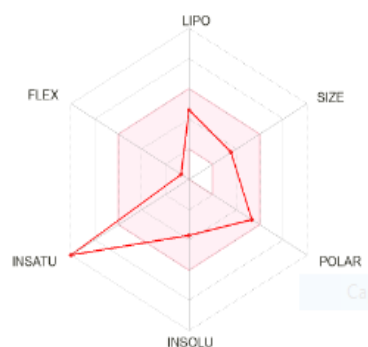


Figure 33: Radar de biodisponibilité Diosmétine (a) et lutéoline (b).

Apigénine présente un taux de polarité très élevée par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques (tableau 7) donc prédit comme non biodisponible par voie orale suite à la présence d'une violation à la règle de Lipinski (figure 34)

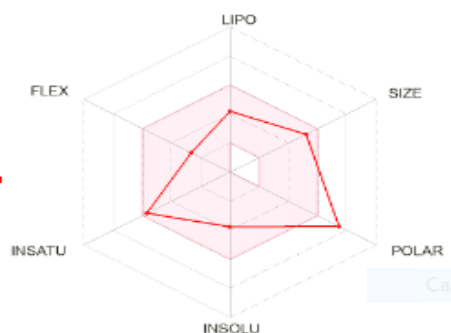


Figure 34: Radar de biodisponibilité Apigénine

Cynaroside dépasse la gamme optimale de radar par un taux polarité plus élevé par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques, donc il est non biodisponible par voie orale suite à la présence de deux violations à la règle de Lipinski (figure 35) et (tableau 7).

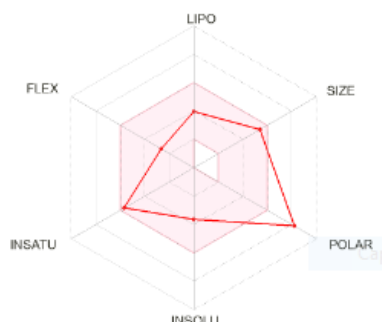


Figure 35: Radar de biodisponibilité cynaroside

Isovetexine présente un taux de polarité très élevée par rapport l'intervalle des propriétés physico-chimiques (tableau 7) donc prédit comme non biodisponible par voie orale suite à la présence d'une violation à la règle de Lipinski ((figure 36).

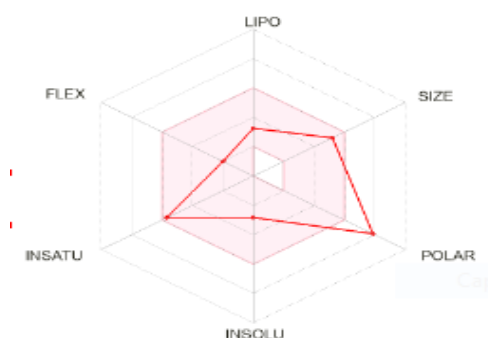


Figure 36: Radar de biodisponibilité Isovetexine

Parmi les 11 meilleurs inhibiteurs testés, seule la berbérine respecte tous les paramètres pharmacocinétique et les règles de biodisponibilité, ce qui en fait un médicament biodisponible par voie orale. En revanche, bien que la diosmétine et la lutéoline répondent parfaitement à la règle de cinq de lipinski (0 violation) elle ne sont pas considérées comme des médicaments en raison de leurs faible taux d'instauration. Il est important de noter que la biodisponibilité d'un médicament est un facteur clé dans son efficacité clinique.

Conclusion

La présente étude avait pour but d'identifier *in silico* des inhibiteurs potentiels ciblant l'enzyme lanostérol 14- α -déméthylase de la voie de mévalonate à partir de composés phytochimiques présents dans la nature. Pour cela, nous avons choisi le Docking moléculaire qui présente la principale méthode bio-informatique utilisé pour prédire le mode d'interaction des inhibiteurs avec la protéine lanosterol 14- α déméthylase. Nous avons ciblé 60 molécules avec la protéine Lanosterol 14- α déméthylase à l'aide de PyRx et nous avons sélectionné les molécules présentant une meilleur affinité ou le ΔG est le plus faible.

Afin de réaliser l'amarrage moléculaire par UCSF Chimera, onze inhibiteurs d'origine phytochimique naturelle ont été sélectionné il s'agit d'Acide ursolique, Apigénine-7-O-rutinoside, la rutine, la naringine, la cynaroside, l'apéginine, l'isovetexine, la berbérine, la diosmétine, la lutéoline et épigallocatechin Gallate . Parmi eux certains flavonoïdes ont été identifiés. Apigénine-7-O-rutinoside est principalement extrait de plantes du genre *Epimedium*. La naringine est principalement présente dans les agrumes, en particulier dans les pamplemousses, et son extraction est souvent réalisée à partir de l'écorce de pamplemousse. Le diosmétine et la rutine sont présents dans diverses plantes de la famille des Rutaceae. La lutéoline, le cosmosiin et la cynaroside sont présents dans plusieurs plantes de la famille des Asteraceae. L'épigallocatechine gallate (EGCG), un catéchine, est un composé bioactif que l'on trouve dans le thé vert (*Camellia sinensis*). Les feuilles de thé vert sont couramment utilisées pour extraire l'EGCG. L'isovetexin est présent dans plusieurs plantes, notamment celles appartenant à la famille des Poaceae. En ce qui concerne les terpènes, L'acide ursolique est présent dans diverses plantes, notamment dans la famille des Rosaceae. La berbérine, un alcaloïde, se trouve dans différentes plantes, dont certaines appartiennent à la famille des Berberidaceae, comme l'épine-vinette (*Berberis vulgaris*).

Par la suite, une analyse des interactions de lanosterol 14- α déméthylase avec les inhibiteurs via le logiciel DSV a été effectuée. Enfin, les propriétés physico-chimiques de la molécule testée ont été étudiées par SwissADME afin de la rendre biodisponibles par voie orale.

D'après les résultats obtenus par le logiciel DSV, nous avons analysés Les différents types d'interactions établies. Ensuite, une analyse des propriétés pharmacologiques permet de prédire que la berbérine est un inhibiteur qui fait un médicament biodisponible par voie orale. La berbérine est particulièrement connue pour être extrait de l'épine-vinette (*Berberis vulgaris*) une plante originaire de diverses régions, notamment d'Europe, d'Asie et en particulier d'Afrique du Nord.

Il convient, dans les perspectives d'avenir, de poursuivre cette étude en recherchant d'autres inhibiteurs naturels contre lanosterol 14-alpha déméthylase et de confirmer ces résultats théoriques en réalisant des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Reference bibliographique

A

Abe, F., Usui, K., & Hiraki, T. (2009). Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 48(36), 8494-8504.

Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical mycology*, 43(4), 285-318.

Antoine D, Vincent Z. (2019). Application of the SwissDrug Design Online Resources in Virtual Screening. *International journal of molecular science* [en ligne].18/09/2019. Sci. 2019,

B

Baginski, M., Resat, H., & McCammon, J. A. (1997). Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Molecular pharmacology*, 52(4), 560-570.

Bard, M., Lees, N. D., Barbuch, R. J., & Sanglard, D. (1987). Characterization of a cytochrome P450 deficient mutant of *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 147(2), 794-800.

Bard, M., Sturm, A. M., Pierson, C. A., Brown, S., Rogers, K. M., Nabinger, S., ... & Hazen, K. C. (2005). Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 52(4), 285-293.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L. (2015). *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company.

Burley S. K., Berman H. M., Bhikadiya C., Bi C., Chen L., Di Costanzo L., ...& Zardecki C. (2018). RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy.

C

Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S., & Oliynyk, M. (2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry & biology*, 8(7), 713-723.

Capecch A., Mahendra A., Daniel P., & Daniel P. (2019). PubChem and ChEMBL beyond Lipinski. *Mol. Inf.*, 1-12.

Carrillo-Muñoz, A. J., Tur-Tur, C., Cárdenes, D., Rojas, F., & Giusiano, G. (2013). Sertaconazole antifungal profile determined by a microdilution method versus nine topical substances against dermatophyte fungi. *Chemotherapy*, 58(5), 399-404.

Chabasse D., Raymond R., Marot A., Pihet M ., (2006). *Candida pathogènes*. Edition lavoisier, Paris, pp :42-61

Chen, S.N., & Fabricant, D.S. (2016). Phytochemicals from medicinal plants: perspectives from the early 21st century. *Journal of Natural Products*, 79(3), 476-487.

Clay, L., Caudron, F., Denoth-Lippuner, A., Boettcher, B., Buvelot Frei, S., Snapp, E. L., & Barral, Y. (2014). A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *Elife*, 3, e01883.

Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., ... & Sanglard, D. (2007). Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryotic cell*, 6(10), 1889-1904.

Cruz, M. C., Goldstein, A. L., Blankenship, J. R., Del Poeta, M., Davis, D., Cardenas, M. E., ... & Heitman, J. (2002). Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *The EMBO journal*, 21(4), 546-559.

Current, W. L. (1997). Fungal cell wall biosynthesis: Penicillins for fungi. *PROGRAM ABSTR 35TH ANNUAL MEET INFECT DIS SOC*.

D

Dallakyan S., Olson A J. (2014) Criblage de bibliothèques de petites molécules par amarrage avec PyRx. *Biologie chimique*, Pages 243-250.

Damij, N., Levnajić, Z., Rejec Skrt, V., & Suklan, J. (2015). What motivates us for work? Intricate web of factors beyond money and prestige. *PloS one*, 10(7), e0132641.

Daneshmend, T. K., & Warnock, D. W. (1983). Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clinical pharmacokinetics*, 8, 17-42.

de Biologie, 51(293), 53-63

De Luca L., Vittorio S., Peña Díaz S., Pitasi G., Fornt Suné M., Bucolo F., Ventura S., Gitto R. (2022). Ligand-based discovery of a small molecule as inhibitor of α -Synuclein amyloid formation. *International Journal of Molecular Sciences*; 23(23): 1-14.

De Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J., de Sousa Cartágenes, M. D. S., Filho, A. K., do Nascimento, F. R., ... & de Andrade Monteiro, C. (2018). Candida infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in microbiology*, 9, 1351.

Denning, D. W. (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 889-891.

Desoubeaux, G., Chandénier, J. (2010). Aspergillus and aspergillus diseases. Feuillet

Dupont, S., Lemétais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?. *Evolution*, 66(9), 2961-2968.

F

Florent, M., Noël, T., Ruprich-Robert, G., Da Silva, B., Fitton-Ouhabi, V., Chastin, C., ... & Chapeland-Leclerc, F. (2009). Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2982-2990.

Fraga, C.G. (Ed.). (2018). Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. John Wiley & Sons.

G

Georgopapadakou, N. H., & Tkacz, J. S. (1995). The fungal cell wall as a drug target. *Trends in microbiology*, 3(3), 98-104

Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.

Guillot, J., & Dannaoui, E. (2016). La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 4, 314

H

Hayakawa, H., Sobue, F., Motoyama, K., Yoshimura, T., & Hemmi, H. (2017). Identification of enzymes involved in the mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(3), 702-708.

Hector, R. F. (1993). Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical microbiology reviews*, 6(1), 1-21.

Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., & Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian journal of microbiology*, 57, 270-277.

Huang C C., Meng E C., Morris J H., Pettersen E F., Ferrin T E. (2014) Amélioration de UCSF Chimera via des services Web. Recherche sur les acides nucléiques, Volume 42, Numéro 1, Pages 478-484.

J

Jia, N., Arthington-Skaggs, B., Lee, W., Pierson, C. A., Lees, N. D., Eckstein, J., ... & Bard, M. (2002). *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(4), 947-957.

K

Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*, 46(1), 120-128.

Kelly, S. L., Lamb, D. C., Baldwin, B. C., Corran, A. J., & Kelly, D. E. (1997). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol $\Delta 22$ -desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9986-9988.

Klug, L., & Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS yeast research*, 14(3), 369-388.

Konecna, A., Toth Hervay, N., Valachovic, M., & Gbelska, Y. (2016). ERG6 gene deletion modifies *Kluyveromyces lactis* susceptibility to various growth inhibitors. *Yeast*, 33(12), 621-632.

Kristan, K., & Rižner, T. L. (2012). Steroid-transforming enzymes in fungi. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 129(1-2), 79-91.

Kurtz, M. B., & Douglas, C. M. (1997). Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 35(2), 79-86.

L

Lee, S. H., Raboune, S., Walker, J. M., & Bradshaw, H. B. (2010). Distribution of endogenous farnesyl pyrophosphate and four species of lysophosphatidic acid in rodent brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(10), 3965-3976.

Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin b. *Applied microbiology and biotechnology*, 68, 151-162.

Liu, J. F., Xia, J. J., Nie, K. L., Wang, F., & Deng, L. (2019). Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-8.

M

Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1-10.

Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., ... & Kelly, S. L. (2010). Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4527-4533.

Milhaud, J., Ponsinet, V., Takashi, M., & Michels, B. (2002). Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1558(2), 95-108.

Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 505(2), 131-143.

Mo, C., & Bard, M. (2005). Erg28p is a key protein in the yeast sterol biosynthetic enzyme complex. *Journal of lipid research*, 46(9), 1991-1998.

N

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company.

O

Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.

P

Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

Paquet, M. J., Fournier, I., Barwicz, J., Tancrède, P., & Auger, M. (2002). The effects of amphotericin B on pure and ergosterol-or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by 2H NMR. *Chemistry and physics of lipids*, 119(1-2), 1-11.

Pasrija, R., Krishnamurthy, S., Prasad, T., Ernst, J. F., & Prasad, R. (2005). Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 905-913.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(S3), S112-S120.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163.

Polak, A. (1977). 5-Fluorocytosine--current status with special references to mode of action and drug resistance. *Contributions to microbiology and immunology*, 4, 158-167.

Polak, A., & GRENsoN, M. (1973). Evidence for a common transport system for cytosine, adenine and hypoxanthine in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *European Journal of Biochemistry*, 32(2), 276-282.

Polak, A., & Scholer, H. J. (1975). Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy*, 21(3-4), 113-130.

Prasad, R., & Rawal, M. K. (2014). Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in pharmacology*, 5, 202.

Q

Quindós, G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista iberoamericana de micología*, 31(1), 42-48.

R

Raut, J.S., Karuppayil, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264

Rojas-Rutz, M., Torres-Molina, J.A., Fuentes-Montero, M.E., & González-Coloma, A. (2018). Alkaloids from nature to therapeutics: achievements, challenges and perspectives. *Molecules*, 23(2), 513.

S

Sanglard, D., Coste, A., & Ferrari, S. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS yeast research*, 9(7), 1029-1050.

Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., & Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2404-2412.

Shapiro, R. S., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(2), 213-267.

Singh, P. K., Agrawal, A., & Shukla, A. K. (2010). Web-based resources in biotechnology. *Trends in Biosciences*, 3(1), 82-85.

Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*, 2013.

Speller, D. C. (1980). *Antifungal chemotherapy*. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Sussex PO19 1UD.

Stamm, A. M., Diasio, R. B., Dismukes, W. E., Shadomy, S., Cloud, G. A., Bowles, C. A., ... & Group, I. D. M. S. (1987). Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *The American journal of medicine*, 83(2), 236-242.

Stone, E. A., Fung, H. B., & Kirschenbaum, H. L. (2002). Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clinical therapeutics*, 24(3), 351-377.

T

Theesfeld, C. L., & Hampton, R. Y. (2013). Insulin-induced gene protein (INSIG)-dependent sterol regulation of Hmg2 endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8519-8530.

Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 148, pp. 63-106). Springer.

Touré, S. (2018). *Interactions insectes-micro-organismes entomopathogènes comme source d'inspiration pour la découverte concomitante de bio-insecticides et d'antimicrobiens* (Doctoral dissertation, Sorbonne université).

Trott, O., & Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.

V

Vanden Bossche, H., Warnock, D. W., Dupont, B., Kerridge, D., Gupta, S. S., Improvisi, L., ... & Ronin, O. (1994). Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32(sup1), 189-202.

Vermes, A., van der Sijs, H., & Guchelaar, H. J. (2000). Flucytosine: correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy*, 46(2), 86-94.

W

Waldorf, A. R., & Polak, A. (1983). Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(1), 79-85.

Walker, L. A., Gow, N. A., & Munro, C. A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 47(2), 117-126.

Walker, L. A., Gow, N. A., & Munro, C. A. (2013). Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 146-154.

Ward, D. M., Chen, O. S., Li, L., Kaplan, J., Bhuiyan, S. A., Natarajan, S. K., ... & Cox, J. E. (2018). Altered sterol metabolism in budding yeast affects mitochondrial iron–sulfur (Fe-S) cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10782-10795.

Warn, P. A., Sharp, A., Guinea, J., & Denning, D. W. (2004). Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against *Aspergillus* and *Candida*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 743-749.

Watson, P. F., Rose, M. E., & Kelly, S. L. (1988). Isolation and analysis of ketoconazole resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26(3), 153-162.

Z

Zavrel, M., Hoot, S. J., & White, T. C. (2013). Comparison of sterol import under aerobic and anaerobic conditions in three fungal species, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 12(5), 725-738.

Zinser, E. R. W. I., Paltauf, F. R. I. T., & Daum, G. U. N. T. H. E. R. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of bacteriology*, 175(10), 2853-2858.