



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر

Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

---

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologique

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Étude in silico de potentiel inhibiteur de la vitamine D  
contre la Protéase et la protéine Spike de SARS-CoV-2**

Présenté par :

AMARA KORBA Amina

Président : Mr.MEDJOUR Abdelhak

MAA Université d'El Oued

Examineur : Mr.LANEZ Elhafnaoui

MCB Université d'El Oued

Promoteur : Mr.GHANIA Ahmed

MAA Université d'El Oued

Année universitaire : 2021/2022

## Remerciement

Tout d'abord, je prie Allah, le Tout-Puissant, de m'avoir donné cette opportunité et de m'avoir permis de continuer avec succès.

Je tiens à remercier mon encadreur Dr GHANIA ahmed pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma recherche de master sous leur supervision, leur soutien continu, leurs encouragements tout au long de ma recherche et pour leurs commentaires et discussions bénéfiques qui ont contribué à la réalisation et à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Dr ZEGHEB nadjiba Pour m'aider et me suivre dans toutes les étapes de mon sujet et Dr LANEZ Elhafnaoui pour m'aider de terminer la partie pratique du ma mémoire .Je remercie également les membres du comité d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Enfin, je voudrais dédier cette mémoire a mes parents et mon frère qui m'a soutenu dans toutes les étapes de ma vieet un merci spécial à la famille de mon mari et mon mari pour être avec moi et toutes mes amies qui me soutient malgré la distance.Merci à tous avec beaucoup d'amour et d'appréciation .

**Résumé :**

Dans cette étude, nous visons à évaluer une nouvelle activité de la vitamine D contre le SRASCoV-2 à l'aide de méthodes in silico et à étudier son activité sur la protéine Spike et la protéase, l'une des protéines sars cov-2. Le test était hypothétique. Elle a été réalisée à l'aide d'Autodock(version 4.2.6), et elle nous a montré des bons résultats.

L'étude d'amarrage moléculaire a montré que le complexe de vitamine D était presque actif avec les 4 types les plus importants qui se sont propagés rapidement dans tous les pays du monde à partir du nouveau Corona, car il interagissait avec B.1.1.7, B.1.617.2 et BA .1 avec une énergie de liaison de 8 à 11 Kcal/mol et a réagi avec B.1.351 avec une faible énergie de liaison, mais avec les réactions électrostatique nous avons constaté qu'il y avait une liaison et des liaisons hydrogène, il y avait une bonne liaison avec acide aminé .

**Abstract :**

In this study, we aim to evaluate a novel activity of vitamin D against SARS-CoV-19 using in silico methods and investigate its activity on Spike protein and protease, one of the COVID-19 proteins. 19. The test was hypothetical. It was made using Autodock, and it showed us good results.

The molecular docking study showed that vitamin D complex was almost active with the 4 most important types which spread rapidly to all countries of the world from the new Corona, because it interacted with B.1.1. 7, B.1.617.2 and BA .1 with a binding energy of 8-11 Kcal/mol and reacted with B.1.351 with low binding energy, but with the water repelling reactions we found that there was bonding and hydrogen bonds, there was good bonding with amine acids.

## الملخص

في هذه الدراسة، نهدف الى تقييم نشاط جديد لفيتامين دي ضد فيروس كورونا باستخدام طرق السيليكو والتحقيق في نشاطه على بروتين سبايك و البروتياز، احد بروتينات كوفيد 19 حيث كان الاختبار افتراضيا، تم صنعه باستخدام برنامج الاوتودوك، حيث اظهر نتائج جيدة.

أظهرت دراسة الالتحام الجزيئي أن مركب فيتامين (د) كان نشطاً تقريباً مع أهم 4 أنواع انتشرت بسرعة إلى جميع دول العالم من كورونا الجديد، لأنها تفاعلت مع ب.1.1.7 و ب.1.617.2 و با.1 مع طاقة ربط تبلغ 8 الى 11 كيلو كالوري/ المول و تفاعل مع ب.1.351 بطاقة ربط منخفضة، ولكن مع تفاعلات صد الماء وجدنا أن هناك روابط ترابط وهيدروجينية، هناك كان ارتباطاً جيداً بالأحماض الأمينية.

## Liste d'abréviations

**Sars-cov** : coronavirusdu syndrome respiratoire aigu sévère

**Mers-cov** : syndrome respiratoire du Moyen-Orient

**Pdb** :Protein Data Bank

**Pubchem** : banque de données américaine de molécules chimiques

**ADT** : autodock Tools

**In silico** : méthode d'étude effectuée au moyen d'ordinateurs

**PDBQT** : Protein data Bank, Q for charges and T for torsion

**D2** :ergocalciférol

**D3** :cholécalciférol

**Mpro** : protéase principale

**PLpro** : protéase semblable à la papaïne

**TDRA** : teste antigénique

**Pcr** : Polymerase Chain Reaction

## Liste des tableaux :

|                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1.1 : La liste des résidus d'acides aminés joue un rôle important dans le SARS-CoV-2 Mpro.....                                                                                                                                                      | 13  |
| Tableau 1.2 : la Sévérité du SARS- coV 2 (J Clin Med.2020).....                                                                                                                                                                                             | 21  |
| Tableau 2.1 : généralité pour le cov-2.....                                                                                                                                                                                                                 | 28  |
| Tableau 2.2 : les variations de alpha cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut,2022).....                                                                                                                                                       | 28  |
| Tableau 2.3 : les variations de Beta cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut,2022).....                                                                                                                                                        | 29  |
| Tableau 2.4 : les variations de Gamma cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut,2022).....                                                                                                                                                       | 30  |
| Tableau 2.5 : les variations de Delta cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut,2022).....                                                                                                                                                       | 31  |
| Tableau 2.6 : les variations de Omicron cov-2 (Emma Hodcroft,2022).....                                                                                                                                                                                     | 34  |
| Tableau 2.7 : les variations de Epsilon cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut,2020).....                                                                                                                                                     | 35  |
| Tableau 2.8 : les variations de zeta cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020).....                                                                                                                                                      | 35  |
| Tableau 2.9 : les variations de Eta cov-2 Áine O'Toole and Verity Hill, Rambaut Group, University of Edinburgh. Flight volume data from Kamran Khan, Isaac Bogoch, Alexander Watts, Oliver Pybus, Moritz Kraemer. Sequences sourced from GISAID, 2021)..... | 36  |
| Tableau 2.10 : les variations de Théta cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2021).....                                                                                                                                                    | 37  |
| Tableau 2.11 : les variations de Lota cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020).....                                                                                                                                                     | 37  |
| Tableau 2.12 : les variations de Mu cov-2 (Anaïs Thiébaux ,2021).....                                                                                                                                                                                       | 38  |
| Tableau 2.13 : les variations de Kappa cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020).....                                                                                                                                                    | 38  |
| Tableau 2.14 : les variations de Lambda cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020).....                                                                                                                                                   | 39  |
| Tableau 2.15 : Des autres variations de cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2022).....                                                                                                                                                   | 40  |
| Tableau 3.1 : Sources alimentaires de vitamine D (Base de données Ciquel, ANSES) (HAS ,2013- Florence Daine,2020) .....                                                                                                                                     | 64  |
| Tableau 5.1 : le code PDB de covid -19 avec une forme 3D.....                                                                                                                                                                                               | 100 |
| Tableau 5.2 : le code Pubchem de ligand avec une forme 3D .....                                                                                                                                                                                             | 100 |
| Tableau 6.1 : le complexe (protéine-ligand) avec une forme 3D.....                                                                                                                                                                                          | 104 |
| Tableau 6.2 : Interactions Hydrophobes De B.1.1.7.....                                                                                                                                                                                                      | 105 |
| Tableau 6.3 : liaisons hydrogène de B.1.1.7 .....                                                                                                                                                                                                           | 105 |
| Tableau 6.4 : Interactions hydrophobes de B.1.351 .....                                                                                                                                                                                                     | 106 |
| Tableau 6.5 : liaisons hydrogèneB.1.351.....                                                                                                                                                                                                                | 106 |
| Tableau 6.6 : Interactions hydrophobes de B.1.617.2 .....                                                                                                                                                                                                   | 108 |
| Tableau 6.7 : liaisons hydrogène de B.1.617.2 .....                                                                                                                                                                                                         | 108 |

### Liste des figures :

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1.1 : génome et structure de cov-2..                                                          | 08 |
| Figure 1.2 : Les structures de la protéine S.....                                                    | 10 |
| Figure 1.3 : Représentation schématique de la production et de la fonction du SARS-CoV- 2 PLpro..... | 14 |
| Figure 2.1 : B.1.1.7 lignée .....                                                                    | 41 |
| Figure 2.2 : B.1.1.7 + E484K lignée avec S : E484K .....                                             | 41 |
| Figure 2.3 : B.1.1.7+L452R lignée avec S : L452R.....                                                | 42 |
| D-B.1.1.7+S494P .....                                                                                | 42 |
| Figure 2.4 : B.1.1.7+S494P lignée avec S : S494P .....                                               | 42 |
| Figure 2.5 : Q.1 lignée.....                                                                         | 43 |
| Figure 2.6 : Q.2 lignée.....                                                                         | 43 |
| Figure 2.7 : Q.3 lignée.....                                                                         | 44 |
| Figure 2.8 : Q.4 lignée.....                                                                         | 44 |
| Figure 2.9 : B.1.531 lignée .....                                                                    | 45 |
| Figure 2.10 : B.1.351+E516Qlignée avec S : E516Q .....                                               | 45 |
| Figure 2.11 : B.1.351+L18F lignée avec S : L18F.....                                                 | 46 |
| Figure 2.12 : <i>B.1.351+P384L lignée avec S : P384L</i> .....                                       | 46 |
| Figure 2.13 : B.1.351.2 lignée.....                                                                  | 47 |
| Figure 2.14 : B.1.351.3 lignée.....                                                                  | 47 |
| Figure 2.15 : P.1 lignée.....                                                                        | 48 |
| Figure 2.16: P.1+P681H lignée avec S : P681H.....                                                    | 48 |
| Figure 2.17 : P.1.1 lignée.....                                                                      | 49 |
| Figure 2.18 : P.1.2 lignée.....                                                                      | 49 |
| Figure 2.19 : B.1.617.2 lignée.....                                                                  | 50 |
| Figure 2.20 : B.1.617.2+E484Q lignée avec S : E484Q.....                                             | 50 |
| Figure 2.21 : B.1.617.2+K417N lignée avec S : K417N.....                                             | 51 |
| Figure 2.22 : B.1.617.2+Q613H lignée avec S : Q613H.....                                             | 51 |
| Figure 2.23 : AY.1 lignée .....                                                                      | 52 |
| Figure 2.24 : AY.2 lignée .....                                                                      | 52 |
| Figure 2.25 : AY.3 lignée .....                                                                      | 53 |
| Figure 2.26 : AY.4 lignée .....                                                                      | 53 |
| Figure 2.27 : AY.6 lignée .....                                                                      | 54 |
| Figure 2.28 : AY.6 lignée .....                                                                      | 54 |
| Figure 2.29 : AY.7 lignée .....                                                                      | 55 |
| Figure 2.30 : AY.8 lignée .....                                                                      | 55 |
| Figure 2.31 : AY.9 lignée .....                                                                      | 56 |
| Figure 2.32 : AY.11 lignée.....                                                                      | 56 |
| Figure 2.33 : AY.11 lignée.....                                                                      | 57 |
| Figure 2.34 : AY.12 lignée.....                                                                      | 57 |
| Figure 2.35 : BA.1 lignée.....                                                                       | 58 |
| Figure 2.36 : BA.2 lignée.....                                                                       | 58 |
| Figure 2.37 : BA.2.12.1 lignée .....                                                                 | 59 |
| Figure 2.38 : BA.3 lignée.....                                                                       | 59 |
| Figure 2.39 : BA.4 lignée.....                                                                       | 60 |

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 2.40 : BA.5 lignée.....                                                                                                         | 60  |
| Figure 3.1 : Schéma du métabolisme de la vitamine D3. ....                                                                             | 68  |
| Figure 4.1 : L'ACE2, le système rénine-angiotensine et la vitamine D.....                                                              | 79  |
| Figure 4.2 : La carence vitaminique D et les conséquences sur les principales .....                                                    | 80  |
| Figure 5.1 : Trois représentations possibles de la structure tridimensionnelle de la<br>protéine isomérase de phosphate de triose..... | 87  |
| Figure 5.2 : Le Docking de deux molécules. ....                                                                                        | 89  |
| Figure 6.1 : resltat de fusion d B.1.1.7-VITD .....                                                                                    | 105 |
| Figure 6.2 : résultats de fusion B.1.531 et VITD3 .....                                                                                | 107 |
| Figure 6.3 : résultats de fusion B.1.617.2 et VITD3 .....                                                                              | 108 |
| Figure 6.3 : résultats de fusion B.1.617.2 et VITD3 .....                                                                              | 110 |

## Sommaire :

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Résumé : .....             |    |
| Abstract : .....           |    |
| Liste des tableaux : ..... |    |
| Liste des figures : .....  |    |
| Summaries : .....          |    |
| Introduction.....          | 02 |

### Partie 1 : Etude Bibliographique

#### Chapitre I : Syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus

|                                                                        |                    |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1.1. Généralité : .....                                                | 06                 |
| 1.2.Définition de covid 19 : .....                                     | 06                 |
| 1.3.Structureduvirusetorganisation génétique : .....                   | 07                 |
| 1.3.1.Structure : .....                                                | 07                 |
| 1.3.2.Génome : .....                                                   | 07                 |
| 1.3.3. protéine S (spike):.....                                        | 08                 |
| 1.3.4. Protéine d'enveloppe (E) : .....                                | 11                 |
| 1.3.5. Protéase principale : .....                                     | 12                 |
| 1.3.6. ARN polymérase dépendante de l'ARN : .....                      | 15                 |
| 1.4. Symptômes : .....                                                 | 16                 |
| 1.5.Epidémiologie : .....                                              | 17                 |
| 1.5.1.Contagiosité : .....                                             | <a href="#">17</a> |
| 1.5.2.Réservoir : .....                                                | 17                 |
| 1.5.3.Transmission : .....                                             | 18                 |
| 1.5.4.La période d'incubation : .....                                  | 18                 |
| 1.6.Sévérité du SARS- coV 2 avec des caractéristiques typiques : ..... | 18                 |
| 1.6.1.cas asymptomatique ou pré-asymptomatique de COVID-19 : .....     | 19                 |
| 1.6.2.Cas légère de covid 19 : .....                                   | 19                 |
| 1.6.3.Cas modérés de covid 19 : .....                                  | 19                 |
| 1.6.4.Cas grave ou sévère : .....                                      | 19                 |
| 1.6.5.Cas critique de covid 19 : .....                                 | 20                 |
| 1.7.les tests de dépistage du coronavirus: .....                       | 21                 |
| 1.7.1.teste antigénique : .....                                        | 21                 |
| 1.7.2.Teste sérologique : .....                                        | 22                 |

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 1.7.3. Teste virologique :                                | 22 |
| 1.8. LES MÉDICAMENT antiviraux CONTRE LA COVID-19 :       | 23 |
| 1.9. les différents types de vaccins contre la COVID-19 : | 24 |

## **Chapitre II : Les mutations de la COVID-19**

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Séquence de référence :                                                              | 28 |
| 2.2. Variante préoccupante (COV) :                                                        | 28 |
| 2.1.1. Variant Alpha :                                                                    | 28 |
| 2.2.2. Variants beta :                                                                    | 29 |
| 2.2.3. Variant Gamma :                                                                    | 29 |
| 2.2.4. Variant delta :                                                                    | 30 |
| 2.2.5. Variant omicron :                                                                  | 31 |
| 2.2.6. Variant Epsilon :                                                                  | 34 |
| 2.2.7. Variant zêta :                                                                     | 35 |
| 2.2.8. Variant êta :                                                                      | 35 |
| 2.2.9. Variant thêta :                                                                    | 36 |
| 2.2.10. Variant iota :                                                                    | 37 |
| 2.2.11. Variant mu :                                                                      | 38 |
| 2.2.12. Variant kappa :                                                                   | 38 |
| 2.2.13. Variant lambda :                                                                  | 38 |
| 2.3. Autres variantes :                                                                   | 39 |
| 2.4. Visualiseur de génome de variantes (Mullen J, Tsueng G, et int., and tCfVSB, 2022) : | 41 |
| 2.4.1. Les mutations de variant Alpha :                                                   | 41 |
| 2.4.2. Mutation de variant Béta :                                                         | 45 |
| 2.4.3. Les mutations de variant Gamma :                                                   | 48 |
| 2.4.4. Les mutations de variant Delta :                                                   | 50 |
| 2.4.5. Les mutations de variant Delta :                                                   | 58 |

## **CHAPITRE III : Présentation de Vitamine D**

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Généralités :                                        | 62 |
| 3.2. Métabolisme de la vitamine D :                       | 62 |
| 3.2.1. Définition de vitamine D :                         | 62 |
| 3.2.2. Sources de vitamine D :                            | 62 |
| 3.3. Biosynthèse de la vitamine D <sub>3</sub> :          | 65 |
| 3.4. Maladies associées au métabolisme de la vitamine D : | 68 |
| 3.5. Dosage sanguin de la vitamine D :                    | 70 |

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1. Résultats normaux :                                                            | 70        |
| 3.5.2.Taux de vitamine D élevé                                                        | 70        |
| 3.5.3.Taux de vitamine D bas                                                          | 70        |
| <b>3.6.Compléments alimentaires à base de vitamine D : posologie et indications :</b> | <b>71</b> |
| 3.7.Vitamine D comme traitement :                                                     | 71        |
| 3.7.1.QUELLE EFFICACITÉ POUR LA VITAMINE D ? :                                        | 71        |
| 3.7.2. PRÉCAUTIONS À PRENDRE AVEC LA VITAMINE D :                                     | 71        |
| 3.7.3. FORMES ET DOSAGE DE LA VITAMINE D.....                                         | 72        |

#### **Chapitre IV : coronavirus et la vitamine D**

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.la relation entre le covid 19 et la vitamine D3 :                                  | 74        |
| 4.2. Relations avec l'atteinte des voies respiratoires et la réponse immunologique :.. | 74        |
| 4.3. Effets d'un apport complémentaire sur l'évolution de la Covid-19 :.....           | 76        |
| 4.4. La vitamine D diminuerait la gravité de la Covid-19 :.....                        | 77        |
| Partie 2 : Étude expérimentale .....                                                   | <b>82</b> |

#### **Chapitre V : Matériel et méthode**

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Généralité sur l'in silico :                                | 84 |
| 5.2.Définition de l'in silico :                                  | 84 |
| 5.3.Rôle de la méthode :                                         | 85 |
| 5.4. Docking moléculaire :                                       | 85 |
| 5.5.Les protéines :                                              | 86 |
| 5.6. Les molécules en biologie :.....                            | 87 |
| 5.7. La banque de données des protéines .....                    | 88 |
| 5.8.Le problème de Docking :                                     | 89 |
| 5.9. Les méthodes de Docking :.....                              | 90 |
| 5.10. Les algorithmes génétiques :.....                          | 91 |
| 5.11. Les logiciels de Docking :.....                            | 91 |
| 5.11.1. AutoDock :.....                                          | 91 |
| 5.11.2.les modification sur le programme d'autodock 4.2.6 :..... | 93 |
| 5.11.3. L'Utilisation de l'autodock :.....                       | 94 |

#### **Chapitre VI : résultats et discussions**

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 6.1. Docking moléculaire.....                                   | 102 |
| 6.1.1. Les complexes formés sur le programme de Docking : ..... | 102 |
| 6.1.1.1. Le complexe B.1.1.7-VITD3 :.....                       | 104 |
| 6.1.1.2.B.1.351-VITD3 : .....                                   | 106 |
| 6.1.1.3.B.1.617.2-VITD3 :.....                                  | 107 |

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| 6.1.1.4.BA.1-VITD3 : .....                               | 109 |
| 6.2. Les 4 versions de covid 19 et la vitamine D : ..... | 110 |
| Conclusion .....                                         | 112 |
| References.....                                          |     |

# Introduction

## Introduction

La croissance démographique humaine, les avancées technologiques et l'évolution des comportements sociaux conduisent à la sélection de nouveaux pathogènes microbiens. Des médicaments antimicrobiens, des vaccins, des diagnostics et des traitements pour les maladies infectieuses émergentes doivent être développés. Les forces sélectives à l'origine de l'émergence de nouvelles maladies infectieuses et leurs implications pour notre survie commencent à peine à être comprises. Les maladies infectieuses émergentes sont causées par des micro-organismes nouveaux ou non reconnus auparavant. Bien que le terme fasse partie du lexique des journalistes dans les années 1990, les maladies infectieuses émergentes sont depuis longtemps reconnues comme un résultat important de l'évolution hôte-pathogène. Parce que les infections émergentes peuvent avoir de graves conséquences sur la santé publique, elles font l'objet à la fois de la presse populaire et de la recherche scientifique. Cette série de revues, motivée par l'apparition du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), la première maladie infectieuse émergente du 21<sup>ème</sup> siècle(**Vincent R. Racaniello , J Clin Invest, march 2004**).L'épidémie de COVID-19 est devenue une menace clinique pour la population générale et les travailleurs de la santé dans le monde entier. Cependant, les connaissances sur ce nouveau virus restent limitées. L'option efficace de la thérapie antivirale et de la vaccination est actuellement en cours d'évaluation et de développement. Ce que nous pouvons faire maintenant, c'est mettre en œuvre de manière agressive des mesures de contrôle des infections pour empêcher la propagation du SRAS-CoV-2 par transmission interhumaine. Les autorités de santé publique doivent continuer à surveiller la situation, car plus nous en apprenons sur ce nouveau virus et ses épidémies associées, mieux nous pouvons réagir(**Chih-Cheng Lai , Tzu-Ping Shih ,Wen-Chien Ko , Hung-Jen Tang , Po-Ren Hsueh ,2020**). Il est surtout indispensable de développer des traitements cliniquement efficaces pour contenir l'épidémie. La protéase majeure (Mpro) et la polymérase dépendante de l'ARN (RdRP), qui sont respectivement responsables de la protéolyse virale et de la réplication et de la transcription du génome viral, sont des cibles médicamenteuses intéressantes pour le SRAS-CoV-2, bien que leur mode d'action reste inconnu. Il a été rapporté que la vitamine D a de puissants effets antagonistes sur l'agent causal du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Dans ce contexte, l'activité de la vitamine D contre le coronavirus a été évaluée. Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer

les activités potentielles de la vitamine D contre le SRAS-CoV-2 à l'aide d'un programme in silico, , et elle est divisée en trois parties, comme suit :

La première partie est destinée à une étude bibliographique, qui se compose de quatre chapitres :

- Le premier chapitre parle de tout ce qui concerne le SARS-Covid 19
- Le deuxième chapitre parle des mutations et des changements survenus d'une version à l'autre de cov-2
- Le troisième chapitre parle de tout ce qui concerne la vitamine D
- Le quatrième chapitre parle de la relation de covid-19 et la vitamine D

La deuxième partie concerne le travail expérimental qui se divise en deux chapitres :

- Le chapitre cinq contient les matériaux et les méthodes applicables dans notre travail.
- Le chapitre six présente les résultats et leur discussion.

Le travail est enfin complété par une conclusion jugée utile pour valoriser ce travail.

# Première Partie : Etude Bibliographique

# Chapitre I : Syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus

### **1.1. Généralité :**

L'intérêt de l'étude de virus du genre corona virus est en partie lié a leur abondance dans l'environnement. Infectant une grande quantité d'animaux différents, ils ont une importance vétérinaire et économique de aux pathologies grave auxquelles lis sont associes . Infectant l'humain chez qui ils peuvent aussi causer des maladies, leur intérêt scientifique est d'autant plus grandissant depuis la survenue en 2002-2003 du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS ou SARS ) . les coronavirus humains , longtemps associes a des maladie bénignes comme les rhumes saisonnier , montrent de plus en plus d'implication possibles dans des pathologies plus graves ( **jessica Desjardins , 2010**). Les coronavirus sont une vaste famille de virus susceptibles de provoquer des maladies diverses chez l'homme, allant du simple rhume au syndrome respiratoire du Moyen-Orient (mers) et au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Un nouveau coronavirus (sars -cov-2) a été identifié en 2019 à Wuhan, en chine. Il s'agit d'un nouveau coronavirus qui n'avait pas encore été identifié chez l'homme. Cette formation constitue une introduction générale au covid-19. (**bitsha-kitime dieudoné kabkia,2020**)

-**Le SRAS-CoV** (Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) a été identifié en 2002-2004, en Afrique centrale, comme la cause d'une épidémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) .

-**Le MERS-CoV** (syndrome respiratoire du Moyen-Orient) a été identifié en 2012 au Moyen-Orient où il a provoqué des syndromes respiratoires. Depuis lors, 27 pays ont signalé des infections par le MERS-Cov .

-**Le SRAS-CoV-2** est identifié fin 2019 comme la cause de la maladie COVID19 qui aurait commencé à Wuhan, en Chine, et s'est propagée dans le monde entier, provoquant une pandémie qui dure encore aujourd'hui(**Aurélié Blaize ,2020**).

### **1.2.Définition de covid 19 :**

Fin 2019, des cas groupés de pneumonies survenaient en Chine dont certains étaient mortels. Les premiers cas confirmés de Covid-19 ont été détectés le 8 décembre 2019 à Wuhan en Chine. Le 9 janvier 2020, le virus responsable est identifié, il s'agit d'un nouveau coronavirus appelé Sars-CoV-2 responsable d'une maladie baptisée "Covid-

19" par l'OMS. Un an plus tard, les médecins confirment qu'il y a encore beaucoup à apprendre de cette nouvelle maladie.

Covid-19 est le nom donné par l'OMS le 11 février 2020 à une nouvelle maladie infectieuse respiratoire :

- "Co" pour "corona"
- "vi" pour "virus"
- "D" pour "disease" ("maladie" en anglais).
- "19" pour l'année de son apparition : 2019. (**Aurélié Blaize , 2021**)

### **1.3.Structureduvirusetorganisationgénétique :**

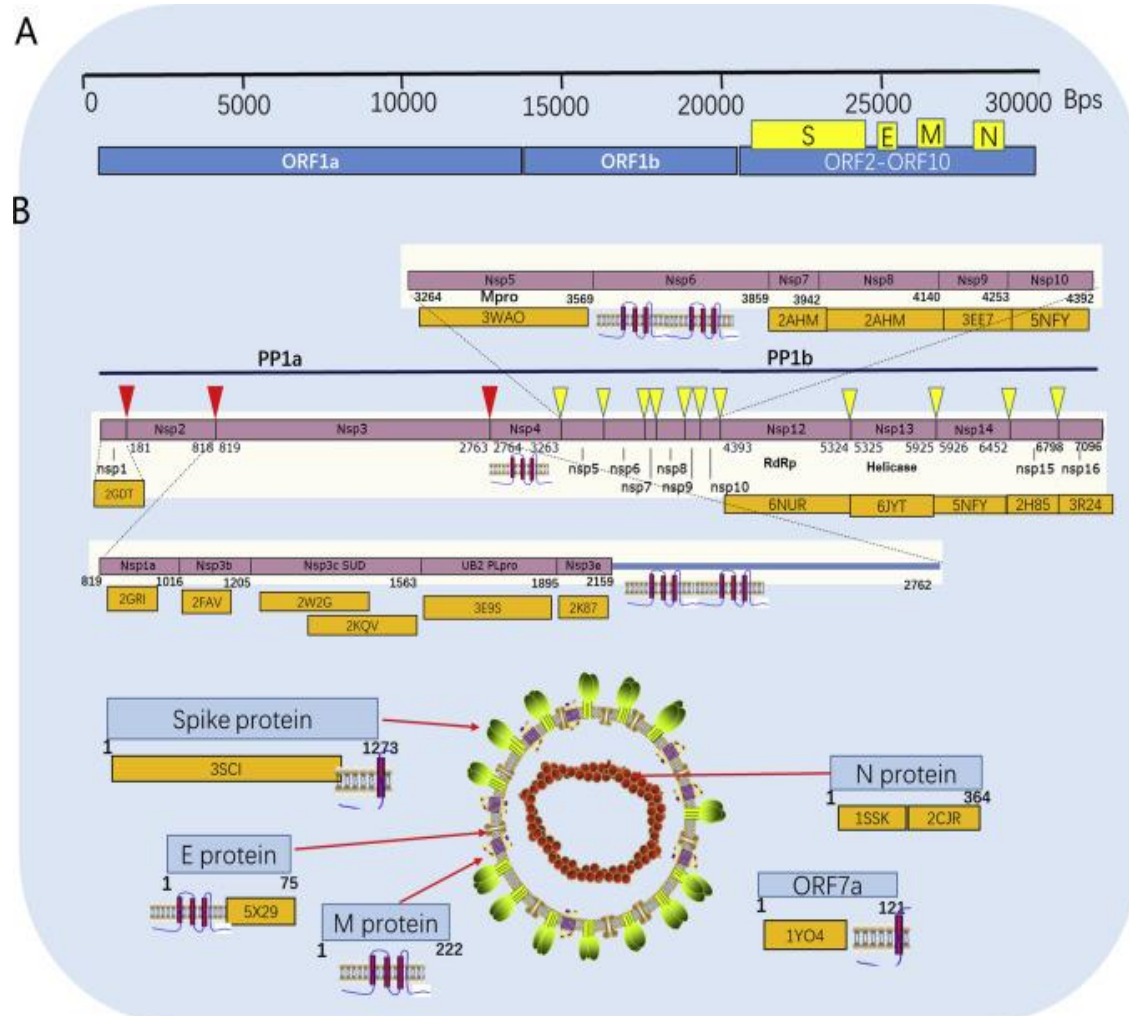
#### **1.3.1.Structure :**

Virus sphérique, enveloppé de 60-220 nm, comprend de l'extérieur vers l'intérieur, la glycoprotéine Spike (S) (donne l'aspect en couronne au virus en microscopie électronique), l'enveloppe, la membrane et la nucléocapside elle-même, icosaédrique à symétrie cubique. Cette dernière contient une molécule de génome viral : de l'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire, non segmenté et positif (29 881 paires de bases). (**Imane Jamaï Amir,\* Zina Lebar, Ghita yahyaoui, et Mustapha Mahmoud ,2020**)

#### **1.3.2.Génome :**

Le génome des CoV comporte un nombre variable de cadres de lecture ouverts (ORF). Les deux tiers de l'ARN viral sont situés principalement dans le premier ORF (ORF1a/b), traduit deux poly protéines, pp1a et pp1b, et code pour 16 protéines non structurales (NSP), alors que les ORF restants codent pour des protéines de structure et des protéines accessoires. Le reste du génome du virus code pour quatre protéines essentielles de structure, dont la glycoprotéine (S), la protéine de l'enveloppe (E), la protéine matricielle (M) et la protéine nucléocapside (N), ainsi que plusieurs protéines accessoires, qui interfèrent avec la réponse immunitaire de l'hôte (**Jia H.P., Look D.C., Shi L,2005**). L'étude de Wu *et al.* a montré une similitude génomique et phylogénétique avec le Sars-CoV, en particulier dans le gène de la glycoprotéine S(**Wu F., Zhao S., Yu B,2020**). Zhang *et al.* ont analysé le génotype de différents patients atteints du Covid-19 et ils ont constaté des modifications rares et spontanées du génome viral (**Liangsheng Zhang,Fu-ming Shen,Fei Chen, and Zhenguo**

**Lin,2020).** L'étude de Tang *et al.* a analysé 103 génomes de patients infectés par le Covid-19 et a permis d'identifier deux souches de Sar-CoV-2 : la souche L et la souche S. La souche L est plus agressive et contagieuse (**Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu, 2020).**



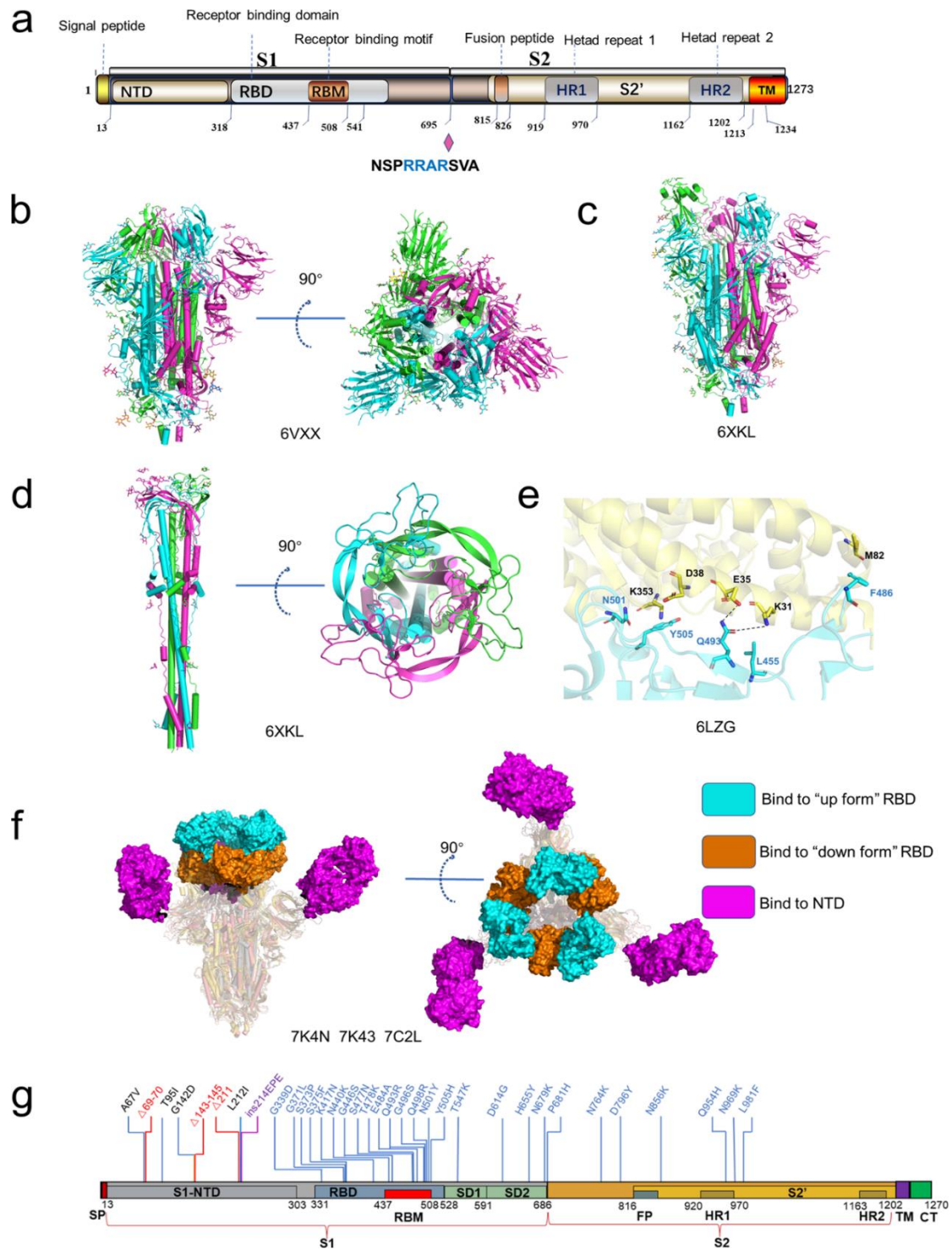
**Figure 1.1 : génome et structure de cov-2**

(CanrongWu, YangLiu, YueyingYang, †,PengZhang, WuZhong, YaliWang, QiqiWang, ,YangXu, MingxueLi, XingzhouLi, MengzhuZheng, LixiaChen, HuaLi,2020)

### 1.3.3. protéine S (spike):

La protéine S est une protéine de fusion transmembranaire de type I fortement glycosylée et composée de 1 160 à 1 400 acides aminés, selon le type de virus. Par

rapport aux protéines M et E qui sont principalement impliquées dans l'assemblage du virus, la protéine S joue un rôle crucial dans la pénétration des cellules hôtes et l'initiation de l'infection. Notamment, la présence de protéines S sur les coronavirus est à l'origine des saillies en forme de pointes trouvées à leur surface. Les protéines S des coronavirus peuvent être divisées en deux sous-unités fonctionnelles importantes, qui comprennent la sous-unité S1 N-terminale, qui forme la tête globulaire de la protéine S, et la région S2 C-terminale qui forme la tige de la protéine et est directement intégrée dans l'enveloppe virale. Lors de l'interaction avec une cellule hôte potentielle, la sous-unité S1 reconnaîtra et se liera aux récepteurs de la cellule hôte, tandis que la sous-unité S2, qui est le composant le plus conservé de la protéine S, sera responsable de la fusion de l'enveloppe du virus avec le membrane de la cellule hôte. Alors comment la protéine S permet aux coronavirus de pénétrer dans les cellules Une fois que la sous-unité S1 se lie aux récepteurs de la cellule hôte, deux changements conformationnels majeurs doivent se produire pour que la sous-unité S2 achève la fusion du virus à la membrane cellulaire. Les deux composants de la sous-unité S2 qui sont impliqués dans la fusion du coronavirus comprennent les régions de répétition heptade (HR) un et deux, autrement appelées HR1 et HR2 . La première conformation, autrement appelée pré-épingle à cheveux, implique la transformation d'un lieu non structuré au sein de la sous-unité S2 pour devenir hélicoïdal. Le deuxième changement conformationnel à se produire implique l'inversion de l'hélice C de cette sous-unité vers la bobine, entraînant la formation d'un faisceau de six hélices. Une fois ces conformations terminées, le peptide de fusion est ancré à la membrane de la cellule hôte pour permettre au virus de se rapprocher de la membrane cellulaire et éventuellement de délivrer la nucléocapside à la cellule cible. **(benedette Cuffari M.Sc, Emily Henderson B.Sc,2021)**



**Figure 1.2 : Les structures de la protéine S (Can rong wu,wan chao yin, yi jiang , H.eric Xu,2022)**

- a-** Schéma de l'architecture du domaine de la protéine SARS-CoV-2 S. Les sous-unités S1 et S2 sont indiquées, le losange représentant les emplacements du site de clivage de la furine. Peptide signal SP, domaine de liaison au récepteur

RBD, motif de liaison au récepteur RBM, sous-domaine SD1 1, sous-domaine SD2 2, peptide de fusion FP, répétition heptade HR1 1, répétition heptade HR2 2, région transmembranaire TM, queue cytoplasmique CT

- b-** Vues de côté et de dessus de la structure de préfusion de la protéine S du SRAS-CoV-2 avec tous les RBD dans la conformation « vers le bas » (PDB : 6VXX). La protéine est représentée sous forme de dessin animé et les glycosyles sont représentés sous forme de bâtons.
- c-** vue latérale de la structure de préfusion de la protéine S du SARS-CoV-2 avec un RBD dans la conformation « up » (PDB : 6XKL).
- d-** Vues de côté et de dessus de la structure post-fusion de la protéine SARS-CoV-2 S (PDB : 6M3W).
- e-** structure du SARS-CoV-2 RBD complexé avec ACE2 (PDB : 6LZG). ACE2 est représenté en jaune. Le RBD est représenté en cyan. Les résidus de contact clés sont représentés sous forme de bâtons aux interfaces SARS-CoV-2 RBD – ACE2.
- f-** Vues latérales et de dessus de trois structures cryo-EM superposées de SARS-CoV-2 S en complexe avec des nAbs. S2E12 (représenté par une surface cyan) se lie à la conformation « up » du SARS-CoV-2 S RBD (PDB : 7K4N) ; S2M11 (représenté par une surface brune) se lie à la conformation « vers le bas » du SARS-CoV-2 S RBD (PDB : 7K43) ; 4A8 (représenté par une surface magento) se lie au NTD du SARS-CoV-2 S (PDB : 7C2L).
- g-** Acides aminés mutés dans la protéine variante S d'Omicron.

#### **1.3.4. Protéine d'enveloppe (E) :**

La protéine E est une petite protéine membranaire intégrale mais peut-être la plus énigmatique. Il est principalement exprimé dans les cellules infectées au cours du cycle de réplication, et seule une infime fraction est intégrée à l'enveloppe du virus. La protéine E est essentielle à l'assemblage et à la maturation du virus. Ils ont trois domaines: l'extrémité hydrophile des acides aminés se compose de 7 à 12 acides aminés, le domaine hydrophobe transmembranaire contenant 25 acides aminés et une longue extrémité C-terminale avec la majorité des protéines. Le domaine transmembranaire (TMD) comprend deux acides aminés impartiaux non polaires : Leu et Val confèrent une hydrophobicité solide à la protéine E. La région centrale

[TMD] est non chargée, qui est flanquée d'un côté par l'acide aminé chargé négativement et de l'autre côté via l'extrémité carboxy de charges variables, qui ensemble donnent au peptide E une charge nette brute de zéro. La protéine E du SRAS-CoV contient un thème restrictif appelé protéine d'épaisseur post-synaptique 95 (PSD95), Drosophila plate massive tumour silencer (Dlg1), Zonula occludens-1 protein (zo-1), PBM trouvé dans les quatre derniers acides aminés corrosifs du Fin C. La zone PDZ peut se lier à l'extrémité C de la protéine connecteur cellulaire engagée dans le processus cellulaire qui provoque la maladie virale. L'analyse génétique de la protéine E a révélé que les séquences protéiques du SRAS-CoV-2 présentent une identité élevée à partir de l'isolat de pangolin et de chauve-souris. En outre, les preuves ont révélé une caractéristique distinctive des variants E du SARS-CoV-2 en présence d'Arg en position 69, qui remplace Asp, Glu et Gln dans les protéines homologues du SARS-CoV-1 E. Par ailleurs, il existe une délétion en position 70, qui correspond à Cys ou Gly dans les autres protéines homologues et d'autres variations existantes aux positions 37, 55 à 56, et en 72 (**S.udhaya kumar , N.Madhana Priya, S.R.Nithya, Priyanka Kannan, Nikita Jain, D.Thirumal kumar,R.Magesh, Salma Younes , Hatem Zayed, C.Georgepriya Doss,2021**).

#### **1.3.5. Protéase principale :**

Le génome du SRAS-CoV code pour de nombreuses protéines, dont le gène de la réplicase, élément vital du génome CoV, codant pour 16 NSP qui constituent deux grands polypeptides, PP1a PP1ab. Deux types de protéases à cystéine fonctionnent sur ces PP pour activer les NSP. La cystéine protéase de type chymotrypsine clive l'extrémité C-terminale de ces PP, et le Mpro traite l'extrémité N-terminale, appelée protéase de type papaïne (PLpro). PLpro excise les trois premiers sites de clivage dans les PP, tandis que CLpro clive les 11 sites restants, entraînant la libération de 16 NSP. Mpro, 3CL est une enzyme critique pour le cycle de vie du virus. Son activité produit des protéines non structurales qui sont cruciales pour la réplication du génome et la production de virions de coronavirus : l'ARN polymérase dépendante de l'ARN, une hélicase, des ribonucléases et 3CLpro lui-même, à partir de deux types de polyprotéines (pp1a et pp1ab). La maturation du virus SARS-Cov2 (coronavirus du SRAS) dépend du clivage des grandes polyprotéines 1a et 1ab qui se chevauchent par deux protéases virales :

-Mpro (protéase principale)

-PLpro (protéase semblable à la papaïne)(**Sigma-Aldrich,2021**)

#### **a- Mpro (protéase principale) :**

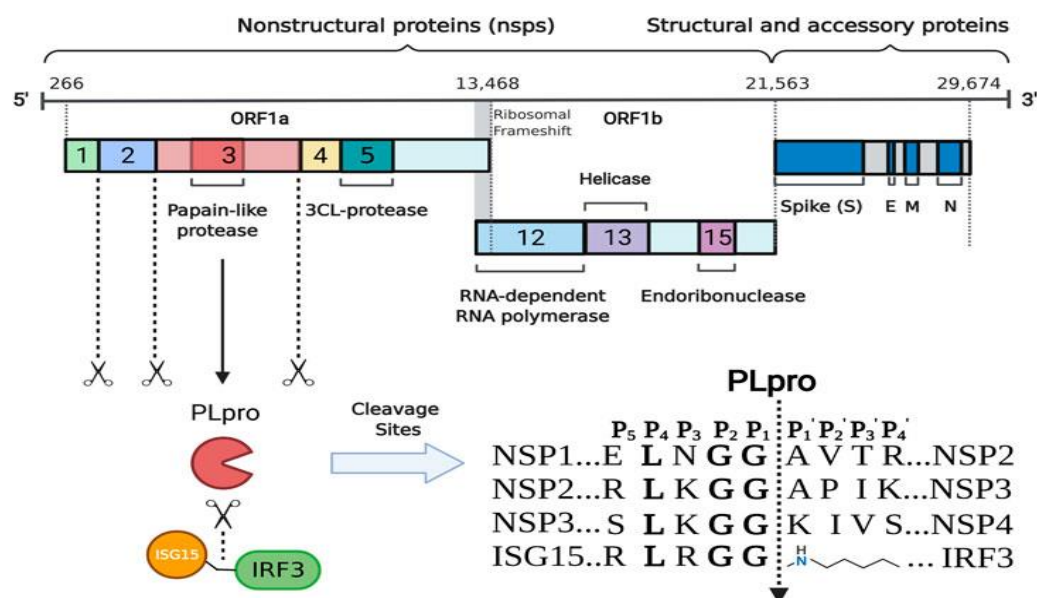
Le Mpro clive en pas moins de 11 sites sur la grande polyprotéine 1ab avec la séquence de reconnaissance de L-Q↓ (S, A, G) (↓ fait référence au site de clivage).<sup>25</sup> Le Mpro du SRAS-CoV-2 est un homodimère de 67,6 kDa cystéine protéase ayant une énorme identité de séquence avec SARS-CoV Mpro . Mpro de CoV forme un dimère où chaque monomère est constitué d'une région catalytique N-terminale et d'une région C-terminale. De plus, les résidus N-terminaux forment un pli typique de la chymotrypsine tandis que les résidus C-terminaux forment un domaine supplémentaire. De plus, chaque protomère contenant trois domaines tels que les domaines I (résidus 8 à 101), II (résidus 102 à 184) et le domaine III (résidus 201 à 303).<sup>22</sup> Les domaines I et II épousent un double pli en tonneau  $\beta$  et le site actif est situé dans une fente peu profonde entre deux barillets  $\beta$  antiparallèles . Notamment, le domaine du faisceau hélicoïdal terminal C, domaine III, pourrait impliquer la stabilisation de leurs formes homodimères actives. Le site actif peut être subdivisé en plusieurs (sous)sites. Notamment, la dyade catalytique formée par H41-C145 est observée au site S1 . Les chaînes latérales hydrophobes se trouvent principalement sur les sites S2 et S4. La liste des résidus d'acides aminés jouant un rôle clé dans le SRAS-CoV-2 Mpro est mise en évidence dans le tableau 1.( **Sk. Abdul Amin , Suvankar Banerjee , Kalyan Ghosh , Shovanlal Gayen, Tarun Jha,2021**)

| <b>Rôle dans SARS-CoV-2 Mpro</b> | <b>Résidu</b>                                                                          |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Duo catalytique                  | H41, C145                                                                              |
| Liaison au substrat              | H41, M49, G143, S144, H163, H164, M165, E166, L167, D187, R188, Q189, T190, A191, Q192 |
| Dimérisation                     | R4, S10, G11, E14, N28, S139, F140, S147, E290, R298                                   |

**Tableau 1.1 : La liste des résidus d'acides aminés joue un rôle important dans le SARS-CoV-2 Mpro.**

**b-PLpro (protéase semblable à la papaine) :**

La protéase de type papaine PLpro est une enzyme essentielle du coronavirus qui est nécessaire au traitement des polyprotéines virales pour générer un complexe de réplicase fonctionnel et permettre la propagation virale<sup>1,2</sup>. PLpro est également impliqué dans le clivage des modifications post-traductionnelles protéiques sur les protéines de l'hôte en tant que mécanisme d'évasion contre les réponses immunitaires antivirales de l'hôte<sup>3-5</sup>. SARS-CoV-2 PLpro est une protéine légèrement basique de 315 résidus avec une teneur élevée en résidus de cystéine (3,5%). En plus de la Cys111 catalytique, il existe quatre résidus cystéine coordonnant d'importants ions zinc structuraux et six autres répartis dans toute la structure protéique. Et le rôle important de plpro que nous montrons dans la figure 3(Jerzy Osipiuk, Saara-Anne Azizi, Steve Dvorkin, Michael Endres, Robert Jedrzejczak, Krysten A. Jones, Soowon Kang, Rahul S. Kathayat, Youngchang Kim, Vladislav G. Lisnyak, Samantha L. Maki, Vlad Nicolaescu, Cooper A. Taylor, Christine Tesar, Yu-An Zhang, Zhiyao Zhou, Glenn Randall, Karolina Michalska, Scott A. Snyder, Bryan C. Dickinson, Andrzej Joachimiak, 2021).



**Figure 1.3 : Représentation schématique de la production et de la fonction du SARS- CoV- 2 PLpro.**

L'ARN à brin positif (les chiffres indiquent la position du nucléotide), y compris l'ORF 1a/b, les protéines structurales S (pointe), E (enveloppe), M (membrane) et N (nucléocapside) sont représentés. PLpro est codé par une partie de nsp3. Il est capable de faire mûrir nsp1-3 et de cliver préférentiellement la protéine de type ubiquitine ISG15 de IRF3 en reconnaissant des sites de clivage spécifiques (Haihai Jiang, Peiyao Yang, and Jin Zhang ,2022).

#### 1.3.6. ARN polymérase dépendante de l'ARN :

Nsp12 fonctionne comme une ARN polymérase dépendante de l'ARN et est un composant central de la machinerie de réplication-transcription (Hillen HS, Kokic G, Farnung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P,2020). Les facteurs auxiliaires nsp7 et nsp8 sont essentiels pour améliorer la liaison de nsp12 à la matrice d'ARN et son activité enzymatique (Kirchdoerfer RN, Ward AB,2019). L'association des ARN nsp7–nsp8–nsp12 et matrice-amorce constitue les composants minimaux d'un holo-RdRp fonctionnel, qui est le composant principal du SARS-CoV-2 RTC (Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E,2014). Plusieurs structures d'holo-RdRp ou d'holo-RdRp complexées avec des inhibiteurs ont été déterminées par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Kabinger F, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, et al,2021). Ces structures donnent un aperçu de l'architecture moléculaire des composants holo-RdRp. La sous-unité nsp12 contient principalement plusieurs domaines hautement conservés dans le coronavirus, dont un domaine d'extension spécifique au nidovirus (NiRAN), un domaine de polymérase C-terminal et un domaine d'interface au milieu. L'épingle à cheveux  $\beta$  (résidus V31 à K50), un domaine conservé unique situé en amont du domaine NiRAN, est pris en sandwich par le sous-domaine NiRAN et palm dans le domaine polymérase et stabilise la structure globale. Yan et al. ont révélé que le NiRAN catalyse la formation de la structure du noyau de la coiffe (GpppA) (Yan L, Ge J, Zheng L, Zhang Y, Gao Y, Wang T, et al,2021). Le domaine central de la polymérase C-terminale de nsp12 adopte une conformation droite en coupe classique, composée des sous-domaines du doigt, de la paume et du pouce et de plusieurs motifs structuraux conservés. L'hétérodimère SARS-CoV-2 nsp7-nsp8 partage une similitude structurale significative avec celui du SARS-CoV. L'hétérodimère nsp7-nsp8 se lie au-dessus du

sous-domaine du pouce et prend en sandwich les boucles de doigt étendues pour stabiliser nsp12. Nsp7 contribue à la majeure partie de la liaison de l'hétérodimère à nsp12, tandis que nsp8 contacte peu nsp12. Le deuxième nsp8 (nsp8-2) s'attache au sommet du sous-domaine du doigt et forme des interactions supplémentaires avec le domaine d'interface. Les sites actifs de SARS-CoV-2 RdRp et la reconnaissance de l'ARN ont été résumés et discutés en détail dans la revue précédente ( **Jiang Y, Yin W, Xu HE,2021**)

#### **1.4. Symptômes :**

Les symptômes du COVID-19 semblent être similaires à ceux du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), à partir de 2 à 14 jours d'exposition au SRAS-CoV-2, les symptômes comprennent, mais sans s'y limiter, la fièvre, la fatigue et la toux sèche. Dans certains cas, les patients peuvent avoir des courbatures, une congestion nasale, un écoulement nasal, des maux de gorge ou de diarrhée, une nouvelle perte de goût ou d'odorat, des tremblements répétés accompagnés de frissons. Ces symptômes sont généralement légers et commencent progressivement. Certaines personnes (asymptomatiques) sont infectées mais ne développent aucun symptôme et ne vous sentez pas mal. Plus récemment, une étude portant sur plus de 26 000 adultes français a été menée dans laquelle des symptômes physiques persistants ont été signalés. Certains des symptômes extrêmes du COVID-19 impliqueraient des lésions tissulaires par le système immunitaire des patients et l'étude a indiqué une augmentation des activités des molécules du système immunitaire et l'interleukine (IL-6) aiderait à la régulation cellulaire. L'inflammation à long terme des poumons serait l'un des symptômes respiratoires graves du COVID-19, qui proviendrait des cellules immunitaires spécifiques. Une étude menée sur 88 sujets atteints de pneumonie grave causée par une infection par le SRAS-CoV-2, la plupart des individus ayant un nombre élevé de lymphocytes T trouvés dans les poumons, a indiqué que près de 70 % des macrophages alvéolaires, qui sont des cellules immunitaires typiques situées dans les poumons contenaient le SRAS-CoV-2. Presque toutes les variantes, y compris delta et omicron, provoquent des symptômes COVID-19 similaires qui peuvent persister dans le temps. Ces symptômes comprennent la fatigue, l'essoufflement ou la difficulté à respirer, la toux, les douleurs articulaires, les douleurs thoraciques, la concentration de la mémoire ou les problèmes

de sommeil, les étourdissements, la dépression ou l'anxiété, les battements cardiaques rapides ou forts, l'aggravation des symptômes après des activités physiques ou mentales, ce qui peut causer des troubles musculaires. ou courbatures, peau, lèvres ou ongles de couleur pâle, grise ou bleue, selon le teint de la peau, incapacité à se réveiller ou à rester éveillé, nouvelle perte de goût ou d'odorat, mal de gorge, congestion ou écoulement nasal, nausées ou vomissements, et dans certains cas, diarrhée et/ou symptômes gastro-intestinaux (GI) dus à l'excrétion du virus. D'autre part, l'omicron est moins susceptible de provoquer une maladie grave telle qu'une pneumonie pouvant nécessiter une hospitalisation, mais son taux de propagation est plus élevé, certaines preuves indiquant que moins de personnes perdent le goût et l'odorat (**V.Peyronnet , J.Sibiude , P.Deruelle , C.Huissoud , X.Lescure , J.-C.Lucet , L.Mandelbrot , I.Nisand , C.Vayssière , Y.Yazpandanah , D.Luton , O.Picone,2020**)

### **1.5.Epidémiologie :**

#### **1.5.1.Contagiosité :**

Le taux de reproduction ( $R_0$ ) est un indicateur qui apprécie le potentiel de contagiosité d'un agent infectieux. C'est le nombre moyen de sujets auxquels un malade risque de transmettre la maladie dans une population non immunisée contre le virus. Si le  $R_0$  est supérieur à 1, alors la maladie tend à s'étendre d'elle-même en l'absence d'action. Il faut dire que le confinement réduit sensiblement ce fameux indice. Des études supposent que le risque de contamination est plus important les premiers jours d'apparition des signes cliniques et pourrait persister plus de trois semaines (**Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D,2020- Chen H., Guo J., Wang C,2020**).

#### **1.5.2.Réservoir :**

Plusieurs études ont suggéré que la chauve-souris pourrait être le réservoir potentiel du Sars-CoV-2. Toutefois, jusqu'à présent rien ne prouve que l'origine du (2019 n CoV) provenait du marché de fruits de mer de Wuhan. Les chauves-souris sont le réservoir naturel d'une grande variété de CoV, y compris les virus de type Sars-CoV et de type Mers-CoV (**Imane Jamai Amir,\* Zina Lebar, Ghita yahyaoui, et Mustapha Mahmoud,2020**).

### **1.5.3.Transmission :**

Initialement, on pensait que ce virus est transmis de l'animal à l'homme, puisque plus de la moitié des sujets atteints avaient fréquenté le marché de fruits de mer, cependant les jours suivants ont permis d'écarter cette hypothèse. Actuellement, il est admis que la transmission interhumaine est la principale voie de transmission . Le virus peut pénétrer dans l'organisme par contact avec les yeux, nez, bouche avec des mains contaminées, par inhalation de gouttelettes/sécrétions d'un malade, ou en cas de contact avec des surfaces infectées.Jusqu'à présent, la transmission verticale n'a pas été confirmée, cependant plusieurs cas de transmission postnatale ont été rapportés (**Tephanie H.R., Sarah H.W ,2020**). Par ailleurs, l'isolement d'ARN viral dans le sang et les selles a évoqué la possibilité d'une contamination sanguine ou oro-fécale qui n'a toutefois pas été démontrée à ce jour (**Chen W, Lan Y, Yuan X,2020 - Wang W, Xu Y, Gao R,2020**). La contamination par la muqueuse oculaire pourrait être possible (**Wu P, Duan F, Luo C,2019**).Une étude réalisée à l'hôpital de Zhongnan de l'université de Wuhan a montré que 29 % du personnel médical et 12,3 % des agents de sécurité ont attrapé le Covid-19 en milieu hospitalier (**Li Q, Guan X, Wang X,2020**).

### **1.5.4.La période d'incubation :**

C'est l'intervalle entre la date d'un premier contact potentiel avec un patient suspect ou confirmé de Covid-19 et la date d'apparition des signes cliniques, notion importante pour déterminer la durée de l'isolement afin de contrôler la propagation de l'infection. La période d'incubation varie de deux à quatorze jours (médiane cinq jours). Or, l'étude de Guan *et al.*, réalisée sur un large échantillon, a suggéré une moyenne de trois jours, avec une extrême arrivant à 24 jours (**Backer J.A., Klinkenberg D., Wallinga J,2020**).

### **1.6.Sévérité du SARS- coV 2 avec des caractéristiques typiques :**

Dans la plupart des cas, quand une personne est contaminée par le coronavirus, elle développe des symptômes. Ces signes cliniques varient d'un organisme à l'autre : fièvre, maux de tête, maux de gorge, perte du goût et de l'odorat, toux sèche, fatigue, essoufflement, frissons, troubles digestifs avec ou sans nausées ou encore conjonctivite. La majorité des cas confirmés en laboratoire, 80% selon l'OMS, présente "*des formes légères à modérées*" de Covid-19. Aussi, entre 20 et 50% des

patients selon les études ne présentent aucun signe clinique. D'après une dernière étude chinoise de grande ampleur, ce sont 40,5% des cas confirmés de Covid-19 qui développeraient des infections de manière asymptomatique(Valantine poingnon , Pr Anne-Claude Crémieux,2021.

#### **1.6.1.cas asymptomatique ou pré-asymptomatique de COVID-19 :**

Les cas asymptomatiques de COVID-19 sont des personnes infectées par le SRAS-COV-2 mais qui ne présentent pas de symptômes de COVID-19. Ces personnes ont été testées positives au SARS-COV-2, mais n'ont pas développé de symptômes tels que fièvre, toux ou difficultés à respirer. Elles peuvent être dans le déni de leur état d'infection ou mettre en doute la validité des méthodes de test. Elles ont donc tendance à refuser ou à ignorer tout conseil en matière de respect des mesures de santé publique visant à prévenir la transmission de la maladie à d'autres membres de leur famille, à leurs amis et à la communauté(Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al ,2020).

#### **1.6.2.Cas légère de covid 19 :**

Symptômes légers (toux, fièvre, problème d'odorat, etc.). Le virus poursuit sa réplication et c'est ce qui occasionne les symptômes. Certains traitements expérimentaux, comme les anticorps monoclonaux, visent à réduire la charge virale à ce stade de l'infection. Il n'existe cependant pas encore de résultats scientifiques justifiant l'intégration de ces remèdes dans la pratique régulière( Alexis Riopel,2020).

#### **1.6.3.Cas modérés de covid 19 :**

Symptômes modérés (infection du système respiratoire inférieur, taux d'oxygène sanguin égal ou supérieur à 94%). Pour ces patients, une hospitalisation peut se révéler nécessaire. La réplication virale est encore le moteur de la maladie, mais des problèmes d'inflammation peuvent s'y additionner. L'administration de remdésivir, un antiviral surtout utilisé dans les cas les plus sévères, peut commencer à être envisagée par les professionnels de la santé( Alexis Riopel,2020).

#### **1.6.4.Cas grave ou sévère :**

Symptômes graves (taux d'oxygène sanguin inférieur à 94%, respiration rapide, accumulation de liquide dans les poumons). L'hospitalisation est nécessaire. Pour ces malades, la réaction disproportionnée du système immunitaire est la cause principale des symptômes. Un apport supplémentaire en oxygène peut aider. À partir de ce stade,

l'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde qui calme la réponse immunitaire, est envisageable( Alexis Riopel,2020).

#### 1.6.5.Cas critique de covid 19 :

Symptômes critiques (insuffisance respiratoire, dysfonctionnement de certains organes). L'emballement du système immunitaire met en danger la vie de ces patients. Toutes les stratégies cliniques mentionnées précédemment peuvent être utilisées(Alexis Riopel,2020).et le tableau suivant montre les symptômes et les résultats les plus importants en fonction de l'état du patient :

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Asymptomatique</b> | <p><b>Manifestations cliniques</b> : Absentesousignes typique et atypiques</p> <p><b>résultats d'imagerie</b> :aucun changement dans les tomodensitogrammes ( CT) et les radiographies (X-ray scans)</p> <p><b>Autres</b> : tests positifs pour le sras cov 2</p>                                                                                                                                                               |
| <b>Légère</b>         | <p><b>Manifestations cliniques:</b></p> <p>- <b>Typiques</b> :Fièvre ,toux sèche, maldegorgeécoulementnasal, fatigue,myalgies, céphalées,anosmie.</p> <p>-<b>Atypiques</b> :nausées,vomissements,diarrhée, douleursabdominales.</p> <p><b>Résultats d'imagerie</b> : généralement aucun changement dans les tomodensitogrammes et les radiographies</p> <p><b>A u t r e s</b> : absence de toute manifestation de pneumonie</p> |
| <b>Modéré</b>         | <p><b>Manifestations cliniques:</b> Présence desymptômes depneumonie,fièvre&gt;37.8,toux sèche</p> <p><b>Résultats Imagerie:</b>généralement la présence d'opacités en verre dépoli et de consolidation pulmonaire</p> <p><b>Autres</b> : crépitements ou respiration sifflante lors de l'auscultation pulmonaire</p>                                                                                                           |
| <b>Sévère</b>         | <p><b>Manifestationscliniques:</b>dyspnée,hypoxie,extensions deslésions&gt;50%,diarrhée,vomissements,nausées</p> <p><b>Résultats Imagerie:</b> opacités en verre dépoli, consolidation pulmonaire, épanchement pleural, lymphadénopathie</p> <p><b>Autres</b> : détérioration continue des résultats cliniques des patients</p>                                                                                                 |

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clinique | <p><b>Manifestations cliniques:</b> difficulté respiratoire grave et essoufflement, douleurs thoraciques, troubles des mouvements, perte de la parole.</p> <p><b>Résultats Imagerie:</b> opacités en verre dépoli (généralement bilatérales), consolidation pulmonaire, nodules pulmonaires.</p> <p><b>Autres:</b> aggravation continue des résultats cliniques des patients, complications les plus fréquentes, troubles respiratoires aigus, syndrome d'angoisse ou insuffisance respiratoire, lésion myocardique, arythmie ou insuffisance cardiaque, lésions maternelles aiguës, lésions hépatiques aiguës, encéphalopathie, coagulation intravasculaire disséminée, rhabdomyolyse, choc septique ou multiple dysfonction d'organe</p> |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Tableau 1.2 : la Sévérité du SARS- coV 2 (J Clin Med.2020)**

### **1.7.les tests de dépistage du coronavirus:**

#### **1.7.1.teste antigénique :**

Les tests de détection rapides des antigènes ou TDRA (souvent appelés tests rapides) sont utilisés pour détecter les protéines virales. Bien que la technologie progresse, les tests de dépistage des antigènes sont généralement moins sensibles que les tests de détection moléculaires pour diagnostiquer la COVID-19 chez les personnes qui n'ont aucun symptôme de maladie (asymptomatique). Cependant, les tests de dépistage des antigènes sont utiles pour dépister la maladie chez les personnes asymptomatiques s'ils sont effectués à intervalles réguliers (appelés tests en série)(canada , ca.2022).

L'objectif des tests est d'identifier les personnes contagieuses et à risque de transmission. Des études<sup>8, 9, 10</sup> examinant la période infectieuse des patients atteints de COVID-19 ont montré que le virus peut être cultivé à partir de patients dans les 8 premiers jours suivant l'apparition des symptômes. Ce résultat correspond aux recommandations des fabricants selon lesquelles les TDR-Ag peuvent être utilisés dans les 5 à 7 premiers jours suivant l'apparition des symptômes (tableau 1). Les TDR Ag peuvent ne pas être aussi précis que les tests moléculaires, mais ils sont plus accessibles en termes de disponibilité et de facilité d'utilisation, et peuvent être utilisés pour étendre les tests en dehors des laboratoires, y compris des tests répétés fréquents si nécessaire. La disponibilité des résultats en 15 à 20 minutes et la

fréquence des tests ont été démontrées par des études de modélisation comme étant plus importantes que la sensibilité (**Prof Rosanna W Peeling PhD , Prof Piero L Olliaro MD , Debrah I Boeras PhD , Noah Fongwen MD ,2021**).

### **1.7.2. Teste sérologique :**

Les tests sérologiques constituent une autre catégorie de tests. Ils sont destinés à identifier les personnes ayant développé une immunité contre le SARS-Cov-2. Ils nécessitent un prélèvement sanguin (il n'est pas nécessaire d'être à jeun) et recherchent les anticorps produits par les cellules immunitaires d'un patient pour se défendre contre un agent pathogène. Une ordonnance n'est pas nécessaire mais permet d'être remboursé. Les résultats sont obtenus en 24h. Le test rapide d'orientation diagnostique - TROD, est effectué par prélèvement d'une goutte de sang, et peut être réalisé par les pharmaciens depuis le 11 juillet 2020 (**le Service Public d'Information en Santé ,2021**)

### **1.7.3. Teste virologique :**

Les tests PCR Covid-19 sont des tests dits « virologiques » qui fonctionnent par prélèvement nasopharyngé (par le nez). Déployés sur tout le territoire français, ce sont les tests plus recommandés pour savoir si l'on est infecté par le coronavirus.

- Ces tests Covid-19 permettent de détecter l'ARN du virus.
- Grâce à eux, il est possible de poser un diagnostic assez tôt en début d'infection, dès les premiers jours suivants l'apparition des symptômes.
- Le résultat vous permet de savoir si vous êtes actuellement porteur du coronavirus et contagieux.
- Le test PCR permet également de détecter certaines nouvelles souches du coronavirus, notamment la britannique.

Le prélèvement pour un test PCR se fait à l'aide d'un petit écouvillon inséré dans le nez et peut être réalisé par différents professionnels de santé (médecins, infirmiers...).

Les échantillons sont ensuite analysés en laboratoire pour confirmer ou non l'infection au coronavirus. Tout le monde peut se faire dépister de la Covid-19 grâce aux tests PCR, sauf les enfants de moins de 6 ans, pour qui ils sont déconseillés. On peut également effectuer une aspiration des sécrétions nasales en cas de suspicion d'infection à la covid-19 chez le nourrisson (**Zoé Falgarone, 2022**).

### **1.8.LES MÉDICAMENT antiviraux CONTRE LA COVID-19 :**

- ✓ Le remdésivir (VEKLURY)
- ✓ le molnupiravir (LAGEVRIO)
- ✓ le nirmatrelvir/ritonavir (PAXLOVID)
- ✓ Le RONAPREVE (casirivimab/imdevimab)
- ✓ Le EVUSHELD (tixagévimab/cilgavimab)
- ✓ Le XEVUDY (sotrovimab)
- ✓ La dexaméthasone
- ✓ Le tocilizumab (ROACTEMRA)
- ✓ L'anakinra (KINERET)
- ✓ divers antibiotiques, dont l'azithromycine
- ✓ la vitamine D
- ✓ l'hydroxychloroquine
- ✓ l'ivermectine
- ✓ le nitazoxanide
- ✓ la chlorpromazine
- ✓ la colchicine
- ✓ la ciclosporine
- ✓ les antiviraux lopinavir, ribavirine, favipiravir, oseltamivir et sofosbuvir
- ✓ le clofoctol (**vidal ,2022**)
- ✓ Ronapreve
- ✓ Regkirona
- ✓ L'Evusheld
- ✓ le bamlanivimab/etesivimab
- ✓ les corticoïdes
- ✓ l'oxygénothérapie

- ✓ Les AINS
- ✓ Le prophylactique à base d'anticoagulants( **Marcel Ichou,2022**)

### **1.9.les différents types de vaccins contre la COVID-19 :**

Il existe 4 types de vaccins injectables contre la COVID-19 : Quel que soit le vaccin, le principe est le même : il s'agit de présenter un élément exogène (virus, parasite, bactérie, molécule nouvelle) à notre système immunitaire afin qu'il apprenne à le reconnaître et à fabriquer des anticorps spécifiques qui seront prêts à le neutraliser lorsque nous le rencontrerons plus tard. Le vaccin va permettre le développement de cellules immunitaires "mémoires", capables de reconnaître immédiatement l'agent pathogène s'il venait à infecter l'individu par la suite. On distingue deux types de réactions immunitaires ciblées : la réaction humorale (par le biais d'anticorps) et la réaction cellulaire (par le biais de globules blancs destinés à détruire l'élément infectant ou les cellules infectées). Ces deux éléments sont durables : quelques mois à quelques années pour les anticorps (et les cellules mémoires pourront en fabriquer de nouveau), quelques années ou toute la vie pour les globules blancs.

#### **1) Les vaccins à ARN**

Ces vaccins contiennent une molécule d'ARN, c'est-à-dire du matériel génétique qui va permettre aux cellules humaines de produire transitoirement certaines protéines du virus, mais pas de coronavirus entiers. Dans le cas de la COVID-19, c'est l'ARN messager codant la protéine de pointe Spike du SARS-CoV-2 qui est utilisé. Isolée, cette protéine Spike ne rend pas malade mais elle est reconnue par le système immunitaire qui va développer des défenses immunitaires contre elle. L'ARN du vaccin est fragile. Il est protégé par une enveloppe qui peut être synthétique (des particules lipidiques pour les vaccins Moderna et Pfizer) ou dérivée de substances naturelles. Il est à noter que l'ARN du vaccin est dégradé en quelques jours par les cellules humaines.

exemples :

- vaccin ARNm-1273 développé par Moderna et les National Institutes of Health
- vaccins BNT162b1 et BNT162b2 de Pfizer et BioNtech

## **2) Les vaccins à vecteurs viraux recombinants**

Un autre moyen d'acheminer une partie du matériel génétique du coronavirus dans les cellules humaines afin qu'elles produisent certaines protéines du SARS-CoV-2, est d'utiliser un vecteur viral. C'est un virus modifié et inoffensif conçu pour transporter de l'information génétique. Le vecteur viral utilisé n'est pas celui qui cause la COVID-19 mais un adénovirus, un virus responsable de certains rhumes, chez l'homme ou le chimpanzé. Une fois injecté dans le corps, l'adénovirus va infecter temporairement les cellules et leur permettre de produire une protéine particulière du coronavirus (toujours la protéine Spike pour les vaccins en cours de développement). Cette protéine ne rend pas malade mais est reconnue par le système immunitaire qui va alors développer des défenses immunitaires contre elle.

exemples :

- vaccin d'AstraZeneca et de l'université d'Oxford : vaccin expérimental vectorisé à l'adénovirus chimpanzé (ChAdOx1/AZD1222) codant la protéine Spike du SARS-CoV-2
- vaccin russe Sputnik V / COVINA-19 (rAd5-S et rAd26-S)
- vaccin de la société chinoise CanSino Biologics à vecteur d'adénovirus
- vaccin Janssen (Ad26.COV2.S)

## **3) Les vaccins à virus entiers, inactivés ou atténués**

Ce sont des virus entiers inactivés ou atténués qui sont présentés au système immunitaire. Un virus inactivé est comme un virus "mort" : il ne peut pas se multiplier dans l'organisme. Ce virus est inactivé au formol (technique de Pasteur) ou par traitement thermique. Quant au virus atténué, il est obtenu par sélection génétique : on ne garde qu'une souche virale qui a acquis des mutations en le rendant inoffensif. Dans ce cas, le virus est encore vivant et peut encore se multiplier mais sans provoquer de symptômes. Il existe un risque statistique, impossible à éliminer totalement, qu'une infime proportion de particules virales gardent leur capacité à

infecter l'individu. Cette dernière technique n'est pas utilisée dans le contexte de la COVID-19.

exemples :

- vaccin inactivé CoronaVac créé par Sinovac Life Sciences (Chine)
- vaccin inactivé de Sinopharm/Wuhan Institute of Virology (Chine)
- vaccin inactivé Covaxin en développement avec le Indian Council of Medical Research

#### **4) Les vaccins à sous-unités protéiques**

Au lieu de présenter le virus entier au système immunitaire, on injecte simplement une des protéines du virus. En général, c'est la protéine Spike du coronavirus qui est choisie. Dans le cadre du vaccin Novavax, elle est présentée sur de petits "rouleaux" de matière grasse dans lesquels les protéines sont plantées comme elles le seraient à la surface du coronavirus.

exemples :

- vaccin Novavax (NVX-CoV2373), développé par Novavax et fabriqué par Emergent Biosolutions

Au-delà des vaccins injectables, plusieurs **vaccins à administration intranasale** (dans le nez) sont en développement, dans le but de stimuler les défenses particulières des muqueuses du nez, du pharynx, des bronches et des poumons. Ils pourraient être utilisés seuls ou en complément des vaccins injectables(**Korsia-Meffre,2021**)

## Chapitre II : Les mutations de la COVID-19

## 2.1. Séquence de référence :

| Lignée | Synonymes        | Émergence       | Variantes de spike | Autres variantes | Phénotypes             |
|--------|------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------------|
| 19 A   | Wuhan-Hu-1, nCoV | China, Dec 2019 | None               | None             | Reference for variants |

**Tableau 2.1 : généralité pour le cov-2**

## 2.2. Variante préoccupante (COV) :

une variante pour laquelle il existe des preuves d'une augmentation de la transmissibilité, d'une maladie plus grave et/ou d'une fuite de la neutralisation par les anticorps :

### 2.1.1. Variant Alpha :

Le conseiller scientifique du gouvernement, Patrick Vallance, précise que cette variante contient pas moins de 24 changements par rapport au virus "original", un nombre de mutations qu'il juge "inhabituellement grand", d'autant plus que ces changements sont "associés aux changements dans la protéine que le virus fabrique et à la manière dont le virus se lie aux cellules ou les pénètre" (**Gérald Kierzek, 2021**).

| Lignée | Synonymes                                | Émergence    | Variantes de spike                                                                   | Autres variantes                                                                                                                                  |
|--------|------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alpha  | B.1.1.7<br>20I/501Y.V1,V<br>OC 202012/01 | UK, Sep 2020 | Del 69-70<br>Del 144<br>N501Y<br>A570D<br>D614G<br>P681H<br>T716I<br>S982A<br>D1118H | N: D3L, N:<br>S235FORF1ab;nsp3:T1001I,<br>A1708D, I2230TORF1ab;<br>nsp6: del 3675-3677ORF1ab;<br>RdRp: P4715LORF8:<br>R52IORF8: Q27*ORF8:<br>Y73C |

**Tableau 2.2: les variations de alpha cov-2 (Aine O'Toole , Verity Hilland Andrew Rambaut, 2022)**

### 2.2.2.Variants beta :

En y regardant de plus près, on a vu des mutations inquiétantes. C'est là qu'on a découvert qu'il s'agissait d'un variant différent, avec six ou sept mutations sur la protéine Spike, qui est responsable de l'infection chez l'humain et est importante pour la réaction immunitaire (**Estelle Priam ,2021**)

| Lignée | Synonymes            | Émergence              | Variantes de spike                                                                    | Autres variantes                                                                                                                              |
|--------|----------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Beta   | B.1.351, 20H/501Y.V2 | South Africa, Aug 2020 | (L18F)<br>D80A<br>D215G<br>(Del 241-243)<br>K417N<br>E484K<br>N501Y<br>D614G<br>A701V | N: T205I<br>ORF1a; nsp1:T265I<br>ORF1ab; nsp3: K1655N<br>ORF1ab; 3CL: K3353R<br>ORF1ab; nsp6: del 3675-3677<br>ORF1ab; RdRp:P4715L<br>E: P71L |

**Tableau 2.3 : les variations de Beta cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hilland Andrew Rambaut,2022)**

### 2.2.3.Variant Gamma :

le variant gamma qui circule et qui a été classé par les autorités sanitaires comme "préoccupant" , ils présentent les modifications qui sont réparties sur le génome viral, mais dont les modifications les plus importantes sont sur la protéine S (ou Spike) qui est la cible principale de la réponse immunitaire ( **Dorothée Duchemin ,2021**)

| Lignée | Synonymes                          | Émergence           | Variantes de spike                                                                                                                                    | Autres variantes                                                                                                                                                                   |
|--------|------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gamma  | P.1,<br>B.1.1.28.1,<br>20J/501Y.V3 | Brazil, Jul<br>2020 | L18F<br><br>T20N<br><br>P26S<br><br>D138Y<br><br>R190S<br><br>K417N/T<br><br>E484K<br><br>N501Y<br><br>D614G<br><br>H655Y<br><br>T1027I<br><br>V1176F | ORF1ab;nsp3: S1188L,<br>K1795Q<br><br>ORF1ab; nsp6; del 3675-<br>3677<br><br>ORF1ab; RdRp: P4715L<br><br>ORF1ab; nsp13:E5665D<br><br>ORF3a: S253P<br><br>ORF8: E92K<br><br>N: P80R |

**Tableau 2.4 : les variations de Gamma cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hilland Andrew Rambaut,2022)**

#### **2.2.4.Variant delta :**

Le variant Delta est caractérisé par plusieurs mutations tout au long de sa structure, mais dont les plus importantes sont situées sur la protéine S toutes dans le domaine N-terminal . Ce variant est 40 à 60 % plus contagieux que les autres variants en circulation et se montre moins sensible aux anticorps neutralisants (**Julie Kern ,2021**)

| Lignée | Synonymes      | Émergence       | Variantes de spike                                                                        | Autres variantes                                                                                                                                                                                                |
|--------|----------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Delta  | B.1.617.2, 21J | India, Dec 2020 | T19R<br>(G142D)<br>156del<br>157del<br>R158G<br>L452R<br>T478K<br>D614G<br>P681R<br>D950N | ORF1ab; nsp3: A1306S, P2046L, P2287S<br>ORF1ab; 3CL:K3255R<br>ORF1ab; nsp12:P5715L, G5063S<br>ORF1ab; nsp13:P5401L<br>ORF1ab; nsp14:A6019V<br>ORF3a:S26L<br>M:I82T<br>ORF7a:V82A, T120I<br>N:D63G, R203M, D377Y |

**Tableau 2.5 : les variations de Delta cov-2 (Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut,2022)**

#### 2.2.5.Variant omicron :

le variant Omicron compte 32 mutations sur protéine S et une cinquantaine en tout. L'OMS, a noté qu'un nombre croissant d'études semblait montrer qu'Omicron était plus contagieux, mais moins virulent que les autres variants, et qu'il affectait principalement les voies respiratoires supérieures, provoquant des symptômes plus légers (OMS,2022)

| Lignée       | Synonymes                          | Émergence              | Variantes de spike                                                     | Autres variantes                                                                                                        |
|--------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Omicron BA.1 | BA.1<br>(previously B.1.1.529),21K | South Africa, Dec 2021 | A67V,69-70del<br>T95I,GVYY142-145D,NL211-212I,ins214EPE<br>G339D,S371L | N:P13L, 31-33del, R203K, G204R<br>ORF1ab; nsp3: K856R, SL2083I, A2710T<br>ORF1ab; 3CL: T3255I, P3395H ORF1ab; nsp6: del |

|              |             |                              |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |             |                              | S373P,S375F<br>K417N,N440K<br>G446S,S477N<br>T478K,E484A<br>Q493R,G496S<br>Q498R,N501Y<br>Y505H,T547K<br>D614G,H655Y<br>N679K,P681H<br>N764K,D796Y<br>N856K,Q954H<br>N969K,L981F                    | 3674-3676, I3758V<br><br>ORF1ab; RdRp:P4715L<br><br>ORF1ab; nsp14: I5967V<br><br>E:T9I M:D3G, Q19E, A63T<br>Orf9b:P10S, 27-29del                                                                                                                                                                      |
| Omicron BA.2 | BA.2<br>21L | South<br>Africa,<br>Dec 2021 | T19I,LPPA24-27S<br>G142D,V213G<br>G339D,S371F<br>S373P,S375F<br>T376A,D405N<br>R408S,K417N<br>N440K,S477N<br>T478K,E484A<br>Q493R,Q498R<br>N501Y,Y505H<br>D614G,H655Y<br>N679K,P681H<br>N764K,D796Y | N:P13L, 31-33del, R203K,<br>G204R, S413R<br>ORF1ab; nsp1:S135R,<br>ORF1ab; nsp3:T842I,<br>G1307S,ORF1ab;<br>nsp4:L3027F, T3090I,<br>L3201F,ORF1ab;<br>3CL:T3255I, P3395H<br>ORF1ab; nsp6:del 3675-3677ORF1ab;<br>RdRp:P4715LORF1ab;nsp13:<br>R5716C<br>ORF1ab; nsp14: I5967V<br>ORF1ab; nsp15: T6564I |

|              |      |                           |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------|------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |      |                           | Q954H,N969K                                                                                                                                                                                                                                   | ORF3a: T223IE:T9IM: Q19E,<br>A63TORF6: D61LORF8:<br>S84L Orf9b:P10S, 27-29del                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Omicron BA.4 | BA.4 | South Africa,<br>Jan 2022 | T19I,LPPA24-<br>27S<br>Del 69-<br>70,G142D<br>V213G,G339D<br>S371F,S373P<br>S375F,T376A<br>D405N,R408S<br>K417N,N440K<br>L452R,S477N<br>T478K,E484A<br>F486V,Q498R<br>N501Y,Y505H<br>D614G,H655Y<br>N679K,P681H<br>N764K,D796Y<br>Q954H,N969K | N:P13L, 31-33del, P151S,<br>R203K, G204R, S413R,<br>ORF1ab; nsp1:S135R,<br>Del141-143 ORF1ab;<br>nsp3:T842I, G1307S,<br>ORF1ab; nsp4:L3027F,<br>T3090I, ORF1ab;<br>3CL:T3255I, P3395H<br>ORF1ab; nsp6:del 3675-3677<br>ORF1ab; RdRp:P4715L<br>ORF1ab; nsp13:R5716C<br>ORF1ab; nsp14: I5967V<br>ORF1ab; nsp15: T6564I<br>ORF3a: T223I E:T9I<br>M: Q19E, A63T ORF6: D61L<br>ORF7b: L11F<br>ORF8: S84L Orf9b:P10S, 27-<br>29del |
| Omicron BA.5 | BA.5 | South Africa,<br>Jan 2022 | T19I,LPPA24-<br>27S<br><br>Del 69-<br>70,G142D<br><br>V213G,G339D<br><br>S371F,S373P<br><br>S375F,T376A<br><br>D405N,R408S                                                                                                                    | N:P13L, 31-33del, R203K,<br>G204R, S413R<br><br>ORF1ab; nsp1:S135R,<br><br>ORF1ab; nsp3:T842I,<br>G1307S, ORF1ab;<br>nsp4:L3027F, T3090I,<br><br>ORF1ab; 3CL:T3255I,<br>P3395H ORF1ab; nsp6:del<br>3675-3677                                                                                                                                                                                                                 |

|  |  |  |             |                            |
|--|--|--|-------------|----------------------------|
|  |  |  | K417N,N440K | ORF1ab; RdRp:P4715L        |
|  |  |  | L452R,S477N | ORF1ab; nsp13:R5716C       |
|  |  |  | T478K,E484A | ORF1ab; nsp14: I5967V      |
|  |  |  | F486V,Q498R | ORF1ab; nsp15: T6564I      |
|  |  |  | N501Y,Y505H | ORF3a: T223I E:T9I         |
|  |  |  | D614G,H655Y | M: D3N, Q19E, A63T         |
|  |  |  | N679K,P681H | ORF8: S84L Orf9b:P10S, 27- |
|  |  |  | N764K,D796Y | 29de                       |
|  |  |  | Q954H,N969K |                            |

**Tableau 2.6 : les variations de Omicron cov-2 (Emma Hodcroft,2022)**

#### **2.2.6.Variant Epsilon :**

Selon une étude menée par des chercheurs américains ce variant est définie par trois mutations dans la protéine Spike, la "clé" qui permet au virus de pénétrer dans nos cellules et contre laquelle les vaccins sont dirigés. Le variant Epsilon est classé par les autorités françaises comme Variant en cours d'évaluation, ou VUM ("variant under monitoring" c'est-à-dire que les données épidémiologiques montrent l'absence de diffusion importante/en progression et/ou l'absence d'éléments virologiques, épidémiologiques ou cliniques probants en faveur d'un impact significatif en santé publique (**kzenon,2021**)).

| Lignée  | Synonymes                                   | Émergence     | Variantes de spike            | Autres variantes                                                                         |
|---------|---------------------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Epsilon | B.1.427, California(CA)<br>B.1.429, CAL.20C | USA, Sep 2020 | S13I,W152C<br><br>L452R,D614G | ORF1a: T265I,(S3158T), (I4205V)ORF1b: P314L, (P976L), D1183Y<br><br>ORF3a: Q57H N: T205I |

**Tableau 2.7 : les variations de Epsilon cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut,2020)**

### 2.2.7.Variant zêta :

Le génome Zeta possède 3 mutations d'acides aminés , qui se trouvent toutes dans le code de la protéine Spike du virus .

| Lignée | Synonymes       | Émergence        | Variantes de spike                       | Autres variantes |
|--------|-----------------|------------------|------------------------------------------|------------------|
| Zeta   | P.2, B.1.1.28.2 | Brazil, Oct 2020 | E484K (F656L)<br>D614G (T859I)<br>V1176F | Non              |

**Tableau 2.8 : les variations de zeta cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020)**

### 2.2.8.Variant éta :

Cette variante porte certaines mutations De plus, cette variante a la même délétion de 3 acides aminés dans ORF1a aux positions 3675-3677 que celle observée dans trois variantes préoccupantes (**Emma Hodcroft, PhD, 2022**)

| Lignée | Synonymes              | Émergence              | Variante de spike                                                          | Autres variantes                                                               |
|--------|------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Eta    | B.1.525,<br>20A/S:484K | Worldwide,<br>Dec 2020 | (Q52R)<br>A67V<br>Del 69-70<br>Del 144<br>E484K<br>D614G<br>Q677H<br>F888L | ORF1ab: L4715F,<br>E:L21F, E:I82T,<br>del:11288:9, del:21765:6,<br>del:28278:3 |

**Tableau 2.9 : les variations de Eta cov-2 Áine O'Toole and Verity Hill, Rambaut Group, University of Edinburgh. Flight volume data from Kamran Khan, Isaac Bogoch, Alexander Watts, Oliver Pybus, Moritz Kraemer. Sequences sourced from GISAID, 2021)**

#### **2.2.9.Variant thêta :**

P.3 est considéré comme une variante sous enquête (VUI) par Public Health England (PHE) et était auparavant considéré comme une variante d'intérêt par l'Organisation mondiale de la santé. Avec d'autres variantes préoccupantes (VOC) classées par PHE .P.3, les virus contiennent de multiples mutations préoccupantes dans la protéine de pointe, qui ont été liées à une transmissibilité accrue et à une évasion immunitaire (Rebecca Rose, David J. Nolan, Tessa M. LaFleur, Susanna L. Lamers , 2022)

| Lignée | Synonymes              | Émergence                | Variantes de spike                                             | Autres variantes                                                             |
|--------|------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Thêta  | P.3,B.1.1.28.3,<br>21E | Philippines,<br>Jan 2021 | E484K<br>N501Y<br>D614G<br>P681H<br>E1092K<br>H1101Y<br>V1176F | ORF1ab: L3201P,<br>D3681E, L3930F,<br>P4715L<br>ORF8: K2Q<br>N: R203K, G204R |

**Tableau 2.10 : les variations de Thêta cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2021)**

#### **2.2.10.Variant iota :**

Le génome d'Iota (B.1.526) contient les mutations d'acides aminés , toutes présentes dans le code de la protéine Spike du virus la mutation Spike qui peut aider le virus à échapper aux anticorps , qui peut aider le virus à se lier plus étroitement aux cellules humaines.

| Lignée | Synonymes    | Émergence        | Variantes de spike                                      | Autres variantes         |
|--------|--------------|------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|
| Iota   | B.1.526, 21F | USA, Nov<br>2020 | (L5F) T95I<br>D253G (S477N)<br>(E484K) D614G<br>(A701V) | ORF1ab: del3675-<br>3677 |

**Tableau 2.11 : les variations de Lota cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020)**

### 2.2.11. Variant mu :

Le variant est pour le moment porteur de trois mutations génétiques

| Lignée | Synonymes            | Émergence                | Variante de spike        | Autres variantes                                                               |
|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Mu     | B.1.621<br>B.1.621.1 | Colombie<br>janvier 2021 | N501Y,<br>P681H<br>E484K | ORF3a:Q57H<br>ORF3a:<br>Δ257<br>ORF8:T11K<br>ORF8:P38S<br>ORF8:S67F<br>N:T205I |

Tableau 2.12 : les variations de Mu cov-2 (Anaïs Thiébaux ,2021)

### 2.2.12. Variant kappa :

La variante Kappa présente trois altérations notables dans les séquences d'acides aminés, qui se trouvent toutes dans le code de la protéine de pointe du virus.

| Lignée | Synonymes                | Émergence          | Variante de spike                                          | Autres variantes |
|--------|--------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|------------------|
| Kappa  | B.1.617.1,<br>20A/S:154K | India, Oct<br>2021 | (T95I),G142D<br>E154K,L452R<br>E484Q,D614G<br>P681R,Q1071H | Non              |

Tableau 2.13 : les variations de Kappa cov-2 (Aine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020)

### 2.2.13. Variant lambda :

Le variant Lambda est une mutation de la souche originale du SARS-CoV-2. **Le variant lambda est** porteur de mutations pouvant avoir un impact sur la transmissibilité ou l'échappement à la réponse anticorps neutralisante (**Maude Sebaihi,2021**) La protéine Spike (ou « S ») du variant Lambda présente sept mutations (pour mémoire, la protéine Spike, dont la forme rappelle celle d'un

champignon, est présente en de nombreux exemplaires sur l'enveloppe externe du virus (**Carlos Mamani, 2021**)

| Lignée | Synonymes            | Émergence         | Variantes de spike                                     | Autres variantes |
|--------|----------------------|-------------------|--------------------------------------------------------|------------------|
| Lambda | C.37,<br>B.1.1.1.C37 | Peru, Dec<br>2020 | G75V,T76I ;Del<br>246-<br>252,L452QF490S<br>D614GT859N | non              |

**Tableau 2.14 : les variations de Lambda cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2020)**

### 2.3.Autres variantes :

| Lignée           | Synonymes | Émergence                | Variantes de spike                              | Autres variantes                                           |
|------------------|-----------|--------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>B.1.1.318</b> | Non       | Switzerland,<br>Jan 2021 | T95I,Del,Y144<br>E484K<br>D614G ,P681H<br>D796H | Non                                                        |
| <b>B.1.375</b>   | Non       | USA, Sep<br>2020         | Del H69-V70<br>D614G                            | ORF1ab: T1828A<br>ORF1b: E1264D<br>ORF3a: T151I,<br>M:I48V |
| <b>B.1.177</b>   | 20A.EU1   | Europe, Jul<br>2020      | A222V<br>D614G                                  | Non                                                        |
| <b>B1</b>        | 20A.EU2   | Europe, Jun<br>2020      | S477N<br>D614G                                  | Non                                                        |
| <b>A.23.1</b>    | Non       | Uganda, Oct<br>2020      | (R102I)<br>F157L<br>V367F                       | nsp3: E95K<br>nsp6: M86I, L98F<br>ORF8: L84S, E92K         |

|                  |     |                                   |                                                                                                                                    |                                                                                                                |
|------------------|-----|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |     |                                   | <b>Q613H</b><br><b>(P681R)</b>                                                                                                     | <b>N: S202N, Q418H</b>                                                                                         |
| <b>B.1.616</b>   | Non | France<br>(Britanny),<br>Jan 2021 | <b>H66D</b><br><b>Del 144/145</b><br><b>D215G</b><br><b>V483A</b><br><b>H655Y</b><br><b>G669S</b><br><b>Q949R</b><br><b>N1187D</b> | <b>ND</b>                                                                                                      |
| <b>B.1.214.2</b> | Non | Europe, Nov<br>2020               | <b>ins214TDR</b><br><b>Q414K</b><br><b>N450K</b><br><b>D614G</b><br><b>T716I</b>                                                   | <b>N: T205I</b><br><b>ORF1a: A4016V,</b><br><b>T1881I, I1398V</b><br><b>ORF1b: P314L</b><br><b>ORF9b: S50L</b> |

**Tableau 2.15 : Des autres variations de cov-2 (Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , 2022)**

## 2.4. Visualiseur de génome de variantes (Mullen J, Tsueng G, et int., and tCfVSB ,2022) :

### 2.4.1. Les mutations de variant Alpha :

#### A-B.1.1.7 :

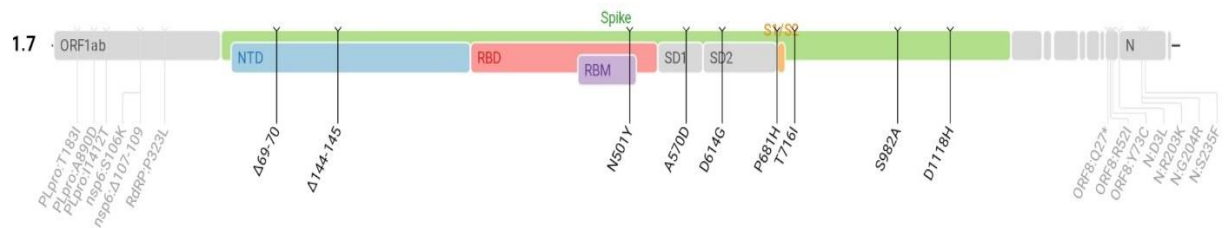


Figure 2.1 : B.1.1.7 lignée

#### B-B.1.1.7+E484K :

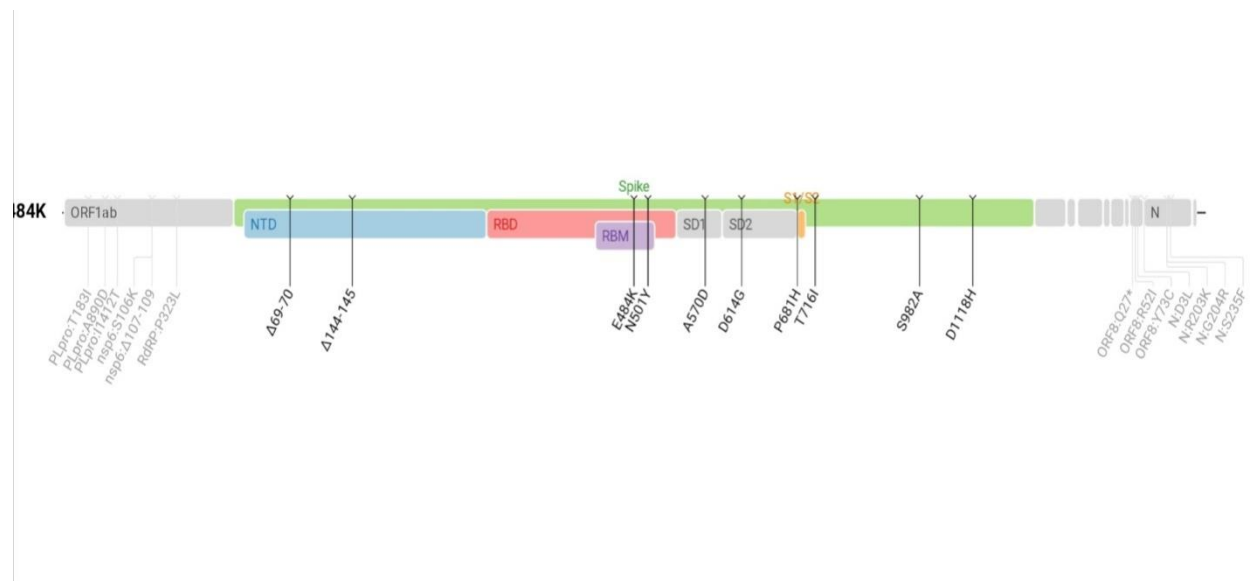


Figure2.2 : B.1.1.7 + E484K lignée avec S : E484K

## C-B.1.1.7+L452R :

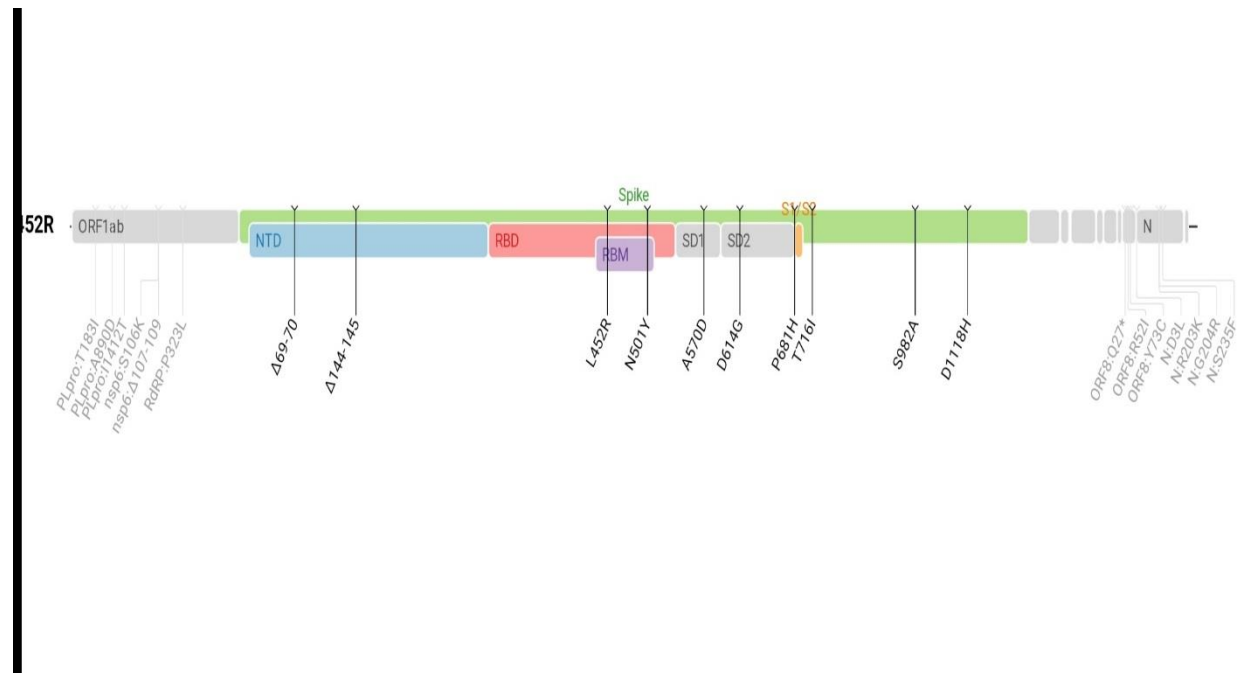


Figure2.3 : B.1.1.7+L452R lignée avec S : L452R

## D-B.1.1.7+S494P

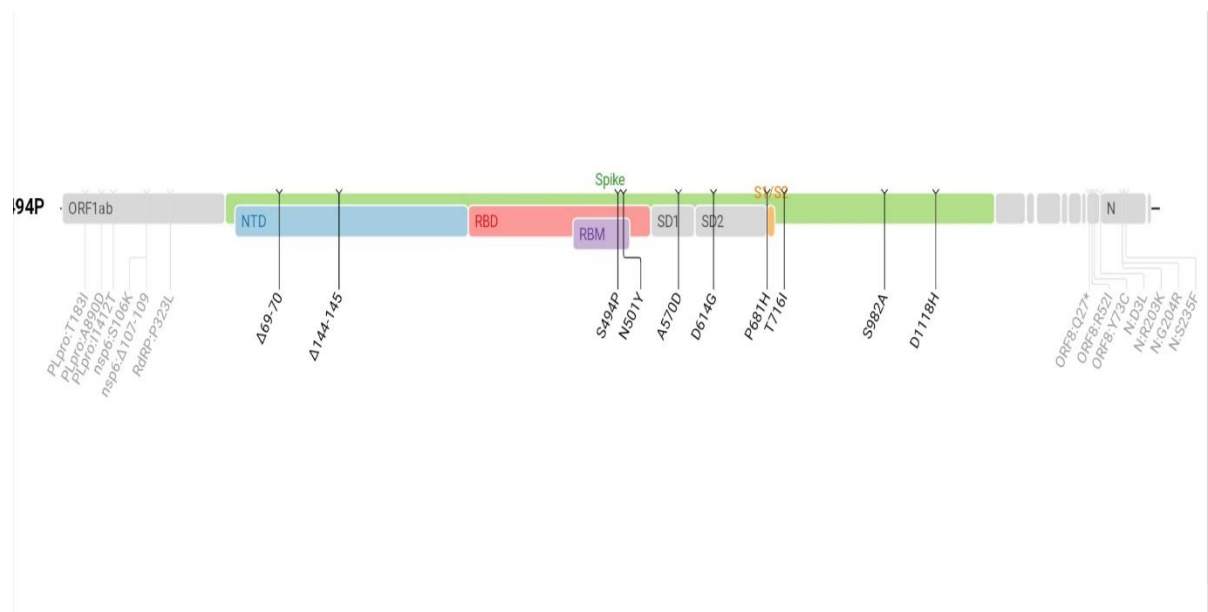


Figure2.4 : B.1.1.7+S494P lignée avec S : S494P

E-Q.1 :

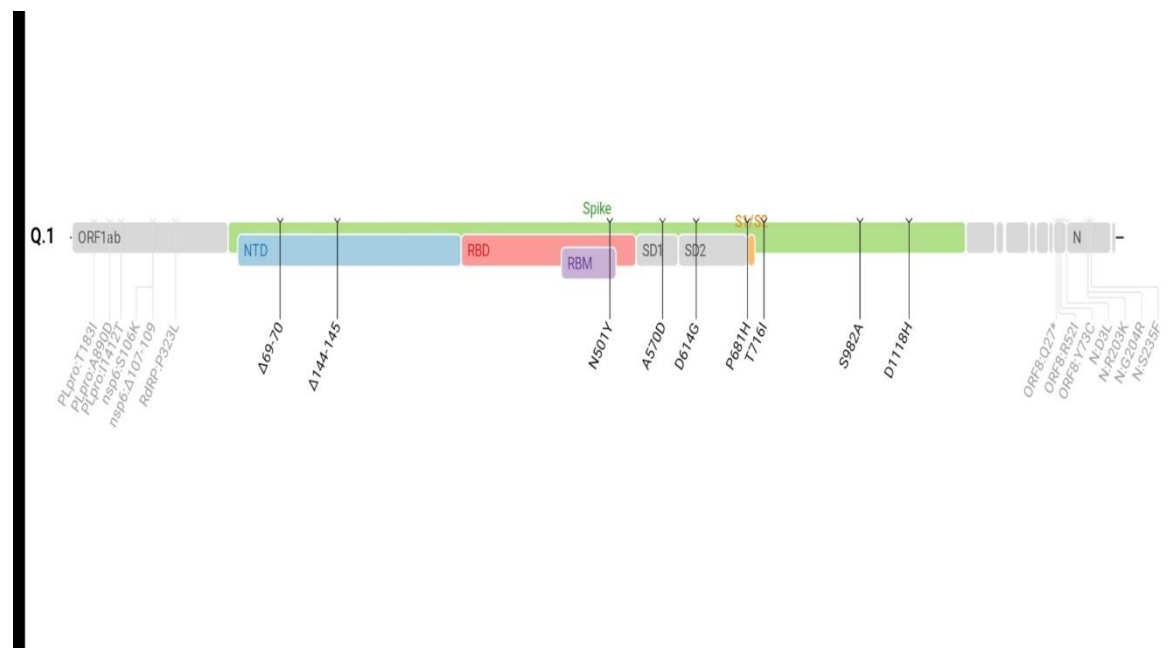


Figure 2.5 : Q.1 lignée

F-Q.2 :

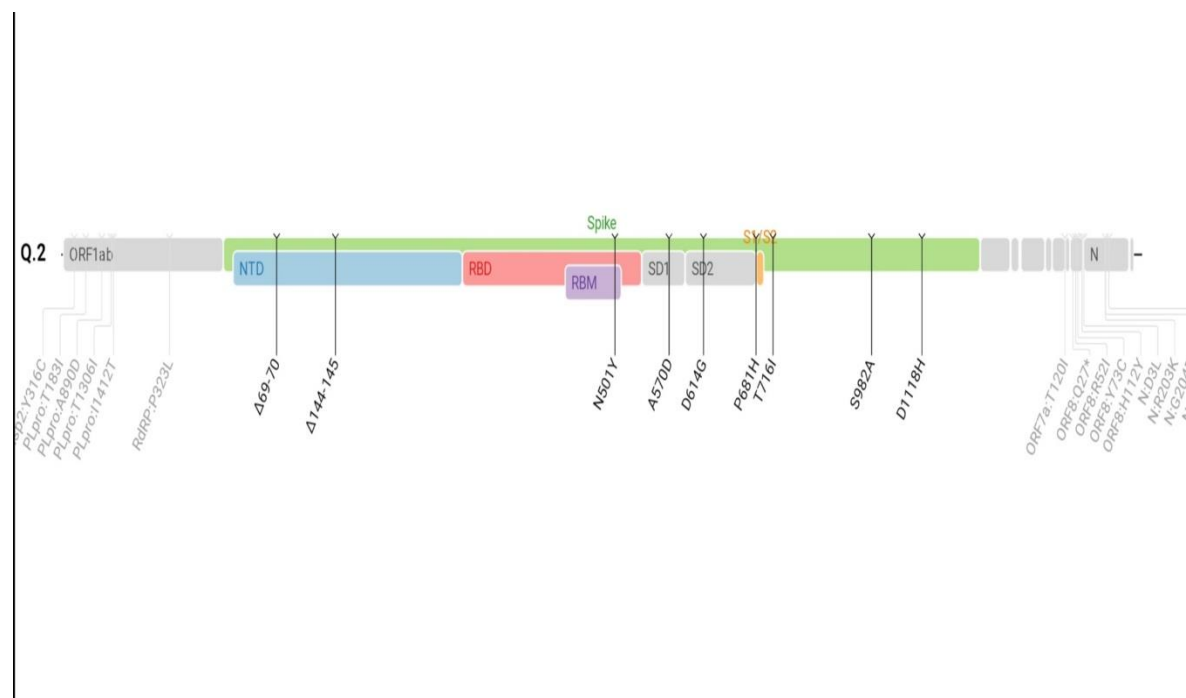


Figure2.6 : Q.2 lignée

G-Q.3 :

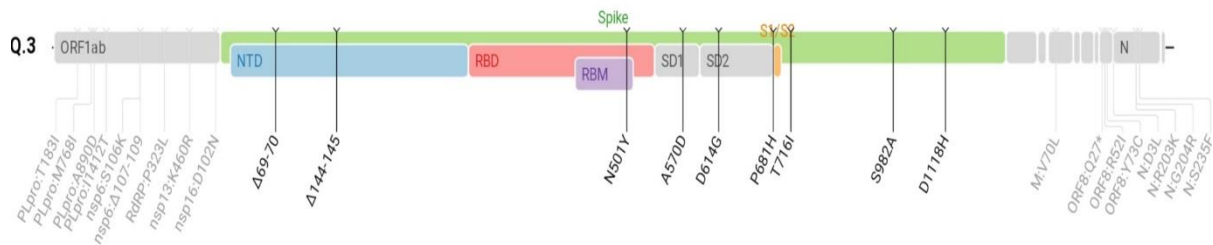


Figure 2.7 : Q.3 lignée

H-Q.4 :

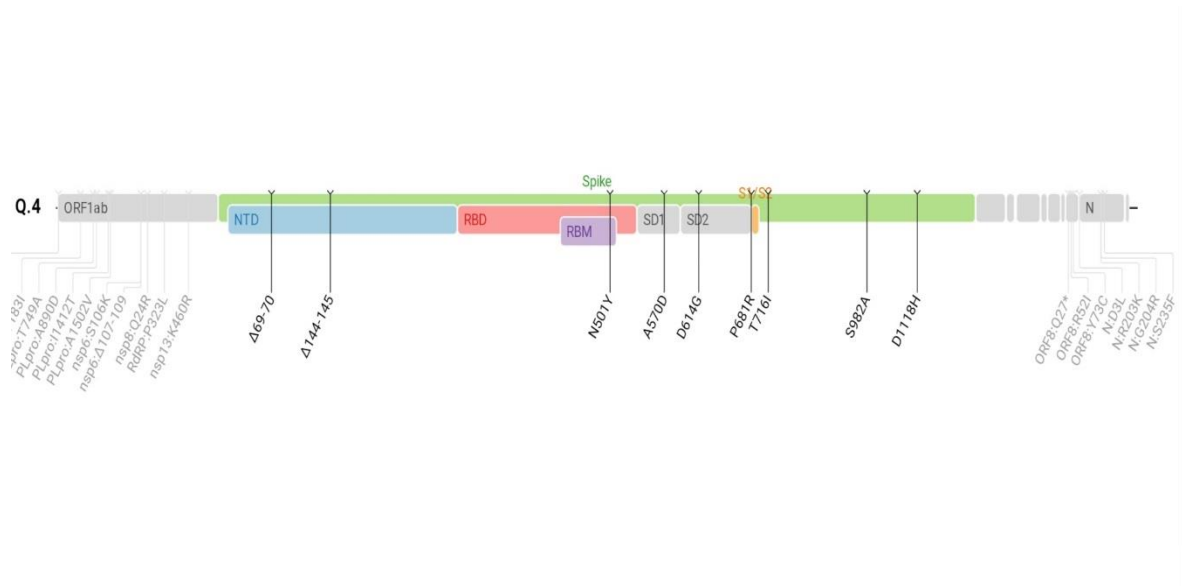


Figure 2.8 : Q.4 lignée

## 2.4.2. Mutation de variant Béta :

### A-B.1.351 :

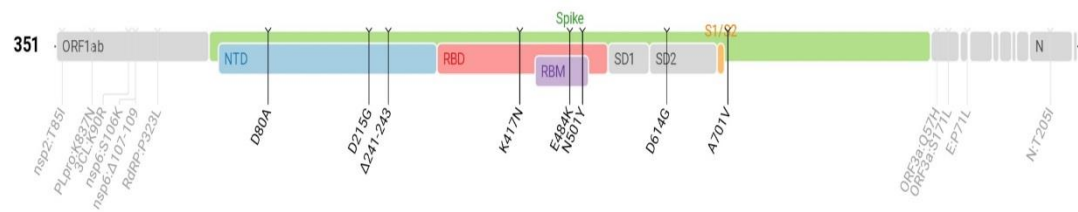


Figure 2.9 : B.1.531 lignée

### B-B.1.351+E516Q :

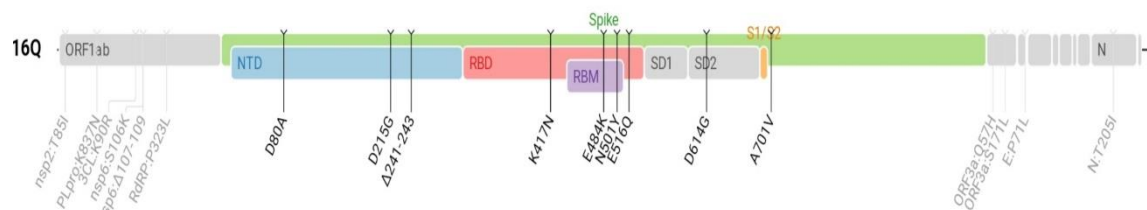
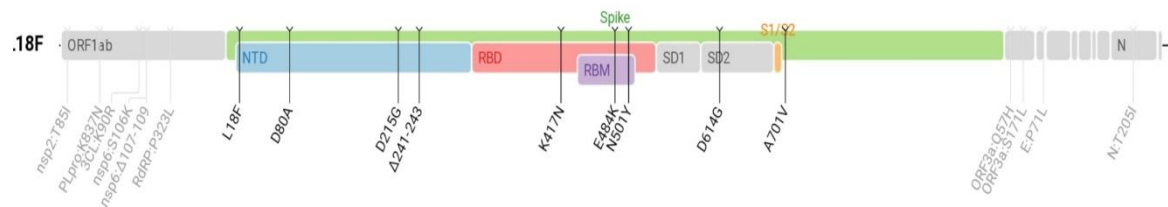


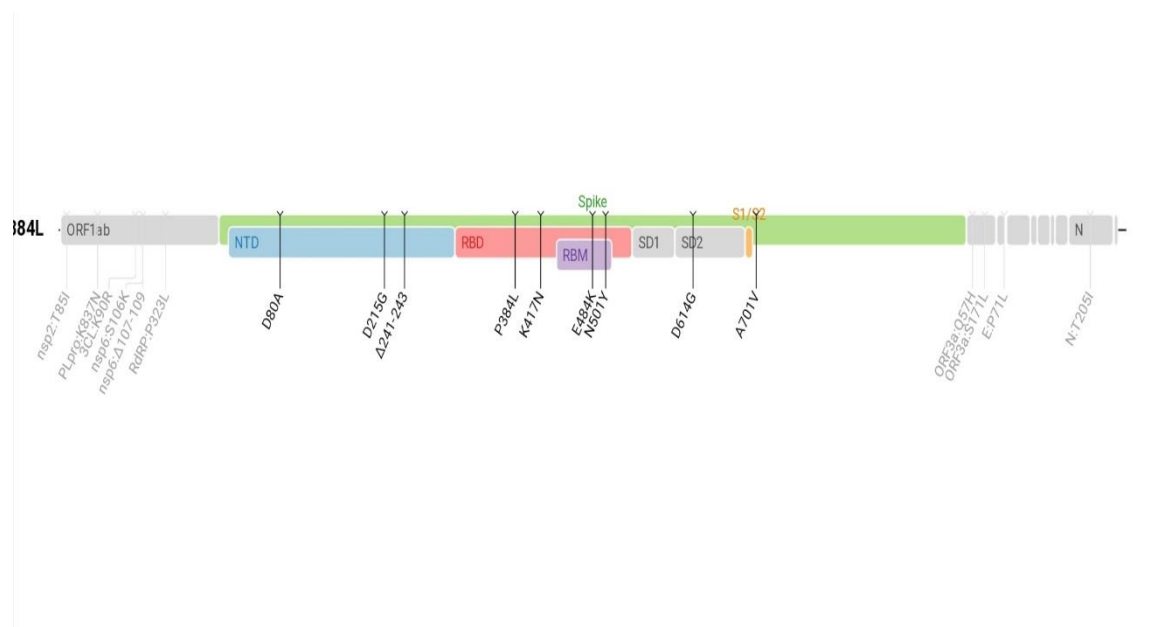
Figure 2.10 : B.1.351+E516Qlignée avec S : E516Q

**C-B.1.351+L18F :**



**Figure 2.11 : B.1.351+L18F lignée avec S : L18F**

**D-B.1.351+P384L :**



**Figure 2.12 : B.1.351+P384L lignée avec S : P384L**

## E-B.1.351.2 :

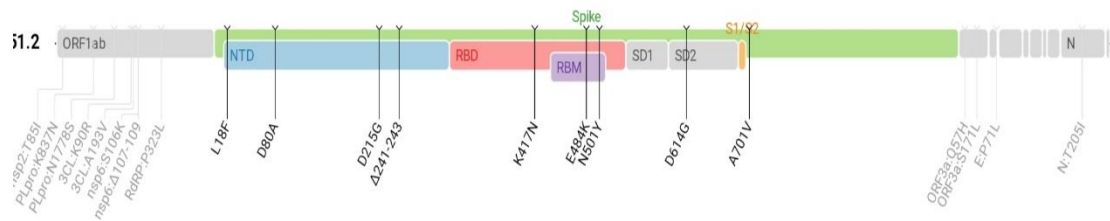


Figure 2.13 : B.1.351.2 lignée

## F-B.1.351.3 :

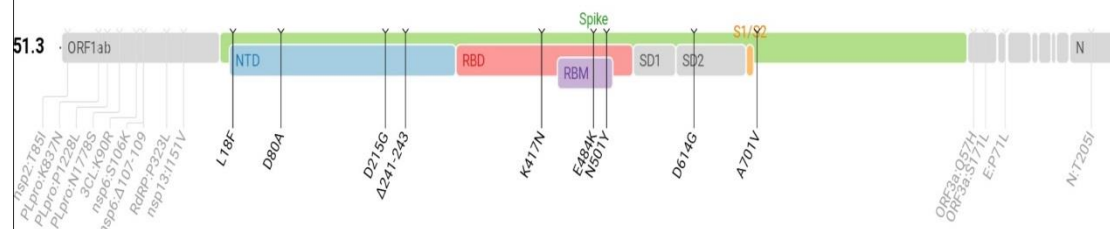


Figure 2.14 : B.1.351.3 lignée

### 2.4.3. Les mutations de variant Gamma :

#### A-P.1 :

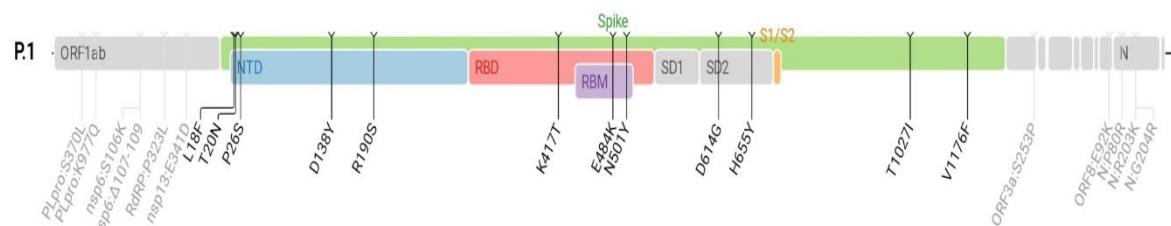


Figure 2.15 : P.1 lignée

#### B-P.1+P681H :

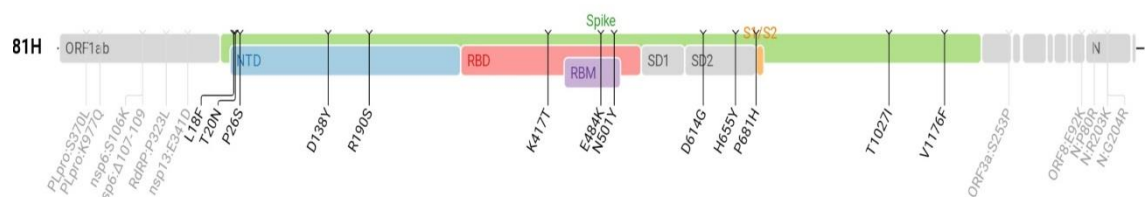


Figure 2.16: P.1+P681H lignée avec S : P681H

### C-P.1.1 :

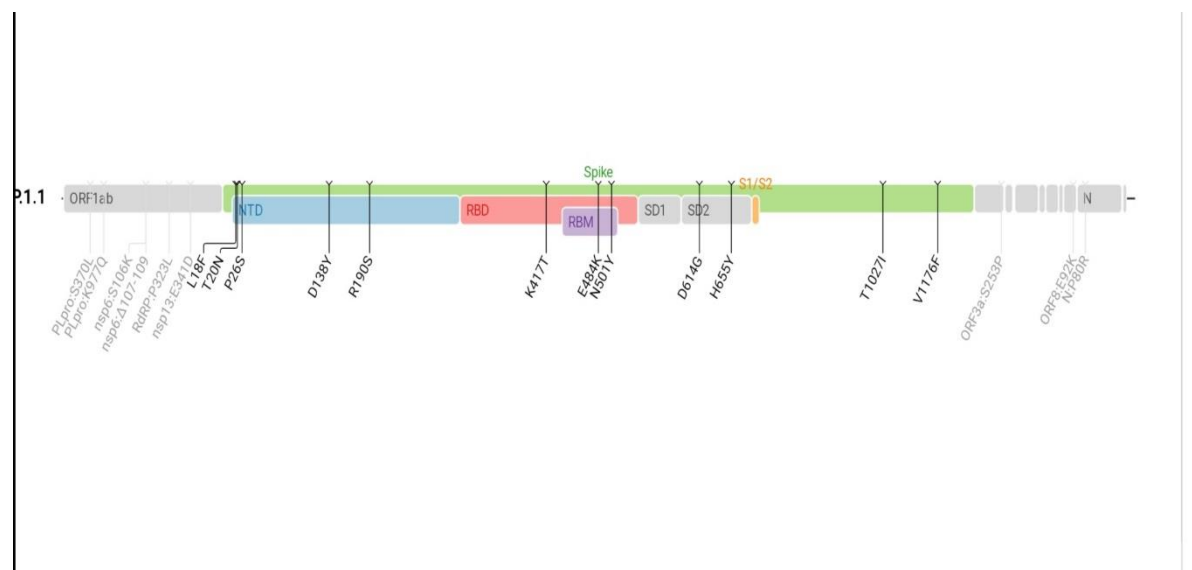


Figure 2.17 : P.1.1 lignée

### D-P.1.2 :

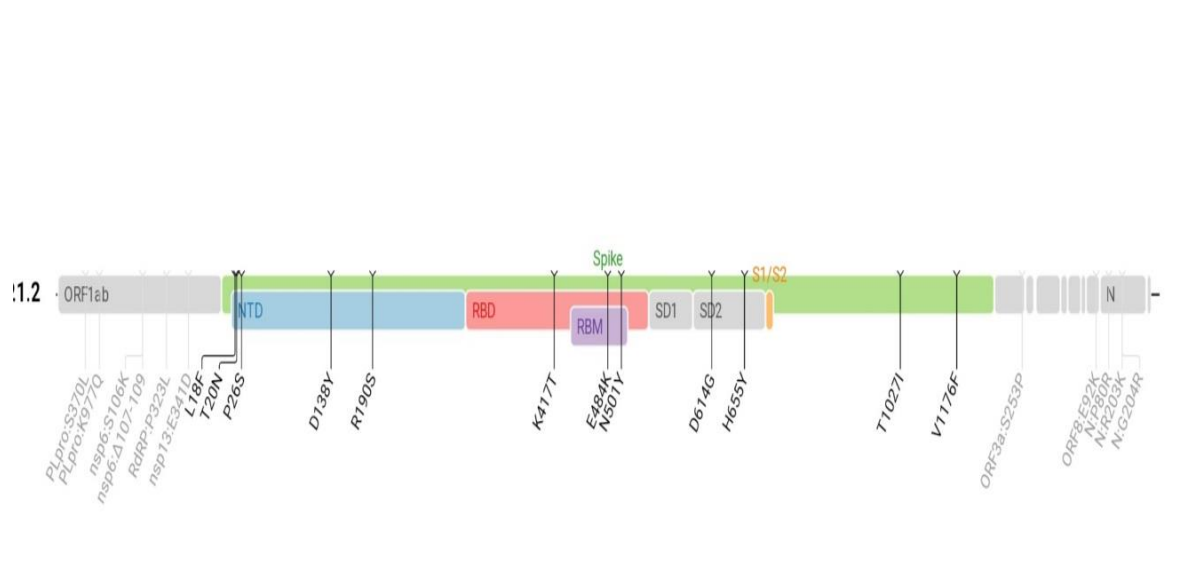


Figure 2.18 : P.1.2 lignée

#### 2.4.4. Les mutations de variant Delta :

##### A-B.1.617.2 :

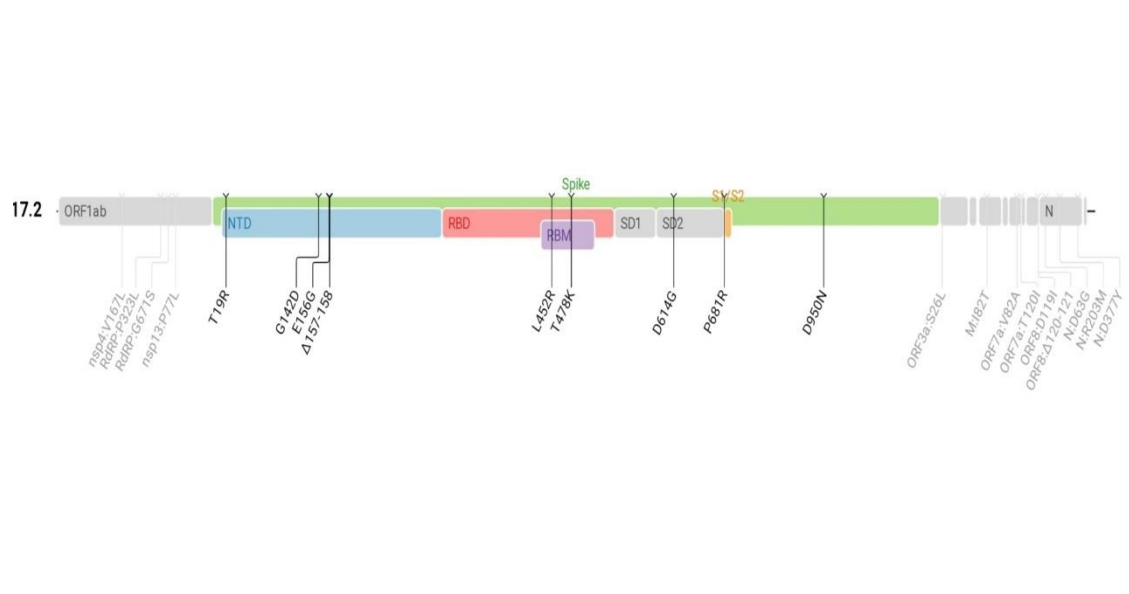


Figure 2.19 : B.1.617.2 lignée

##### B-B.1.617.2+E484Q :

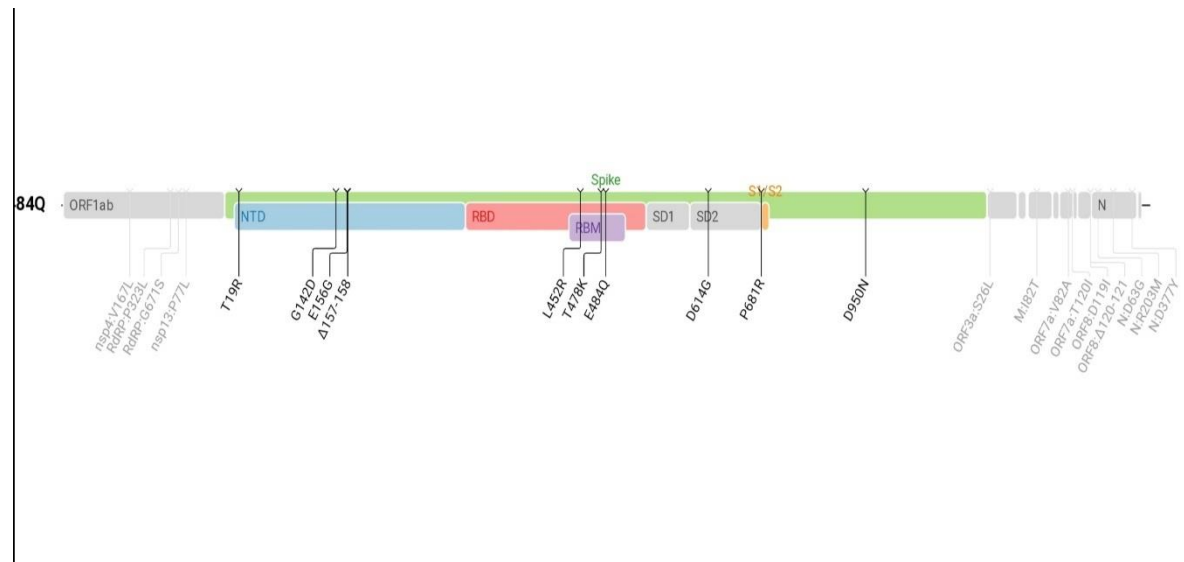


Figure 2.20 : B.1.617.2+E484Q lignée avec S : E484Q

### C-B.1.617.2+K417N :

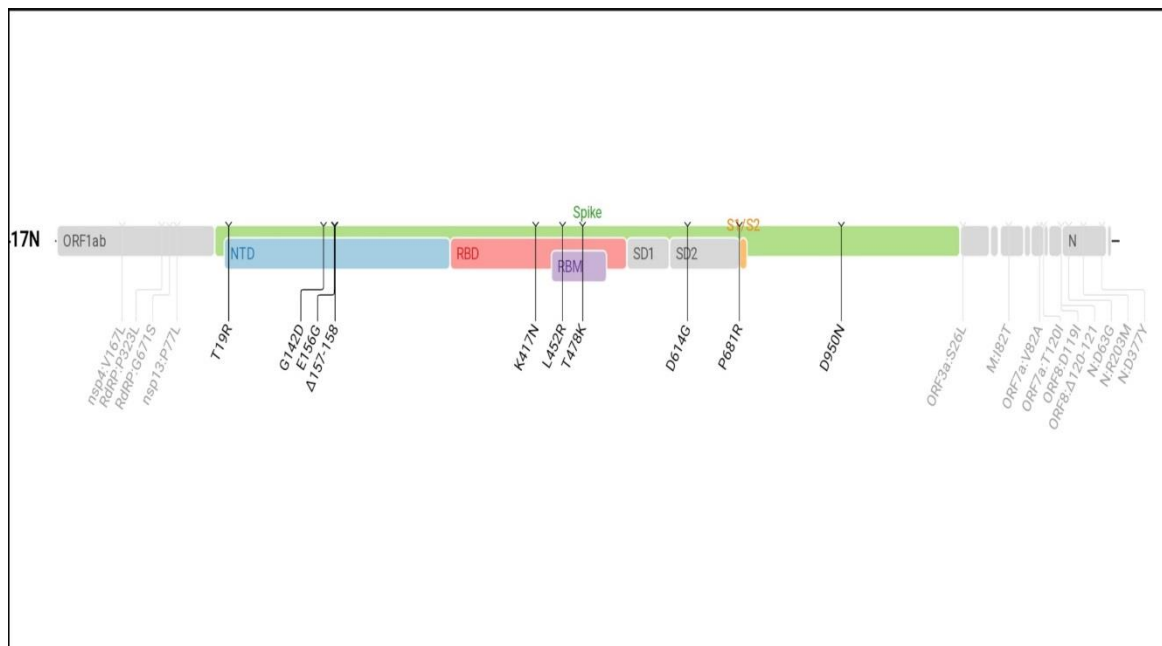


Figure 2.21 : B.1.617.2+K417N lignée avec S : K417N

### D-B.1.617.2+Q613H :

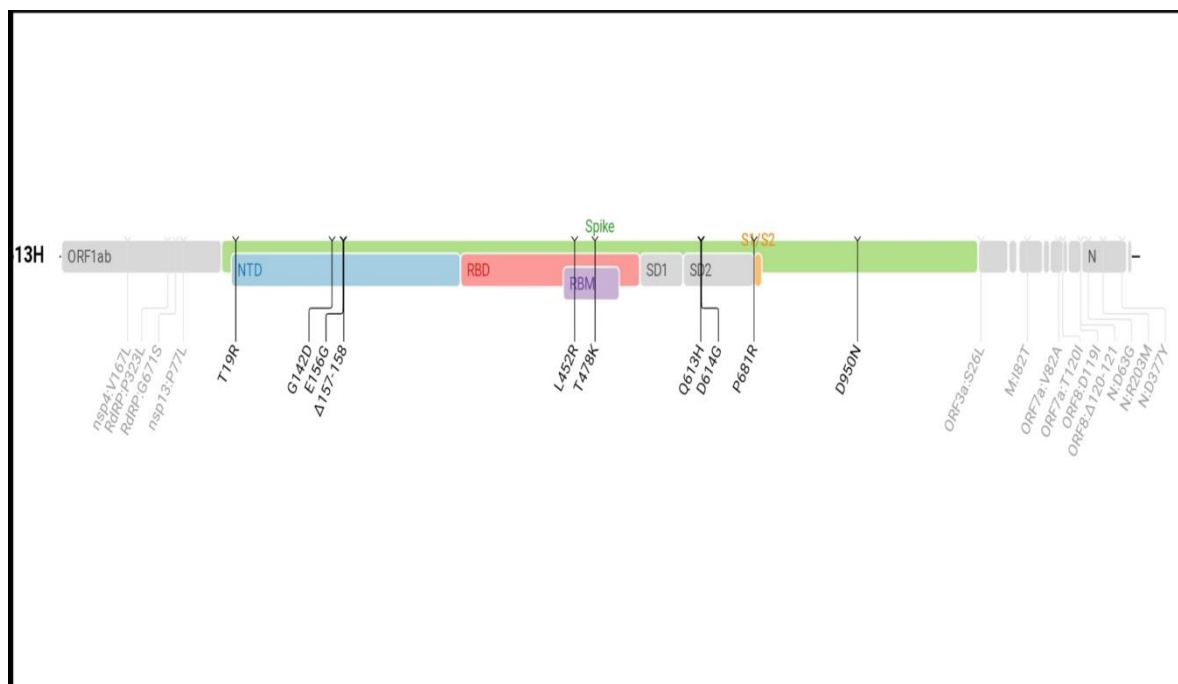


Figure 2.22 : B.1.617.2+Q613H lignée avec S : Q613H

## E- AY.1 :

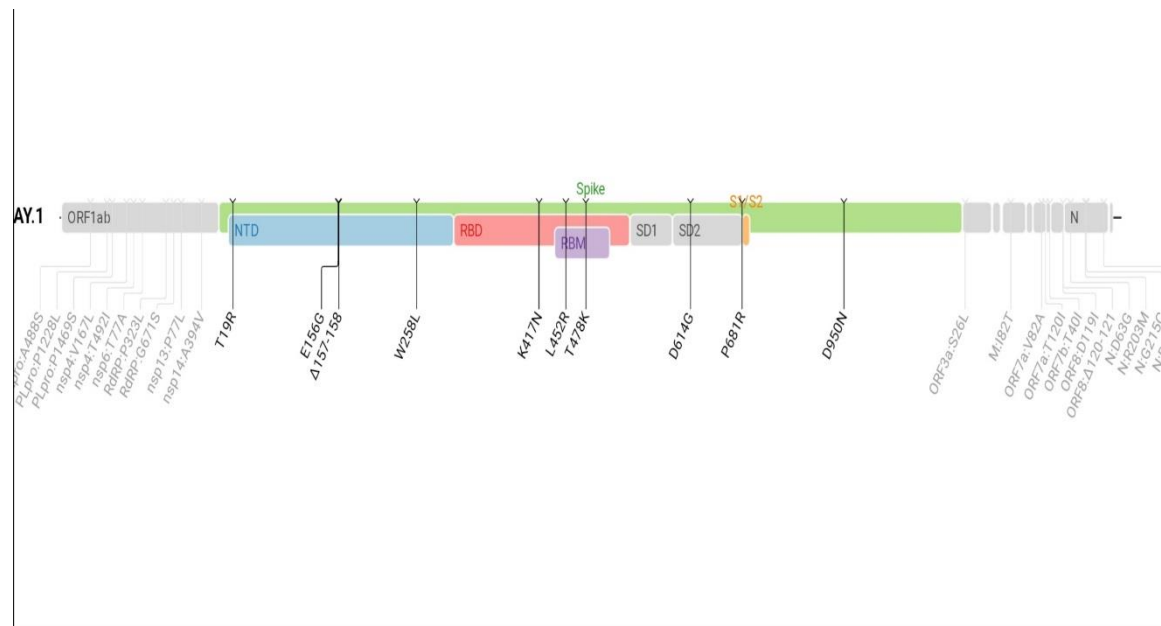


Figure 2.23 : AY.1 lignée

## F- AY.2 :

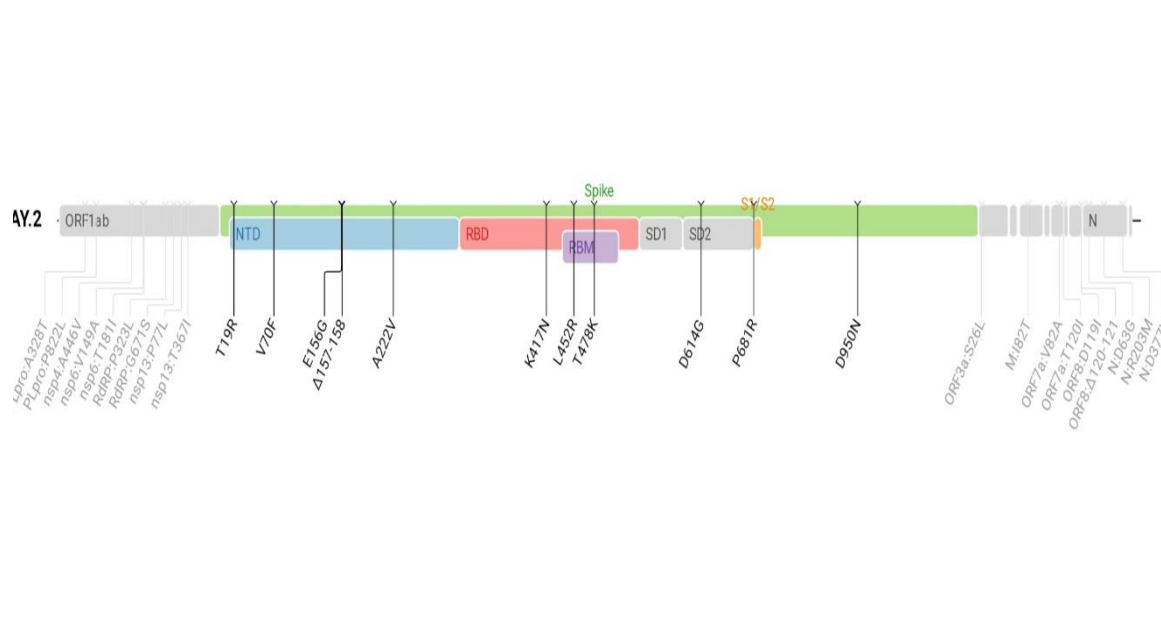


Figure 2.24 : AY.2 lignée

## G- AY.3 :

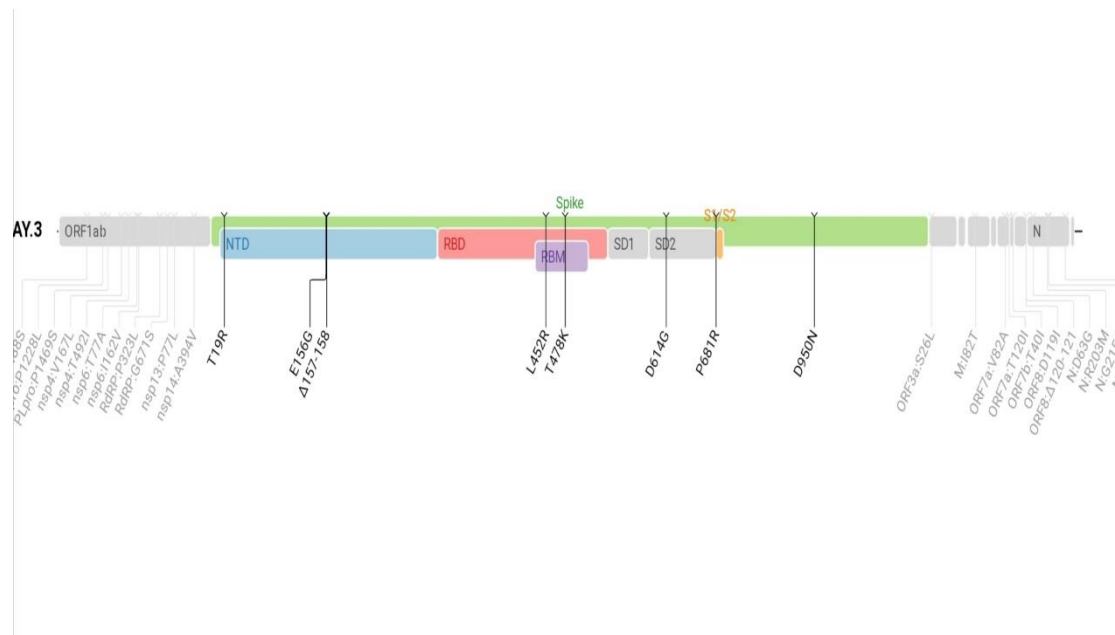


Figure 2.25 : AY.3 lignée

## H- AY.4 :

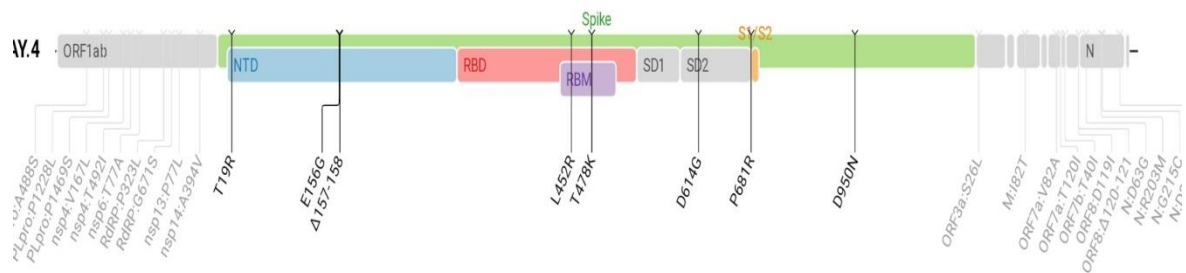


Figure 2.26 : AY.4 lignée

## I-AY.5 :

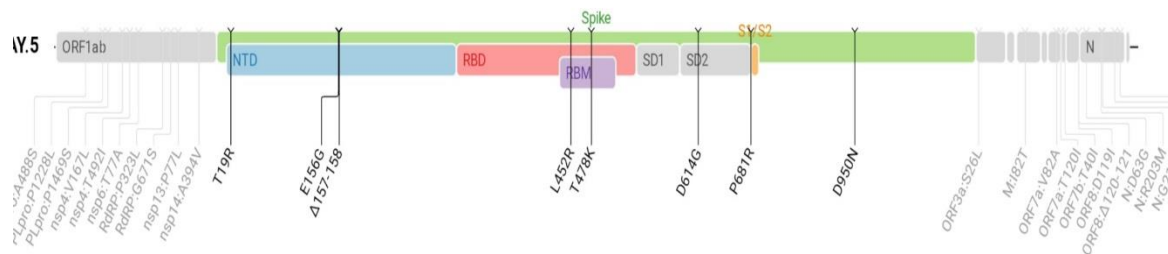


Figure 2.27 : AY.6 lignée

## J-AY.6 :

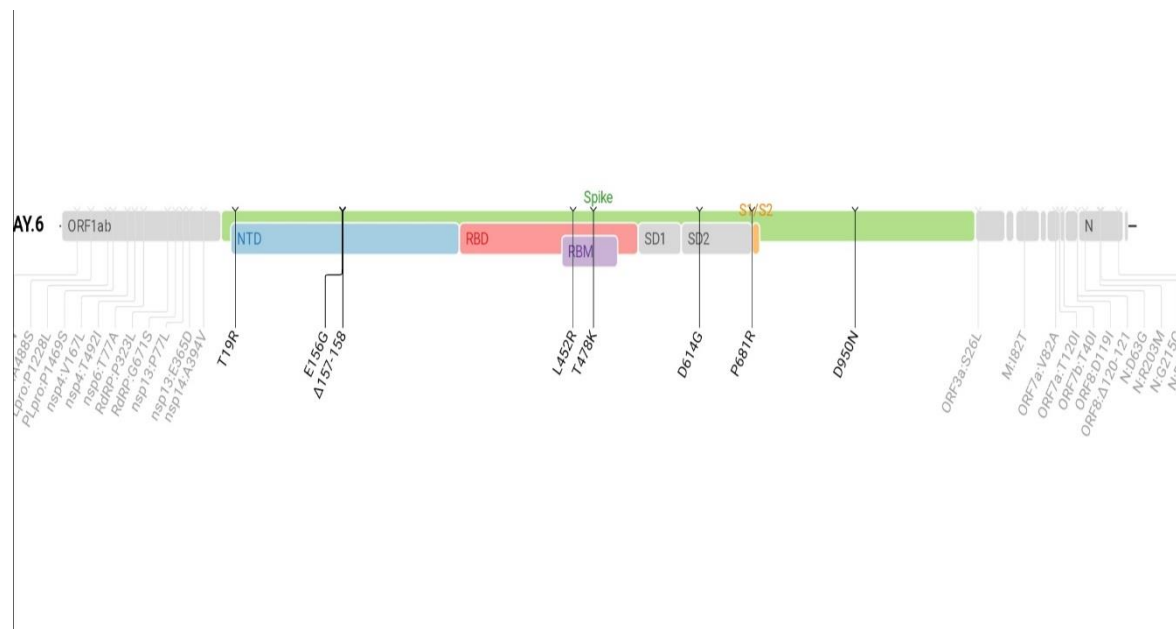


Figure 2.28 : AY.6 lignée

## K-AY.7 :

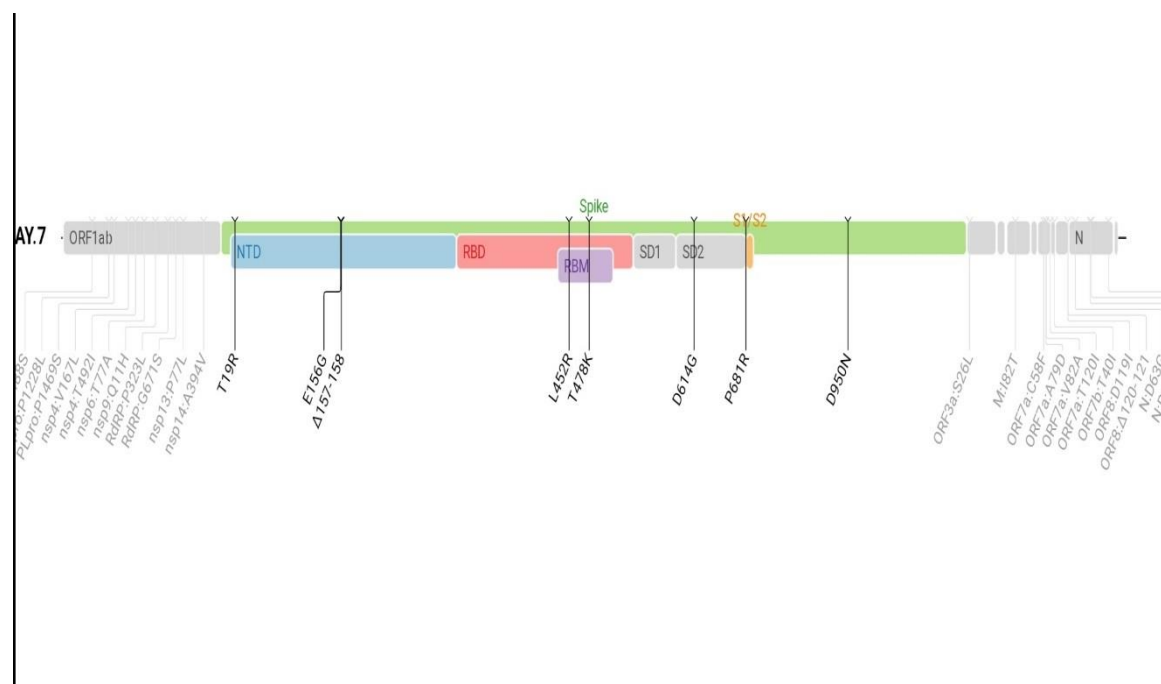


Figure 2.29 : AY.7 lignée

## L-AY.8 :

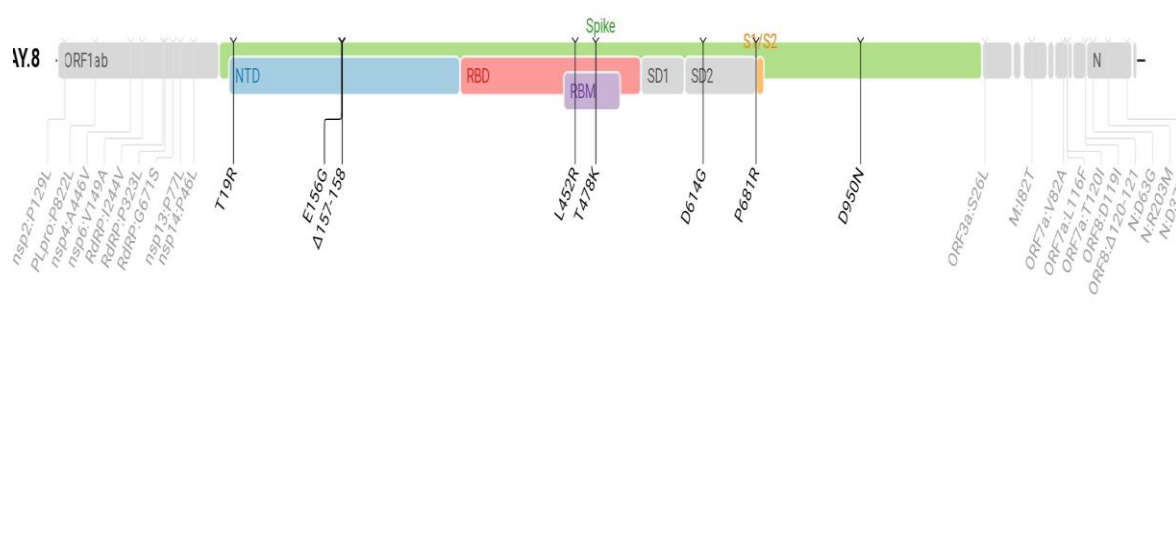


Figure 2.30 : AY.8 lignée

## M- AY.9 :

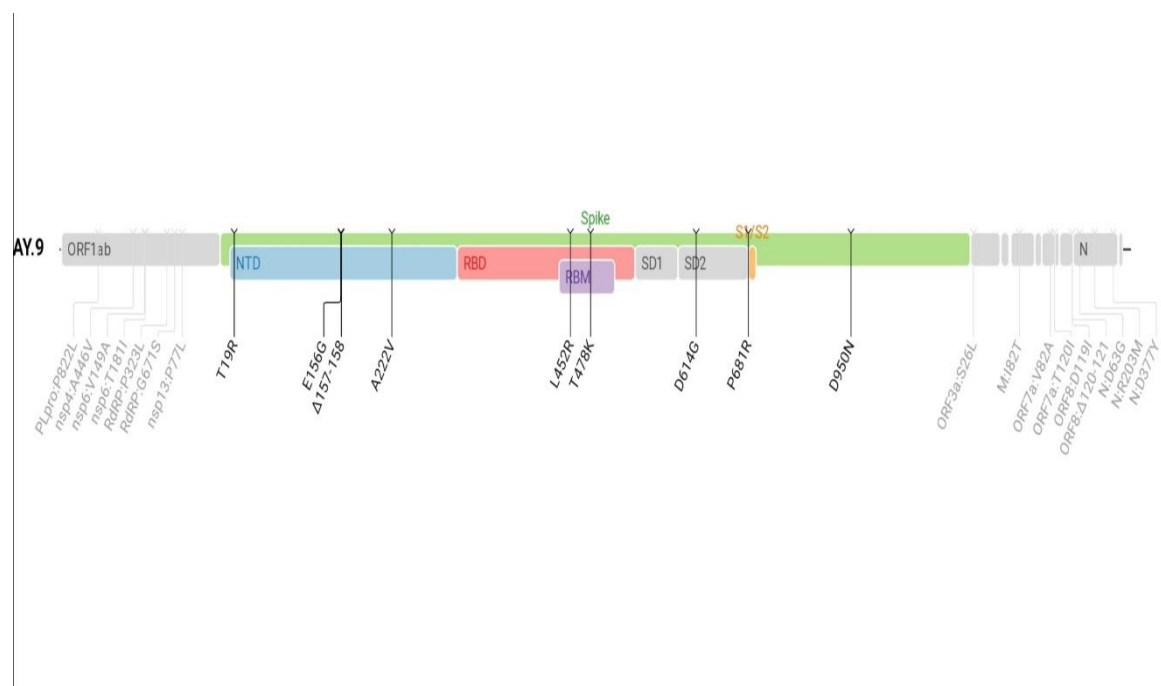


Figure 2.31 : AY.9 lignée

## N- AY.10 :

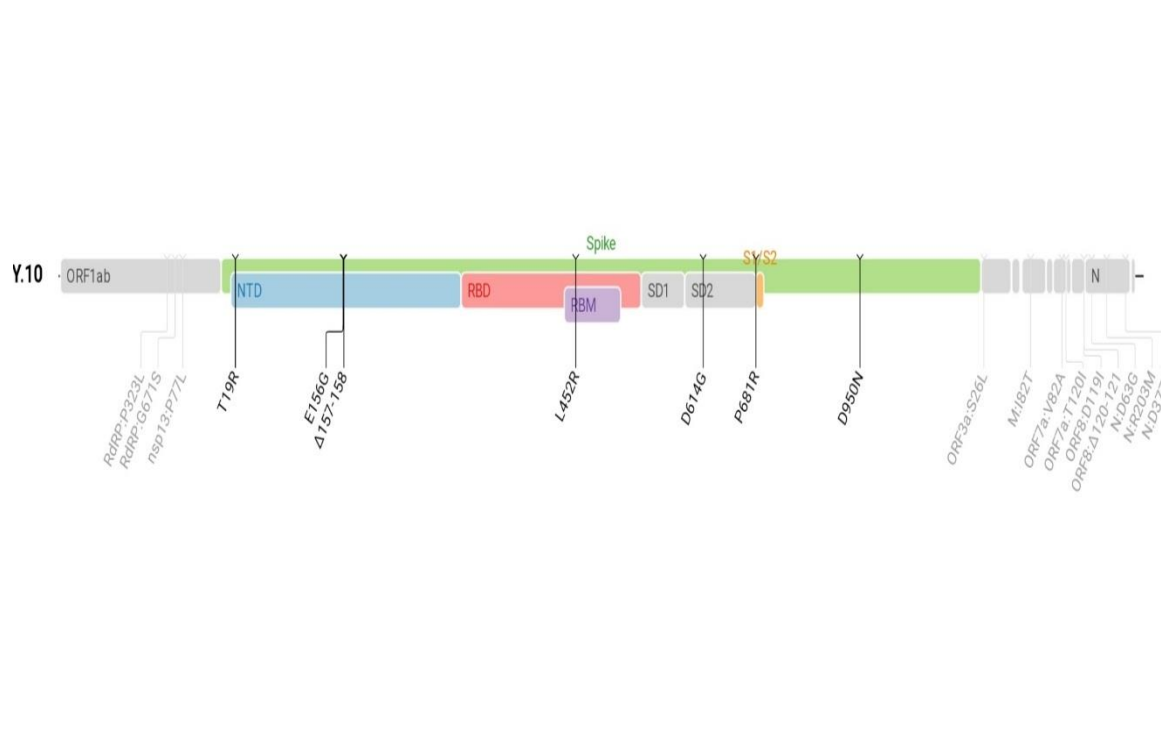
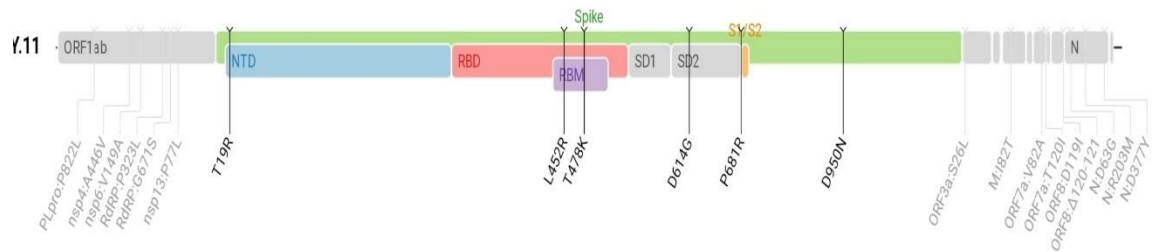


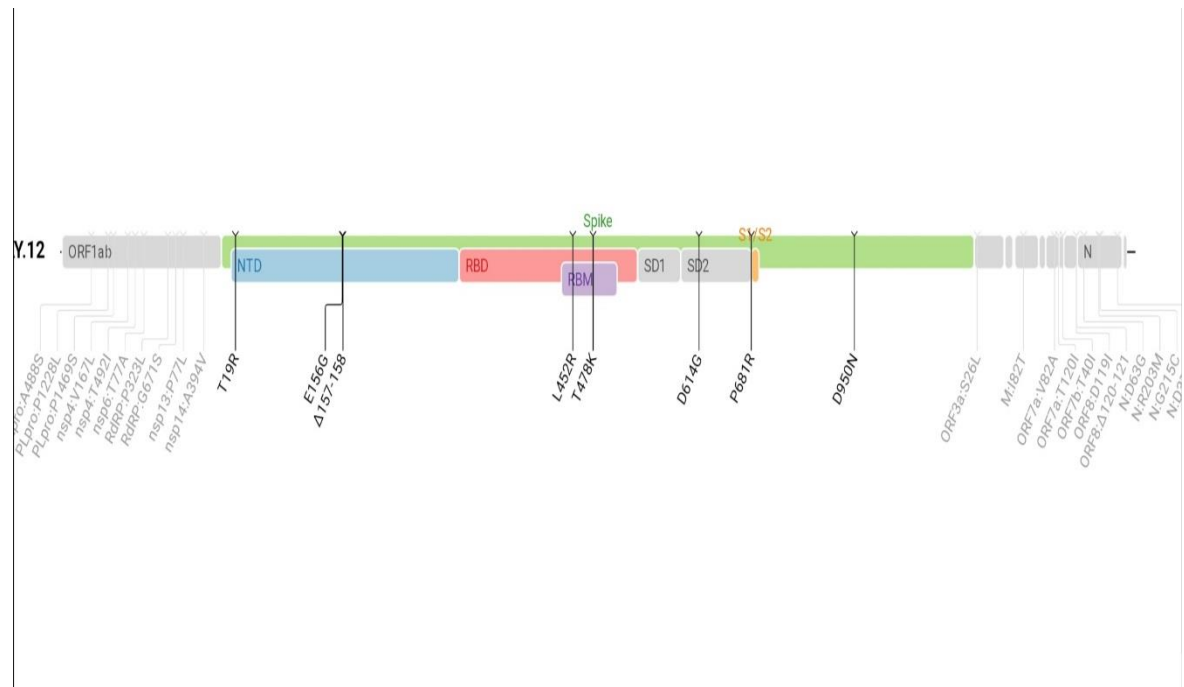
Figure 2.32 : AY.11 lignée

**O- AY.11 :**



**Figure 2.33 : AY.11 lignée**

**P-AY.12 :**



**Figure 2.34 : AY.12 lignée**

#### 4.2.5. Les mutations de variant omicron :

##### A-BA.1 :

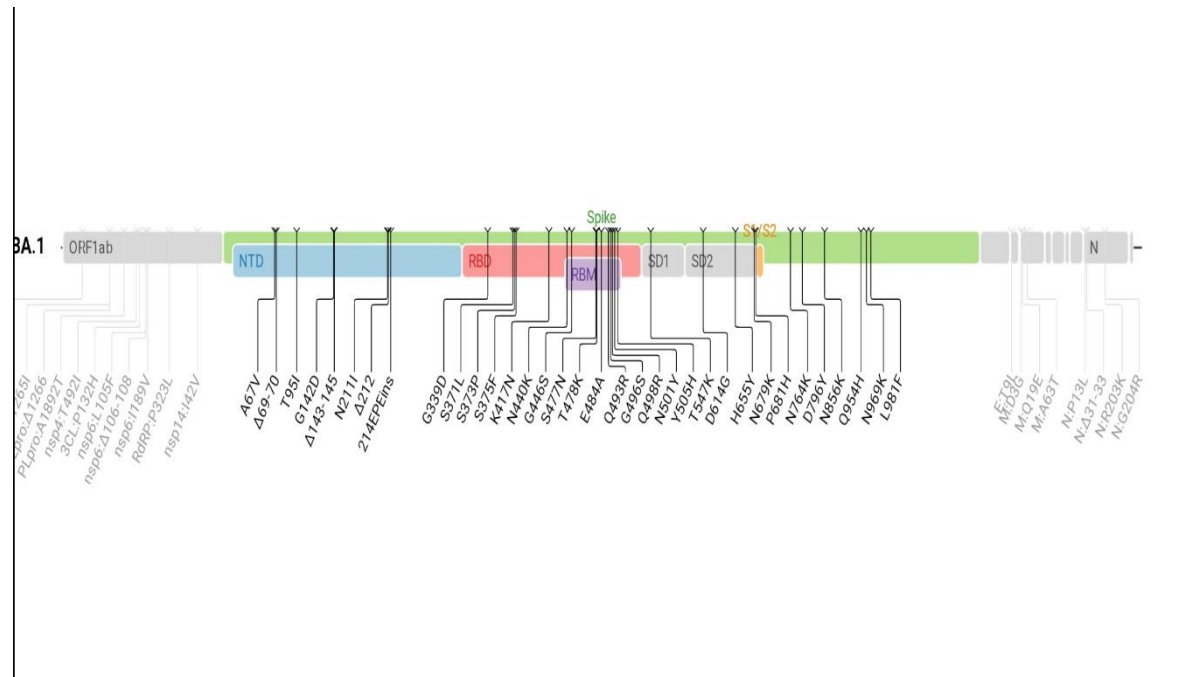


Figure 2.35 : BA.1 lignée

##### B-BA.2 :

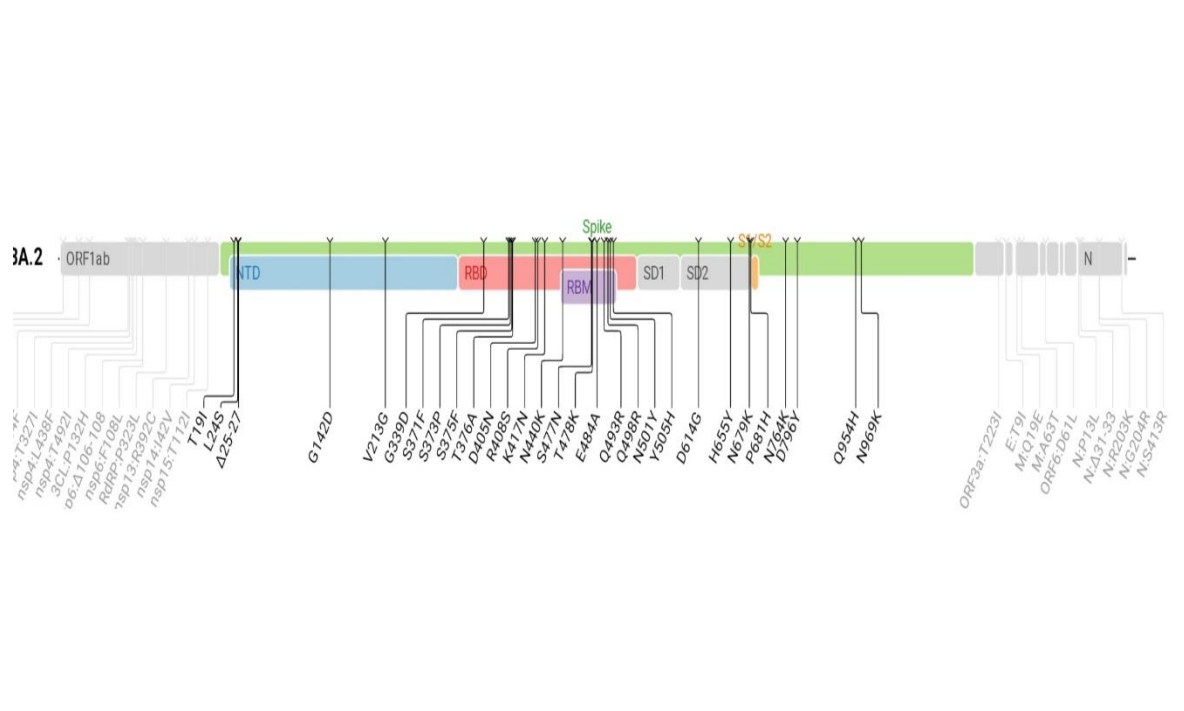


Figure 2.36 : BA.2 lignée

## C-BA.2.12.1 :

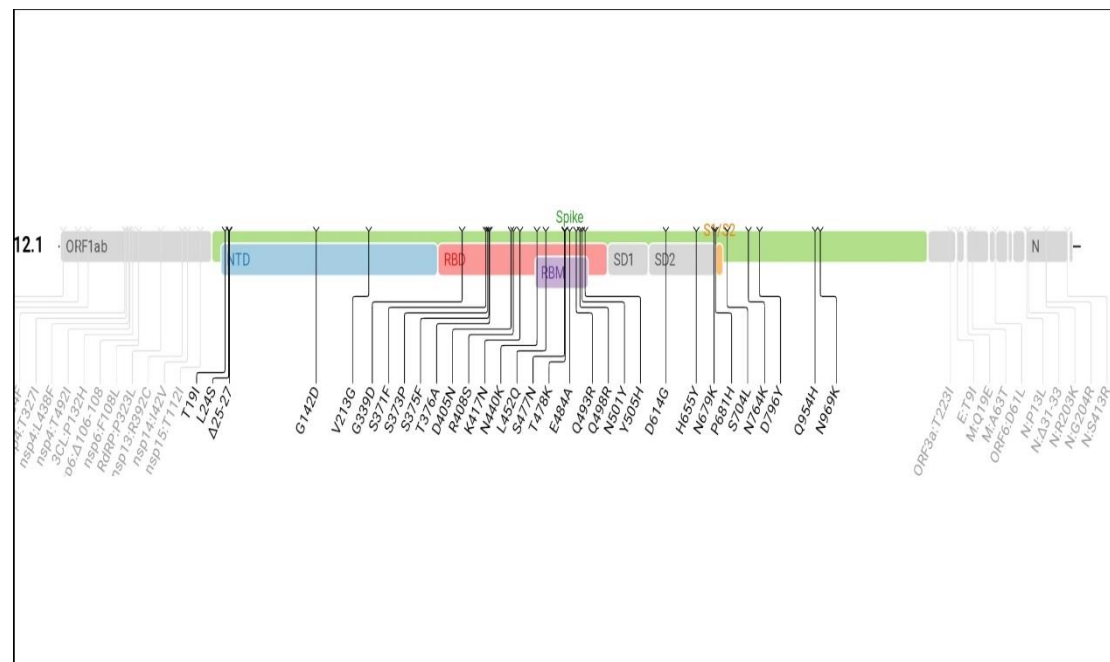


Figure 2.37 : BA.2.12.1 lignée

## D- BA.3 :

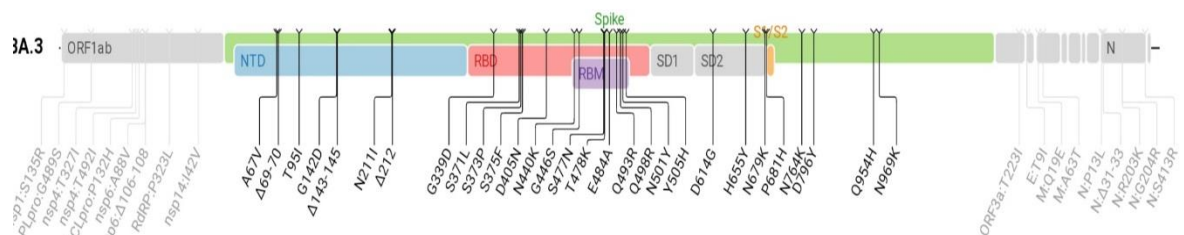


Figure 2.38 : BA.3 lignée

## E- BA.4 :

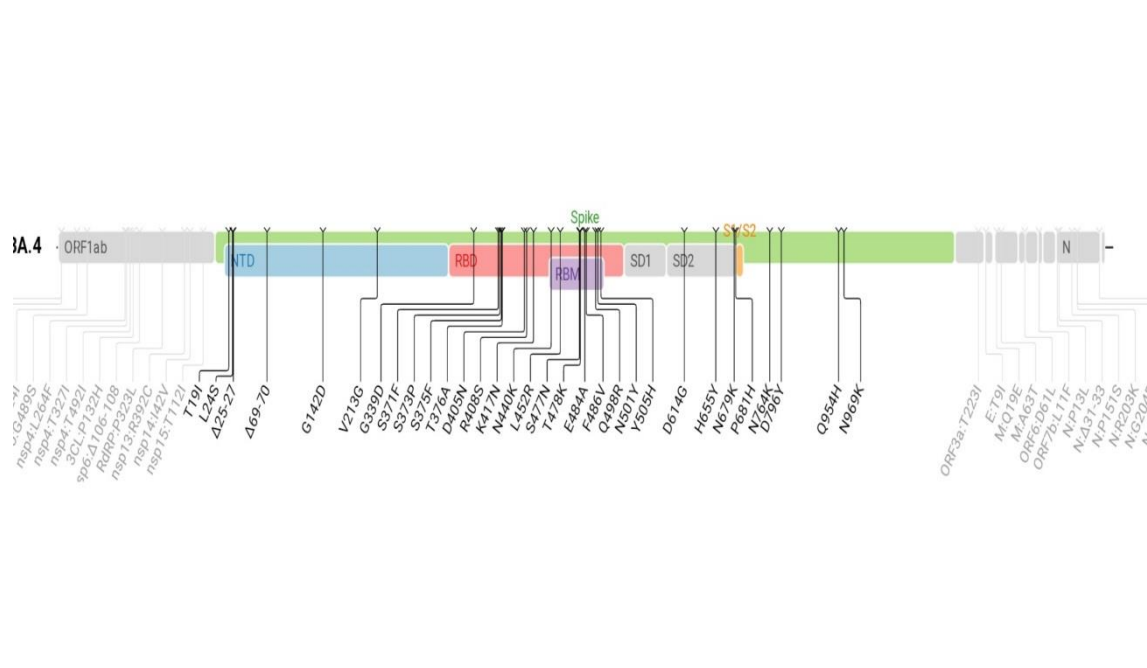


Figure 2.39 : BA.4 lignée

## F- BA.5 :

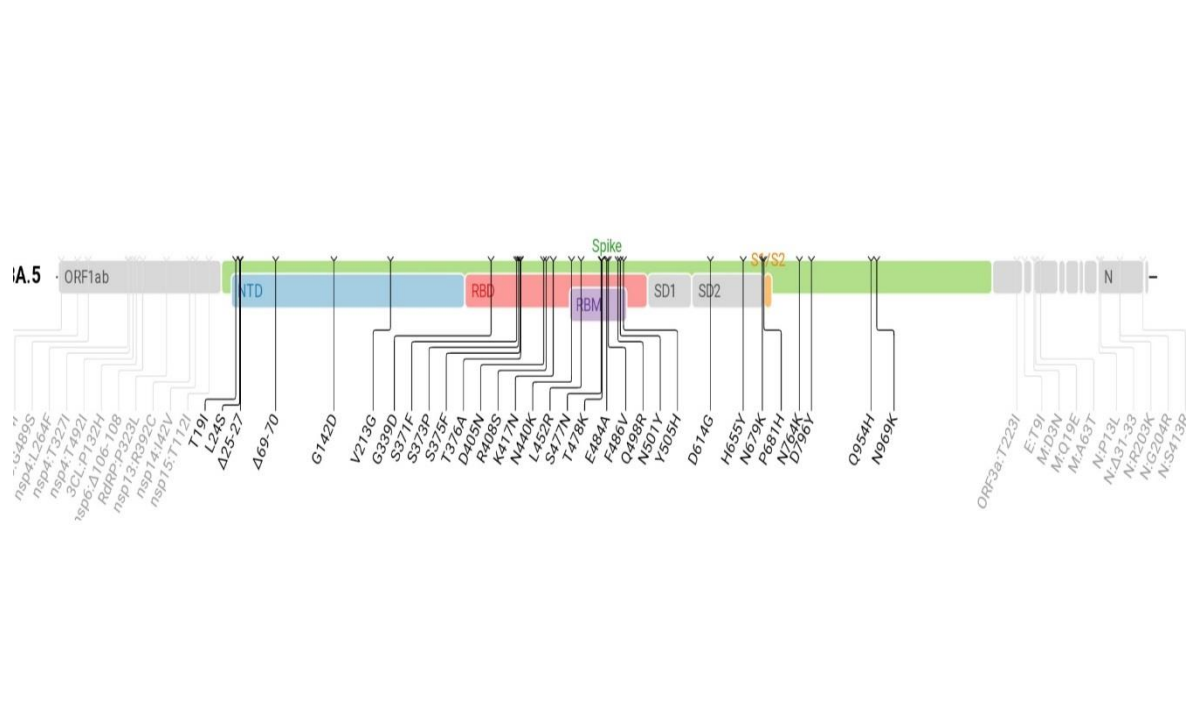


Figure 2.40 : BA.5 lignée

# CHAPITRE III : Présentation de Vitamine D

### **3.1.Généralités :**

Les vitamines sont des substances organiques sans valeur énergétique mais essentielles à l'organisme. Le corps humain ne peut généralement pas les produire seul, et leur apport alimentaire est donc indispensable. Elles participent à la construction de l'organisme (croissance, développement du squelette...), au fonctionnement et à l'entretien du corps (transformation et utilisation des macronutriments, vision, coagulation du sang, systèmes musculaire, nerveux, immunitaire, fabrication d'ADN...). "A ce jour, nous avons identifié treize vitamines, dont huit vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12), la vitamine C et quatre vitamines liposolubles, solubles dans le gras des aliments. Il s'agit des vitamines A, D, E et K" ( Emilie Tissandié ,Yann Guéguen ,Jean-Marc A.Lobaccaro Jocelyne Aigueperse et Maâmar ,2006).

### **3.2. Métabolisme de la vitamine D :**

#### **3.2.1. Définition de vitamine D :**

La vitamine D est un terme générique désignant tous les stéroïdes présentant une activité anti-rachitique. Les deux vitamines D2 (ergocalciférol) et D3 (cholécalférol) diffèrent par leur origine végétale ou animale et ont une activité biologique comparable chez les mammifères. Aussi le terme de vitamine D est-il utilisé pour désigner indifféremment l'une ou l'autre. Chez l'homme, la vitamine D a une double origine : exogène et endogène. La vitamine D est en effet apportée par l'alimentation, sous la forme de vitamine D2 dans les aliments d'origine végétale et de vitamine D3 dans les aliments d'origine animale.

Synonymes: vitamine D: ergocalciférol(vitamine D2), cholécalférol (vitamine D3). 25-hydroxyvitamine D3 ou 25 – hydroxy cholécalférol ou calcidiol, 25-hydroxyvitamine D2 ou 25- hydroxy- ergocalciférol (Biomnis, 2015).

#### **3.2.2. Sources de vitamine D :**

##### **A-Peau :**

La vitamine D3 est synthétisée dans la peau à partir des rayons ultraviolets B du soleil interagissant avec une molécule adipeuse (7-déhydrocholestérol) présente dans la peau, afin de créer de la pré-vitamine D. Celle-ci est ensuite transportée au foie, où la vitamine D<sub>2</sub> se forme. Transportée ensuite aux reins, la vitamine D<sub>2</sub> est convertie en

vitamine D<sub>3</sub> (parfois appelée ergocalciférol). C'est la vitamine D<sub>3</sub> qui est utilisée par les cellules de l'organisme. La création de la vitamine D<sub>3</sub> à partir de ses molécules précurseurs est facilitée par des enzymes.

Si l'organisme produit des quantités excessives de vitamine D<sub>3</sub> à partir des rayons de soleil, des enzymes s'activent pour convertir la vitamine D<sub>3</sub> en ses formes inactives(Sean R. Hosein ,2012).La synthèse cutanée représente la principale source d'apport en vitamine D(HAS, 2013).

#### **B-Alimentation :**

Quelques aliments contiennent naturellement de la vitamine D (cf tableau 1). Il s'agit principalement de poissons gras (foie de morue, saumon, sardine, maquereau...), du jaune d'œuf et de champignons (shiitake). Aux Etats-Unis beaucoup d'aliments sont enrichis en vitamine D (lait, céréales, jus d'orange, yaourts, margarines...). En Europe, depuis 2006, la réglementation permet l'ajout de vitamine D sous forme de vitamine D<sub>2</sub> ou de vitamine D<sub>3</sub> dans l'ensemble des denrées alimentaires. En France deux arrêtés<sup>2</sup> autorisent l'enrichissement de certains aliments comme le lait, les produits laitiers et les huiles(HAS,2013).

| <b>Produit</b>                                                 | <b>µg/100g*</b> |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|
| Huile de foie de morue                                         | 200             |
| Foie de morue en boîte                                         | 54.3            |
| Huile combinée (mélange de 4 huiles)<br>enrichie en vitamine D | 50              |
| Saumon, hareng, anchois, pilchard                              | 12-20           |
| Saumon cuit                                                    | 8.7             |
| Hareng fumé ou grillé                                          | 16.1-22         |
| Sardine, truite arc en ciel, maquereau,<br>margarine           | 8-12            |
| Maquereau frit ou sardine grillée                              | 12.3            |
| Anguille, thon, huître, caviar, jaune<br>d'œuf                 | 3-8             |

|                                                                                 |         |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Thon en boîte au naturel                                                        | 6.1     |
| Truite des rivières, limande, œufs de lompe                                     | 1.5-3   |
| Œuf                                                                             | 1.5     |
| Rouget, foies de génisse et d'agneau, beurre, jambon, lard, pâtés, champignons. | 0.6-1.5 |
| Fromage blanc ou yaourt nature enrichi en vitamine D                            | 1.25-5  |
| Merlu cuit                                                                      | 3.2     |
| Foie de veau cuit                                                               | 2.5     |
| Emmental                                                                        | 1.8     |
| Rôti de veau cuit                                                               | 1.3     |
| Camembert, Livarot, fromage des Pyrénées                                        | 0.7-1.1 |
| Beurre                                                                          | 1       |
| Foie de génisse cuit                                                            | 0.86    |
| Lait enrichi en vitamine D                                                      | 0.8     |

**Tableau 3.1 : Sources alimentaires de vitamine D (Base de données Ciqual, ANSES) (HAS ,2013- Florence Daine,2020)**

- 1 µg = 40 UI (24)

--Teneur en vitamine D en microgrammes (µg) pour 100 g d'aliment

-A titre d'exemple : 50 g de thon en boîte (une demi boîte) + 1 œuf + 30 g d'emmental (une part) + 10 cl de lait enrichi en vitamine D (un petit verre) = 100 % de l'apport conseillé à un enfant ou un adulte.

#### **C-Supplémentation médicamenteuse :**

La vitamine D existe également sous forme de suppléments médicamenteux. Différentes spécialités contiennent, à doses variées, soit de la vitamine D2 soit de la

vitamine D3. Cette supplémentation peut prendre la forme d'un traitement quotidien oral (à prendre pendant le repas) ou d'injections mensuelles ou trimestrielles (la vitamine D s'accumule dans la graisse du corps)(VIDAL,2016) .

### **3.3. Biosynthèse de la vitamine D<sub>3</sub> :**

#### **A-De la provitamine D à la vitamine D3 :**

Elle est initiée principalement dans la peau : les rayons UVB réagissent avec le 7-déhydrocholestérol (provitamine D cutanée) présent normalement dans les couches profondes de la peau pour produire la pré-vitamine D3. Il s'agit d'une réaction physicochimique où l'absorption des photons d'une certaine énergie par le 7-déhydrocholestérol provoque un réarrangement de structure (photoisomérisation). Cette pré-vitamine D3 est intrinsèquement instable et rapidement elle va subir un réarrangement de ses doubles liaisons pour former le cholécalférol (ou vitamine D3).

L'absorption intestinale de la vitamine D d'origine alimentaire se fait de façon passive dans l'intestin grêle. Elle va rejoindre ensuite la circulation générale par voie lymphatique, incorporée aux chylomicrons(Aimée VATAN ,2011).

#### **B-Le transport de la vitamine D3 au foie :**

La vitamine D2 ou D3 passe ensuite dans le sang circulant, puis elle est transportée jusqu'au foie grâce à une protéine porteuse, la vitamin D-binding protein (DBP). Elle ne peut circuler librement dans le plasma que véhiculée par cette protéine qui la protège de l'oxydation. La vitamine D d'origine cutanée représente habituellement environ 90% de la vitamine D circulante (Aimée VATAN ,2011).

#### **c-Les variations de synthèse**

Tout d'abord, les rayonnements ultraviolets sont facilement arrêtés par les nuages ainsi que les poussières dans l'atmosphère : d'où une faible efficacité de ce rayonnement dans les villes polluées. L'efficacité varie aussi d'après leur angle d'incidence, la latitude et la saison de l'année. De plus pour une même dose, une peau hypopigmentée va produire plus de vitamine D3 qu'une peau hyperpigmentée : la couche kératinisée ou les pigments mélaniques vont arrêter les rayons ultraviolets. Il y aura donc une prédisposition des africains par exemple à faire des carences en vitamine D lorsqu'ils iront habiter dans des pays peu ensoleillés. Enfin, la quantité de

7-déhydrocholesterol stockée dans la peau diminue avec l'âge ce qui induit une nette diminution de la synthèse cutanée de vitamine D3 au cours du vieillissement(**Aimée VATAN ,2011**).

#### **D-L'activation de la vitamine D**

**-L'étape hépatique :** la synthèse de 25-hydroxyvitamine D3 ou 25(OH) D3

Dès qu'elle arrive dans le foie, la vitamine D2 ou D3 est hydroxylée en position C-25 par la 25-hydroxylase (CYP2R1) : elle est ainsi transformée en 25(OH) D3, 25-hydroxyvitamine D3 ou calcidiol. D'autres enzymes, telle que la CYP27A1, peuvent également catalyser cette hydroxylation : ces cytochromes sont situés dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Cette 25(OH) D3 représente la forme de stockage avec une demi-vie plasmatique de deux à trois semaines. Elle est stockée dans le tissu adipeux et les muscles ce qui a pour conséquence que les sujets maigres ont une capacité de stockage plus faible que les sujets gras et sont donc susceptibles d'être plus facilement carencés. Elle va ensuite être prise en charge par la protéine plasmatique DBP pour être véhiculée jusqu'au rein, l'endocytose du complexe 25(OH) D3/DBP via la mégaline est l'une des voies d'entrée dans la cellule rénale du tube contourné proximal (**Nykjaer et al. 1999**).

**-L'étape rénale :**

Dans le tubule proximal, elle est hydroxylée en position C-1 par la 25(OH) D1-alpha hydroxylase (CYP27b1) mitochondriale et ainsi transformée en 1,25-dihydroxyvitamine D, 1,25(OH)<sub>2</sub> D ou calcitriol : qui est la forme biologiquement active avec une demi vie plasmatique de quatre heures.

Le rein est à l'origine de l'essentiel du calcitriol circulant, mais d'autres tissus cibles de la vitamine D (monocytes, peau, placenta, os, parathyroïdes, pancréas, peau, ganglions lymphatiques, poumon et glandes surrénales) expriment également cette enzyme(**Hewison, M, D Zehnder, R Bland, et Pm Stewart, 2000**) .La production extrarénale de 1,25(OH)<sub>2</sub> D est connue depuis longtemps et a été confirmée plus récemment .Mais le rôle physiologique auto/para ou endocrine du calcitriol produit de façon extrarénale reste encore largement méconnu. Une fois synthétisée, la vitamine D3 active va diffuser dans l'organisme et agir sur ses organes cibles tels que l'intestin,

l'os, les reins et les parathyroïdes(**Lambert et , P W, P H Stern, R C Avioli, N C Brackett, RT Turner, A Greene, I Y Fu, et NH Bell 1982**).

#### **e-Le stockage et la dégradation de la vitamine D :**

##### **-Le stockage :**

Le stockage semble avoir lieu dans le muscle, le tissu adipeux et le foie. Le renouvellement du stock est lent : une charge massive unique empêche une carence pendant deux à trois mois.

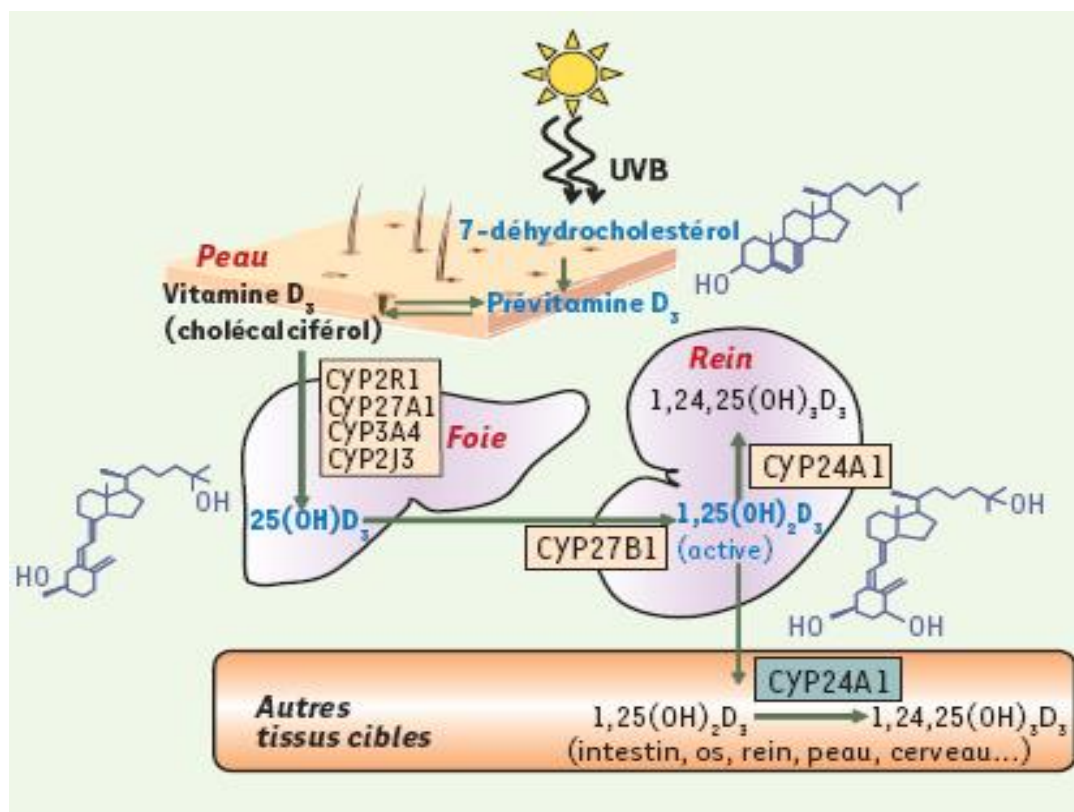
##### **-Le catabolisme et l'élimination du calciférol**

La concentration circulante de la vitamine D active dépend également de son catabolisme. La CYP24A1 catalyse la conversion de 1,25-dihydroxyvitamine D3 en 1,24,25- trihydroxyvitamine D3 : c'est la première étape dans la voie de dégradation de la vitamine D qui aboutira à la formation d'acide calcitroïque inactif.

La CYP24A1 est ubiquitaire et contrôle ainsi les concentrations locales de vitamine D active au niveau des différents tissus, elle peut aussi catalyser une hydroxylation en C-23 et produire de la 1-alpha,25(OH)<sub>2</sub> D-26,23-lactone.

Le calcitriol stimule l'expression CYP24A1 et active ainsi sa propre destruction alors que la PTH l'inhibe.

L'élimination de la vitamine D et de ses métabolites se fait par voie fécale(**Tissandié, Emilie, Yann Guéguen, Jean-Marc Lobaccaro, Jocelyne Aigueperce, et Paâmar Saouidi, 2006**).



**Figure 3.1 : Schéma du métabolisme de la vitamine D3.**

Dans la peau, le précurseur de la vitamine D3, le 7-déhydrocholestérol, est transformé en prévitamine D3 qui est secondairement isomérisée en vitamine D3 (ou cholécalférol). Dans le foie, la 25-hydroxyvitamine D3 ou 25(OH)D3 est synthétisée à partir de la vitamine D3 après action de CYP27A1, CYP2R1, CYP2J3 ou CYP3A4. Dans les tissus cibles, la 1 $\alpha$ -hydroxylase CYP27B1 synthétise la forme biologiquement active 1,25-dihydroxyvitamine D3 ou 1,25(OH) $_2$ D3. Son catabolisme (essentiellement dans le rein) est initié par la 24-hydroxylase CYP24A1 (Tissandier, Emilie, Yann Guéguen, Jean-Marc Lobaccaro, Jocelyne Aigueperce, et Paâmar Saouidi, 2006).

### **3.4. Maladies associées au métabolisme de la vitamine D :**

Les maladies liées au statut vitaminique D sont très souvent le résultat d'une carence en vitamine D. Cette carence entraîne un rachitisme chez le jeune en croissance (Garabédian M, Menn S, Walrant-Debray O, et al, 2005). Chez l'adulte, un trouble de la minéralisation osseuse, appelé ostéomalacie (Maugars Y, Glémarec J, Guillot P, et al, 2000), peut entraîner une hypersécrétion de PTH. Chez la personne âgée, cette carence constitue un terrain favorable à l'ostéoporose, maladie caractérisée par une masse minérale basse et des altérations de la microarchitecture osseuse (Breuil V,

**Euller-Ziegler,2004).** Les fractures sont la complication la plus fréquente et s'accompagnent d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité. Il est intéressant de noter que l'ostéomalacie peut résulter de la prise prolongée de médicaments tels que le phénobarbital ( **Gascon-Barré M, 2004**), qui après activation du récepteur nucléaire PXR, induit l'expression de CYP24A1, ce qui conduit à la dégradation incontrôlée de la vitamine D active entraînant une altération de l'homéostasie phosphocalcique ( **Pascussi JM, Vilarem MJ,2005**).

Il existe également des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine D à transmission autosomique récessive. Le rachitisme pseudo-carenciel de type I résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant CYP27B1 (**Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, et al,2002**). Le taux de 25(OH)D<sub>3</sub> est normal chez les individus atteints du rachitisme pseudo-carenciel de type I alors que le taux de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> s'effondre. Des déformations et douleurs osseuses, un retard de croissance et une myasthénie caractérisent la maladie. L'administration de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est nécessaire pendant toute la vie des personnes atteintes de cette affection. A l'inverse, le rachitisme pseudo-carenciel de type II résulte d'une anomalie de l'expression du gène codant VDR. Il se caractérise donc par une résistance des organes cibles à l'action de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dont le taux est élevé. Ce rachitisme pseudo-carenciel de type II se manifeste par un tableau de rachitisme sévère et précoce, associé à une alopecie dans 80 % des cas. Le traitement consiste en l'administration de doses massives de tous les dérivés de la vitamine D<sub>3</sub> et de calcium (**Dumas R ,1999**).

À côté de ces états de carence, de déficit ou d'insuffisance en vitamine D, un apport excessif (intoxication) peut entraîner une hypervitaminose qui provoque une hypercalcémie par augmentation de l'absorption intestinale et de la résorption osseuse. Cette hypercalcémie peut conduire à des atteintes rénales (lithiases et néphrocalcinoses). Les cas d'hypervitaminose endogène sont rares sauf dans certaines maladies telles que les granulomatoses qui se caractérisent par une production non contrôlée de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (**Souberbielle JC, Friedlander G, Kahan A, Cormier C,2006**)-(**Holick MF,1995**)

### **3.5. Dosage sanguin de la vitamine D :**

#### **3.5.1. Résultats normaux :**

Dosage de 25-OH- D3 : 75 à 200 nmol/L soit 30 à 80 µg /L Seuil de toxicité > 250 nmol/L soit 100 µg /L(Annabelle Iglesias,2020).

#### **3.5.2.Taux de vitamine D élevé**

Un taux de vitamine D3 élevé dans le sang peut-être le signe :

- d'une intoxication lors de traitements par la vitamine D .
- d'une lithiase hypercalcémique .
- d'une sarcoïdose(Annabelle Iglesias,2020).

#### **3.5.3.Taux de vitamine D bas**

Un taux de vitamine D3 bas dans le sang peut être lié à :

- un rachitisme ou une ostéomalacie par carence nutritionnelle ou digestive
- une ostéoporose sénile
- la maladie de Paget
- un cancer de la prostate
- des apports insuffisants (les carences s'observent généralement pendant la grossesse, la croissance et chez les personnes âgées)
- une hyperparathyroïdie ;
- une insuffisance hépatique ou une cirrhose : pas de forme active
- une insuffisance rénale ou une hypoparathyroïdie
- un traitement par anti-convulsivants ;
- une néphrose(Annabelle Iglesias,2020)

### **3.6.Compléments alimentaires à base de vitamine D : posologie et indications :**

Les compléments alimentaires à base de vitamine D sont particulièrement indiqués pour favoriser la santé osseuse et musculaire. Ils permettent aussi de stimuler les défenses immunitaires et de préserver les fonctions cognitives. Vous pouvez trouver les compléments alimentaires sous forme huileuse ou en gélules, à base de vitamine D2 ou de vitamine D3. Il semblerait que la vitamine D3 sous forme huileuse soit la mieux assimilée par l'organisme. La posologie de la vitamine D est en général de 15 à 30 microgrammes par jour(Léa Zubiria ,2022).

### **3.7.Vitamine D comme traitement :**

#### **3.7.1.QUELLE EFFICACITÉ POUR LA VITAMINE D ? :**

L'administration de vitamine D fait partie des traitements préventifs de l'ostéoporose, en particulier chez les femmes ménopausées habitant des régions peu ensoleillées. La vitamine D est parfois prescrite aux personnes de tous âges qui s'exposent peu à la lumière du jour, comme les grands malades, les invalides, les personnes âgées ou les habitants des pays nordiques, particulièrement en hiver.Le lait maternel renfermant relativement peu de vitamine D, une courte exposition du bébé au soleil plusieurs fois par semaine est souvent recommandée. De plus, une administration de 400 à 800 UI (unités internationales) par jour de vitamine D est également recommandée chez l'enfant au sein ou consommant moins de 500 ml de lait pour nourrissons par jour.Concernant le psoriasis, des traitements locaux à base de dérivés de la vitamine D, comme le calcipotriol par exemple, sont couramment prescrits par les dermatologues.Le rôle de la vitamine D dans la stimulation du système immunitaire n'est pas démontré.Récemment, une analyse croisée de dix-huit études a révélé qu'une supplémentation médicalement contrôlée de vitamine D pendant plusieurs années semble réduire le risque de développer des maladies cardiovasculaires, un diabète de type 2, et même certains cancers. Néanmoins, des études plus poussées sont nécessaires pour confirmer cette tendance(VIDAL,2016).

#### **3.7.2. PRÉCAUTIONS À PRENDRE AVEC LA VITAMINE D :**

La vitamine D s'accumule dans l'organisme : un excès d'apport peut avoir de graves conséquences qui persisteront plusieurs semaines après l'arrêt de la prise de

cette vitamine. Néanmoins, les cas d'intoxication sont exceptionnels et correspondent à la prise de doses extrêmement élevées de vitamine D. En provoquant une élévation anormale et permanente du taux de calcium dans le sang, un surdosage en vitamine D provoque des nausées, des maux de tête, des douleurs des muscles et des os, des troubles du rythme cardiaque, ainsi que des dépôts de calcium dans les reins, les vaisseaux sanguins, le cœur et les poumons. De graves troubles rénaux peuvent apparaître et mettre la vie en danger. Ces effets indésirables apparaissent dès que l'apport quotidien dépasse 50 000 UI, équivalentes à 1,25 mg par jour. Les personnes qui prennent des médicaments contre les troubles du rythme cardiaque doivent éviter de prendre des compléments alimentaires contenant de la vitamine D. Dans tous les cas, la prise de doses quotidiennes supérieures à 2 000 UI (50 µg) doit se faire sous contrôle médical (Vidal, 2016).

### **3.7.3. FORMES ET DOSAGE DE LA VITAMINE D**

La vitamine D et ses dérivés se présentent sous diverses formes : comprimés, capsules molles, solutions huileuses, crèmes ou solutions injectables par exemple. Dans le cas d'une insuffisance d'apport, le médecin peut prescrire la vitamine D sous forme de doses hebdomadaires de 400 à 2 000 UI (10 à 50 µg) pendant huit semaines, ou sous forme d'une dose unique pour l'hiver (Samantha Pagès, 2021).

# Chapitre IV : coronavirus et la vitamine D

#### **4.1.la relation entre le covid 19 et lavitamineD3 :**

La vitamine D, de plus en plus demandée en pharmacie et de plus en plus prescrite, pourrait être un atout dans le traitement du Covid-19 en réduisant la mortalité ou la gravité de la maladie. Son effet immunomodulateur potentiel est actuellement étudié par de nombreuses équipes internationales de chercheurs(**Anne-Claire N ,2021**).Une étude anglaise a également rapporté que la prise de fortes doses de vitamine D3 (environ 280 000 UI sur une période de 7) était associée à une amélioration de 87 % de la survie chez les patients hospitalisés pour Covid-19, initiales de 25 (OH)D(**Françoise Debiais,2021**).La vitamine D est connue pour son rôle dans le métabolisme du calcium (absorption intestinale, fixation osseuse). Mais elle a d'autres effets, antiviraux et anti-inflammatoires, médiés par son action sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ACE2) et la régulation qu'elle exerce sur la production de cytokines par les macrophages et les lymphocytes(**Hugues TOLOU ,2022**) . Certaines études ont montré que les personnes hospitalisées pour une forme sévère de la COVID-19 présentent également un faible taux de vitamine D (carence en vitamine D). Cependant, les facteurs de risque de développer une forme sévère de la COVID-19 sont les mêmes que ceux de développer une carence en vitamine D, il est donc difficile de dire si la carence en vitamine D elle-même est un facteur de risque de forme sévère de la COVID-19. Les facteurs de risque comprennent une mauvaise santé générale, une mauvaise alimentation et des problèmes de santé préexistants, tels que le diabète, les maladies du foie et des reins.La vitamine D est importante pour la santé des os, des dents et des muscles. Elle aide à réguler la glycémie, le cœur et les vaisseaux sanguins, ainsi que les poumons et les voies respiratoires. Elle joue également un rôle dans le renforcement du système immunitaire de l'organisme. Il s'agit de zones affectées par la COVID-19, donc donner de la vitamine D aux personnes atteintes de la COVID-19 pourrait les aider à se rétablir plus rapidement ou à réduire le risque de forme sévère( **Stroehlein JK, Wallqvist J, Iannizzi C, Mikolajewska A, Metzendorf M-I, Benstoem C, Meybohm P, Becker M, Skoetz N, Stegemann M, Piechotta V ,2021**).

#### **4.2. Relations avec l'atteinte des voies respiratoires et la réponse immunologique :**

Dans le cas de l'infection à SARS-CoV-2, des rôles clé ont été suggérés pour la vitamine D, sous tendus principalement par son influence sur la sévérité des affections

aiguës du système respiratoire. L'enzyme responsable de la synthèse de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D est présente dans de nombreux tissus, notamment les cellules de la lignée myéloïde et les macrophages. La vitamine synthétisée en dehors des reins ne contribue pas significativement à la concentration circulante, mais a une action locale, autocrine et paracrine. Contrairement à la synthèse rénale, elle n'est pas régulée par l'hormone parathyroïdienne, mais par les cytokines et dépend largement de la concentration circulante de 25(OH)D. De sorte que, même si le taux circulant de 1,25(OH)<sub>2</sub>D reste normal en présence de concentrations fort basses de 25OHD, le taux local de 1,25(OH)<sub>2</sub>D est, lui, diminué. De nombreuses études in vitro ont montré que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D augmente la capacité germicide des macrophages et la formation de jonction serrées entre les cellules épithéliales, qui constituent une barrière physique à la pénétration des microorganismes **(Bilezikian JP, Bikle D, Hewison M, Lazaretti-Castro M, Formenti AM, Gupta A, et al, 2020)**. Elle agit également comme modulateur de la réponse immunitaire de la sécrétion des cytokines. Ces deux actions ont potentiellement un effet favorable sur la protection vis-à-vis de la Covid-19 et d'autres infections des voies respiratoires, et aussi sur la prévention de la tempête cytokinique à la base des formes graves de la Covid-19. Indépendamment, la vitamine D est un régulateur du système rénine/angiotensine (RAS) **(- Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J, 2004)** qui est probablement impliqué dans la pathogénie des formes graves de la maladie. Plusieurs études observationnelles ont associé la prévalence des infections virales des voies respiratoires (IVR) et un statut déficient en vitamine D. Les essais contrôlés examinant l'effet d'une administration de vitamine D sur l'incidence et la sévérité des IVR ont donné des résultats variables, et souvent décevants. Néanmoins, une méta-analyse de 25 études randomisées contre placebo **(Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al, 2017)**, a montré une réduction du risque d'IVR de 12 % (IC : 4 à 19) chez les patients recevant le traitement. L'étude montre également que cette diminution significative du risque n'est observée que pour des prises régulières, quotidiennes ou hebdomadaires, et non pour de fortes doses données en bolus. Elle est plus significative, avec une réduction du risque de 70 % (IC : 47 à 83) en cas de carence initiale (25OHD inférieure à 25nmol/L).

### **4.3. Effets d'un apport complémentaire sur l'évolution de la Covid-19 :**

Plusieurs auteurs suggèrent que la déficience en vitamine D pourrait être associée à un plus haut taux d'infection par le SARS-CoV-2 . Certaines études ont également suggéré qu'un taux bas de 25(OH)D pourrait être associé à la sévérité de l'expression de la maladie . Une récente étude de cohorte rétrospective (270 patients) ne trouve par contre aucune association significative entre le taux de vitamine D et les conséquences cliniques de la maladie. On ne dispose pas d'études de qualité sur l'administration de vitamine D et la susceptibilité au virus ou le développement de formes graves. Comme il n'est pas éthique de laisser des patients en carence profonde en vitamine D, de telles études ne pourraient concerner que des individus ayant au départ des taux de 25(OH)D supérieurs à 25 nmol/L, ce qui, au vu des résultats de Martineau et al, réduirait très probablement leur puissance à montrer un effet favorable. Par contre, Annweiler et al (2020) ont publié récemment une étude observationnelle chez 77 patients âgés (84 à 93 ans) admis avec un test positif pour le SARS-CoV-2 qu'ils ont répartis en 3 groupes : le groupe 1 (n = 29) sont des patients qui ont reçu dans l'année précédant l'admission une supplémentation orale régulière en vitamine D3 à raison de 50 000 UI (1 250 µg) par mois ou 80 000 UI (2 000 µg) tous les 3 mois, sur base du dossier médical ; le groupe 2 (n = 16) sont des patients qui ont reçu 80 000 UI (2 000 µg) de vitamine D dans les quelques heures suivant le diagnostic ; le groupe 3 (n = 32) comprend tous les autres et sert de référence. Après ajustement pour les co-variables (âge, comorbidités), ils observent une mortalité significativement plus basse et une sévérité significativement moindre de la maladie dans le groupe 1 que dans le groupe de référence. Par contre, il n'y avait pas de différencesignificative entre les groupes 2 et 3. Cette observation supporte l'hypothèse qu'un meilleur statut en vitamine D pré-infection réduit le risque de faire une forme sévère de la Covid-19, mais pas qu'une intervention même précoce après le diagnostic pourrait améliorer la situation. Il n'est cependant pas exclu que des doses élevées de vitamine D administrées précocement pourraient avoir une action positive. Le même groupe a entamé une étude randomisée etcontrôlée comparant l'effet de deux dosages de vitamine D (50 000 vs 200 000 UI) administrés à l'admission sur l'évolution . Les résultats sont annoncés pour mai 2021. Une autre étude récente a montré par contre que l'administration de relativement hautes doses de calcifediol (25(OH)D) (2 x 266 µg en une prise et 266 µg/semaine par la suite) à un groupe de 75

patients randomisés 2/1 diminuait significativement le risque d'admission aux soins intensifs et de mortalité, mais il s'agit d'une étude qui reste critiquable, notamment en raison du fait qu'elle n'est pas en double insu et que

le taux de base de vitamine D est inconnu. De plus, il s'agit d'une population plus jeune, avec un âge moyen de 52 ans (Entrenas Castillo et al, 2020). Ces quelques études montrent que la vitamine D pourrait faire partie de l'ensemble des mesures prises pour diminuer le risque d'évolution de l'infection vers la maladie et, peut-être, la fréquence des formes sévères de la maladie. A ce stade, il n'y a pas de preuves suffisantes que la complémentation en vitamine D chez des patients infectés prévienne une évolution néfaste (deux études non concordantes, mais dans des populations différentes).

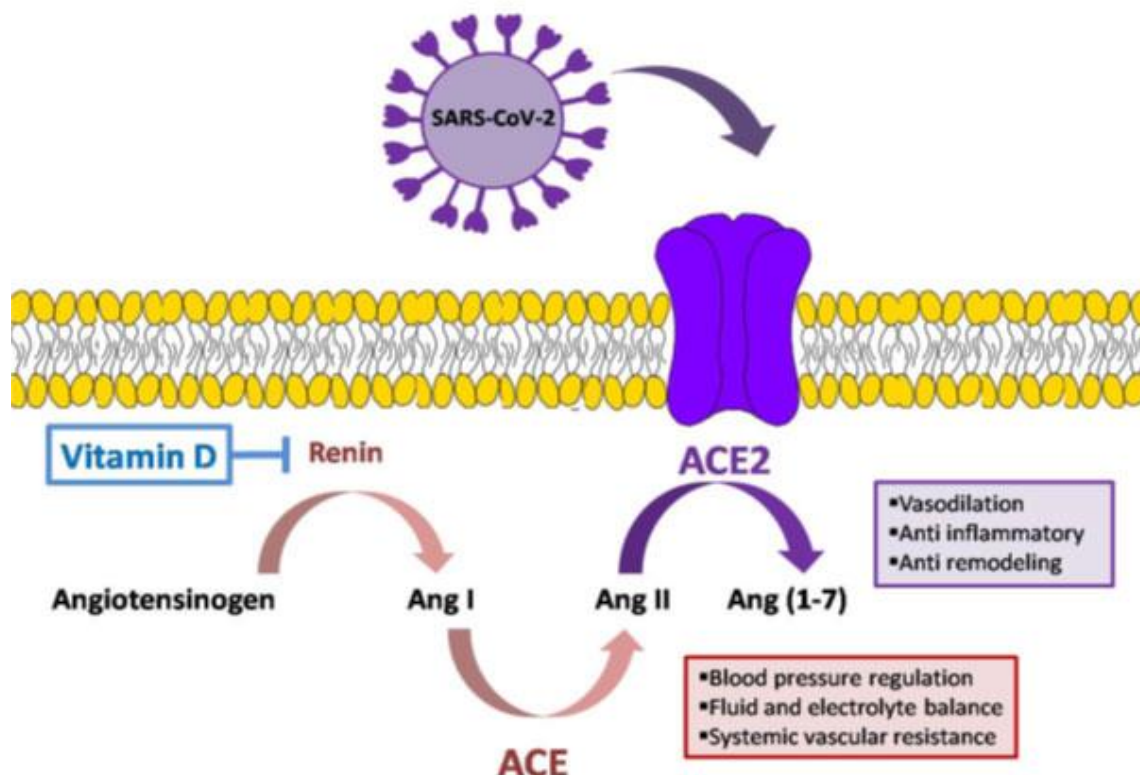
De même, il n'y a pas d'argument solide soutenant l'administration de vitamine D à très hautes doses, mais plutôt une supplémentation régulière dans le temps.

#### **4.4. La vitamine D diminuerait la gravité de la Covid-19 :**

Les études en faveur de la vitamine D pour lutter contre la Covid-19 se multiplient. Celle-ci n'est pas un remède et ne se substitue pas au vaccin, mais permettrait d'éviter les formes graves de la maladie. "La vitamine D permet de réguler la production de différentes protéines, dont des protéines anti-inflammatoires et des peptides anti-microbiens", résume sur Franceinfo Cédric Annweiler, chef du service de gériatrie au CHU d'Angers, qui dirige une étude nommée CoViTrial, labellisée "priorité de recherche nationale" et qui vise à mesurer l'efficacité d'une très forte dose de vitamine D sur les patients atteints du virus. Selon Cédric Annweiler, cette vitamine joue aussi un rôle sur le système rénine-angiotensine, "le récepteur ACE2, qui est la cible du virus Sars-CoV-2, sa porte d'entrée dans notre organisme". "Des études françaises ont montré que chez les personnes âgées, celles qui reçoivent régulièrement des suppléments de vitamine D, ont un risque diminué de 90% de faire une forme grave si elles contractent l'infection", renchérit-il sur France Inter, expliquant que la vitamine D peut "être une arme de plus face au Covid"(Frédéric Sergeur, 2021).

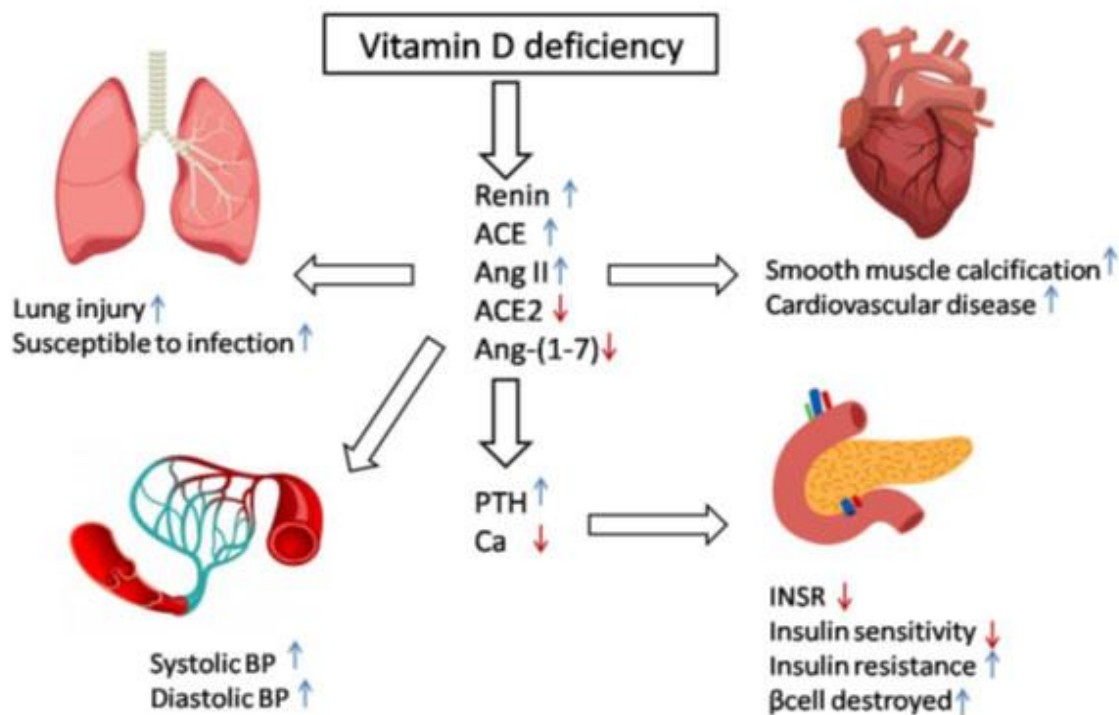
La pathogenèse des lésions pulmonaires aiguës survenant dans la Covid-19 implique une stimulation de la production de rénine, d'enzyme de conversion (ACE), d'angiotensine II et du récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R), ainsi qu'une inhibition de la synthèse d'ACE2, une autre enzyme de conversion membranaire ayant une forte similitude avec l'ACE (Ghavideldarestani M, Honardoost M, E

**Khamseh M, 2020).** Or, il a été découvert que la pénétration du Sars-CoV2 dans les cellules humaines s'effectue grâce à cette ACE2, qui agit en tant qu'exopeptidase permettant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine 1-9, un nonapeptide inactif. L'ACE2 est exprimée dans l'épithélium du tractus respiratoire, les pneumocytes et la muqueuse orale, qui constituent ainsi des portes d'entrée pour le Sars-CoV2. Son expression est également constatée sur les lymphocytes des muqueuses orale et digestive. La vitamine D pourrait ainsi atténuer les lésions pulmonaires aiguës en induisant l'expression de l'ACE2 et de l'angiotensine 1-7 et en inhibant la sécrétion de rénine et la cascade ACE/angiotensine II/AT1R (figure 1). Angiotensines I et II sont clivées par l'enzyme de conversion ACE. Dans l'organisme, la liaison de l'angiotensine II avec l'AT1R induit vasoconstriction artérielle, inflammation aiguë et apoptose. L'angiotensine 1-7 est antagoniste des effets de l'angiotensine II, et exerce ainsi des effets anti-inflammatoires et vasodilatateurs, et s'oppose au remodelage vasculaire. Le rapport angiotensine II/angiotensine 1-7 est déterminé par l'équilibre entre les niveaux de l'ACE et de l'ACE2. Des niveaux élevés d'ACE/angiotensine II et des niveaux bas d'ACE2/angiotensine 1-7 sont impliqués dans la pathogénie des lésions pulmonaires aiguës. Une surexpression de l'ACE2 et du récepteur de la vitamine D serait protectrice vis-à-vis des lésions d'alvéolite.



**Figure 4.1 : L'ACE2, le système rénine-angiotensine et la vitamine D**

La vitamine D pourrait intervenir à ce niveau, en inhibant la sécrétion de rénine et en surexprimant l'ACE2, ce qui a pour effet de réprimer l'activité du système rénine angiotensine, avec régulation de la pression artérielle, pour la normaliser, et diminution des résistances vasculaires systémiques afin de contrecarrer la vasoconstriction. Les études épidémiologiques ont mis en évidence une probabilité plus importante d'aggravation de la pathologie Covid-19 et de la mortalité afférente chez les patients atteints de comorbidités telles qu'obésité, diabète, hypertension, pathologies cardiovasculaires et respiratoires chroniques ou cancers, et chez les sujets âgés. De nombreuses études ont par ailleurs rapporté un lien entre la fatalité d'évolution clinique (case-fatality rates) et la carence vitaminique D qui prédomine chez ces patients. Une carence prolongée pourrait ainsi être considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant, potentialisant le risque de sévérité cardiorespiratoire chez les sujets fragiles infectés par le Sars-CoV2 et par lequel une décompensation en cascade des comorbidités est redoutée en raison de l'inflammation aiguë systémique potentiellement induite par une suractivation du système rénine-angiotensine figure 2.



**Figure 4.2 : La carence vitaminique D et les conséquences sur les principales comorbidités en contexte d'infection Covid-19 (Ghavidelarestani M, Honardoost M, E Khamseh M, 2020).**

À l'appui de cette hypothèse, une récente étude observationnelle multicentrique (trois hôpitaux d'Asie du sud) et rétrospective a démontré l'importance d'un taux sérique vitaminique D suffisant pour limiter le risque de sévérité de la Covid-19, et a ainsi conduit à discuter de l'option thérapeutique d'une supplémentation en vitamine D pour prévenir une aggravation potentiellement induite par une carence initiale (Alipio M, 2020).

La vitamine D intervient probablement dans le cours évolutif de la Covid-19 en atténuant le processus d'emballement inflammatoire au niveau du système rénine-angiotensine et en affectant le système immunitaire (Grant W-B, Lahore H, McDonnell S-L, Baggerly C-A, French C-B, Aliano J-L, Battoa H-P, 2020). Grâce à ses propriétés anti-infectieuses et immunomodulatrices, la supplémentation systématique devrait constituer une alternative thérapeutique intéressante en tant que stratégie antivirale à visée prophylactique et curative (Daneshkhah A, Agrawal V, Eshein A, Subramanian H, Roy H-K, Backman V, 2020). Des études randomisées contrôlées de large ampleur, en termes de taille et de typage clinique des populations, sont à mener afin de déterminer dans quelle mesure la gestion de la pandémie à Sars-

CoV2 pourrait passer par celle de la carence vitaminique D, qui existe de façon continue dans la plupart des pays du globe. Explorer l'utilisation thérapeutique de la vitamine D dans la prévention de l'hyperactivation inflammatoire de la pathologie Covid-19, et obtenir une meilleure compréhension des effets de la vitamine D, à la fois pro-oxydants sur le système immunitaire et antioxydants sur les cellules pulmonaires, seraient les objectifs premiers à atteindre de ces études(Ilie P-C, Stefanescu S, Smith L,2020).

# DEUXIEME Partie : Étude expérimentale

# Chapitre V : Matériel et méthode

### 5.1. Généralité sur l'in silico :

La recherche in silico. Ce vocable indique le début et l'ampleur d'un phénomène en biologie moléculaire : les recherches ne sont plus seulement in vivo ou in vitro, mais ont un recours de plus en plus essentiel aux analyses informatiques. Il souligne ainsi l'importance des technologies de l'information et de la communication (TIC) dans le développement de cette discipline et en désigne surtout deux champs spécifiques : la génomique et la bio-informatique. Nous présentons ici un modèle explicatif du cycle de l'information scientifique et technique (IST) dans cette communauté par le biais d'une observation participante effectuée au sein d'un laboratoire de génétique des microbes à l'INRA. Nous avons appréhendé l'appropriation de l'information numérique par les chercheurs à l'aide d'un modèle heuristique construit sur le cycle de vie du document (acquisition, recherche, archivage...) et de transformation de l'information (informations / documents / connaissances) intitulé cycle de l'information scientifique et technique. L'activité informationnelle des chercheurs est circonscrite par ce modèle. Le "bouclage"<sup>4</sup> d'un cycle induit la construction de connaissances, d'informations et de documents. La collecte peut être réalisée à partir de banques de données, de sites web, d'expériences dans les laboratoires, de "butinage" (browsing) dans les rayonnages d'une bibliothèque... Le traitement correspond à l'activité cognitive des chercheurs ou à des manipulations par des outils informatiques. La diffusion est définie comme l'ensemble des opérations nécessaires à la propagation des connaissances. La transformation de l'information s'inscrit dans ce processus où la connaissance est la formation des idées, l'information est la mise en forme des connaissances (in-formation) et l'information inscrite sur un support constitue un document. Le concept d'unité informationnelle veut mettre en exergue la "granularité" de l'information et désigne une partie de document à collecter ou à traiter (Gabriel Gallezot, 2002).

### 5.2. Définition de l'in silico :

Ces méthodes, également appelées les SAR ou (Q)SAR pour (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationship* ou « systèmes experts », font appel à des outils informatiques, d'où leur nom « in silico ». Les SAR représentent une relation entre la structure d'un composé ou d'une classe de composés et un effet biologique, et donnent une réponse de type oui/non. Les (Q)SAR utilisent des modèles mathématiques plus élaborés et

donnent des réponses plus complètes. Ces deux catégories reposent sur des bases de données obtenues d'après des études *in vivo* ou *in vitro*, ou d'après des observations d'études cliniques, et les relient par des corrélations statistiques aux informations structurales. La qualité des (Q)SAR dépend donc de la qualité de la base de données utilisée( **Nancy Claude, Françoise Goldfain-Blanc et André Guillouzo,2009**).

### **5.3.Rôle de la méthode :**

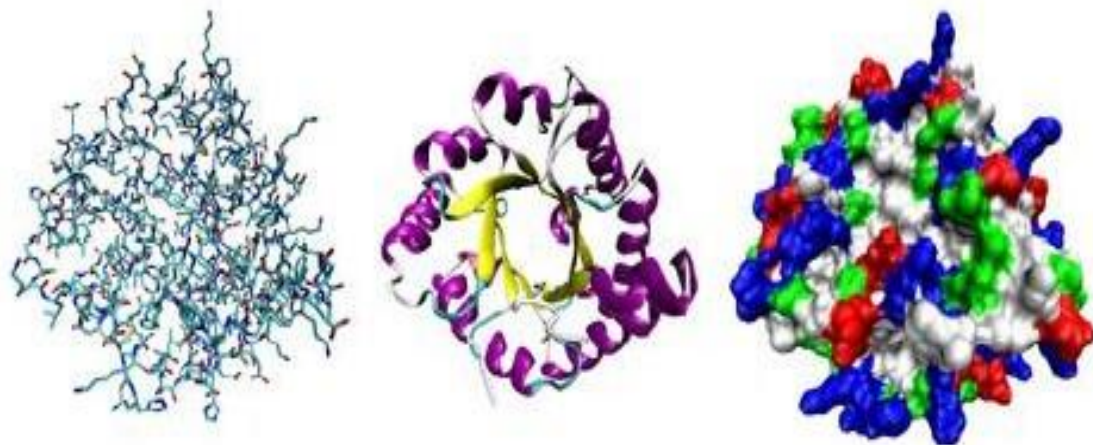
Actuellement, ces méthodes *in silico* jouent un rôle d'orientation pour l'évaluation de produits pour lesquels aucune donnée n'est disponible. Un exemple est la recherche du potentiel génotoxique d'une molécule. Cette recherche s'effectue très tôt dans le processus de développement, dès l'étape de *screening*, afin d'éviter la sélection d'une molécule présentant à terme un risque cancérigène.(**Greene N, Judson PN, Langowski JJ, Marchant CA,1990**).

### **5.4. Docking moléculaire :**

La biologie structurale s'intéresse au rapport entre la structure des molécules et leur activité biologique. De manière générale, on peut dire que le domaine recouvre des questions relevant notamment de la pharmacologie. C'est ainsi que pour un récepteur membranaire connu, il s'agit de trouver un ligand, i.e. une molécule médicamenteuse complémentaire. C'est la problématique du « Docking », i.e. l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaireL'étude par simulation plutôt qu'expérimentale du Docking a une longue histoire, par le biais de plusieurs algorithmes, les simulations sont utilisés quotidiennement tant dans le milieu académique que par les laboratoires pharmaceutiques. Le Docking moléculaire est au centre d'applications pratiques comme l'ingénierie des protéines, la conception de médicaments et le criblage des banques de molécules potentiellement actives, il a ainsi déjà aidé à la conception de nouveaux ligands pour des agents antisida et anti-cancer, et pour le traitement du diabète. Si l'on veut obtenir des avancées significatives, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes pour faciliter les techniques de Docking, par l'amélioration de nos capacités à comprendre et à analyser les interactions de Docking et à développer des hypothèses pour lesquelles les molécules sont susceptibles d'interagir plus favorablement (Mahdjoub Youcef ,2021)

### 5.5. Les protéines :

Les protéines (également connues sous le nom de polypeptides) sont des composés organiques faits d'acides aminés disposés dans un polymère à chaînes linéaire et jointifs, créant un ensemble par des liens de peptide entre les carboxyles et les groupements aminés des résidus adjacents d'acide aminé. (Figure 1) L'ordre des acides aminés dans une protéine est défini par l'ordre d'un gène, qui est codé dans le code génétique (**Ridley, M, 2006**). Généralement le code génétique spécifie 20 acides aminés standards. Pendant ou juste après leurs synthèses, les résidus d'une protéine sont souvent chimiquement transformés par la modification post-transcriptionnel, qui change les propriétés physiques et chimiques, pliage, stabilité, activité, et finalement les fonctions des protéines. Les protéines peuvent également fonctionner ensemble pour réaliser une fonction particulière, et elles s'associent souvent pour former des complexes stables (**Maton A, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Warner MQ, LaHart D, Wright JD ,1993**). Comme d'autres macromolécules biologiques telles que les polysaccharides et les acides nucléiques, les protéines sont des particules essentielles dans l'organisme et participent presque à chaque processus cellulaire. Beaucoup de protéines sont des enzymes qui catalysent des réactions biochimiques et sont essentielles au métabolisme. Les protéines ont été décrites et nommées la première fois par le chimiste suédois Jöns Jakob Berzelius en 1838. Cependant, le rôle fondamental des protéines dans la matière organique n'a pas été complètement apprécié jusqu'en 1926, quand James B. Sumner a prouvé que l'enzyme Uréase était une protéine (**Sumner, JB,1926**). La première protéine à ordonnancer était l'insuline, par Frederick Sanger, qui a gagné le prix Nobel pour cet accomplissement en 1958.



**Figure 5.1 : Trois représentations possibles de la structure tridimensionnelle de la protéine isomérase de phosphate de triose.**

**A gauche : représentation de tout-atome colorée selon le type d'atome. Au milieu : Représentation simplifiée illustrant la conformation d'épine dorsale, colorée par la structure secondaire. A droite : représentation SAS (Surface Accessible au Solvant) colorée par le type de résidu (résidus acides rouges, résidus de base bleus, résidus polaire vert, résidus non polaire blanc).**

#### **5.6. Les molécules en biologie :**

Les molécules biologiques sont principalement constituées d'atomes de carbone (en raison de leur grande capacité à former différentes liaisons covalentes stables et des structures variées), d'hydrogène, mais aussi d'oxygène, d'azote et de soufre (dans le cas des protéines) ainsi que de phosphore (dans le cas des acides nucléiques). On peut distinguer quatre grandes familles de molécules biologiques : les glucides, les lipides, les acides aminés et protéines, les nucléotides et acides nucléiques (**Marie. B,2009**). Les protéines sont parmi les grosses molécules. Les protéines et les peptides sont les constituants majeurs des tissus vivants. Outre leur importance quantitative, ce sont des molécules de premier ordre participant à toutes les fonctions cellulaires (immunité, régulation, transport, mouvement, énergie, catalyse, structure...). La variété de ces fonctions tient à la variété des formes existantes, qui malgré la complexité des molécules, sont bien définies dans un environnement particulier. Les 20 acides aminés existent pouvant être classés selon la structure ou les propriétés physicochimiques de

leur chaîne latérale. On parle de protéine lorsque le nombre d'acides aminés dépasse la centaine, et de peptide en deçà. Pour faciliter à la fois les simulations et la visualisation des protéines, un atome est souvent représenté par une boule, dont le rayon dépend de la nature de l'atome mais aussi de son environnement chimique (**Sébastien. L,2008**) : c'est le modèle de Van der Waals (VdW). La position des atomes décrite dans un fichier PDB.

### **5.7. La banque de données des protéines :**

La Protein Data Bank (PDB) est un répertoire mondial de dépôt d'informations sur la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques : protéines, essentiellement et des acides nucléiques. Ces molécules proviennent de l'ensemble des règnes biologiques. Les structures tridimensionnelles sont issues principalement d'analyses par diffraction des rayons X, les autres par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou de modélisations moléculaires. Les progrès réalisés dans le domaine de la cristallographie aux rayons X et de la RMN ont permis la résolution tridimensionnelle de nombreuses structures de protéines. La PDB est gratuitement accessible par Internet et contient un grand nombre d'informations complémentaires comme la séquence ou la phylogénie des macromolécules. Les séquences d'acides aminés sont codées selon une procédure qui fait correspondre une lettre de l'alphabet à chaque acide aminé (Alanine : Ala/A, Arginine : Arg/R, ...) . La banque contient des fichiers pour chaque modèle moléculaire. Ces fichiers décrivent la localisation exacte de chaque atome de la macromolécule étudiée, c'est-à-dire les coordonnées cartésiennes de l'atome dans un repère à trois dimensions. Un fichier PDB comprend autant de lignes que d'atomes, ce nombre variant de 100 à 10000 atomes par molécule.

**ATOM2CAME****TA1-5.725-8.81621.5431.00C**

#### **IDamine coordonnées 3D**

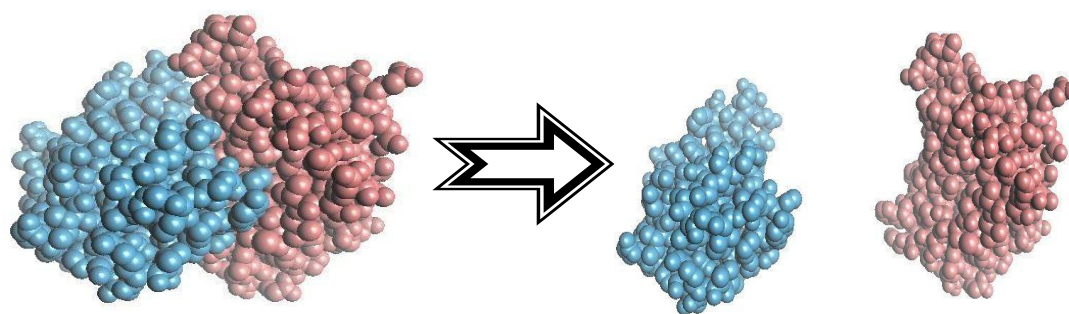
Exemple de ligne d'un fichier PDB

Cette ligne modélise un atome de carbone appartenant à la méthionine (un des 20 acides aminés composant nos protéines), elle contient ses coordonnées 3D, son

numéro d'identification dans la molécule, le numéro d'identification de l'acide aminé auquel il appartient, etc.

### 5.8. Le problème de Docking :

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de détailler la totalité de ces interactions étant donné le nombre incalculable de molécules différentes au sein d'une seule cellule. Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées (figure 2), ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus (**Aurélien. G,2007**). Les logiciels de Docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée, c'est comme une clé et une serrure.



**Figure 5.2 : Le Docking de deux molécules.**

Le modèle clé-serrure est la base de la reconnaissance moléculaire, d'après Fisher en 1894. Sous cette image d'une serrure et d'une clé dont la complémentarité de forme permet l'ouverture de la porte (**Corinne. H,2008**). Pareillement, le ligand se fixe sur

la protéine si leur forme respective le permet. Ce modèle est bien évidemment beaucoup plus simple que la réalité d'une interaction protéine-ligand. La fonction d'une protéine est déterminée par sa possibilité à interagir avec d'autres partenaires, un algorithme de Docking est une procédure qui prédit l'assemblage de ces partenaires, un tel assemblage est appelé un complexe. Il y a trois grandes familles de complexes : les complexes protéine-protéine, les complexes protéine-médicament et les complexes protéine-acide nucléique.

### **5.9. Les méthodes de Docking :**

D'après Halperin et autres, le Docking est un terme utilisé pour des schémas de calcul qui essayent de trouver le « meilleur » correspondance entre deux molécules : un récepteur et un ligand. Il existe trois composants du Docking : la représentation du système, la recherche dans l'espace des conformations, et le classement des solutions potentielles (**Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R,2002**). La résolution d'un problème de Docking implique une procédure de recherche efficace et une bonne fonction de score, autrement dit, la combinaison entre un meilleur algorithme de recherche qui devrait créer un nombre optimum de configurations et une fonction de score qui sert à évaluer et filtrer ces configurations. Parmi les algorithmes de recherche les plus communément utilisés on trouve (**Aatu K, Janne O,2002**) :

- La dynamique moléculaire
- . • Les méthodes de Monte-Carlo.
- Les algorithmes génétiques.
- Les méthodes basées sur les fragments.
- Les méthodes complémentaires de point.
- Les méthodes de la géométrie de distance.
- Les recherches Tabou.
- Les recherches systématiques.

### **5.10. Les algorithmes génétiques :**

Les algorithmes génétiques et la programmation évolutionnaire sont tout à fait appropriés pour résoudre des problèmes de Docking en raison de leur utilité dans la résolution des problèmes d'optimisation complexes. L'idée essentielle des algorithmes génétiques est l'évolution d'une population de solutions possibles par l'intermédiaire des opérateurs génétiques (mutation, croisements et migrations) jusqu'à une population finale, puis l'optimisation d'une fonction prédéfinie de forme. Le processus est l'application des algorithmes génétiques en commençant par coder les variables, dans ce cas les degrés de liberté, dans « un code génétique », par exemple les chaînes de caractères binaires. Par la suite, la création d'une population initiale aléatoire de solutions. Des opérateurs génétiques sont alors appliqués à cette population menant à une population. Cette nouvelle population est alors scorée et classifiée, et en utilisant « la rétention du plus convenable », leurs probabilités de passage à la prochaine itération dépendent de leurs scores. Si la taille de la population reste constante, la population contient des bonnes solutions. Il faut noter que les algorithmes génétiques sont adéquats à la programmation parallèle. Quelques logiciels employant les AG sont : GOLD, AutoDock, DIVALI et DARWIN (Mahdjoub Youcef, 2021).

### **5.11. Les logiciels de Docking :**

Les logiciels les plus fréquemment cités dans la littérature sont : AutoDock (MORRIS G. M., GOODSSELL D. S., HALLIDAY R. S. et al, 1998), GOLD (JONES G., WILLETT P., GLEN R. C., LEACH A. R., TAYLOR R., 1997), FlexX (RAREY M., KRAMER B., LENGAUER T., KLEBE G., 1996), DOCK (EWING T. J., MAKINO S., SKILLMAN A. G., KUNTZ I. D., 2001) et ICM (ABAGYAN R., TOTROV M., 1994). Un logiciel de Docking moléculaire est bon si et seulement si sa fonction de score est bonne (Aatu K, Janne O, 2002).

#### **5.11.1. AutoDock :**

AutoDock est une suite automatisée d'outils d'amarrage protéine-ligand. Les outils AutoDock sont abrégés en ADT. Il est conçu pour prédire les interactions des protéines avec de petites molécules telles que la molécule de médicament et le substrat. L'application de cet outil est immense, allant de la conception de médicaments basée sur la structure, l'optimisation de la molécule principale, l'amarrage protéine-ligand, l'amarrage protéine-protéine, l'analyse et la validation du

mécanisme d'action des molécules médicamenteuses, etc., AutoDock a deux versions, à savoir, AutoDock4 et AutoDock Vina. Dans ce didacticiel, l'accent est mis sur AutoDock4. AutoDock4 analyse les interactions des molécules de ligand au site cible spécifié de la protéine. Les utilisateurs peuvent définir ces sites cibles spécifiques avec l'utilisation de GridBox. AutoDock4 a deux programmes clés à exécuter, à savoir Autogrid4 et AutoDock4. Autogrid4 prépare une carte en grille des acides aminés présents dans la GridBox définie par l'utilisateur. AutoDock4 analyse ensuite les interactions de ces acides aminés avec la molécule de ligand. AutoDock4 a des options pour définir la molécule de protéine comme rigide ou flexible. Tandis que la molécule de ligand est automatiquement annotée pour ses liaisons rotatives et non rotatives et détermine la flexibilité. Dans ce didacticiel, la procédure d'amarrage est affichée pour une macromolécule rigide. L'amarrage rigide des macromolécules est plus rapide que celui de l'amarrage flexible des macromolécules. AutoDock4 prédit l'énergie de liaison libre avec une fonction de notation basée sur le champ de force AMBER et l'analyse de régression linéaire, en plus en se référant à un grand ensemble de données de bibliothèque d'interactions protéine-ligand connues avec leurs constantes d'inhibition qui ont été utilisées dans AutoDock3. On constate que l'erreur standard dans l'énergie de liaison libre dans AutoDock4 est d'environ 2,5 kcal/mol. Dans ce tutoriel, un protocole de base pour utiliser AutoDock4 pour analyser les interactions de la protéine sélectionnée et de la molécule de ligand est discuté. Ce protocole est présenté pour aider les étudiants et les chercheurs qui souhaitent utiliser AutoDock4 à des fins d'apprentissage et/ou de recherche. Ce protocole est considéré comme adéquat et efficace par les auteurs, pour utiliser AutoDock4 pour l'analyse d'amarrage protéine-ligand. Le protocole discuté peut être utilisé pour étudier les interactions de la molécule de ligand sélectionnée (molécule de médicament) avec des cibles protéiques choisies. Les utilisateurs, cependant, doivent faire un petit travail préparatoire sur le fichier pdb de la molécule de protéine. La structure 3D téléchargée des protéines à partir du site Web du RCSB doit être modifiée avant l'ancrage dans AutoDock4. Bien qu'une petite discussion sur la préparation des molécules protéiques soit présentée dans ce didacticiel, il est conseillé aux utilisateurs de poursuivre leurs lectures sur la préparation des structures protéiques (**Lokesh Ravi , Kannabiran Krishnan ,2016**)

### **5.11.2.les modification sur le programme d'autodock 4.2.6 :**

Il y a plusieurs changements dans AutoDock 4.2.6 (**Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William “Lindy” Lindstrom, Ruth Huey, StefanoForli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson ,2014**) :

#### **A-Plateformes:**

Plus de plates-formes informatiques sont prises en charge:

- Linux2 sur Intel i86 (32 bits) et sur Intel x86\_64 (64 bits)
- Linux3 sur Intel x86\_64 (64 bits)
- Macintosh OS X 10.5 (Leopard) sur PowerPC (32 et 64 bits), OS X 10.5-10.9 (Leopard,Snow Leopard, Lion, Mountain Lion et Mavericks) sur Intel i86 (32 bits) et Intelx86\_64 (64 bits) .
- Solaris 8 (SunOS 5.8) sur SPARC
- Windows 5 (XP), 6 (Vista), 7, 8.1 sur Intel i86.

Désormais, AutoDock et AutoGrid sont compilés à l'aide de l'arithmétique à double précision. Il y a également une meilleure compatibilité multiplateforme du générateur de nombres aléatoires interne.

#### **B-Amélioration de la vérification des erreurs :**

La vérification des erreurs des arguments de ligne de commande est améliorée.

AutoDock vérifie maintenant les numéros d'atomes qui définissent les torsions internes et "flexres".

#### **C-Provenance et reproductibilité des travaux et des séries :**

Chaque fichier journal d'amarrage (dlg) contient toujours le nom d'hôte, la date d'exécution, le répertoire de travail et les noms des fichiers PDBQT d'entrée. Chaque cycle d'amarrage contient toujours ses graines initiales de nombres aléatoires, son énergie totale finale et son état final dans un format uniforme adapté à l'analyse automatisée. Invoquer « autodock4 (ou autogrid4) –version » rapporte les options de configuration au moment de la compilation.

### **D-Regroupement d'algorithmes de recherche multiples :**

Désormais, plusieurs méthodes de recherche peuvent être utilisées dans une seule tâche AutoDock : par exemple, 50 exécutions de l'algorithme génétique lamarckien suivies de 50 exécutions de recuit simulé. Les exécutions sont effectuées en série : aucun résultat n'est reporté d'un algorithme à l'autre. Tous les résultats sont classés et regroupés dans l'étape d'analyse à la fin de l'ensemble du travail.

### **E-Visualisation du recuit simulé et des exécutions de recherche locale uniquement :**

Vous pouvez désormais utiliser ADT (AutoDock Tools) pour visualiser les résultats des tâches AutoDock qui utilisent le recuit simulé ou la recherche locale uniquement.

Vous devez télécharger la dernière version d'ADT à partir de <http://mglttools.scripps.edu/downloads/latest>

### **F-4.2.6 Limitation de libération :**

La commande « do\_local\_only » exécute l'algorithme pseudo-solis-wets, même si le solis-wets a été spécifié à l'aide de "set\_local sw1". Cela s'applique uniquement à "do\_local\_only": la commande "ga\_run" utilisera la recherche locale spécifiée. (Nous conseillons le pseudo-solis-wets pour toutes les recherches locales : « set psw1 ») (Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William “Lindy” Lindstrom, Ruth Huey, StefanoForli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson ,2014).

### **5.11.3. L'Utilisation de l'autodock :**

#### **ÉTAPE 1 : Préparation des coordonnées :**

La première étape consiste à préparer les fichiers de coordonnées du ligand et du récepteur pour inclure les informations nécessaires à AutoGrid et AutoDock. Ces fichiers de coordonnées sont créés dans un format de fichier de coordonnées spécifique à AutoDock, appelé PDBQT, qui comprend :

- 1) Atomes d'hydrogène polaires.
- 2) Charges partielles.
- 3) Types d'atomes.

#### 4) Information sur l'articulation des molécules flexibles.

Pour un calcul d'amarrage typique, vous allez créer un fichier de coordonnées pour le récepteur et un fichier séparé de coordonnées pour le ligand. Dans les amarrages où les acides aminés sélectionnés dans le récepteur sont traités comme flexibles, vous allez créer un troisième fichier qui inclut les coordonnées des atomes dans les parties flexibles du récepteur.

Dans une étude typique, l'utilisateur prépare les fichiers de coordonnées en plusieurs étapes à l'aide d'AutoDockTools. Un didacticiel détaillé est disponible sur le site Web d'AutoDock pour vous guider tout au long de ce processus. Les deux premières étapes peuvent être effectuées à l'aide des outils du menu Edition d'AutoDockTools, ou avec d'autres programmes de modélisation moléculaire :

- 1) Ajouter des atomes d'hydrogène à la molécule.
- 2) Ajouter des charges partielles. Ensuite, lisez la molécule dans AutoDockTools en utilisant le Ligand (pour le ligand) ou la Grille (pour les menus du récepteur) et créez le fichier PDBQT :
- 3) Supprimer les hydrogènes non polaires et fusionner leurs charges avec les atomes de carbone.
- 4) Attribuer des types d'atomes, en définissant les accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène et les atomes de carbone aromatiques et aliphatiques.
- 5) Choisissez un atome racine qui servira de racine pour la description de la flexibilité de l'arbre de torsion.
- 6) Définir les liaisons rotatives et construire l'arbre de torsion (**Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. and Olson, A. J.1996**).

#### **ÉTAPE 2 Exécuter AutoGrid :**

AutoDock nécessite des cartes de grille pré-calculées, une pour chaque type d'atome présent dans le ligand ancré. Cela permet d'accélérer les calculs d'amarrage. Ces cartes sont calculées par AutoGrid. Une carte quadrillée consiste en un réseau tridimensionnel de points régulièrement espacés, entourant (entièrement ou partiellement) et centré sur une région d'intérêt de la macromolécule à l'étude.

Il peut s'agir d'une protéine, d'une enzyme, d'un anticorps, d'ADN, d'ARN ou même d'un polymère ou d'un cristal ionique. L'espacement typique des points de grille varie de 0,2 Å à 1,0 Å, et la valeur par défaut est de 0,375 Å (environ un quart de la longueur d'une simple liaison carbone-carbone). Chaque point de la carte quadrillée stocke l'énergie potentielle d'un atome ou d'un groupe fonctionnel "sonde" qui est due à tous les atomes de la macromolécule.

**A-Grid>ouvre GPF** : récupère les paramètres d'un fichier de paramètres de grille existant.

**B-Grille> Macromolécule** : offre des options pour ouvrir un fichier PDBQT existant ou choisir une molécule qui a été lue à l'aide de PMV.

**C-Grid>Définir les types de carte** : outils pour définir les types d'atomes pour les grilles qui seront calculées. Les grilles doivent être calculées pour chaque type d'atome dans le ligand, et si des chaînes latérales flexibles sont utilisées dans le récepteur, leurs types d'atomes doivent également être inclus. L'option « Directement » permet à l'utilisateur de saisir directement la liste des types d'atomes. D'autres options permettent à l'utilisateur de définir les types d'atomes en fonction d'un ligand ou d'un résidu flexible qui a été lu par PMV, ou d'ouvrir le ligand ou le résidu flexible PDBQT et d'utiliser les types d'atomes dans ces fichiers.

**D-Grid>Définir les types de carte >Configurer la carte covalente** : spécifie les paramètres de création d'une carte covalente, qui peuvent être utilisés dans des applications spécialisées pour favoriser la liaison d'un atome de ligand donné en une seule position. Ceci est particulièrement utile pour l'amarrage de complexes covalents entre des ligands et des protéines. Cela calculera une grille séparée avec un atome de type "Z" avec un puits gaussien favorable aux coordonnées données. Le potentiel aura une énergie nulle sur le site, s'élevant à la hauteur de la barrière énergétique dans les zones environnantes.

**E-Grid>GridBox** : lance des commandes interactives pour définir les dimensions et le centre de la grille. Pour entrer des nombres sur la molette, placez le curseur sur la molette et saisissez la nouvelle valeur. Un clic droit sur la molette donne plus d'options. IMPORTANT : lorsque vous avez terminé, utilisez l'option "fermer l'enregistrement actuel" dans le menu "Fichier" du panneau d'options de la grille. Les

options du menu "Centre" du navigateur proposent différentes méthodes pour choisir le centre de la zone de la grille.

**F-Grid>Autre Options** : permet de spécifier et de modifier un fichier de paramètres existant.

**G-Grille>Sortie** : écrit un nouveau fichier de paramètres de grille

**H-Grid>Edit nGPF** : éditeur interactif pour les fichiers de paramètres de grille, qui permet de visualiser le dernier fichier de paramètres de grille écrit par AutoDock Tools (Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. and Olson, A. J.1996).

### **ÉTAPE 3 Amarrage avec AutoDock :**

AutoDock utilise l'un des nombreux algorithmes de recherche conformationnelle pour explorer les états conformationnels d'un ligand flexible, en utilisant les cartes générées par AutoGrid pour évaluer l'interaction ligand-protéine à chaque point de la simulation d'amarrage. Dans un amarrage typique, l'utilisateur ancrera un ligand plusieurs fois, pour obtenir plusieurs conformations ancrées. Les résultats peuvent être regroupés pour identifier des conformations similaires - cela est décrit plus en détail dans la section sur l'analyse . AutoDock nécessite : 1) des cartes de grille pour chaque type d'atome dans le ligand, calculées par AutoGrid, 2) un fichier PDBQT pour le ligand, et 3) un fichier de paramètres d'amarrage qui spécifie les fichiers et les paramètres pour le calcul d'amarrage. AutoDockTools peut être utilisé pour générer le fichier de paramètres d'ancrage, comme décrit ci-dessous, qui porte généralement l'extension « .dpf ». Une description complète du fichier de paramètres d'amarrage est incluse dans l'annexe I. AutoDock écrit les coordonnées d'amarrage finales dans le fichier journal d'amarrage. Comme décrit à l'étape 4 ci-dessous, ces conformations ancrées peuvent être visualisées à l'aide d'AutoDockTools, elles peuvent être écrites sous forme de fichiers PDBQT à l'aide d'AutoDockTools ou elles peuvent être extraites directement du fichier journal d'ancrage à l'aide d'un éditeur de texte. Un calcul AutoDock est lancé depuis la ligne de commande à l'aide de la commande suivante :

**A-Docking>Ouvre PDF** : récupérez les paramètres d'un fichier de paramètres d'ancrage existant.

**B-Ancrage> Macromolécule>Définir un nom de fichier rigide :**

Cette étape spécifie le nom du fichier PDBQT qui sera utilisé pour le récepteur rigide, pour la partie flexible du récepteur.

**C-Docking>Ligand>Ouvrir** : ces deux commandes permettent à l'utilisateur de choisir un ligand déjà lu dans ADT ou d'ouvrir un fichier PDBQT de ligand existant.

**E-Docking>Ligand>Ligand\_Parameters** : ouvre un panneau permettant de définir divers paramètres de ligand, y compris les valeurs de départ pour les angles de translation, de rotation et de torsion. Pour plus de détails, voir la description complète du fichier de paramètres d'amarrage dans l'annexe I.

**F-Docking>Paramètres de recherche >Paramètres d'algorithme génétique** :

Ces trois commandes ouvrent un panneau permettant de définir les paramètres utilisés par chacun des algorithmes de recherche, tels que les horaires de température dans le recuit simulé et les taux de mutation/crossover dans les algorithmes génétiques. Pour plus de détails sur chaque paramètre, voir la description complète en annexe.

**G-Amarrage>Sortie>LamarckianGA> Algorithme Génétique**

**>recherche Locale** :

Ces quatre commandes écrivent le fichier de paramètres d'ancrage à l'aide de l'une des quatre méthodes de recherche disponibles.

**H-Docking>Edit** : éditeur interactif pour les fichiers de paramètres d'ancrage, qui permet de visualiser le dernier fichier de paramètres d'ancrage écrit par AutoDockTools ((Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J.,1996)).

**ÉTAPE 4 : Évaluer les résultats d'un amarrage** :

À la fin d'une simulation d'amarrage, AutoDock écrit les coordonnées de chaque conformation ancrée dans le fichier journal d'amarrage, ainsi que des informations sur les énergies de regroupement et d'interaction. AutoDockTools fournit des options pour analyser les informations stockées dans la station d'accueil fichier journal.

**A-Analyse>Amarrages>Ouvrir** : ouvre un fichier journal d'amarrage.

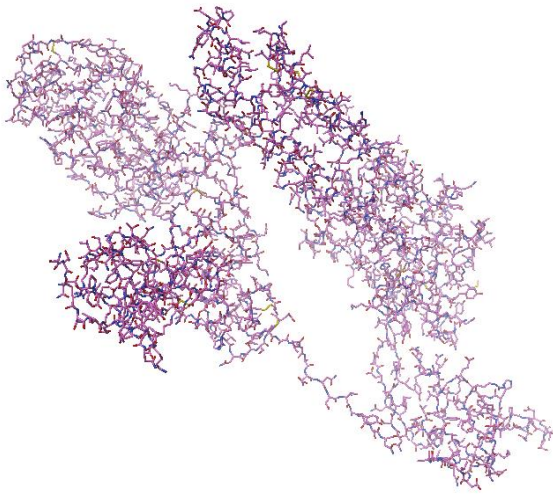
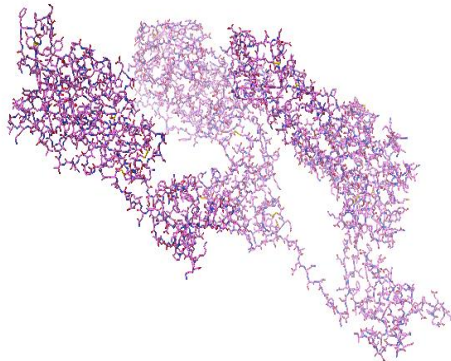
**B-Analyser>Macromolécule** : options pour ouvrir un fichier PDBQT de macromolécule ou choisir une macromolécule déjà lue dans PMV.

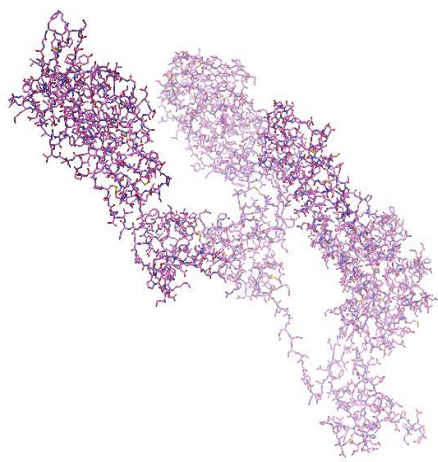
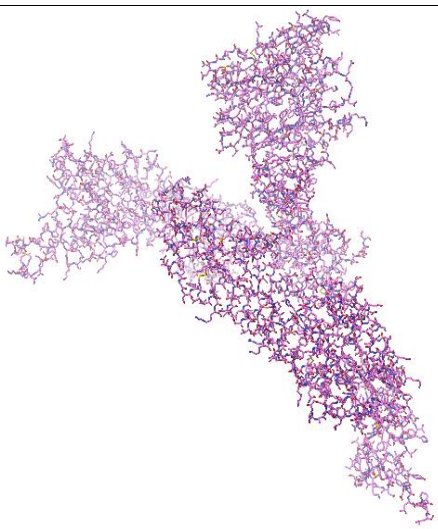
**C-Analyser>Conformations>Jouez classé par énergie :** Ouvre une fenêtre avec des commandes permettant de parcourir les conformations sous forme de film. "Play" utilisera l'ordre des conformations telles qu'elles ont été trouvées dans les calculs d'amarrage, et "PlayRankedByEnergy" ordonnera la conformation de la plus basse énergie à la plus haute énergie. Le bouton "&" ouvre une fenêtre avec des options supplémentaires :

**WriteComplex** écrira un fichier PDBQT pour la conformation actuelle du ligand et du récepteur (Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J.,1996).

## 5.12. Les protéines et le ligand préparé :

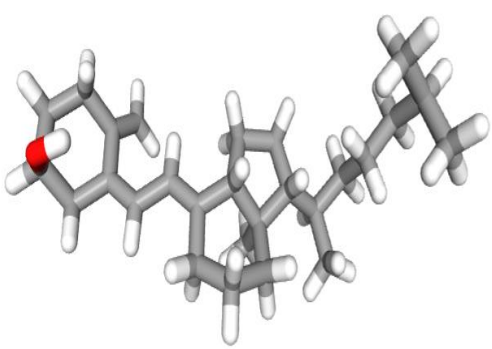
### A-Le code PDB pour les versions de covid-19 :

| Code PDB | Les versions de covid | Forme 3D                                                                             |
|----------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 7EDH     | Alpha<br>(1.617.2)    |   |
| 7V8C     | Béta<br>(B.1.351)     |  |

|      |                      |                                                                                     |
|------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 7V7R | Delta<br>(B.1.617.2) |   |
| 7TB4 | Omicron<br>(BA.1)    |  |

**Tableau 5.1 : le code PDB de covid -19 avec une forme 3D**

**B-Le code pubchem de ligand utilisé :**

| Code<br>pubchem<br>(CID) | Ligand      | Forme 3D                                                                             |
|--------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 129627856                | Vitamine D3 |  |

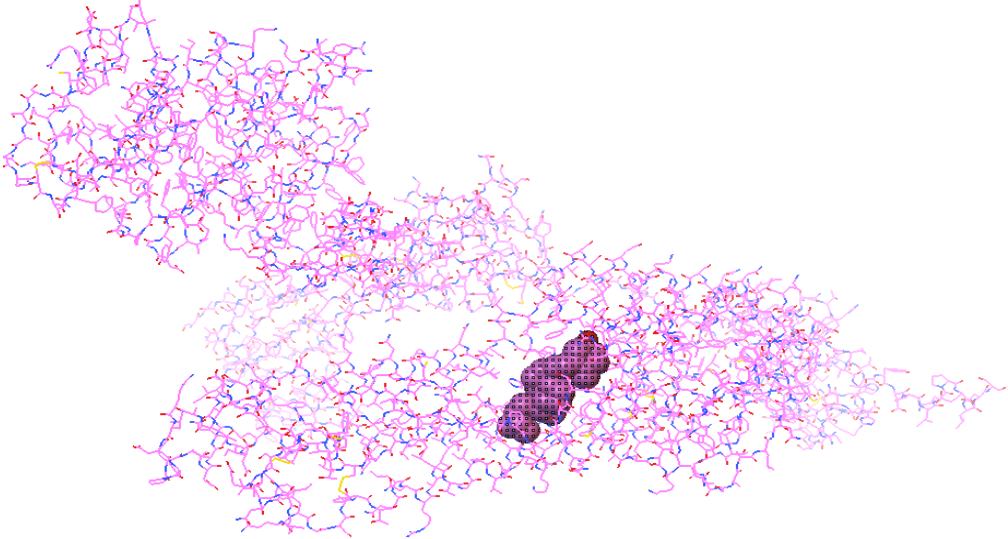
**Tableau 5.2 : le code Pubchem de ligand avec une forme 3D**

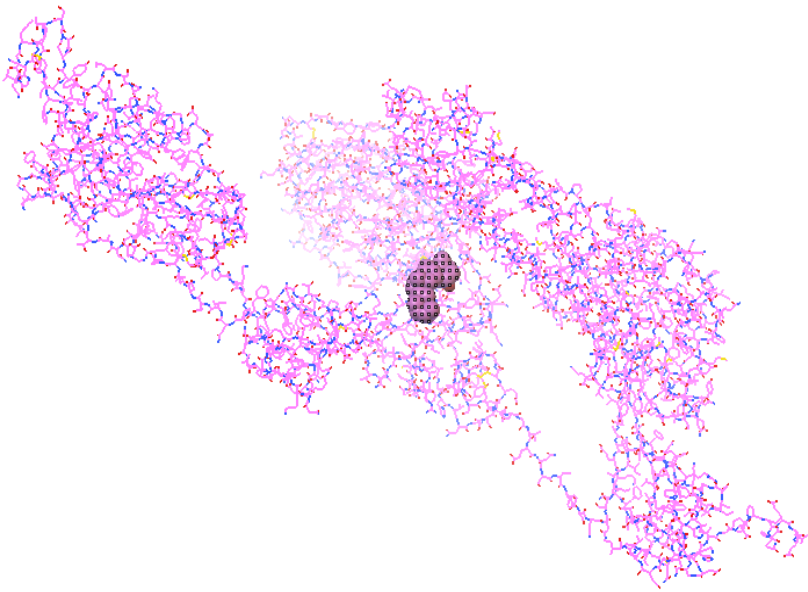
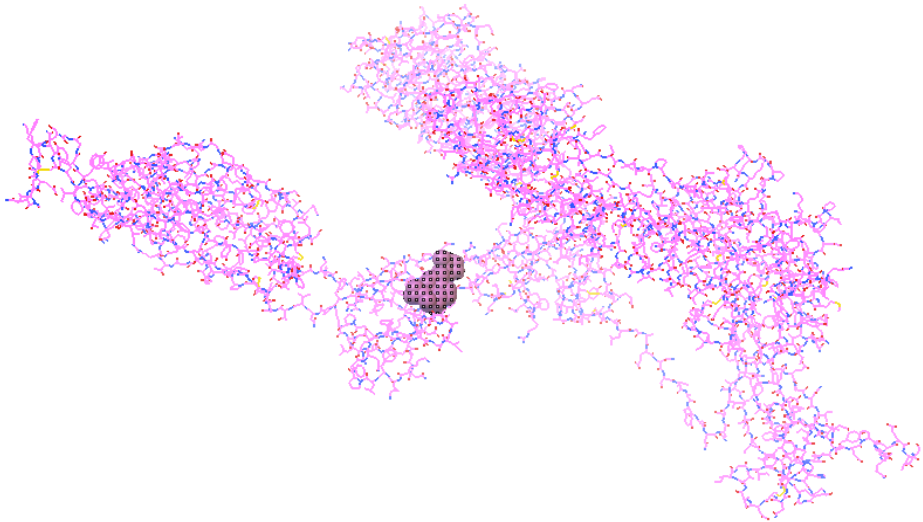
# Chapitre VI : résultats et discussions

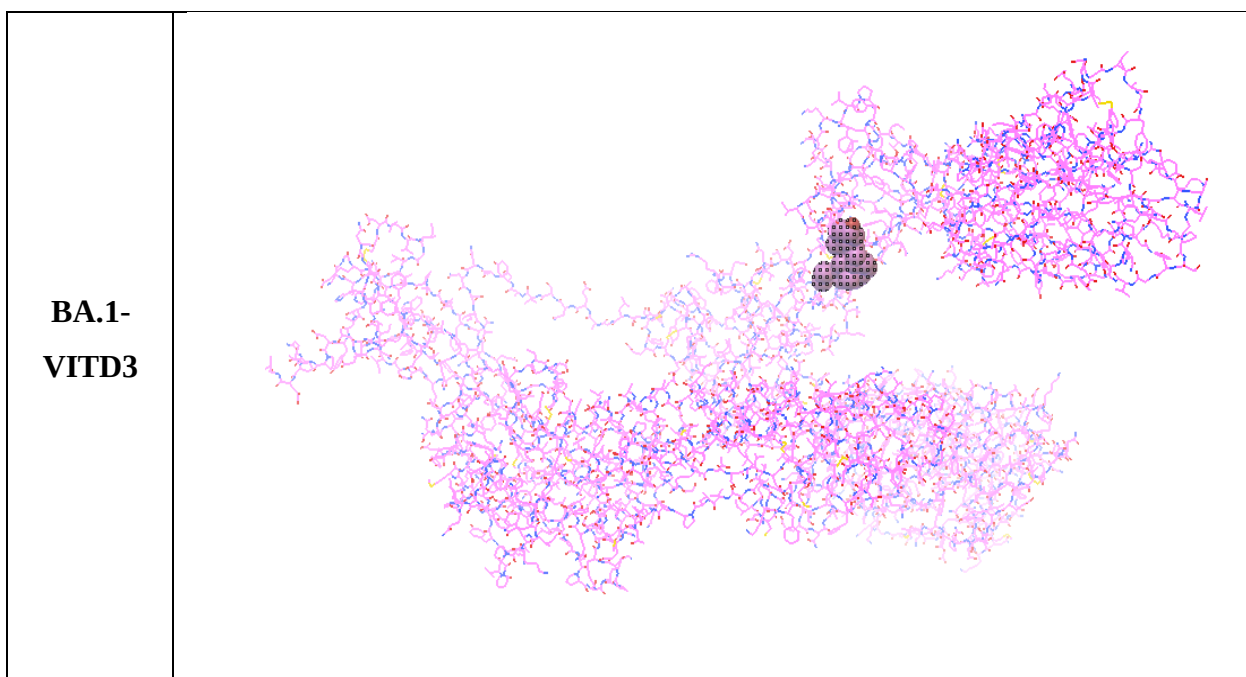
## 6.1. Docking moléculaire :

### 6.1.1. Les complexes formés sur le programme de Docking :

L'étude d'amarrage a été appliquée pour rationaliser les interactions possibles des composés cibles, et cela a été fait avec quatre types différents de virus corona émergents avec le composé de vitamine D, car l'amarrage était comme indiqué dans le tableau 1 :

| Complexe<br>(protéine<br>spike-<br>VITD3) | Forme 3D                                                                            |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| B.1.1.7-<br>VITD                          |  |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>B.1.351-<br/>VITD3</b></p>   |  <p>A 3D molecular model of the B.1.351-VITD3 protein structure. The protein is shown as a complex, multi-domain structure with a central core and several extended loops. The structure is colored in shades of purple, blue, and yellow, with a prominent black mesh-like structure in the center.</p>    |
| <p><b>B.1.617.2-<br/>VITD3</b></p> |  <p>A 3D molecular model of the B.1.617.2-VITD3 protein structure. The protein is shown as a complex, multi-domain structure with a central core and several extended loops. The structure is colored in shades of purple, blue, and yellow, with a prominent black mesh-like structure in the center.</p> |



**Tableau 6.1 : le complexe (protéine-ligand) avec une forme 3D**

#### **6.1.1.1. Le complexe B.1.1.7-VITD3 :**

La fusion entre B.1.1.7 et la vitamine D3 s'est produite dans 12 acides aminés (réactions hydrophobes), où l'énergie de liaison était de -11,19 Kcal/mol, et des liaisons hydrogène se sont produites avec un acide aminé glu, qui était la distance entre lui et le donneur 2,62 et la distance entre celui-ci et l'hydrogène est de 1,90. Nous fournissons les détails dans le tableau 5.1 et 5.2 avec une figure 5.1 qui détaille les résultats. :

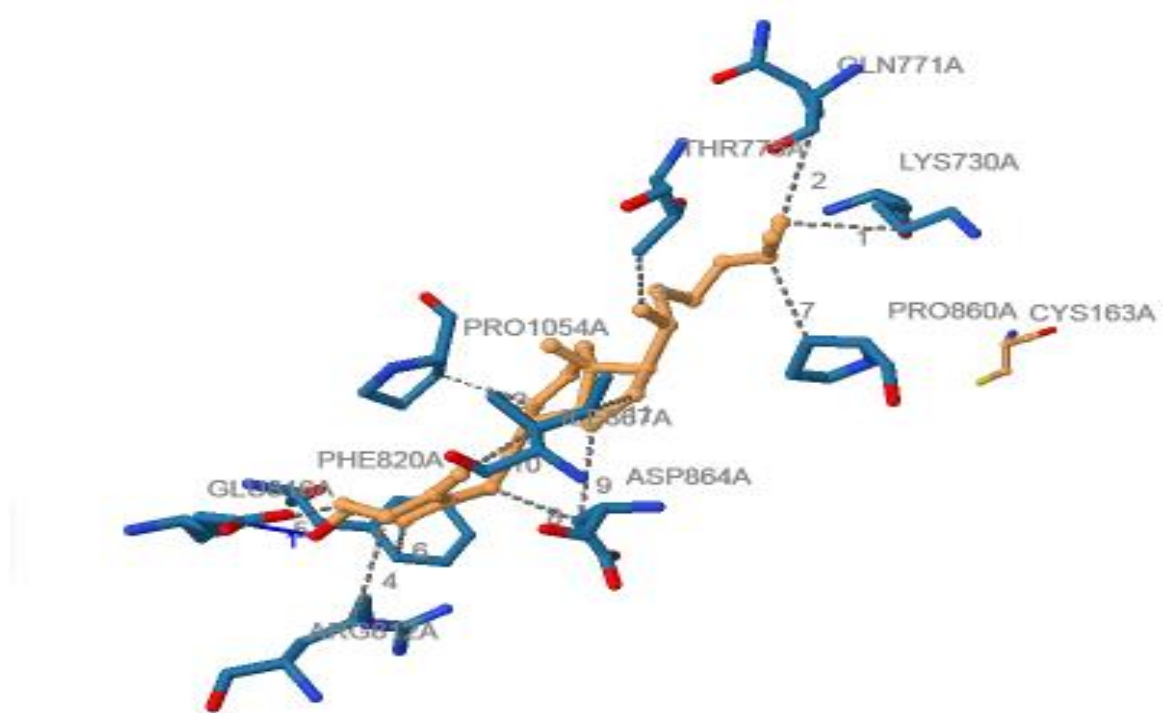
| Acide aminé | Distance |
|-------------|----------|
| LYS730A     | 3.54     |
| GLN771A     | 3.92     |
| THR775A     | 2.91     |
| ARG812A     | 3.66     |
| GLU816A     | 3.34     |
| PHE816A     | 3.54     |
| PRO860A     | 3.16     |
| ASP864A     | 3.03     |
| ASP864A     | 3.35     |
| ILE867A     | 3.71     |

|          |      |
|----------|------|
| ILE867A  | 3.18 |
| PRO1054A | 3.70 |

TABLEAU 6.2 : Interactions hydrophobes de B.1.1.7

| Acide aminé | distance entre l'hydrogène et l'atome accepteur | distance entre l'atome donneur et l'atome accepteur |
|-------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| GLU816A     | 1.90                                            | 2.62                                                |

Tableau 6.3 : liaisons hydrogène de B.1.1.7



Protein -Ligand -Water- Charge Center Aromatic Ring Center-Metal Ion

-----Hydrophobic Interaction -Hydrogen Bond

Figure 6.1 : resultat de fusion d B.1.1.7-VITD

#### 6.1.1.2.B.1.351-VITD3 :

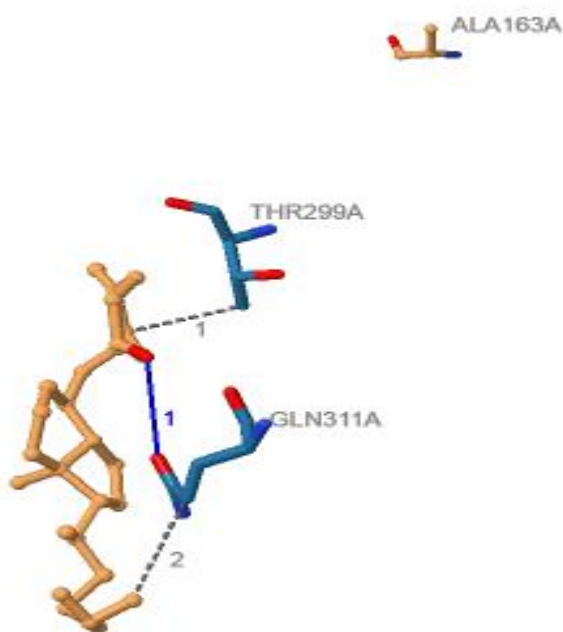
La fusion entre B.1.351 et ligand la vitamine D3 s'est produite dans 2 acides aminés (réactions hydrophobes), où l'énergie de liaison était de -5.41 Kcal/mol et des liaisons hydrogène se sont produites avec un acide aminé gln , qui était la distance entre lui et le donneur 3.89, et la distance entre celui-ci et l'hydrogène est de 2.97 , et nous fournirons les détails dans le tableau 5.3 et 5.4 avec la figure 5.2, qui détaille les résultats :

| Acide aminé | Distance |
|-------------|----------|
| THR299A     | 3.59     |
| GLN311A     | 3.95     |

**Tableau 6.4 : Interactions hydrophobes de B.1.351**

| Acide aminé | distance entre<br>l'hydrogène et l'atome<br>accepteur | distance entre l'atome<br>donneur et l'atome<br>accepteur |
|-------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| GLN311A     | 2.97                                                  | 3.89                                                      |

**Tableau 6.5 : liaisons hydrogèneB.1.351**



Protein -Ligand -Water- Charge Center Aromatic Ring Center-Metal Ion

-----Hydrophobic Interaction - Hydrogen Bond

**Figure 6.2 : résultats de fusion B.1.531 et VITD3**

#### **6.1.1.3.B.1.617.2-VITD3 :**

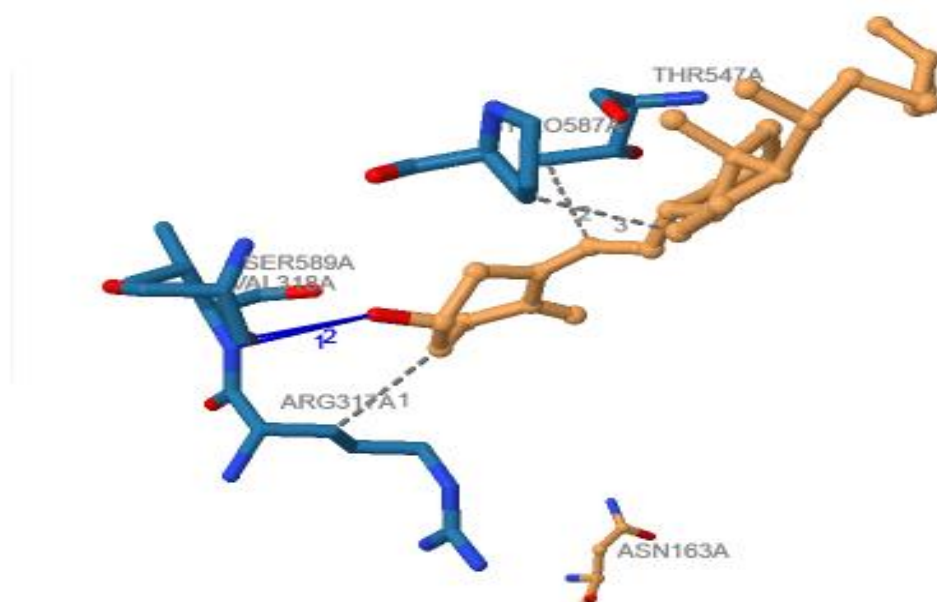
La fusion entre B.1.617.2 et ligand la vitamine D3 s'est produite dans 3 acides aminés (réactions hydrophobes), où l'énergie de liaison était de -9.32 Kcal/mol et des liaisons hydrogène se sont produites avec 2 acides aminés VAL318A et SER589A , qui était la distance entre lui et le donneur 2.93, et la distance entre celui-ci et l'hydrogène est de 2.44 , et nous fournirons les détails dans le tableau 5.5 et 5.6 avec la figure 5.3 , qui détaille les résultats :

| Acide aminé | Distance |
|-------------|----------|
| ARG317A     | 3.25     |
| THR547A     | 3.32     |
| PRO587A     | 3.26     |

Tableau 6.6 : Interactions hydrophobes de B.1.617.2

| Acide aminé | distance entre l'hydrogène et l'atome accepteur | distance entre l'atome donneur et l'atome accepteur |
|-------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| VAL318A     | 3.00                                            | 3.79                                                |
| SER589A     | 2.44                                            | 2.93                                                |

Tableau 6.7 : liaisons hydrogène de B.1.617.2



Protein -Ligand -Water- Charge Center Aromatic Ring Center-Metal Ion

-----Hydrophobic Interaction - Hydrogen Bond

Figure 6.3 : résultats de fusion B.1.617.2 et VITD3

#### 6.1.1.4.BA.1-VITD3 :

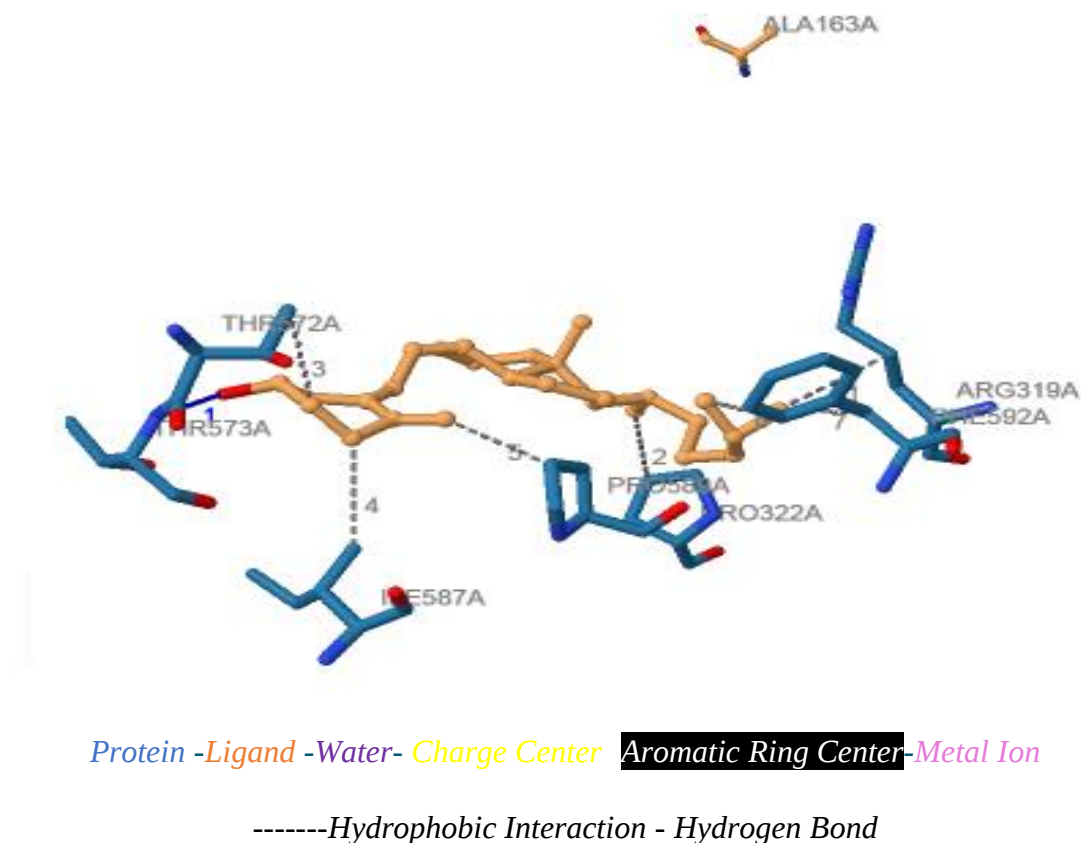
La fusion entre BA.1 et ligand la vitamine D3 s'est produite dans 7 acides aminés (réactions hydrophobes), où l'énergie de liaison était de -8.34 Kcal/mol et des liaisons hydrogène se sont produites avec un acide aminé THR573A, qui était la distance entre lui et le donneur 3.32, et la distance entre celui-ci et l'hydrogène est de 2.52, et nous fournirons les détails dans le tableau 5.7 et 5.8 avec la figure 5.4, qui détaille les résultats :

| Acide aminé | Distance |
|-------------|----------|
| ARG319A     | 3.42     |
| PRO322A     | 3.94     |
| THR372A     | 3.85     |
| ILE587A     | 3.52     |
| PRO589A     | 3.37     |
| PHE592A     | 3.58     |
| PHE592A     | 3.25     |

**Tableau 6.8 : Interactions hydrophobes de BA.1**

| acide aminé | distance entre l'hydrogène et l'atome accepteur | distance entre l'atome donneur et l'atome accepteur |
|-------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| THR573A     | 2.52                                            | 3.32                                                |

**Tableau 6.9 : liaisons hydrogène BA.1**



**Figure 6.4 : résultats de fusion B.1.617.2 et VITD3**

## 6.2. Les 4 versions de covid 19 et la vitamine D :

Les résultats indiquent qu'il y a une interaction qui s'est produite avec tous les types de SRAS-Covid 19, car l'énergie de liaison était forte entre 8 et 11 kcal pour chacun des alpha, delta et omicron, avec une forte interaction avec les quatre types de corona à travers des liaisons hydrogène avec chacun des acides aminés suivants GLU816A/ GLN311A/VAL318A et SER589A/ THR573A, et ils ont également réagi via des liaisons hydrophobes, ce qui signifie que les réactions qui ont eu lieu se sont toutes faites via des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophobes, et la plupart d'entre elles se sont faites par l'énergie de liaison en kilocalories .

# Conclusion

## Conclusion

Dans cette étude, les méthodes in silico appliquées à la vitamine D et l'étude de son effet sur les types les plus importants de nouveaux coronavirus sur les protéases et la protéine de pointe ont conduit à la formation de liens entre le ligand et la protéine SARS-Covid 19. Hypothétiquement, l'examen a été effectué à l'aide du programme Docking et du programme de profil d'interaction protéine-ligand. Cette hypothèse a conduit à l'interaction de tous les types de corona avec la vitamine D, car elle formait des liaisons hydrophobes avec B 1.1. 7 B.1.351 et B.1.617.2 et BA .1 respectivement avec LYS730A, GLN771A, THR775A, ARG812A' GLU816A, PHE816A, PRO860A, ASP864A, ASP864A, ILE867A, ILE867A, ILE867/THR299A et GLN311A/ ARG317A, THR547A, PRO587A/ ARG319A, PRO322A, THR372A, ILE587A, PRO589A, PHE592A, PHE592A et des liaisons hydrogène, respectivement avec GLU816A/ GLN311A /VAL318A et SER589A/THR573A avec Énergie de liaison élevé avec B 1.1. 7et B.1.617.2 et BA .1 et moyenne avec B.1.351 Et ici, nous disons que la réaction s'est faite via des liaisons hydrogène, et son résultat a été excellent .

Enfin, le composé étudié, la Vitamine D, pourrait être un médicament contre le SARS-Covid 19.

## References

- Abagyan, Totrov, Biased probability Monte Carlo conformational searches , and electrostatic calculations for peptides and proteins., J Mol Biol, 1994, 235 : 983-1002 .
- Aatu K, Janne O, : Protein Docking. 2002 .
- Antoine. F, Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance , Thèse doctorat , Université Joseph Fourier - Grenoble I, 2006.
- Aurélien. G, Conception d'un logiciel de Docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives , Thèse de Doctorat , Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble, 2007 .
- Alipio M. Vitamin D supplementation could possibly improve clinical outcomes of patients infected with coronavirus-2019 (Covid-19). SSRN April 9, 2020.
- Anne-Claire N , Vitamine D dans la Covid , 20 avril 2021.
- Annabelle Iglesias , Dosage de vitamine D , 22 septembre 2020.
- Aimée VATAN , LA VITAMINE D : SES PROPRIETES ET SO UTILISATION EN MEDECINE HUMAINE , faculté de pharmacie , 27 juin 2011, page 24-43.
- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , ligeage C.37 , 21 juillet 2020.
- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , ligeage B.1.617.1 , 03 mars 2020.
- Anaïs Thiébaux , Variant Mu (colombien) : nom, symptômes, en France, vaccin , 8 octobre 2021 .
- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , ligeage B.1.526 , 28 janvier 2020.

- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , ligeage P.3 , 8 janvier 2021.
- Áine O'Toole and Verity Hill, Rambaut Group, University of Edinburgh. Flight volume data from Kamran Khan, Isaac Bogoch, Alexander Watts, Oliver Pybus, Moritz Kraemer. Sequences sourced from GISAID, B.1.525 , 19 mai 2021.
- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , lineage P.2 , 13 avril 2020.
- Áine O'Toole, Emily Scher, and Andrew Rambaut , ligeage B.1.427, 11 avril 2020
- Áine O'Toole , Verity Hill and Andrew Rambaut , B.1.1.7, University of Edinburgh , 06 juin 2022.
- Alexis Riopel , Les différents niveaux de sévérité de la COVID-19, Le Devoir ,3 novembre 2020.
- Aurélie Blaize, Maladie covid-19 : définition, durée, évolution, traitements ,23 juillet 2021,page 1 .
- Aurélie Blaize , C'est quoi un coronavirus : origine, nom, mutation, symptômes , 8 septembre 2020.
- bitsha-kitime dieudoné kabkia (EISMV) , PTR santé /CAMES généralité sur coronavirus , 2020 , page 1.
- Backer J.A., Klinkenberg D., Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020. Euro Surveill. 2020;25(5).
- biomnis , biologie médicale spécialisée , VITAMINE D (25-HYDROXY-) , 2015.
- Breuil V, Euller-Ziegler. Nutrition et vieillissement osseux l'ostéoporose. Nutr Clin Metab 2004; 18 : 212–8.
- benedette Cuffari M.Sc, Emily Henderson B.Sc, what are spike proteins ? , news medical life sciences, 2021.
- Corinne. H, recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN , Thèse de Doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2008 .

-Carlos Mamani , Covid-19 : que sait-on du variant Lambda, désormais présent dans 29 pays ? , 7 juillet 2021.

-canada , ca ,Dépistage de la COVID-19 : Moment auquel se faire tester et résultats de tests de dépistage , 31 mars 2022, page 2-10.

-CNGOF 27-Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D. Lancet Infect Dis; 2020. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. S1473309920302000.

-Chen W., Lan Y., Yuan X. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):469–473.

-Chen H., Guo J., Wang C. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. The Lancet. 2020;395:809–815. (10226).

-Canrong Wu, Yang Liu, Yueying Yang, †, Peng Zhang, Wu Zhong, Yali Wang, Qiqi Wang, , Yang Xu, Mingxue Li, Xingzhou Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen, Hua Li, Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods, acta pharmaceutica sinica B, may 2020, page 8 13-benedette Cuffari M.Sc, Emily Henderson B.Sc, what are spike proteins ? , news medical life sciences, 2021.

- Can rong wu, wan chao yin, yi jiang , H.eric Xu, Structure genomics of SARS-CoV2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19, 20 January 2022 , page 14-15.

-Chih-Cheng Lai , Tzu-Ping Shih , Wen-Chien Ko , Hung-Jen Tang , Po-Ren Hsueh , Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges , International Journal of Antimicrobial Agents , 11 February 2020 , page 7-8 .

-Dorothée Duchemin , Variant brésilien (Gamma) : en France, vaccin, symptômes, 22 novembre 2021

- Dumas R. Les rachitismes vitaminorésistants. Arch Pediatr 1999; 6 : 715–9.

-Daneshkhah A, Agrawal V, Eshein A, Subramanian H, Roy H-K, Backman V. The possible role of vitamin D in suppressing cytokine storm and associated mortality in Covid-19 patients. April 30,2020.

-EWING T. J., MAKINO S., SKILLMAN A. G., KUNTZ I. D., DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases., J. Comput , Aided. Mol. Des., 2001, 15 : 411-428.

-Emilie Tissandié, Yann Guéguen, Jean-Marc A.Lobaccaro, Jocelyne Aigueperse et Maâmar Souidi , Vitamine D : Métabolisme, régulation et maladies associées , 15 décembre 2006.

-Emilie Tissandié ,Yann Guéguen ,Jean-Marc A.Lobaccaro Jocelyne Aigueperse et Maâmar , Vitamine D : Métabolisme, régulation et maladies associées , decembre 2006 , V 22 : 1095-1100 .

-Emma Hodcroft, PhD , Variant: 21D (Eta) , 19 mai 2022.

-Emma Hodcroft , Variant: 21K (Omicron) , 6 juin 2022 .

-Estelle Priam , Variant Bêta (sud-africain) Covid-19 : ce qu'il faut savoir sur le variant d'Afrique du Sud , 28 avril 2021.

-Florence Daine, Vitamine D ou calciférol, 29 mai 2020 .

-Françoise Debiais, service de rhumatologie, CHU de Poitiers, Poitiers, Effet bénéfique de la vitamine D dans la Covid : quelles sont les données ?, 7 janvier 2021.  
94- Hugues TOLOU , Covid 19 : l'et protecteur de la vitamine D se conrme , 6 mars 2022 .

- Frédéric Sergeur , La vitamine D diminuerait la gravité de la Covid-19 , 19 janvier 2021.

-Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J. (1996), J. Mol. Recognition, 9: 1- 5. Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock .

-Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William "Lindy" Lindstrom, Ruth Huey, Stefano Forli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson , utomated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors , Updated for version 4.2.6 , Autodock version 4.6 , 28 July 2014.

-Greene N, Judson PN, Langowski JJ, Marchant CA. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. SAR QSAR Environ Res 1999; 10 : 299–314.

-Gabriel Gallezot , La recherche in silico. les chercheurs et la documentations numérique, Editions du cercle de la librairie, 2002, page 1-2.

-Grant W-B, Lahore H, McDonnel S-L, Baggerly C-A, French C-B, Aliano J-L, Battoa H-P. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of Influenza and Covid-19 infections and deaths. Nutriens 2020; 12: 988.

-Ghavideldarestani M, Honardoost M, E Khamseh M. Role of vitamin D in pathogenesis and severity of Covid-19 infection. April 20, 2020.

-Gascon-Barré M. Antiepileptic drugs and bone health. In : Dawson-Hughes B, Holick MF, eds. Nutrition and bone health. Totowa-New Jersey, USA : Humana Press, 2004 : 647–66.

-Garabédian M, Menn S, Walrant-Debray O, et al. Prevention of child and adolescent vitamin D deficiency. II. Validation of a decision-making abacus based on sun exposure and vitamin D intakes. Arch Pediatr 2005; 12 : 410–9 .

-Gérald Kierzek , Variant Alpha (anglais) Covid : symptômes, mortalité, isolement , 8 juillet 2021 .

-- Haihai Jiang, Peiyao Yang ,and Jin Zhang , Potential Inhibitors Targeting PapainLike Protease of SARS-CoV-2: Two Birds With One Stone , 23 February 2022.

-Hillen HS, Kokic G, Farnung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. Nature. 2020, page 584:154–6.

-Hewison, M, D Zehnder, R Bland, et Pm Stewart. 2000. « 1alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D ». J Mol Endocrinol 25 (2) (octobre 1): 141-148.

-Holick MF. Defects in the synthesis and metabolism of vitamin D. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1995; 103 : 219–27.

-Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Proteins. 2002, 47: 409-443.

- Ilie P-C, Stefanescu S, Smith L. The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality. *Aging Clin Exp Res* May 6, 2020.
- Imane Jamaï Amir, \* Zina Lebar, Ghita yahyaoui, et Mustapha Mahmoud, Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique, 24 juillet 2020, 31(619): 15–20.
- jessica Desjardins, rôles des protéines accessoires du coronavirus humains OC43, 2010 , page 6.
- Jia H.P., Look D.C., Shi L, ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia, *Journal of Virology*,2005, page 79(23):14614–14621.
- Jerzy Osipiuk, Saara-Anne Azizi, Steve Dvorkin, Michael Endres, Robert Jedrzejczak, Krysten A. Jones, Soowon Kang, Rahul S. Kathayat, Youngchang Kim, Vladislav G. Lisnyak, Samantha L. Maki, Vlad Nicolaescu, Cooper A. Taylor, Christine Tesar, Yu-An Zhang, Zhiyao Zhou, Glenn Randall, Karolina Michalska, Scott A. Snyder , Bryan C. Dickinson, Andrzej Joachimiak ,Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors,02fubruy 2021,page 1.
- Jiang Y, Yin W, Xu HE. RNA-dependent RNA polymerase: structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;538:47–53.
- J Clin Med , maladie covid-19 de l'adulte , 2020, page 2 .
- Julie Kern , Définition | Variant Delta - variant indien | Futura Santé , 18 juin 2021.
- JONES G., WILLETT P., GLEN R. C., LEACH A. R., TAYLOR R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking., *J. Mol. Biol.*, 1997, 267 : 727-48 .
- Kato S, Yoshizazawa T, Kitanaka S, et al. Molecular genetics of vitamin Ddependent hereditary rickets. *Horm Res* 2002; 57 : 73–8.
- Korsia-Meffre S,Quels sont les différents types de vaccins contre la COVID-19 ? ,28 janvier 2021 , page 2-5.
- Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun*. 2019;10:2342.

- kzenon ,Variant Epsilon : origine, vaccins, dangers, en France ? , 03 aout 2021.
- Kabinger F, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2021;28:740–6.
- Li Q., Guan X., Wang X. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1199–1207.
- le Service Public d’Information en Santé , coronavirus Covid-19 : questions et réponses sur les tests de dépistage , 25 novembre 2021.
- Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin–angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004 ;89-90:387-92 .
- Lokesh Ravi , Kannabiran Krishman , A Handbook on protein-ligand Docking tool : Autodock , June 2016 .
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. and Olson, A. J. (1996), *J. ComputerAided Molecular Design*, 10: 293-304. "Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4.
- MORRIS G. M., GOODSELL D. S., HALLIDAY R. S. et al, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function., *J. Comput , Chem.*, 1998, 19 : 1639-1662 .
- Marie. B, Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques , Thèse de Doctorat , Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2009 .
- Maton A, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Warner MQ, LaHart D, Wright JD , *Human Biology and Health.* Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall , 1993.
- Mahdjoub Youcef , Développement d’une application distribuée en utilisant la plateforme Jini Application Docking moléculaire,université de science et des technologies D’Oron Mohammed Boudiaf , d’département d’informatique 2021 .

-Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al, supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. BMJ 2017;356:i6583.

-Maugars Y, Glémarec J, Guillot P, et al. Métabolisme phosphocalcique et ostéomalacie. Rev Rhum 2000; 67 (suppl 2) : 95–8.

-Mullen J, Tsueng G, et int., and tCfVSB , Stanford Univrsity, Sars cov-2 variants , 9 juin 2022.

-Maude Sebaihi , Variant Lambda du Covid : origine, dangers, France, vaccine , 08 septembre 2021.

-Marcel Ichou , Traitement Covid-19 : prise en charge et médicaments, 6 janvier 2022 .

-Nancy Claude, Françoise Goldfain-Blanc et André Guillouzo, La place des méthodes in silico, in vitro, in omic dans l'évaluation de la sécurité des médicaments , 1 janvier 2009 , page 2.

-Nykjaer, Anders, Duska Dragun, Diego Walther, Henrik Vorum, Christian Jacobsen, Joachim , Flemming Melsen, EI Christensen, et Thomas E Willnow. 1999. « An Endocytic Pathway Essential for Renal Uptake and Activation of the Steroid 25- (OH) Vitamin D3 ». Cell 96 (4) (février 19): 507-515 .

-OMS , l' Organisation mondiale de la Santé , COVID-19 : qu'est-ce que le variant Omicron ? , 26 janvier 2022 .

-Prof Rosanna W Peeling PhD , Prof Piero L Olliaro MD , Debrah I Boeras PhD , Noah Fongwen MD , Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and Challenges , the lancet infections diseases , septembre 2021, page 290-295.

-Pascussi JM, Vilarem MJ. Ostéomalacie consécutive à la prise prolongée de médicaments. Sur la piste de PXR, un récepteur impliqué dans la détoxification. Med Sci (Paris) 2005; 21 : 582–3.

-RAREY M., KRAMER B., LENGAUER T., KLEBE G., A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm., J Mol Biol, 1996, 261 : 470-489.

-Ridley, M. (2006). *Genome*. New York, NY: Harper Perennial. ISBN 0-06- 019497-9.

-Rebecca Rose, David J. Nolan, Tessa M. LaFleur, Susanna L. Lamers , Outbreak of P.3 (Theta) SARS-CoV-2 emerging variant of concern among service workers in Louisiana , january 2022 , v15, page 7-9.

-S.udhaya kumar , N.Madhana Priya, S.R.Nithya, Priyanka Kannan, Nikita Jain, D.Thirumal kumar,R.Magesh, Salma Younes , Hatem Zayed, C.Georgepriya Doss ,A review of novel coronavirus disease (COVID-19): based on genomic structure, phylogeny, current shreds of evidence, candidate vaccines, and drug repurposing,27 march 2021, page 14-15.

-Sigma-Aldrich ,Mpro 3CL Protease from coronavirus SARS-COV-2,2021 , page 2-3.

-Sk. Abdul Amin , Suvankar Banerjee , Kalyan Ghosh , Shovanlal Gayen, Tarun Jha,Protease targeted COVID-19 drug discovery and its challenges Insight into viral main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) inhibitors, 1 January 2021, page 5-6-7.

-Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, et al. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E3900–9.

-Sean R. Hosein , *Survol de la vitamine D : source , doses, interactions avec les médicaments, toxicité* , 2012 .

- Samantha Pagès , *Dosage de la vitamine D : technique, indication, intérêt* , 26 mai 2021 .

-- Stroehlein JK, Wallqvist J, Iannizzi C, Mikolajewska A, Metzendorf M-I, Benstoem C, Meybohm P, Becker M, Skoetz N, Stegemann M, Piechotta V , *La vitamine D est-elle un traitement efficace et sûr de la COVID-19 ?*, 24 may 2021.

-- Sumner, JB , *The isolation and crystallization of the enzyme urease Preliminary paper* , 1926 , *Journal of Biological Chemistry* 69: 435–41.

-Sébastien. L, Arrangements de Cercles sur une Sphère: Algorithmes et Applications aux Modèles Moléculaires Représentés par une Union de Boules , Thèse de Doctorat , Université de Bourgogne-INRIA Sophia-Antipolis, 2008 .

-Tephane H.R., Sarah H.W. What are the risks of Covid-19 infection in pregnant women? The Lancet. 2020;395(10226):760–762.

-Vincent R. Racaniello , J Clin Invest , Emerging infectious diseases , JCI ( the journal of clinical investigation) , march 2004 , page 796.

-V.Peyronnet , J.Sibiude , P.Deruelle , C.Huissoud , X.Lescure , J.-C.Lucet , L.Mandelbrot , I.Nisand , C.Vayssière , Y.Yazpandanah , D.Luton , O.Picone , Infection par le SARS-CoV-2 chez les femmes enceintes : état des connaissances et proposition de prise en charge par CNGOF , mai 2020, page 436-443.

-Valentine poingnon , Pr Anne-Claude Crémieux, Asymptomatiques : qui sont les porteurs sains du Covid-19 ?, 20 décembre 2021,page 4.

-VIDAL , complément alimentaire : vitamine D , 12 décembre 2016.

-Wu P., Duan F., Luo C. Characteristics of ocular findings of patients with coronavirus disease 2019 (Covid-19) in Hubei Province, China. JAMA Ophthalmol. 2020:e201291.

-Wang W., Xu Y., Gao R. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical. JAMA. 2020:e203786.

-Wu F., Zhao S., Yu B, Nature. (sous presse), A new coronavirus associated with human respiratory disease in China,2020.

- Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu , On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 , 3 march 2020, page 1012-1023.

-Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin,2020.