

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 596

*Matière, Molécules, Matériaux et Géosciences*

Spécialité : « *Chimie Organique* »

Par

**Vincent BARAN**

**Synthèse d'analogues nucléos(t)idiques originaux de type  
3'-carboxamido et 3'-C-triazolo, potentiels agents antiviraux pour  
la lutte contre les virus (ré-)émergents à ARN.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 22 Novembre 2024

Unité de recherche : CEISAM – UMR6230 – Nantes Université – Nantes

## Rapporteur.euse.s avant soutenance :

**Emmanuelle Braud**  
**Samir Messaoudi**

Professeure des Universités – Université de Paris Descartes  
Directeur de Recherche CNRS – Ecole Polytechnique de Plaiseau

## Composition du Jury :

Examineur.rice.s :

**Luigi Agrofoglio**  
**Catherine Gaulon-Nourry**

Professeur des Universités – Université d'Orléans  
Maître de conférences des Universités – Le Mans Université

Directrice de thèse :

**Monique Mathé-Allainmat**

Chargée de Recherche CNRS – Nantes Université

Co-directeur de thèse :

**Jacques Lebreton**

Professeur des Universités – Nantes Université

# Chapitre 1 : Les nucléosides et leurs enjeux dans la lutte contre les virus à ARN.

## I. Définition, structure et conformation.

### 1. Définition structurale des nucléos(t)ides.

Les nucléosides sont des molécules composées de deux motifs hétérocycliques, la partie osidique et la partie base nucléique. Concernant la structure ose, celle-ci se présente tel un tétrahydrofurane pouvant être en série ribose (R = OH) ou désoxyribose (R = H). La nomenclature de ce cycle s'effectue dans le sens horaire commençant par le carbone 1' puis, de manière croissante jusqu'à la fonction alcool primaire, portée par le numéro 5'. Une seconde spécificité concernant sa nomenclature, consiste à faire la différence entre les nucléosides et les nucléotides. Lorsque la fonction hydroxyle en position 5' est liée à un atome de phosphore (sous la forme de phosphate), alors cette espèce est appelée nucléotide. Concernant les bases nucléiques, celles-ci sont liées au sucre sur sa position anomérique *via* une liaison  $\beta$ -D-glycosidique avec l'azote N1 ou N9. De plus on distingue deux familles de bases azotées, les purines avec l'adénine (A) et la guanine (G), et les pyrimidines avec la cytosine (C), la thymidine (T) et l'uridine (U). (Figure 1)

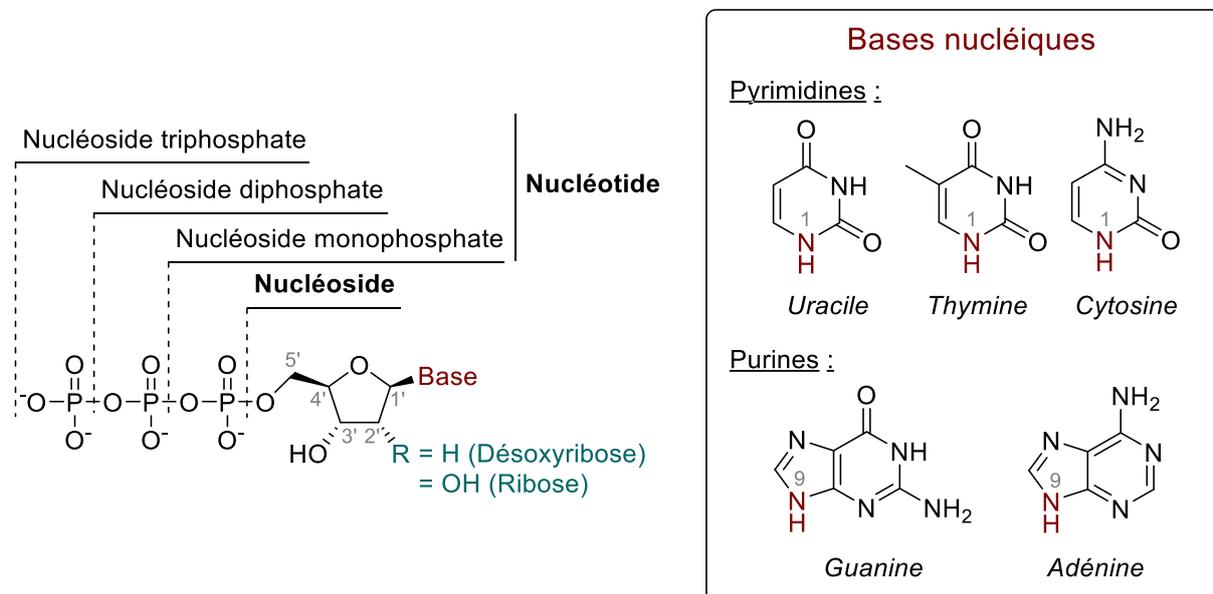


Figure 1 : Structure des nucléos(t)ides

### a. Les oligonucléotides.

Lorsque les nucléotides sont liés entre eux *via* une liaison phosphodiester, entre les hydroxyles en position 3' et 5', ils sont alors appelés oligonucléotides. Ces oligomères contiennent les

informations génétiques nécessaires au développement et à la reproduction d'organismes vivants et microorganismes tels que les virus. On parlera alors d'un monobrin (ou double brin) d'ADN pour Acide DésoxyriboNucléique, ou alors d'ARN pour Acide RiboNucléique. L'ADN fut isolé pour la première fois en 1869 par F. Miescher puis c'est en 1953 que R. Franklin ainsi que J. D. Watson et F. Crick<sup>1</sup> proposèrent une structure en forme hélicoïdale de l'ADN. De fait, les bases nucléiques interagissent entre elles *via* des liaisons hydrogènes (Figure 2a). Les bases guanine et cytosine, par exemple, vont s'appareiller selon une triple interaction, tandis que l'adénine et la thymidine vont former une double interaction. Cette complémentarité est une composante essentielle au repliement du double brin d'ADN et au maintien de sa structure hélicoïdale *dextrogyre* rigide. Cette double hélice est formée d'un enchaînement entre un petit sillon (12 Å) suivi d'un grand sillon (22 Å). Toutes les 10 paires de bases (34 Å) un tour complet est effectué par l'ADN, et son diamètre est d'environ de 20 Å (Figure 2b).

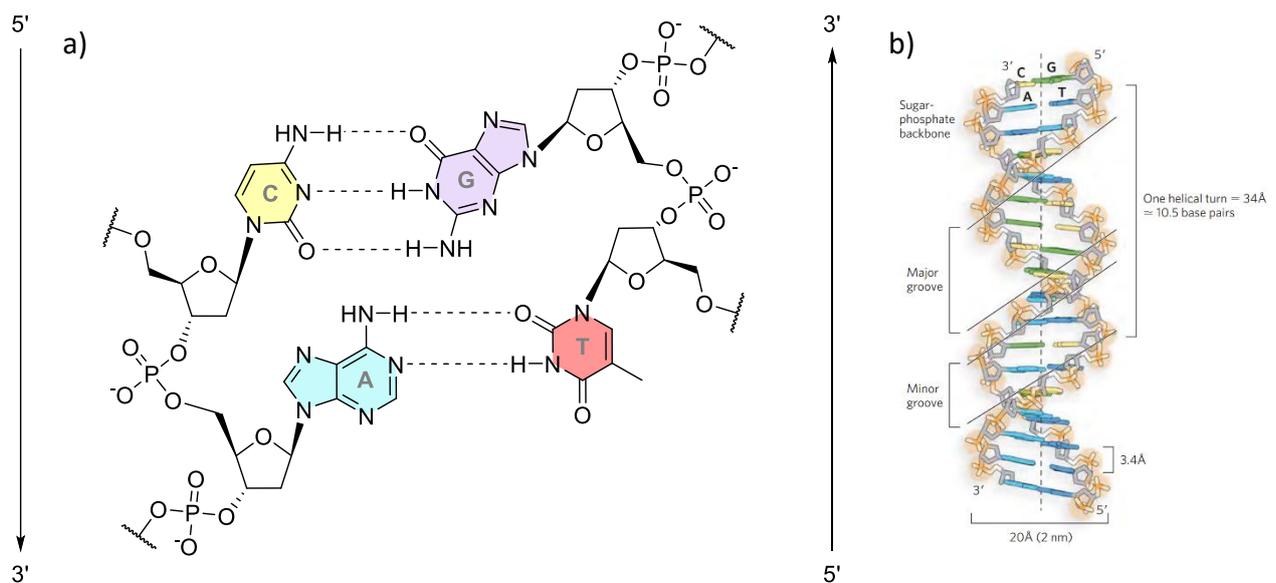


Figure 2 : Construction de l'ADN. a) appariement des bases selon le modèle de Watson et Crick. b) Structure de l'ADN.

Cette description de l'ADN correspond à sa forme la plus courante et la plus stable, dite, ADN-B. En effet, il existe plusieurs structures tertiaires de l'ADN, biologiquement actives, qui sont caractérisées par le sens de rotation, la longueur de l'hélice, la taille entre les sillons...<sup>2</sup> (Figure 3a)

L'ADN-A, présente peu de différence face à son homologue B. Cependant, il est à noter que par la présence d'un *puckering* (ou conformation du sucre) de type C<sub>3'</sub>-endo (initialement C<sub>2'</sub>-endo pour l'ADN-B, Figure 3b), sa longueur, pour un nombre équivalent de pair de bases,

est raccourcie, ainsi qu'une déformation des silos impliquant un élargissement de son diamètre. Cette déformation est issue de la déshydratation de l'ADN-B. Cette conformation ADN-B est aussi utilisée par l'ARN pour former des doubles brins.

L'ADN-Z a une conformation *zig-zag*, induit par le *puckering* du sucre variant entre ceux portant des bases purines ( $C_3'$ -endo) ou pyrimidines ( $C_2'$ -endo), ainsi que la conformation de la liaison glycosylamine (*syn* pour les purines et *anti* pour les pyrimidines). Ces modifications vont induire un changement drastique sur sa structure tertiaire, en étant plus long (pour un nombre équivalent de paires de bases), un sens de rotation vers la gauche et un diamètre plus court.

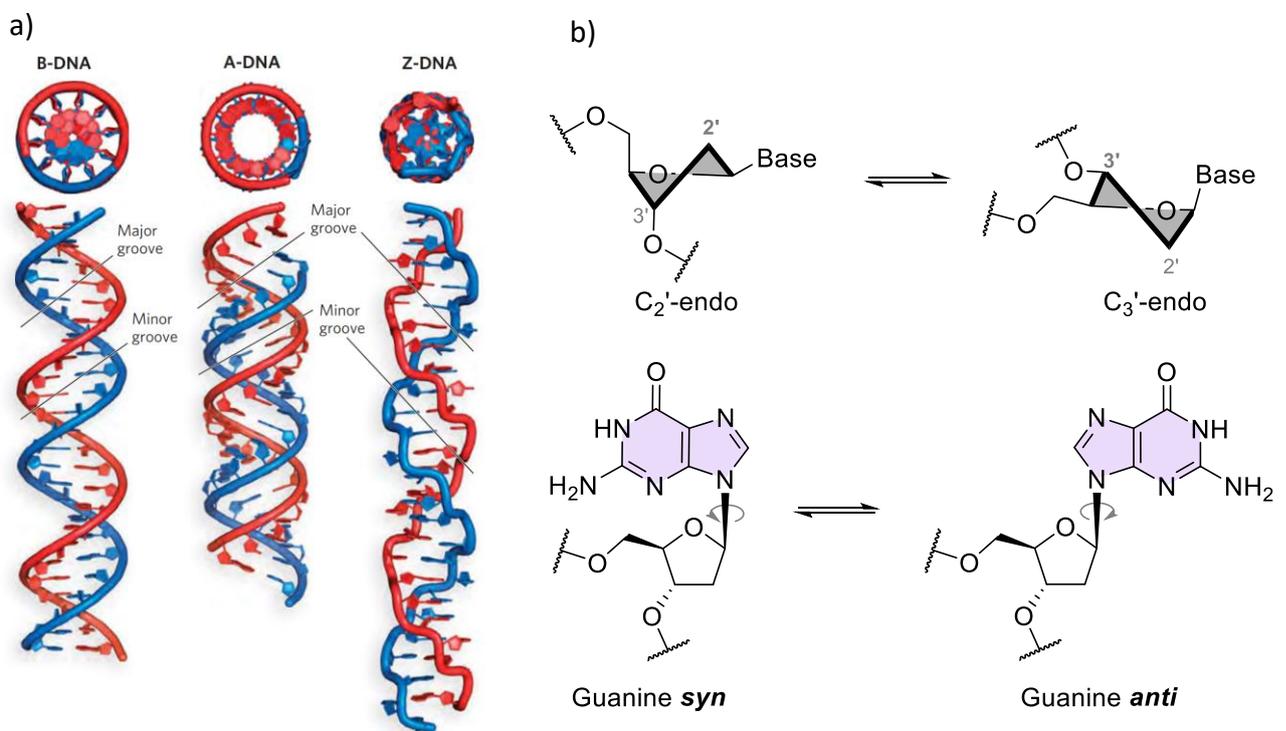


Figure 3 : a) Structure tertiaire de l'ADN-A, -B, -Z. b) Conformation  $C_2'$ -endo (ADN-B) et  $C_3'$ -endo (ADN-A), (en haut), et la conformation *syn* et *anti* de la guanine (en bas).

## 2. Conformations du sucre et leurs propriétés

A travers la description de l'ADN nous avons abordé la notion de conformation du sucre, aussi appelé, *puckering*. Cette notion a fait l'objet de nombreuses études<sup>3</sup> et est importante dans la chimie des nucléosides puisqu'elle régit et guide ces derniers à être reconnus, ou non, par les différentes protéines de l'organisme. De manière similaire à la chimie des sucres présentant des conformations chaises, bateau... Les nucléosides vont avoir plusieurs formes dépendant des angles de tension du squelette osidique et des effets stéréo-électroniques.

Afin de déterminer leurs géométries il faut étudier les angles de torsion endocyclique noté ( $v_0, v_1, v_2, v_3, v_4$ ) (Figure 4a), par lesquels il sera possible de calculer la valeur  $P$ , qui est l'angle pseudo-rotationnel de phase, et enfin l'amplitude maximale de déformation  $v_{max}$  (Figure 4b). Les angles  $v_x$  correspondent à l'élévation de cet angle selon un plan droit (écart à la planéité) par exemple l'angle  $v_0$  entre  $C_4'-O_4'-C_1'-C_2'$ . A partir de l'angle  $P$ , qui décrit la structure (Twist ou Enveloppe), et de  $v_{max}$ , qui décrit l'étendu maximale de cette conformation, il est possible de reporter ces valeurs sur un cycle pseudo-rotationnel.

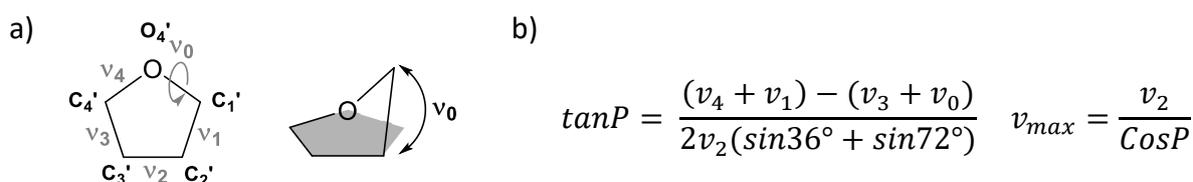


Figure 4 : a) Description des angles de torsion. b) Equation pour déterminer les valeurs  $P$  et  $v_{max}$

A travers la roue de pseudo-rotation (Figure 5a), il est possible de décrire la totalité des conformations possibles pour le nucléoside.

La forme Enveloppe (noté E) correspond à une forme dont quatre des atomes du cycle sont situés sur le même plan linéaire et un seul atome sort de ce dit plan. Si le numéro est en indice, l'atome est en-dessous du plan (exo), et si le numéro est en exposant, l'atome est au-dessus du plan (endo). Ainsi, pour  $P = 126^\circ$ , le puckering est dit  ${}_1E$ , le carbone 1' est en position exo (en dessous du plan) alors que les autres atomes du cycle se trouvent dans le même plan.

La forme Twist (noté T) correspond à une forme dont 2 atomes sortent du plan, de manière similaire le chiffre en exposant indique l'atome en position endo, le chiffre en indice indique l'atome en position exo. Par exemple, pour  $P = 0^\circ$ ,  ${}^3T_2$ , le carbone 3' est au-dessus du plan, et le carbone 2' est au-dessous du plan. Cette position est essentielle vu qu'il s'agit de la conformation Nord (ou  $C_3'$ -endo), qui avec la conformation  ${}^2T_3$ , appelée Sud, sont les plus courantes car de plus faible énergie. Il est intéressant d'observer la transformation entre deux positions enveloppes tel qu'il est montré sur la Figure 5b. Ainsi, lorsque de  $P = 126^\circ$ , celui-ci est sous une conformation  $E_1$ , et, pour passer en  ${}^2E$ , va transitionner par les formes Twist  ${}_1T^2$ , ainsi le carbone 1' va « monter » jusqu'à se retrouver dans le même plan  $O_4'-C_4'-C_3'$ . Tout comme le carbone 2' qui va alors passer en position endo.

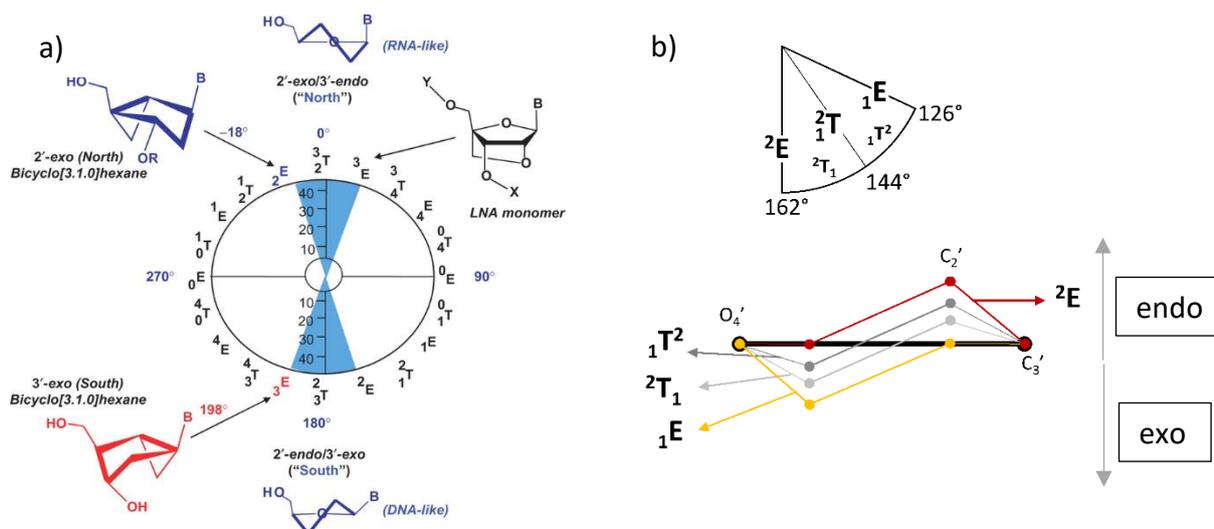


Figure 5 : a) Cycle de pseudo-rotation. b) Transition entre les conformations  $1E$  et  $2E$

Les nucléosides de conformation Nord ( $0^\circ < P < 36^\circ$ ) sont principalement identifiés dans les brins d'ADN de type A et d'ARN, et sont préférentiellement reconnus par les polymérases. Tandis que les nucléosides de conformation Sud ( $144^\circ < P < 180^\circ$ ), sont présents dans les brins d'ADN de type B, et sont reconnus par les kinases.

Cette notion est importante dans le développement d'analogues nucléosidiques et pour mieux comprendre leur fonctionnement une catégorie de nucléosides a été développée appeler LNA pour *Lock-Nucleic-Acid*. Ceux-ci présentent la particularité d'avoir un bicyclic reliant deux positions sur le furane venant bloquer la conformation et par extension leurs *puckering*. La conformation des nucléosides non bloqués peut évoluer et changer selon plusieurs paramètres. Ainsi, il est possible de s'assurer qu'une interaction molécule-protéine est provoquée selon la conformation du nucléoside. Pour illustrer ces propos Marquez *et coll.*<sup>4</sup> ont alors développés une série de LNA carbacyclique pouvant être de conformation Nord (**L-1N**) ou Sud (**L-1S**) respectivement de conformation  $2E$  et  $E_3$  (Figure 6). Lorsque les analogues 3'azido-triphosphates (**L-1aN-TP** et **L-1aS-TP**) ont été testés sur la transcriptase inverse du VIH, il s'est avérée que le nucléotide de conformation N possède une activité antivirale confirmant la préférence des polymérases sur ce type de substrat. Les dérivés **L-1b** et **L-2b**, de conformation sud, ont quant à eux été reconnus par les kinases du virus de l'herpès.<sup>5</sup>

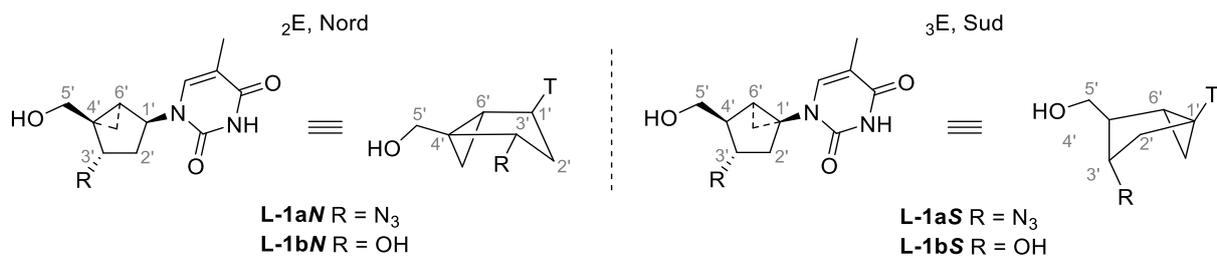


Figure 6 : Nucléoside bloqué selon Marquez et coll.

Il existe plusieurs facteurs pouvant induire les conformations Nord et Sud, le premier concerne l'orientation de la base azotée.

En effet, la torsion de l'angle glycosidique ( $\chi$ ) va évoluer d'une valeur de  $-160^\circ$  pour un nucléoside Nord, à  $-120^\circ$  pour un nucléoside Sud. Comme vu précédemment (Figure 3b), les bases peuvent prendre deux orientations relatives (Figure 7a), *syn* et *anti*, qui vont alors avoir plusieurs effets, notamment, sur les structures tertiaires de l'ADN et la formation de G-quadruplex et surtout le *puckering* (Figure 7b). Deux effets stéréo-électroniques vont alors affectés l'orientation de la base, le premier étant l'effet gauche, qui est, la tendance d'une structure à s'adapter afin d'optimiser les interactions entre paires d'électron et/ou de liaison polaire.<sup>6</sup> La seconde étant l'effet anomérique qui est la tendance qu'a, le doublet non-liant de l'oxygène 4', à orienter l'azote de la base.<sup>7</sup>

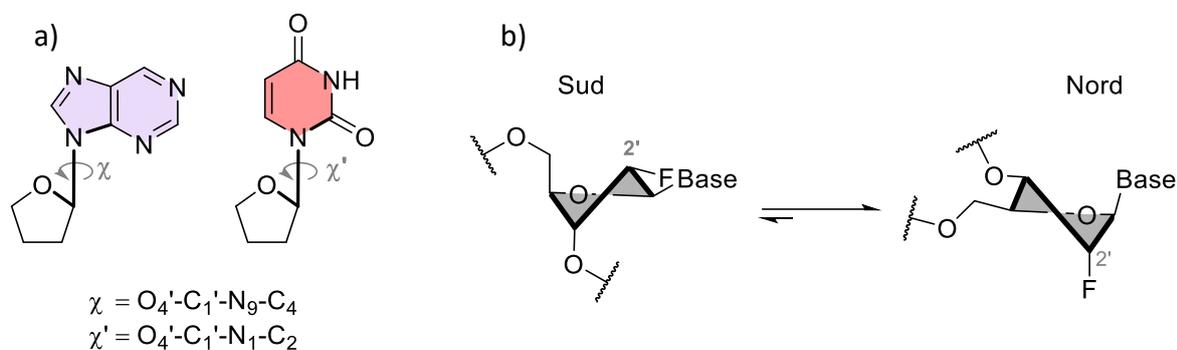


Figure 7 : Torsion de l'angle glycosidique et influence du fluor sur le *puckering*

Les modifications sur la partie osidique peuvent, aussi, avoir une très grande influence sur la conformation, c'est notamment le cas des 2'-Fluoronucléosides et 3'-Fluoronucléosides. Lorsque l'atome de fluor (à caractère fortement électro-négatif) se trouve en position alpha, alors, l'effet gauche va conduire le sucre à prendre une conformation Nord (Figure 7b).

Des études ont permis de déterminer la proportion de conformation Sud *via* la constante de couplage entre les protons  $H_{1'}$  et  $H_{2'}$  (Équation 1). De par l'équation donnée ci-

dessous, il est possible d'admettre, qu'en solution, lorsque la constante de couplage  $H_{1'}-H_{2'}$  est comprise entre 0 et 3 Hz, alors le nucléoside est de conformation Nord. Tandis qu'une constante de couplage entre 6 et 9 Hz indique une conformation Sud.<sup>8</sup>

$$S(\%) = 100 \times (J_{H_{1'}-H_{2'}} - 1)/6.9$$

Équation 1 : Proportion de population de puckering sud

Ainsi, V.A. Kumar et coll.<sup>9</sup> ont notamment étudiés cette relation entre le puckering et les constantes de couplage du proton  $H_{1'}$  à travers l'analyse de LNA issue de la littérature (Tableau 1). En appliquant la formule précédente aux constantes de couplages donnés sur les dérivés LNAs (**L-2**) et deux analogues **3'-F-uridine**, nous pouvons remarquer que les sucres ribose vont adopter une conformation de type Sud (plus de 90%). A l'inverse le sucre de type xylose va avoir une forte proportion de conformation nord (36 et 0,3%). De même pour la 3'-désoxyuridine qui possède une conformation de type nord à plus de 97%.

Dérivés nucléosidiques	Constante de couplage $J$ entre $H_{1'}$ et $H_{2'}$	% conformation sud
<b>3'-désoxyuridine</b>	1,2 Hz	3
<b>L-2 (type-S-bloqué)</b>	7,5 Hz	94
<b>L-2' (type-N-bloqué)</b>	3,5 Hz	36
<b>3'-<math>\alpha</math>F-uridine (type-S)</b>	7,7 Hz	97
<b>3'-<math>\beta</math>F-uridine (type-N)</b>	1,0	0,3

Tableau 1 : Analyse conformationnelle sur le puckering et les constantes de couplage associés

## II. Les virus à ARN et leurs fonctionnements

### 1. Définitions, structures et répliquions des virus

La définition d'un virus a été pour la première fois décrite en 1957 par le microbiologiste Français, André Lwoff, à travers une liste de quatre critères<sup>10</sup> :

- Un virus possède qu'un seul type d'acide nucléique, il peut être donc qualifié de virus à ARN ou à ADN.
- Un virus ne possède pas de métabolisme propre et se reproduit à partir de son génome. Il ne possède pas de capacité de multiplication autonome.
- Un virus ne peut pas se diviser afin de produire deux versions de lui-même (*Scissiparité* ou *binary fission*), et utilise le métabolisme de la cellule hôte pour se reproduire.
- Un virus ne possède pas de système d'énergie enzymatique (mitochondries et ribosomes), c'est pour cela qu'il est défini comme étant parasite, ne pouvant que se reproduire qu'à partir d'une cellule vivante. Il s'agit d'une définition négative puisque celle-ci se base sur la nature non-cellulaire des virus.

Ces derniers, ont été classés par la classification internationale des virus (ICTV) selon 9 ordres, 140 familles, 48 sous-familles et environ 850 genres. Malgré le grand nombre de virus existant, ceux-ci possèdent une structure générale composée d'une capsidie pouvant être de plusieurs formes. Celle-ci va renfermer le génome, c'est-à-dire, l'information génétique (Figure 8a). Le tout peut être entouré d'une enveloppe de phospholipides et de protéines issu de la cellule hôte.

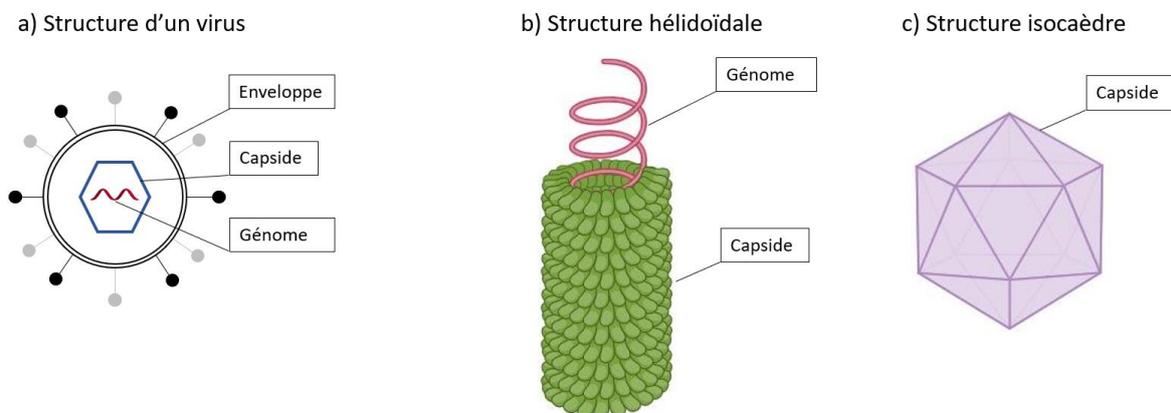


Figure 8 : a) Structure général d'un virus enveloppé. b) Structure hélicoïdale d'un virus. c) Structure icosaèdre d'une capsidie

Les différents composants d'un virus peuvent être décrit par ces caractéristiques<sup>11-13</sup> qui ont été résumés dans le Tableau 2 en prenant quelques virus relevant comme exemple:

Famille	Nom commun	Enveloppe	Forme de la capsid	Classification de Baltimore	Site de réplication
Adenoviridae	Adénovirus	Non	Icosaèdre	I dsDNA	Noyau
Herpesviridae	Virus simple de l'herpès	Oui	Icosaèdre	I dsDNA	Noyau
Parvoviridae	Parvovirus	Non	Icosaèdre	II ssDNA	Noyau
Sedoreoviridae	Rotavirus	Non	Icosaèdre	III dsRNA	Cytoplasme
Coronaviridae	Corona virus	Oui	Complexe	IV (+)ssRNA	Cytoplasme
Flaviviridae	Virus de la dengue, Zika	Oui	Icosaèdre	IV (+)ssRNA	Cytoplasme
Filoviridae	Ebola	Oui	Hélice	V (-)ssRNA	Cytoplasme
Orthomyxoviridae	Influenza, H1N1	Oui	Hélice	V (-)ssRNA	Noyau
Retroviridae	VIH-1	Oui	Complexe	VI ssRNA-RT	Noyau
Hepadnaviridae	Virus de l'hépatite B	Oui	Icosaèdre	VII dsDNA-RT	Noyau

Tableau 2 : Classification des virus

- Le génome : Il peut être présent sous plusieurs formes, réparties dans la classification de Baltimore, qui les classe en sept catégories différentes. Ceux-ci sont répartis selon le type d'acide nucléique, ADN ou RNA, s'ils sont double brin ou monobrin ainsi que leurs sens de lecture (positif ou négatif) couplé ou non à une transcriptase inverse.

- la forme de la capsid : Celle-ci peut être de forme d'icosaèdre, hélicoïdale ou complexe. L'icosaèdre est une forme géométrique composée de 20 faces de triangles équilatéraux, la majorité des virus possèdent cette capsid (Figure 8c). La capsid hélicoïdale est une sous-unité protéinique qui va entourer le monobrin d'ADN ou d'ARN sous forme d'hélice (Figure 8b). La dernière forme est dite complexe pour décrire les autres structures étant ni icosaèdre ni hélicoïdale.

- L'enveloppe : comme dit précédemment, elle peut être présente ou non autour de la capside pour protéger celle-ci contre le système immunitaire de l'hôte en utilisant sa bicouche phospholipidique.

- site répllication : Les virus à ARN vont se répliquer dans le cytoplasme car n'ayant pas besoin de rentrer dans le noyau de la cellule hôte pour se trouver sous forme d'ARN messenger. Hormis pour les rétroviridae et orthomyxoviridae qui sont les deux virus à ARN se répliquant dans le noyau. Pour les virus ADN ceux-ci se répliquent dans le noyau.

#### a. Virus Immunodéficience Humaine de type 1

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été isolé en 1983 en France par l'équipe du professeur Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi de l'institut Pasteur. En 2022, dans le monde, l'UNAIDS a recensé 39 millions de personnes infectées par le VIH. Ce virus est aussi responsable du Syndrome d'ImmunoDéficience Aquis (SIDA) qui tua 630 000 personnes en 2022. Il fait parti de la classe des *Retroviridae* (rétrovirus) et de la famille des *Lentivirus*, qui sont des particules virales d'environ 100 nm de diamètre et présente une enveloppe renfermant deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive (5'→3'), une ADN-polymérase ARN-dépendante appelé Transcriptase Inverse (TI) ainsi que différentes enzymes.

#### Génome VIH-1



#### Virion VIH-1

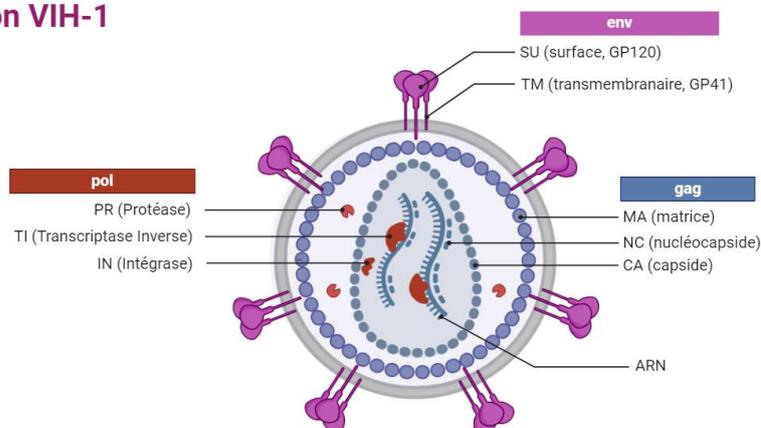


Figure 9 : Génome et structure du VIH-1

Le virus possède une membrane cellulaire dans laquelle sont implantées des glycoprotéines transmembranaires (gp41) surmontées de glycoprotéines de surface (gp120). A l'intérieur de la matrice se trouvent des protéases et la capsid renfermant la machinerie cellulaire (Figure 9). Celle-ci comprend le monobrin d'ARN, l'intégrase, la polymérase. Le génome ARN simple brin du VIH a une longueur de 9700 bases, elle comporte sur chaque extrémité une région Terminale Longue Répétitive (LTR), et comprend 3 gènes codant (*gag*, *pol*, *env*). Le gène *gag*, code les protéines responsables de la structure du virus (matrice, capsid...). Le gène *pol*, code les protéines responsables de la réplication du génome (polymérase, intégrase). Le gène *env*, code les glycoprotéines de l'enveloppe responsables de l'interaction virus-cellule lors de l'étape de fixation. Le virus du SIDA présent dans le système sanguin va infecter des nombreux types de cellules, selon un cycle de réplication<sup>14-16</sup> qui se passe en plusieurs étapes depuis la fixation vers le bourgeonnement (Figure 10) :

**1) La fixation** : la glycoprotéine gp120 du virus va interagir, dans un premier temps, avec le récepteur CD4 et dans un second temps avec le co-récepteur CXCR4 de la cellule hôte induisant une déformation structurale de gp120 et la libération de la glycoprotéine transmembranaire gp41. Cette dernière va rapprocher les membranes virale et cellulaire, et se « plier en deux » permettant la fusion des deux membranes.

**2) La libération** : le matériel génétique comprenant le monobrin d'ARN et les protéines virales sont alors libérés suite à la décapsidation par dissolution dans le cytoplasme.

**3) La transcription inverse** : La transcriptase inverse (ou TI) va synthétiser un monobrin d'ADN à partir de l'ARN génomique par appariement de base, en utilisant des nucléosides naturels sous leurs formes triphosphates. De plus, la TI va détruire l'ARN *via* l'action d'une fonction RNase H intégrée dans la polymérase. Par une deuxième action, le monobrin d'ADN va être doublé pour former un double brin d'ADN.

**4) L'intégration** : l'ADN bicaténaire avec différentes protéines (dont des morceaux de matrices et l'intégrase) vont former un Complexe Pre-Intégration (CIP) qui va passer à travers les pores nucléaires, pour accéder au noyau. Dans un second temps, l'intégrase va insérer l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.

**5) La transcription** : Une fois l'ADN proviral formé, celui-ci est transcrit par l'ARN polymérase II. Utilisant la séquence 5'-LTR comme promoteur, l'ARN messager (ARNm) ainsi

que divers codons de différentes tailles sont synthétisés et exportés hors du noyau. De plus, les gènes *gag-pol* et *gag*, ainsi que l'ARN génomique, sont également synthétisés lors de cette étape.

**6) La translation :** Le ribosome va ensuite traduire l'ARNm et utiliser l'information génétique pour former diverses protéines virales. A chaque triades de bases nucléiques, le ribosome va attribuer un acide aminé, une fois formées, les protéines subissent une étape de maturation *via* l'appareil de Golgi.

**7) L'assemblage :** Les protéines structurales, les gène codants *gag* et *pol* et l'ARN génomique sont transportés au niveau de la membrane cellulaire, et vont s'assembler pour donner une capsid renfermant toute la machinerie cellulaire.

**8) Le bourgeonnement :** En sortant de la cellule, la capsid va prendre une partie de la membrane cellulaire avec les glycoprotéines gp120 et gp41 initialement fixés.

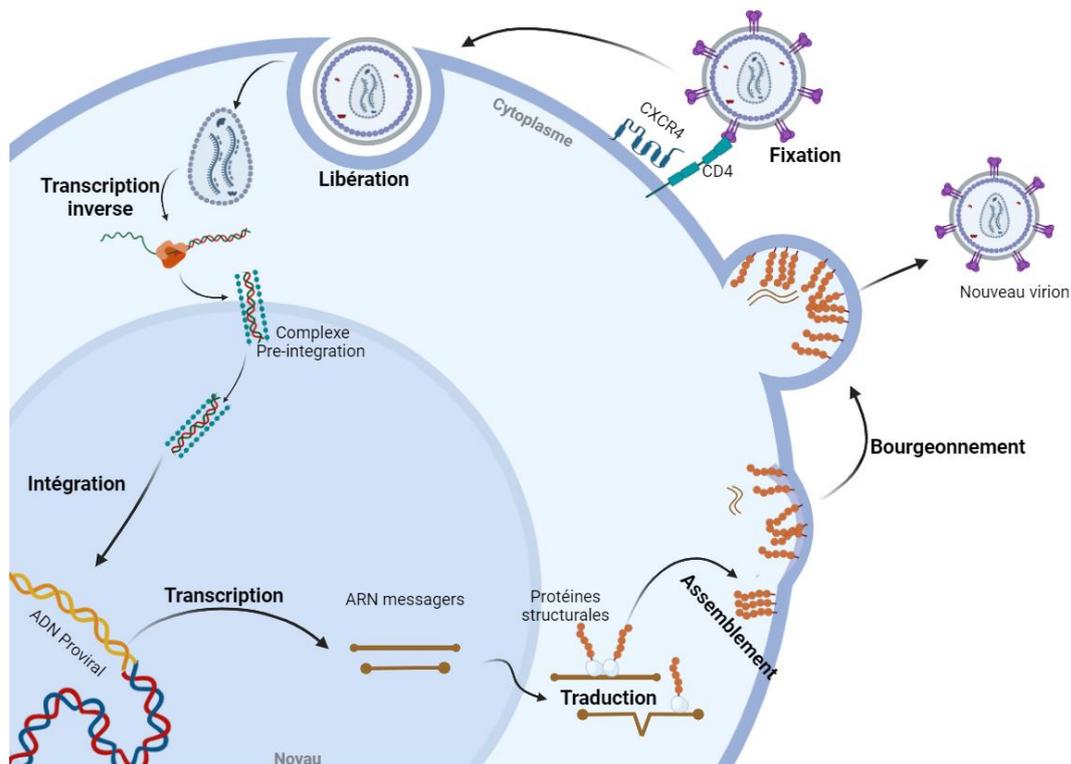


Figure 10 : Cycle de réplication du VIH-1

La transcriptase inverse et l'intégrase étant des protéines propres aux virus, celles-ci constituent des cibles thérapeutiques pertinentes pour tenter de combattre l'infection virale. Dans le cas du VIH nous allons trouver des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase

Inverse (INTI) ou Non-Nucléosidiques (INNTI).<sup>17</sup> Parmi ces molécules l'AZT, ou **Zidovudine**, est le premier anti-rétroviral qui a été approuvé en 1987, ce nucléoside va agir sur l'étape de transcription inverse empêchant le recrutement des autres nucléotides. Huit autres analogues ont depuis été approuvés par la FDA, nous pouvons citer l'**Abacavir**, le **Tenofovir** le **Stavudine** (Figure 11)... Il existe aussi des inhibiteurs non-nucléosidiques qui vont agir sur la TI, tel que le **Nevirapine** qui a permis de mieux comprendre le mode d'action de ces derniers. Ainsi, lorsque l'inhibiteur interagit avec la protéine, selon une zone spécifique, le primer va être écarté du site actif de la polymérase qui va subir une déformation empêchant le recrutement des nucléotides.<sup>18</sup>

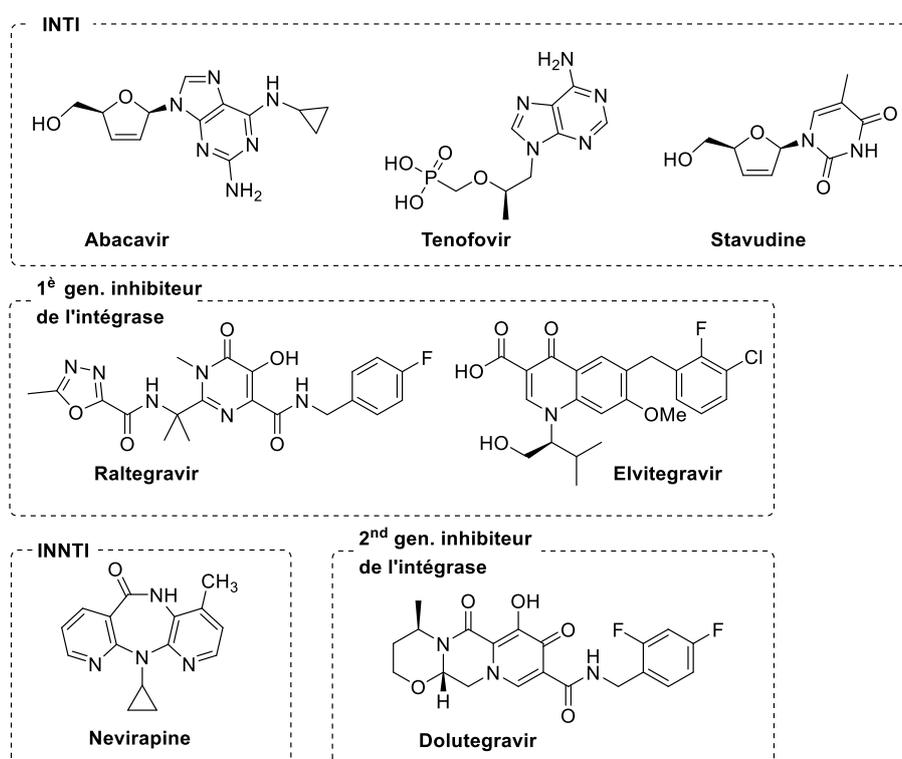


Figure 11 : Inhibiteurs du VIH

D'autres protéines peuvent être inhibées, c'est le cas de l'intégrase et de la protéase.<sup>19</sup> Concernant l'intégrase, il existe deux générations d'inhibiteurs de transfert de brin, approuvés par la FDA.<sup>20</sup> La première comprenant, notamment, le **Raltegravir** et l'**Elvitegravir** ceux-ci possèdent un noyau bicyclique ou apparenté pour la chélation de métaux contenu dans la protéine. Malheureusement, du fait de l'apparition d'intégrases mutantes résistantes à cette première génération, le développement d'une seconde génération a dû être réalisé donnant l'accès, notamment au **Dolutegravir**. Malgré les efforts mis en jeu pour réduire la mutation du virus, cette seconde génération souffre du même problème accompagné d'effets secondaires.

## b. SARS-CoV-2<sup>21-23</sup>

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN de polarité positive de la famille des coronaviridae et est responsable de la crise sanitaire du Covid-19 de 2020. Depuis le 5 janvier 2020, ce virus a infecté plus de 775 millions d'individus avec plus de 7 millions de décès selon l'OMS.<sup>24</sup> Ce virus à ARN monocaténaire de polarité positive, est composé de plusieurs *Open Reading Frames* (ORF) ou cadres de lecture ouverts, qui sont des sections du génome codant des protéines différentes nécessaires au cycle de vie viral. Parmi ces cadres se trouvent ORF1a,b qui, une fois traduites vont former les protéines non-structurales nsp, 1 à 16, dont nsp12 qui est l'ARN polymérase ARN dépendante (RpRd). Les autres protéines tel que S, E, M, N, sont aussi codées dans le génome mais dans d'autres ORF. Ce virus possède au niveau structural plusieurs éléments (Figure 12) :

- Les **spicules (S ou spikes)**, sont des protéines de surface qui, du fait de leur disposition sur le virus, vont lui donner une caractéristique de couronne (d'où coronavirus), ils sont aussi responsables de l'interaction entre les virus et les cellules hôtes.
- L'**enveloppe (E)**, ou membrane virale, qui est une couche lipidique qui permet la stabilité et le maintien structural du virion.
- Les **protéines de membrane (M)**, qui sont des protéines structurales permettant l'assemblage des virions.
- Les **nucléocapsides (N)**, qui sont des protéines maintenant et protégeant l'ARN viral.
- L'ARN viral ou **ARN génomique**, constitue le génome du virus et est utilisé par les polymérases lors de la réplication du virus.

## Génome SARS-CoV-2



## Virion SARS-CoV-2

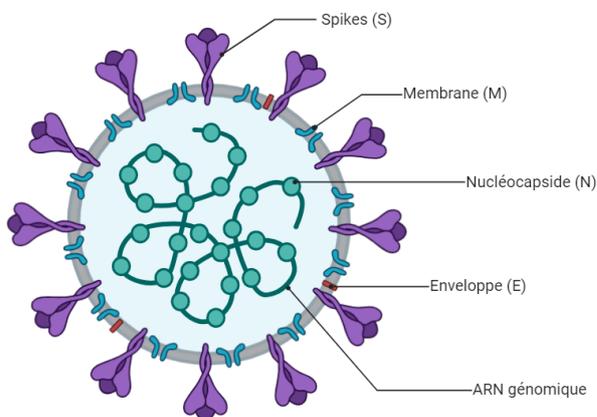


Figure 12 : Structure et génome du SARS-CoV-2

Le cycle de réplication du SARS-Cov-2 est composé de plusieurs étapes (Figure 13) :

- **Interaction et entrée virale** : les protéines spikes (S) comprennent deux parties fonctionnelles (S1 et S2). La première sert en tant que ligand pour se lier avec les récepteurs ACE2, la deuxième sert à fusionner les membranes permettant la libération du génome dans le cytoplasme.
- **Traduction du génome** : contrairement au VIH, la polymérase du SARS-CoV n'est pas directement présente dans le virus. C'est pourquoi, une première étape de traduction de l'ARN viral est réalisée par les ribosomes de la cellule hôte. Comme décrit précédemment, le génome est composé de ORF, les plus importantes étant ORF1a et ORF1b qui lorsqu'elles sont traduites vont donner deux polyprotéines (pp1a,b). Ces dernières seront par la suite clivées par des protéases, donnant les protéines non-structurales nsp1-16. Celles qui nous intéressent sont nsp12 aussi appelée, polymérase RpRd pour ARN-Polymérase-ARN-Dépendante et ses 2 co-facteurs nsp7-8.
- **Réplication de l'ARN** : Une fois la polymérase synthétisée, l'ARN va pouvoir être répliqué suivant deux étapes. Premièrement, la polymérase va utiliser l'ARN génomique en tant que modèle pour construire un brin d'ARN de polarité négative. Celui-ci ne pouvant pas être

reconnue par les protéines, un deuxième passage de la RpRd est nécessaire pour synthétiser l'ARN subgénomique et génomique.

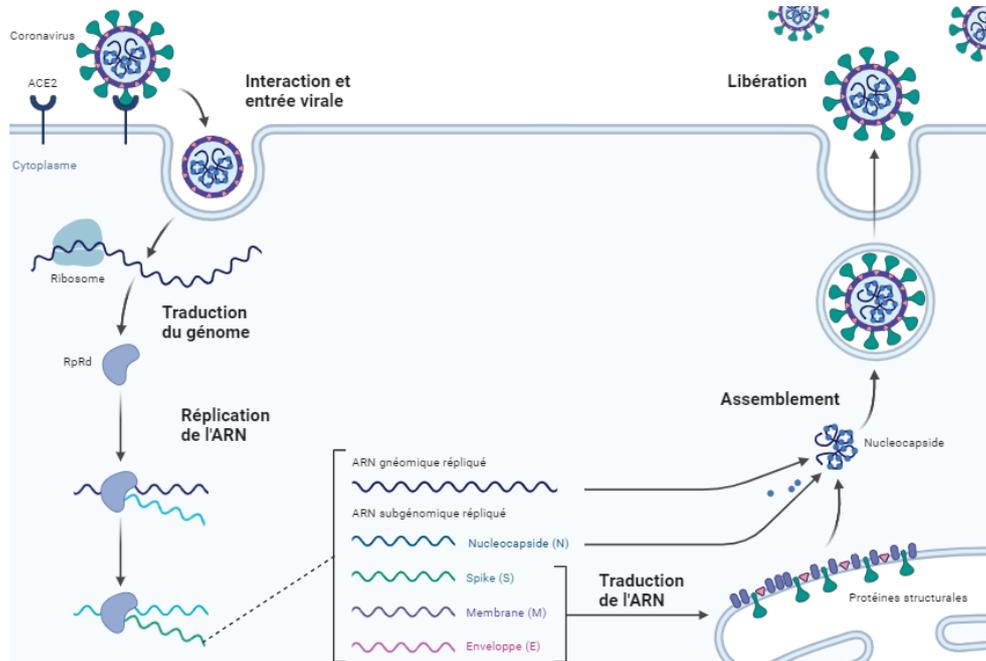


Figure 13 : Cycle de réplication du SARS-CoV-2

- **Traduction de l'ARN subgénomique :** Une fois les différents codons d'ARN formés, ceux-ci sont traduits par le ribosome donnant les protéines S, E, N, M.

- **Assemblage et libération :** Une fois les protéines synthétisées, l'ARN génomique et les nucléocapsides vont s'assembler pour former un virion qui va par la suite être libéré du cytoplasme et infecter de nouvelles cellules.

## 2. Protéines virales polymérases

Un grand nombre de protéines et d'enzymes sont de potentielles cibles sur chacune des étapes du cycle de réplication. Les polymérases telles que la transcriptase inverse (TI) ou la RpRd, sont des protéines clés qui vont devenir des cibles thérapeutiques primordiales et dont la connaissance structurale va permettre une meilleure conception de potentiels inhibiteurs.

### a. Structure de la transcriptase inverse<sup>15,25,26</sup>

La transcriptase inverse est une polymérase hétérodimérique, composée de deux domaines, p66 et p51. Le site actif de la protéine et la RNaseH se trouvant dans la sous-unité p66 tandis que p51 est une sous-unité inactive qui joue le rôle de maintien structural. P66 est composée de 560 acides aminés et possède 2 rôles durant la transcription inverse, celle de polymérase

de l'ADN et d'endonucléase de type Ribonucléase H (Figure 14). P66 est composé de cinq sous-domaines : les doigts (en rouge), la paume (en jaune), le pouce (en marron), la connexion (en turquoise) et la RNaseH (en bleu). De manière schématique, il est similaire à une main droite sur laquelle sont posés sur la paume, les brins d'acides nucléiques, qui sont entourés par les doigts et le pouce. Le but de la transcriptase inverse est de construire le double brin d'ADN viral à partir de l'ARN génomique issu du virus. Pour ce faire, elle va utiliser l'ARN en tant que modèle (ou *template*) et par appariement de base, va construire l'ADN complémentaire. Pour commencer, un initiateur de séquence (ou *primer*) interagit avec l'ARN génomique, et la polymérase va le reconnaître, induisant un changement conformationnel du pouce. Puis, la polymérase va utiliser les désoxynucléosides triphosphates (dNTP) pour construire l'ADN complémentaire *via* une phosphorylation entre la fonction hydroxyle en position 3' et le groupement phosphate du dNTP.

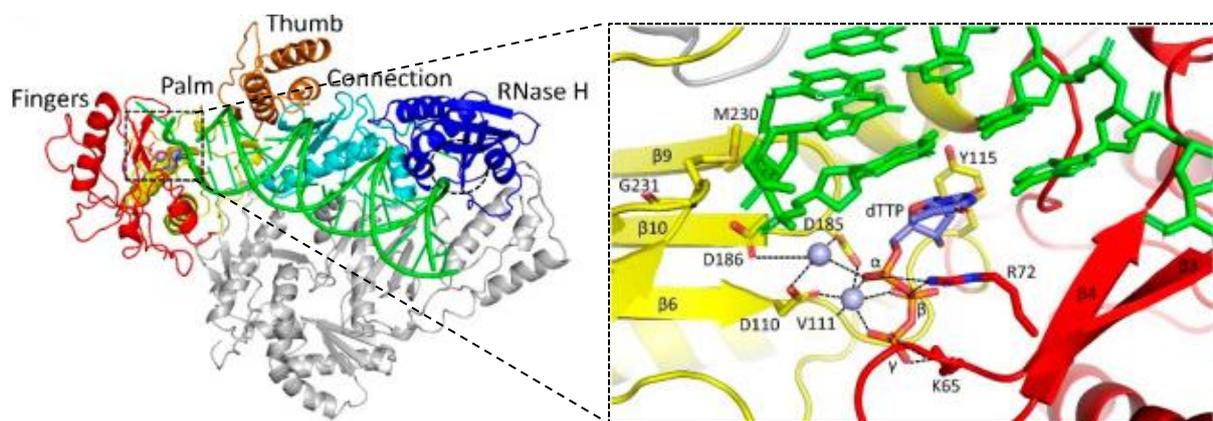


Figure 14 : Site actif de l'élongation et chélation des ions magnésiums (violet)

Cette étape est répétée et dès lors que l'ARN arrive sur le site actif de la RNase H, ce dernier est clivé en plus petit substrat. Il est à noter que le site de catalytique de la polymérase a fait l'objet de nombreuses études.<sup>27,28</sup> Il met en jeu une triade d'acides aspartiques (D110, D185, D186) qui va chélater deux cations divalents ( $Mg/Mn^{2+}$ ) interagissant avec plusieurs oxygènes entre le brin modèle et le phosphate du dNTP, cette assistance est nécessaire pour la libération du groupement pyrophosphate (Figure 14). Ainsi, la fonction hydroxyle terminale, en position 3' du monobrin d'ADN, va réagir avec le phosphore  $\alpha$  du nucléoside triphosphate, libérant une molécule de pyrophosphate (PPi).

## b. ARN Polymérase ARN Dépendante<sup>29,30</sup>

La polymérase du SARS-CoV-2 est un complexe multiprotéique composé de protéines non structurales nsp7 et 8 qui sont des cofacteurs stabilisant la RdRp, tandis que nsp12 est le site actif où la synthèse de l'ARN viral est effectuée. La forme du site catalytique est comparable à une main droite en forme de « tea anse shape » dont les doigts, le pouce et la paume font partie de la nsp12 (a). De manière similaire au VIH, la RdRp est constituée de doigts, d'une paume et d'un pouce, reliée entre eux pour former une triade laissant une cavité apparente. D'un point de vue mécanistique, le template et le primer vont se poser sur la paume à la sortie de la cavité (cercle noir sur la Figure 15a). Les NTP vont venir s'ajouter par l'entrée du site actif et l'étape d'élongation est réalisée, de plus, la nsp8 va accompagner ce brin grâce un maintien structural. Au niveau du site actif, de manière identique au VIH, une triade d'acides aspartiques (D618, D760, D761) va chélater des ions divalents ( $Mg^{2+}$ ), activant l'oxygène en position 3' terminale afin d'y intégrer le NTP qui est recruté.<sup>31</sup> De plus, grâce à l'aide de deux arginines (R553, R624) et de l'autre ion magnésium, le PPI formé va ainsi être capté aider à réaliser la réaction. Sur la Figure 15b et 15c sont représentés les trois états transitions concernant cette étape. R étant l'état de recrutement du NTP distant de 3.5 Å avec le nucléotide. TS correspond à l'état de transition, le  $P\alpha$  (lié au carbone 5' du NTP) se trouve à équidistance (2.0 Å) entre le PPI et l'oxygène 3' du brin copié, et enfin grâce à l'intervention des arginines et des ions divalents, le PPI est capté, tandis que la liaison phosphodiester 3'-5' est formé.

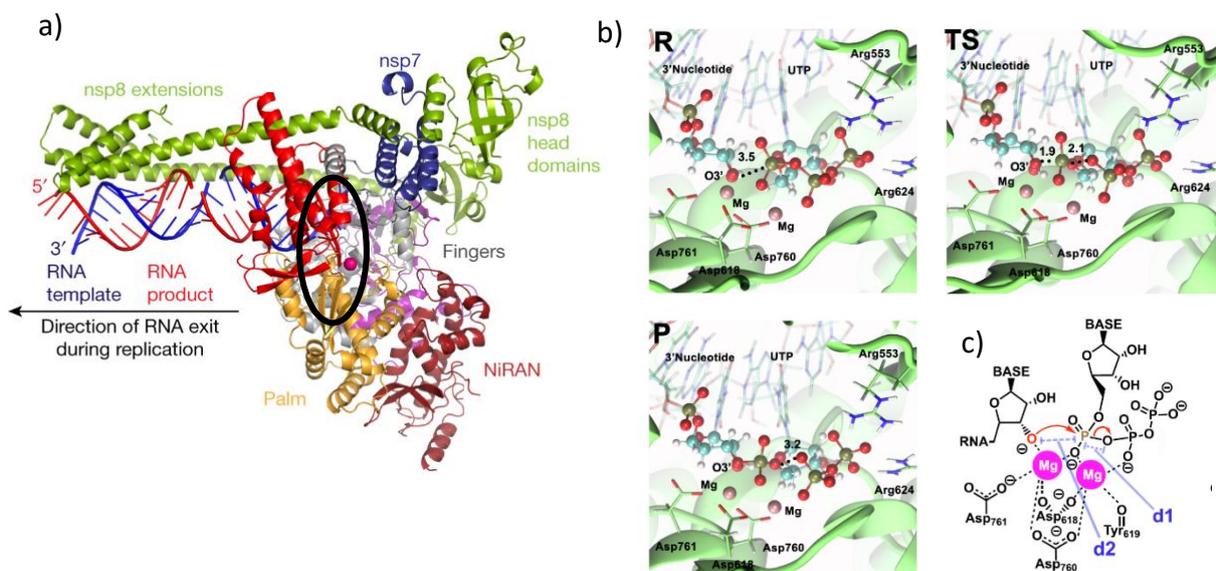


Figure 15 : a) Structure de la RdRp avec l'ARN modèle et copié. b) Modélisation de l'étape d'élongation. c) Représentation schématique de l'étape d'élongation

### III. Du nucléoside au nucléotide

Durant ces 50 dernières années, près de 90 analogues antiviraux ont été approuvés par la FDA.<sup>32</sup> Les nucléosides présentant une richesse structurale il est possible d'opérer plusieurs modifications afin de synthétiser divers analogues avec différents mécanismes d'inhibition. De ce fait, il est possible de modifier la base azotée, le sucre *via* l'insertion de groupement sur les carbones 1' à 5' ou une modification du ribose, ou bien la partie 5' donnant notamment accès aux versions prodrogues.<sup>33,34</sup>

La base azotée peut être modifiée selon plusieurs manières, l'ajout d'un substituant sur une base naturelle tel que la **Idoxuridine** (Figure 16), utilisé contre le HSV-1 inhibant l'action de l'ADN polymérase. L'atome d'azote de la liaison glycosidique peut être retiré pour ajouter à la place un carbone donnant les C-nucléosides. La synthèse de ces analogues a permis de former de puissants antiviraux comme le **Remdesivir**. L'avantage majeur de ces agents et leurs insensibilités vis-à-vis des glycosides hydrolases, des enzymes qui peuvent cliver la liaison glycosidique. Dans cette même dynamique il est possible de modifier le ribose soit en remplaçant l'atome d'oxygène par un carbone donnant accès aux dérivés carbacyclique tel que l'**Entecavir** un anti hépatique B. Il possède un atome de carbone en lieu et place de l'oxygène et un fonction alcène sur ce dernier, il agit en tant qu'inhibiteur de la transcriptase inverse.

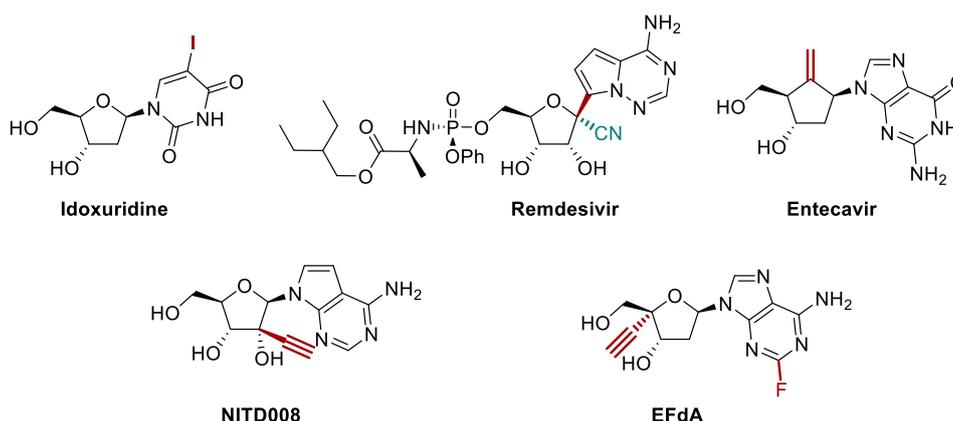


Figure 16 : Analogues nucléosidiques modifiés selon différentes positions

L'insertion de groupement sur le ribose entre les positions 1' et 5' permet de donner des molécules avec une large palette d'action antivirale. Le **Remdesivir** possède une modification sur la position 1' *via* l'introduction d'un groupement cyano. Ce dernier a montré une gamme d'activité large étant actif notamment contre le SARS-CoV-2 et Ebola. Le **NITD008** est un

analogue modifié sur la position 2' comportant un groupement éthyne sur la face beta. Il possède une EC<sub>50</sub> de 0,64 µM contre le virus de la dengue. La modification de la position 3' permet d'obtenir des inhibiteurs de la transcriptase inverse comme l'**AZT**. L'introduction d'un groupement alcyne sur la position 4' a permis d'obtenir l'**EFdA** qui possède en plus, un atome de fluor sur l'adénosine. Cet atome est important car leurant l'adénosine desaminase, ainsi, une EC<sub>50</sub> de 0,072 µM a pu être obtenue contre le VIH.

Pour agir sur les virus et plus particulièrement, pour être pris en charge par les polymérase ces nucléosides doivent traverser la membrane cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, trois étapes successives de phosphorylation sont réalisées par des kinases pour donner des Nucléosides TriPhosphate, ou nucléotides, substrat des polymérase.

### 1. Transport membranaire des nucléosides<sup>35,36</sup>

Un des passages obligatoires pour les nucléosides est celui de la membrane cellulaire. Ces derniers étant non-lipophiles ils doivent utiliser des transporteurs spécifiques. Les Transporteurs Nucléosidiques (hNTS) sont des protéines transmembranaires codées par des gènes SLC (SoLute Carrier) et sont divisés en deux catégories : les Transporteurs Nucléosidiques Concentratifs (CNTs) et les Transporteurs Nucléosidiques Equilibrants (ENTs).

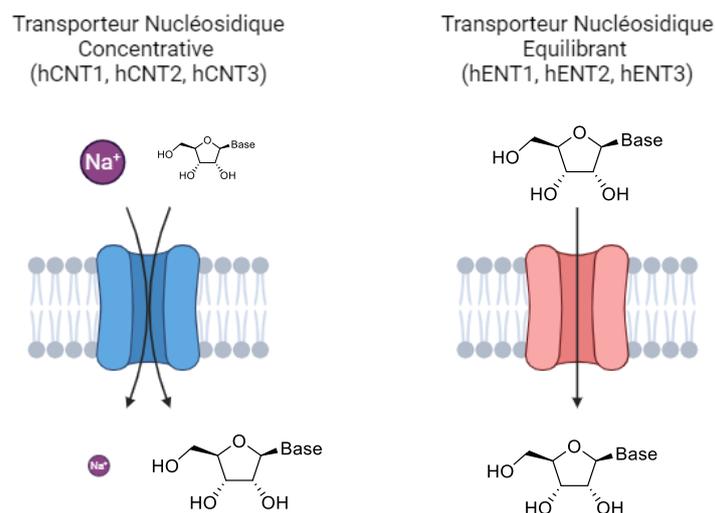


Figure 17 : Mécanisme de transport des nucléosides par les récepteurs nucléosidiques

Pour les CNTs, ceux-ci sont divisés en 3 membres (human CNT1-3) et sont des transporteurs bidirectionnels, c'est-à-dire qu'ils vont réguler la concentration de deux espèces. La paire nucléoside/sodium est transportée par CNT1 et CNT2 avec un ratio de 1 pour 1 ion, tandis que

CNT3 transporte cette paire avec un ratio de 1 nucléoside pour 2 ions sodium. Concernant les ENT pour Transporteur Nucléosidiques Equilibrants ceux-ci sont présents sous trois types différents (hENT1-3) et vont laisser passer les nucléosides selon une différence de concentration entre le milieu intra et extracellulaire (Figure 17). Ce transport peut se faire dans les deux sens afin de mieux réguler l'homéostasie de ce paramètre. Parmi ces classes de transporteurs, les CNTs vont avoir une meilleure affinité pour les nucléosides par rapport aux ENTs.

## 2. Kinases et stratégie prodrogues<sup>37,38</sup>

Une fois dans le milieu intracellulaire le nucléoside ne peut pas être reconnu par les polymérase sous sa forme libre, il doit être activé sous sa forme triphosphate, sous l'action de kinases. Ces réactions d'activation peuvent être une des étapes limitantes pour l'efficacité des nucléosides antiviraux. Ces enzymes vont catalyser le transfert d'un groupement phosphate entre le substrat donneur (ATP) et les substrats accepteur 5'-OH ou mono/di-phosphoester. Des études ont pu déterminer un potentiel mécanisme entre les différents acteurs de cette réaction.<sup>39</sup> En effet, le phosphore  $\gamma$  va passer d'une structure tétraédrique vers un trigonal plan, lors de cette conformation, le phosphore est à équidistance entre les groupements partants et attaquants (Figure 18a). Ce mécanisme a pu être mis en évidence cette géométrie grâce à une structure cristalline de l'ADP- $AlF_3$  interagissant avec une histidine (mécanisme de la troisième phosphorylation). Le complexe d'aluminium va alors mimer ce phosphore  $\gamma$  quittant l'ADP et former une liaison avec l'histidine.

(a)

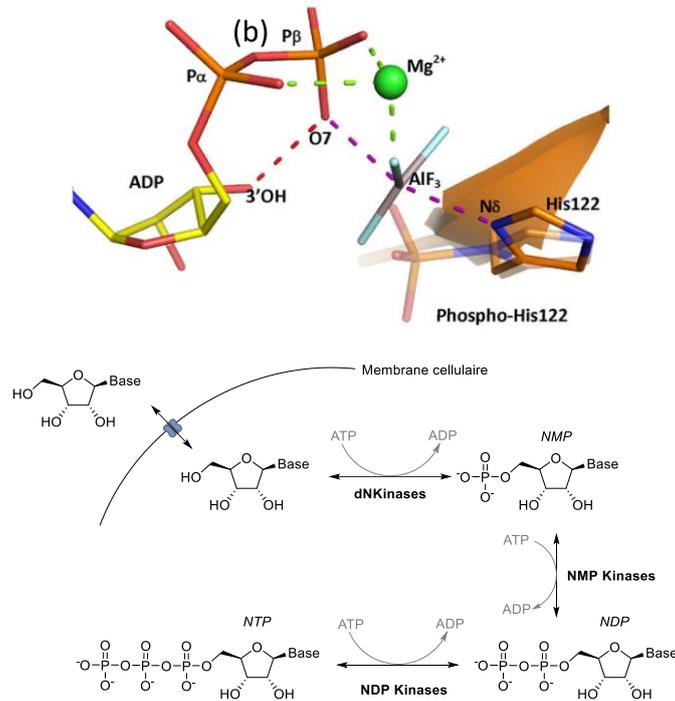


Figure 18 : a) Etat de transition mimant le transfert de phosphate par les kinases. b) Etapes de phosphorylations

Il est à souligner qu'une molécule de magnésium est présente sur le site actif servant à stabiliser les charges du groupement phosphate, ainsi que la présence de lysine et d'arginine chargées. Les trois étapes successives de phosphorylations (Figure 18b) peuvent être décrites selon ces mécanismes :

- Première étape de phosphorylation : Celle-ci peut être réalisée par des kinases cytosoliques (hTK1) ou mitochondriales (hTK2). Du fait de leur variété, il est difficile de faire des généralités quant à leurs sites de liaisons et de leurs structures. Cependant, il semblerait que hTK1 reconnaisse tout aussi bien les analogues modifiés en position 3' que les analogues naturels. Cependant, cette phosphorylation reste l'étape la plus limitante et nous verrons par la suite comment contourner cette étape.
- Deuxième étape de phosphorylation : Concernant la hTMPK, elle présente la caractéristique d'avoir une vitesse de transfert lente ( $k_{cat} = 2s^{-1}$ ), mais cela est compensé par une concentration de détection plus faible ( $k_M = 0.02 \text{ mM}$ ). En comparaison pour hAMPK, le  $k_{cat}$  est plus élevé ( $100 \text{ s}^{-1}$ ) mais un  $k_M$  plus élevé ( $1 \text{ mM}$ ). Il est important de noter que dans le cas de l'AZT, le groupement azido induit une gêne stérique dans le site catalytique.
- Troisième étape de phosphorylation : Le mécanisme de type « ping-pong » fait intervenir une histidine qui après phosphorylation va transférer le groupement

phosphate vers le nucléoside diphosphate NDP pour donner le substrat triphosphate (Figure 18a). La nature du sucre va avoir une influence sur la réaction enzymatique. Ainsi, les 3'-désoxynucléotides auront une moins bonne prise en charge, car la chélation du OH en 3' avec l'ion magnésium favorise la cinétique de phosphorylation. Le second concerne les 2'-désoxynucléotides moins bien reconnus que les analogues riboses mais seulement d'un facteur 2-5.

Comme dit précédemment, la première phosphorylation reste l'étape la plus limitante et essayé de contourner ce problème a fait l'objet de plusieurs études.<sup>40</sup> Préparer des dérivés nucléosidiques monophosphates permettrait de contourner ce problème. Cependant, ceux-ci présentent une faible stabilité *in vivo* due à la déphosphorylation dans le système sanguin et sa nature chargée bloque le passage membranaire que ce soit par diffusion, ou *via* des transporteurs. Plusieurs approches de type prodrogue ont donc été proposées en masquant les groupements phosphates ou phosphonates. Ainsi, l'équipe de McGuigan et coll. s'est plus spécifiquement intéressé aux dérivés phosphoramidates comme prodrogues de nucléosides monophosphate, développant ainsi la technologie ProTide et étudiant de nombreux groupements alkyl/aryloxy-phosphoramidates...<sup>41,42</sup> Cette stratégie consiste en l'utilisation de « fonctions masquées » qui par diverses voies enzymatiques vont être hydrolysées pour libérer le principe actif. Le nucléoside 5'-phosphoramidate plus lipophile peut traverser, par voie passive, la membrane cellulaire, pour ensuite, donner l'analogue monophosphate correspondant après hydrolyse enzymatique (Figure 19).

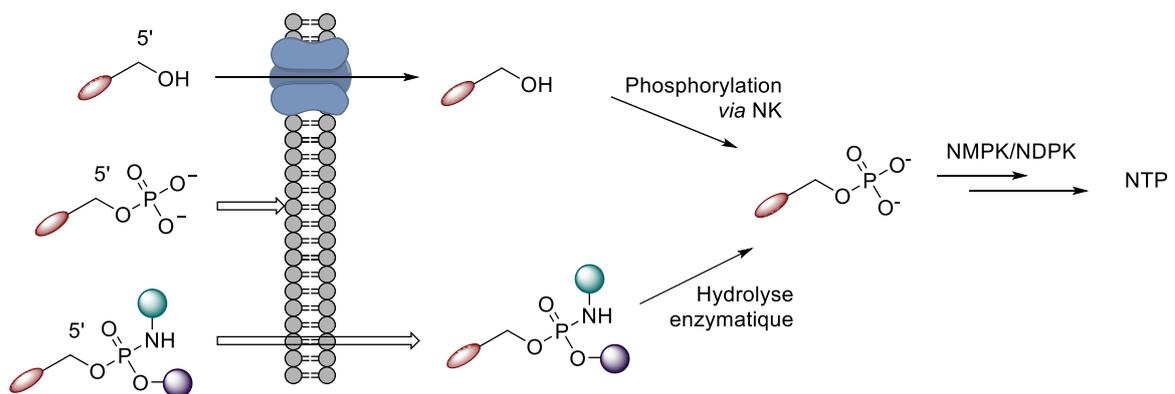


Figure 19 : Différentes voies de passage vers le milieu intracellulaire

Pour ces travaux de thèse, nous avons sélectionné le phosphoramidate comportant un phénol pour la partie aryle (magenta) et un ester d'acide aminé (turquoise), plus précisément une alanine sous forme d'ester. Dans le milieu cellulaire, une première étape d'hydrolyse de la

fonction ester conduit à l'acide carboxylique correspondant. Cette réaction peut être catalysée par la cathepsine A ou par la carboxylesterase 1 (a). La fonction carboxylate réagit sur le phosphoramidate pour libérer le motif phénol et par la même former un cycle à 5 chaînons (b). Puis de manière instantanée, une hydrolyse de cet intermédiaire libère le phosphoramidate chargé (c) qui sera à son tour hydrolysée *via* une phosphoramidase, la HINT1, pour donner le produit monophosphorylé. Ce dernier sera pris en charge par les différentes kinases pour obtenir le NTP correspondant. Des études structure-activités ont permis de montrer que chacun des composants de la prodrogue pouvait être modulable (motif aryle, acide aminé et l'ester), et avoir une influence sur la réactivité vis-à-vis des enzymes et des vitesses d'hydrolyse (Figure 20).

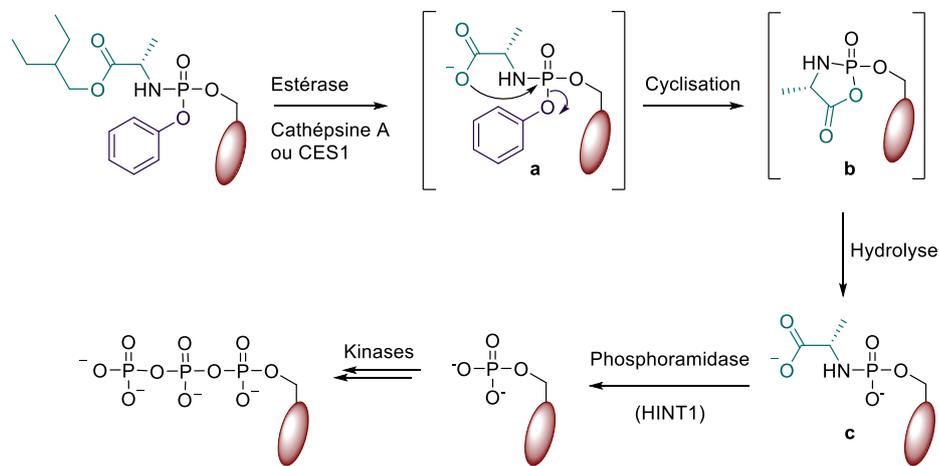


Figure 20 : Principe de la ProTide

### 3. Mode d'inhibition des polymérase *via* les nucléosides

Les nucléosides ou nucléotides modifiés vont mettre en place différents modes d'action afin d'inhiber les polymérase. On décrira ici trois modes d'action avec des cas concrets d'agents antiviraux : la mutagénèse, l'inhibition de chaîne à effet non-immédiat et l'inhibition à effet immédiat.

#### a. Mutagénèse

Au sein de ces agents antiviraux mutagène, se trouve certains analogues déjà utilisés contre des virus à ARN. La **Ribavirine** (RBV) comme le **Molnupiravir**.<sup>43</sup> La RBV est utilisée en combinaison avec d'autres principes actifs contre le SARS-CoV-2 (Figure 21a). Le mécanisme de ces derniers consiste à induire la polymérase en erreur, lors de l'étape de transcription celle-ci va incorporer des nucléotides en lieu et place d'autre, provoquant des mutations. Dans



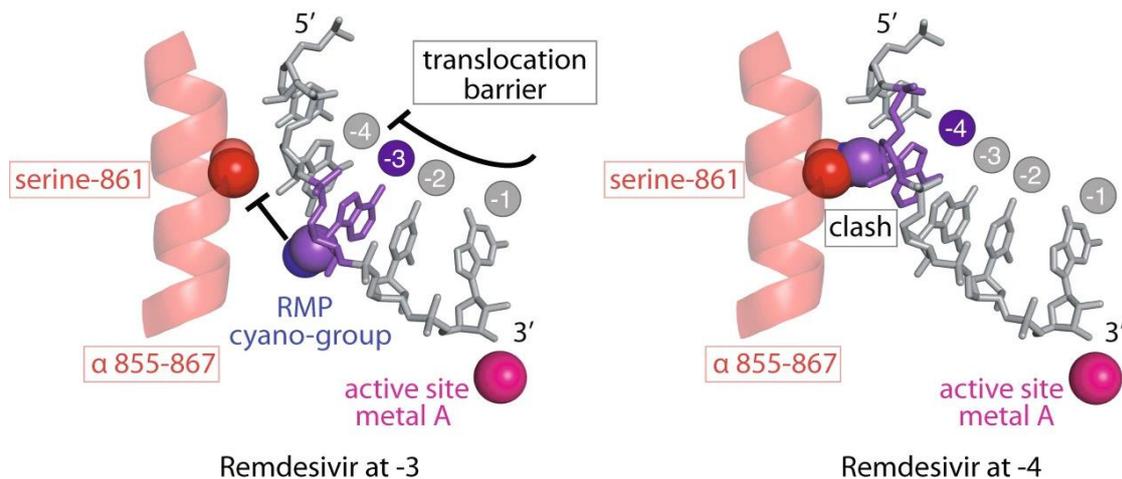


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition du remdesivir

c. Inhibition à effet immédiat et modification en position 3'<sup>47,48</sup>

Pour finir nous allons décrire le mécanisme d'inhibition de l'élongation de chaîne à effet immédiat (*obligate chain terminator*) qui constitue l'axe principal de cette thèse. Pour cela nous allons parler de la **Zidovudine** (ou AZT) qui est l'exemple de référence impliquant ce mécanisme d'inhibition des polymérases. En effet, l'AZT possède une fonction azide en lieu et place de la fonction 3'-hydroxyle, qui est reconnue par la TI sous sa forme l'AZT-TP et donc être incorporée dans le brin d'ADN en construction. Cependant, le groupement azide ne pouvant pas former de liaison phosphodiester 3'-5', la polymérisation est radicalement stoppée ce qui bloque la prolifération du virus (Figure 23).

Cependant, plusieurs inconvénients sont à souligner, tout d'abord le manque de reconnaissance vis-à-vis d'autres polymérase comme la RdRp, qui peut discriminer facilement les analogues 2'-desoxy. De plus, la présence d'une fonction 3'-hydroxyle permet une meilleure reconnaissance des NDPK favorisant la formation des nucléosides triphosphates.

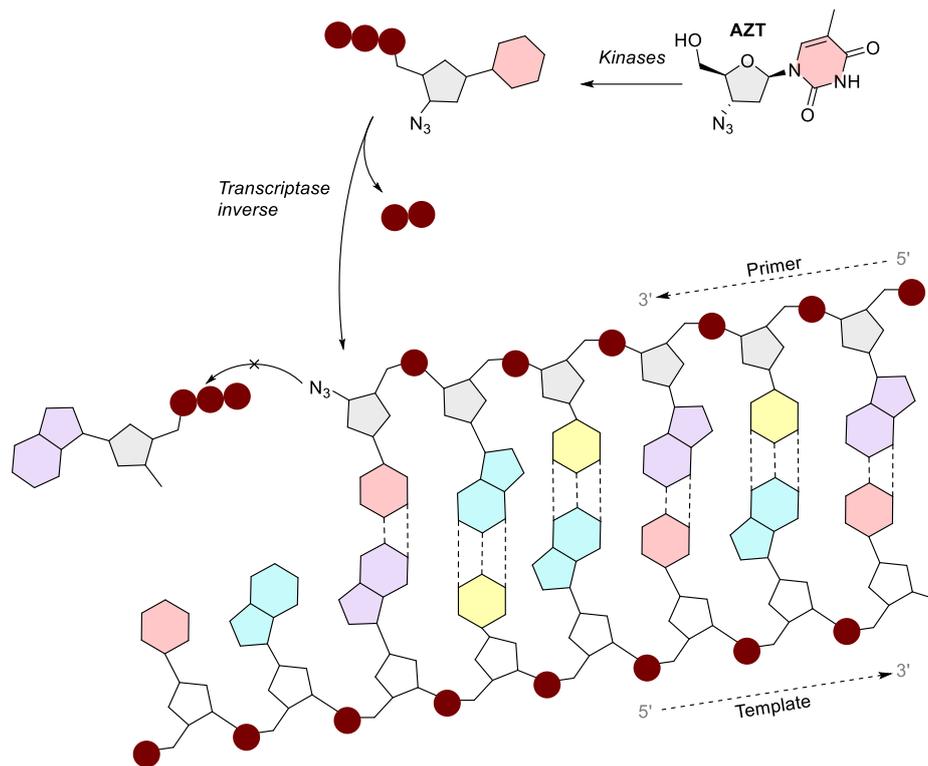


Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de l'AZT

De nombreux autres analogues de nucléosides terminateurs de chaîne immédiat (Figure 24) ont, bien sûr, été développés avec notamment des modifications de la partie osidique.<sup>34</sup> Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'**acyclovir** prescrit contre l'herpès simple 1 et 2 (HSV-1, HSV-2) qui à la différence de l'AZT est très bien reconnu par les kinases et l'acyclovir triphosphate est un bon substrat des polymérases faisant de lui un agent antiviral puissant. Cependant, il souffre d'un manque de solubilité dans les milieux physiologiques et d'une faible biodisponibilité. C'est pourquoi, des versions prodrogues ont été synthétisées, notamment la **valacyclovir** qui est la version 5' estérifiée avec une valine. Ainsi, sous cette forme son activité contre les virus de l'herpès est optimisée de même que sa biodisponibilité.<sup>49</sup> Une autre molécule acyclique est le **tenofovir** qui possède un groupement 5' phosphonate. Ce motif (à ne pas confondre avec le groupement phosphate) a été introduit afin de contourner la première étape de phosphorylation qui est très souvent limitante. Il permet aussi de ne pas être reconnu par les phosphatases qui clivent les liaisons phosphodiester après que l'analogue modifié soit inséré dans le primer. Le **tenofovir** quant à lui est actif contre le VIH-1 et les infections de l'hépatite B chronique.

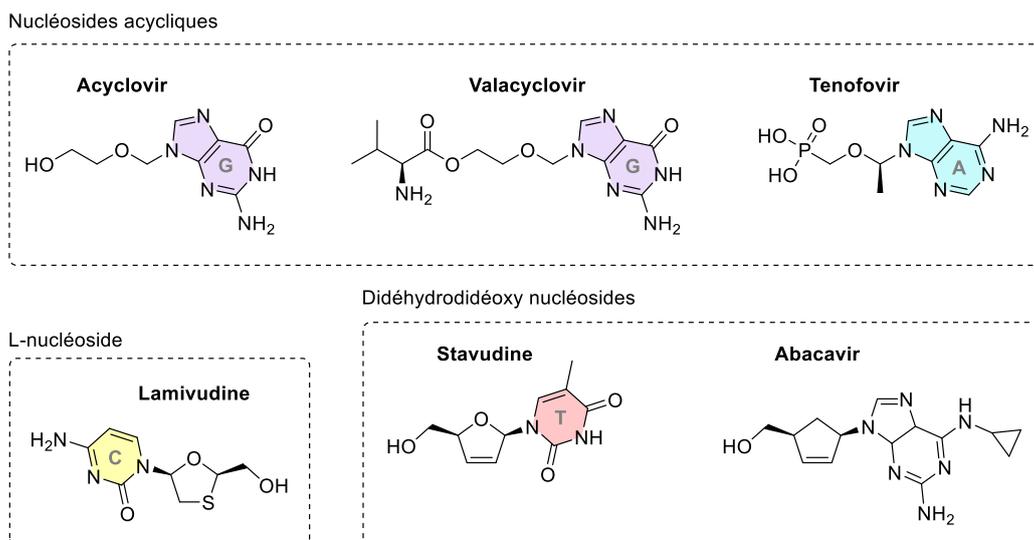


Figure 24 : Structures des agents antiviraux terminateurs de chaînes à effet immédiat

Bien que la très grande majorité des inhibiteurs soient de type D-nucléosides, il existe quelques exemples de L-nucléosides à activité antivirale comme le **lamivudine** (ou **3TC**). Elle est non seulement l'image dans un miroir d'un nucléoside naturel mais possède aussi un atome de soufre en position 3' et possède un mécanisme d'inhibition de chaîne à effet immédiat. Le **3TC** est actif contre le VIH-1 et VIH-2 ainsi que l'hépatite B.<sup>50</sup> Une autre classe d'agents antiviraux à effet immédiat est représentée par les analogues 2',3'-dideoxy tels que la **stavudine** (ou d4T) et l'**abacavir**. Concernant ce dernier, il possède la particularité d'avoir une structure cyclopentane au lieu du tétrahydrofurane et fait partie de la famille des carbo-nucléosides.

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (2) Ghosh, A.; Bansal, M. A Glossary of DNA Structures from A to Z. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2003**, *59* (Pt 4), 620–626. <https://doi.org/10.1107/s0907444903003251>.
- (3) Das, G.; Harikrishna, S.; Gore, K. R. Influence of Sugar Modifications on the Nucleoside Conformation and Oligonucleotide Stability: A Critical Review. *The Chemical Record* **2022**, *22* (12), e202200174. <https://doi.org/10.1002/tcr.202200174>.
- (4) Marquez, V. E.; Ezzitouni, A.; Russ, P.; Siddiqui, M. A.; Ford, Harry; Feldman, R. J.; Mitsuya, H.; George, C.; Barchi, J. J. HIV-1 Reverse Transcriptase Can Discriminate between

Two Conformationally Locked Carbocyclic AZT Triphosphate Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (12), 2780–2789. <https://doi.org/10.1021/ja973535+>.

(5) Marquez, V. E.; Ben-Kasus, T.; Barchi, Joseph J.; Green, K. M.; Nicklaus, M. C.; Agbaria, R. Experimental and Structural Evidence That Herpes 1 Kinase and Cellular DNA Polymerase(s) Discriminate on the Basis of Sugar Pucker. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (2), 543–549. <https://doi.org/10.1021/ja037929e>.

(6) Bernet, B. Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry. Von P. Deslongchamps. Pergamon Press, Oxford 1983. XI, 375 S., Paperback, £ 15.25. *Angewandte Chemie* **1984**, *96* (8), 626–626. <https://doi.org/10.1002/ange.19840960838>.

(7) Plavec, J.; Tong, W.; Chattopadhyaya, J. How Do the Gauche and Anomeric Effects Drive the Pseudorotational Equilibrium of the Pentofuranose Moiety of Nucleosides? *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (21), 9734–9746. <https://doi.org/10.1021/ja00074a046>.

(8) Obika, S.; Morio, K.; Nanbu, D.; Imanishi, T. Synthesis and Conformation of 3'-O,4'-C-Methylenerybonucleosides, Novel Bicyclic Nucleoside Analogues for 2',5'-Linked Oligonucleotide Modification. *Chemical Communications* **1997**, *0* (17), 1643–1644. <https://doi.org/10.1039/A704376G>.

(9) Erande, N.; Gunjal, A. D.; Fernandes, M.; Gonnade, R.; Kumar, V. A. Synthesis and Structural Studies of S-Type/N-Type-Locked/Frozen Nucleoside Analogues and Their Incorporation in RNA-Selective, Nuclease Resistant 2'–5' Linked Oligonucleotides. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (5), 746–757. <https://doi.org/10.1039/C2OB26762D>.

(10) Taylor, M. W. What Is a Virus? *Viruses and Man: A History of Interactions* **2014**, 23–40. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07758-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07758-1_2).

(11) Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U.; Schätzl, H. Viruses: Definition, Structure, Classification. *Molecular Virology* **2013**, 17–30. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_2).

(12) Louten, J. Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology* **2016**, 19–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>.

- (13) Louten, J. Virus Replication. *Essential Human Virology* **2016**, 49–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00004-1>.
- (14) Freed, E. O. HIV-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet* **2001**, 26 (1), 13–33. <https://doi.org/10.1023/A:1021070512287>.
- (15) Engelman, A.; Cherepanov, P. The Structural Biology of HIV-1: Mechanistic and Therapeutic Insights. *Nat Rev Microbiol* **2012**, 10 (4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>.
- (16) Hingrat, Q. L. Virus de l'immunodéficience humaine. *Biologie médicale*.
- (17) Singh, A. K.; Das, K. Insights into HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Inhibition and Drug Resistance from Thirty Years of Structural Studies. *Viruses* **2022**, 14 (5), 1027. <https://doi.org/10.3390/v14051027>.
- (18) Das, K.; Martinez, S. E.; Bauman, J. D.; Arnold, E. HIV-1 Reverse Transcriptase Complex with DNA and Nevirapine Reveals Nonnucleoside Inhibition Mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **2012**, 19 (2), 253–259. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2223>.
- (19) Sever, B.; Otsuka, M.; Fujita, M.; Ciftci, H. A Review of FDA-Approved Anti-HIV-1 Drugs, Anti-Gag Compounds, and Potential Strategies for HIV-1 Eradication. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, 25 (7), 3659. <https://doi.org/10.3390/ijms25073659>.
- (20) Mbhele, N.; Chimukangara, B.; Gordon, M. HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors: A Review of Current Drugs, Recent Advances and Drug Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2021**, 57 (5), 106343. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106343>.
- (21) Lei, S.; Chen, X.; Wu, J.; Duan, X.; Men, K. Small Molecules in the Treatment of COVID-19. *Sig Transduct Target Ther* **2022**, 7 (1), 1–39. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01249-8>.
- (22) V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **2021**, 19 (3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.

- (23) Harrison, A. G.; Lin, T.; Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology* **2020**, *41* (12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.
- (24) COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard. datadot. <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (accessed 2024-08-04).
- (25) Sarafianos, S. G.; Marchand, B.; Das, K.; Himmel, D. M.; Parniak, M. A.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *385* (3), 693–713. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.071>.
- (26) London, R. E. Structural Maturation of HIV-1 Reverse Transcriptase—A Metamorphic Solution to Genomic Instability. *Viruses* **2016**, *8* (10), 260. <https://doi.org/10.3390/v8100260>.
- (27) Larder, B. A.; Purifoy, D. J. M.; Powell, K. L.; Darby, G. Site-Specific Mutagenesis of AIDS Virus Reverse Transcriptase. *Nature* **1987**, *327* (6124), 716–717. <https://doi.org/10.1038/327716a0>.
- (28) Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. Structure of a Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance. *Science* **1998**, *282* (5394), 1669–1675. <https://doi.org/10.1126/science.282.5394.1669>.
- (29) Gao, Y.; Yan, L.; Huang, Y.; Liu, F.; Zhao, Y.; Cao, L.; Wang, T.; Sun, Q.; Ming, Z.; Zhang, L.; Ge, J.; Zheng, L.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zhu, Y.; Zhu, C.; Hu, T.; Hua, T.; Zhang, B.; Yang, X.; Li, J.; Yang, H.; Liu, Z.; Xu, W.; Guddat, L. W.; Wang, Q.; Lou, Z.; Rao, Z. Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from COVID-19 Virus. *Science* **2020**. <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>.
- (30) Hillen, H. S.; Kokic, G.; Farnung, L.; Dienemann, C.; Tegunov, D.; Cramer, P. Structure of Replicating SARS-CoV-2 Polymerase. *Nature* **2020**, *584* (7819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>.
- (31) Aranda, J.; Wieczór, M.; Terrazas, M.; Brun-Heath, I.; Orozco, M. Mechanism of Reaction of RNA-Dependent RNA Polymerase from SARS-CoV-2. *Chem Catal* **2022**, *2* (5), 1084–1099. <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.03.019>.

- (32) Pastuch-Gawołek, G.; Gillner, D.; Król, E.; Walczak, K.; Wandzik, I. Selected Nucleos(t)ide-Based Prescribed Drugs and Their Multi-Target Activity. *European Journal of Pharmacology* **2019**, *865*, 172747. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172747>.
- (33) Yates, M. K.; Seley-Radtke, K. L. The Evolution of Antiviral Nucleoside Analogues: A Review for Chemists and Non-Chemists. Part II: Complex Modifications to the Nucleoside Scaffold. *Antiviral Res* **2019**, *162*, 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.016>.
- (34) Seley-Radtke, K. L.; Yates, M. K. The Evolution of Nucleoside Analogue Antivirals: A Review for Chemists and Non-Chemists. Part 1: Early Structural Modifications to the Nucleoside Scaffold. *Antiviral Res* **2018**, *154*, 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004>.
- (35) Pastor-Anglada, M.; Pérez-Torras, S. Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00606>.
- (36) Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. Nucleoside Transporters: Molecular Biology and Implications for Therapeutic Development. *Molecular Medicine Today* **1999**, *5* (5), 216–224. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01459-8](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01459-8).
- (37) Deville-Bonne, D.; El Amri, C.; Meyer, P.; Chen, Y.; Agrofoglio, L. A.; Janin, J. Human and Viral Nucleoside/Nucleotide Kinases Involved in Antiviral Drug Activation: Structural and Catalytic Properties. *Antiviral Research* **2010**, *86* (1), 101–120. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.02.001>.
- (38) Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2211–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00734>.
- (39) Xu, Y.-W.; Moréra, S.; Janin, J.; Cherfils, J. AIF3 Mimics the Transition State of Protein Phosphorylation in the Crystal Structure of Nucleoside Diphosphate Kinase and MgADP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94* (8), 3579–3583. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3579>.
- (40) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (18), 9154–9218. <https://doi.org/10.1021/cr5002035>.

- (41) McGuigan, C.; Tollerfield, S. M.; Riley, P. A. Synthesis and Biological Evaluation of Some Phosphate Triester Derivatives of the Anti-Viral Drug AraA. *Nucleic Acids Res* **1989**, *17* (15), 6065–6075.
- (42) Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: A Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem* **2009**, *4* (11), 1779–1791. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900289>.
- (43) Kabinger, F.; Stiller, C.; Schmitzová, J.; Dienemann, C.; Kokic, G.; Hillen, H. S.; Höbartner, C.; Cramer, P. Mechanism of Molnupiravir-Induced SARS-CoV-2 Mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol* **2021**, *28* (9), 740–746. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00651-0>.
- (44) Bravo, J. P. K.; Dangerfield, T. L.; Taylor, D. W.; Johnson, K. A. Remdesivir Is a Delayed Translocation Inhibitor of SARS-CoV-2 Replication. *Mol Cell* **2021**, *81* (7), 1548-1552.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.035>.
- (45) Wang, J.; Reiss, K.; Shi, Y.; Lolis, E.; Lisi, G. P.; Batista, V. S. Mechanism of Inhibition of the Reproduction of SARS-CoV-2 and Ebola Viruses by Remdesivir. *Biochemistry* **2021**, *60* (24), 1869–1875. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00292>.
- (46) Kokic, G.; Hillen, H. S.; Tegunov, D.; Dienemann, C.; Seitz, F.; Schmitzova, J.; Farnung, L.; Siewert, A.; Höbartner, C.; Cramer, P. Mechanism of SARS-CoV-2 Polymerase Stalling by Remdesivir. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 279. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>.
- (47) De Clercq, E.; Neyts, J. Antiviral Agents Acting as DNA or RNA Chain Terminators. In *Antiviral Strategies*; Kräusslich, H.-G., Bartenschlager, R., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2009; pp 53–84. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0_3).
- (48) Kamzeeva, P. N.; Aralov, A. V.; Alferova, V. A.; Korshun, V. A. Recent Advances in Molecular Mechanisms of Nucleoside Antivirals. *Curr Issues Mol Biol* **2023**, *45* (8), 6851–6879. <https://doi.org/10.3390/cimb45080433>.
- (49) Perry, C. M.; Faulds, D. Valaciclovir. A Review of Its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in Herpesvirus Infections. *Drugs* **1996**, *52* (5), 754–772. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652050-00009>.

(50) Quercia, R.; Perno, C.-F.; Koteff, J.; Moore, K.; McCoig, C.; St. Clair, M.; Kuritzkes, D. Twenty-Five Years of Lamivudine: Current and Future Use for the Treatment of HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2018**, *78* (2), 125–135. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001660>.

**Titre :** Synthèse d'analogues nucléos(t)idiques originaux de type 3'-carboxamido et 3'-C-triazolo, potentiels agents antiviraux pour la lutte contre les virus (ré-)émergents à ARN.

**Mots clés :** Nucléosides, antiviraux, chimie click, amide, ProTide.

**Résumé :**

La crise sanitaire du COVID-19 a mis en évidence un manque de solutions thérapeutiques contre des virus (ré-)émergents à ARN. C'est de cette problématique qu'est né le projet GAVO, avec pour objectifs la synthèse d'une chimiothèque de nucléosides originaux et leur évaluation sur un panel de virus. Les dérivés de nucléos(t)ides ont, en effet, démontré leur efficacité en tant qu'agents antiviraux, comme la Zidovudine ou l'Acyclovir, inhibiteurs respectifs de la polymérase du VIH et de l'herpès. La modification de la position 3' des nucléosides induit un mécanisme d'inhibition unique, étudié depuis plus de 30 ans.

Peu d'exemples de la littérature décrivent l'insertion d'une liaison carbone-carbone en position 3' de nucléosides pour accéder à des analogues 3'-désoxy-nucléosides. Au cours de ces travaux de thèse, une chimiothèque d'analogues nucléosidiques modifiés en position 3' dans la série pyrimidine a été réalisée, comprenant notamment des composés de types 3'-C-triazole ou 3'-carboxamide, en utilisant la chimie click et le couplage peptidique. Les analogues 5'-O-phosphoramidates (ProTide) ont également été préparés afin d'augmenter la biodisponibilité des composés. Finalement les molécules ont pu être évaluées en tant que potentiels agents antiviraux ou anticancéreux.

**Title :** Synthesis of novel 3'-carboxamido and 3'-C-triazolo nucleos(t)ide analogs as potential antiviral agents against (re-)emerging RNA viruses.

**Keywords :** Nucleosides, antivirals, click chemistry, amide, ProTide.

**Abstract :** The COVID-19 health crisis has highlighted a lack of therapeutic solution regarding RNA viruses. The GAVO consortium emerged from this problematic, aiming to the synthesis of original antiviral nucleos(t)ides and their evaluation, on a panel of viruses. Indeed, nucleosides have proved their efficiency on HIV or HSV as polymerase inhibitors such as Zidovudine and Acyclovir respectively. The modification at the 3' position of nucleosides induces a unique inhibition mechanism studied along the past 30 years.

A few examples in the literature describe carbon-carbon bond insertion for the preparation of 3'-deoxy-nucleosides. During this PhD thesis, a chemical library was synthesized with 3'-modified pyrimidine nucleosides, included 3'-C-triazole and 3'-carboxamide derivatives using click chemistry and peptide coupling reaction. 5'-O-phosphoramidates, also known as ProTide technology, were prepared to enhance biodisponibility of those novel nucleosides. A wide range of candidates were tested as potential antiviral and antitumor agents.