



HAL
open science

Inhibiteurs bisubstrats de méthyltransférases virales

Rostom Ahmed-belkacem, J.J. Vasseur, Françoise Debart

► **To cite this version:**

Rostom Ahmed-belkacem, J.J. Vasseur, Françoise Debart. Inhibiteurs bisubstrats de méthyltransférases virales. *L'Actualité Chimique*, 2022. hal-03721682

HAL Id: hal-03721682

<https://hal.science/hal-03721682>

Submitted on 12 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Inhibiteurs bisubstrats de méthyltransférases virales

Résumé

Au cours des deux dernières décennies, les virus émergents comme les Flavivirus ou les Coronavirus ont causé d'importants dommages sanitaires et économiques. Le complexe de réplication / transcription virale contient des enzymes essentielles au développement du virus. D'autres enzymes comme les méthyltransférases sont impliquées dans la méthylation de la coiffe de l'ARN messager viral. Ces méthylations, sur les positions *N7* de la guanosine et *2'O* du premier nucléotide transcrit dans la coiffe, augmentent la stabilité de l'ARN messager viral dans la cellule tout en le protégeant face aux récepteurs cellulaires du système immunitaire inné, comme RIG-I, qui ont la capacité de reconnaître et entraîner l'élimination de cellules infectées. Leur rôle est donc primordial et une désactivation de ces méthyltransférases pourrait entraîner l'élimination du virus par stimulation du système immunitaire inné. Suivant cet objectif, les travaux de thèse reportés dans cet article concernent la synthèse et l'évaluation d'inhibiteurs de méthyltransférases virales. La conception de ces inhibiteurs repose sur une stratégie bisubstrat afin d'augmenter l'affinité et la spécificité de ces composés originaux.

Mots clés

Acides nucléiques, ARN, Bisubstrats, Inhibiteurs, Méthyltransférases, Nucléosides, SARS-CoV, SARS-CoV 2, Virus émergents.

Abstract

In the last two decades, emerging viruses such as Flavivirus or Coronavirus have caused significant health and economic damage. The viral replication/transcription complex contains enzymes that are essential for virus development. Other enzymes like methyltransferases are

involved in the methylation of the viral messenger RNA cap. These methylations, on the *N7* position of the guanosine and 2'*O* position of the first transcribed nucleotide in the cap, increase the stability of the viral messenger RNA in the cell while protecting it from the cellular receptors of the innate immune system, such as RIG-I, which have the capacity to recognize and cause the elimination of infected cells. Their role is therefore essential and a deactivation of these methyltransferases could lead to the elimination of the virus by stimulation of the innate immune system. Following this objective, the thesis work reported in this article concerns the synthesis and evaluation of viral methyltransferase inhibitors. The design of these inhibitors is based on a bisubstrate strategy to increase the affinity and specificity of these novel compounds.

Keywords

Nucleic acids, RNA, Bisubstrates, Inhibitors, Methyltransferases, Nucleosides, SARS-CoV, SARS-CoV 2, Emerging viruses

Les virus émergents, encore et toujours

Dengue, Zika, Ebola, Chikungunya, SARS-CoV, MERS-CoV et aujourd'hui SARS-CoV-2 : Quel sera le prochain virus émergent à l'origine d'une nouvelle pandémie et quels seront les dommages sanitaires et économiques mondiaux si les moyens de défense et de prévention ne sont pas exploités et mis en œuvre assez tôt pour contrer de telles infections ? Actuellement, aucun traitement antiviral médicamenteux approuvé et efficace n'existe contre ces virus à ARN.

Encadré 1

Les virus à ARN, parfois appelés ribovirus, sont des virus dont le matériel génétique est essentiellement constitué d'ARN. Dans la majeure partie des cas, l'ARN est monocaténaire, c'est-à-dire que l'acide nucléique est constitué d'un seul brin non apparié à une molécule complémentaire. Les virus à ARN monocaténaire peuvent être classés selon la polarité de leur brin (génomme dit de sens positif (+), négatif (-) ou ambisens).

Pour le SARS-CoV-2 à l'origine du Covid-19, de nombreuses entreprises pharmaceutiques ont tenté de repositionner, sans succès flagrant, certains de leurs anciens médicaments (comme le Remdesivir ou le Molnupiravir par exemple) initialement conçus pour cibler généralement les polymérases d'autres virus. C'est la raison qui a poussé la communauté scientifique ces dernières années à produire un effort important pour identifier de nouvelles cibles chez ces virus à ARN et trouver à terme un antiviral à action directe. Parmi ces cibles potentielles, les méthyltransférases (MTases), enzymes libérées par le virus lors de l'infection, jouent un rôle crucial en catalysant la méthylation de la coiffe de l'ARN messenger (ARNm) viral en utilisant comme donneur de méthyle un métabolite nucléosidique présent dans les cellules : la S- adénosyl-L-méthionine (SAM) (Figure 1) [1]. La coiffe, à l'extrémité 5' des ARNm, composée d'une guanosine raccordée au premier nucléotide transcrit par l'intermédiaire d'une liaison 5'-5' triphosphate, est essentielle pour leur traduction en protéines (synthèse des protéines par les ribosomes à partir de l'information génétique contenue dans l'ARNm). Chez le SARS-CoV, le MERS-CoV, le SARS-CoV-2, le virus de Dengue ou encore le virus Zika, les ARNm viraux sont principalement méthylés au niveau de l'atome d'azote en position N7 de la guanosine de la coiffe puis en position 2'O du premier nucléotide transcrit qui est une adénosine. Ces méthylations augmentent la stabilité de l'ARNm viral vis-à-vis des systèmes de dégradation enzymatiques cellulaires [2], améliorent le phénomène de traduction [3] et camouflent l'ARNm viral face au système immunitaire. Bloquer ces méthylations en utilisant des inhibiteurs de ces MTases pourrait être une stratégie adaptée pour l'identification de nouveaux antiviraux qui devraient affaiblir les capacités de répllication et de survie des virus et conduire à l'élimination des virus par stimulation du système immunitaire inné. Une meilleure connaissance de ces enzymes virales faciliterait la conception de médicaments antiviraux, à la veille de nouvelles épidémies.

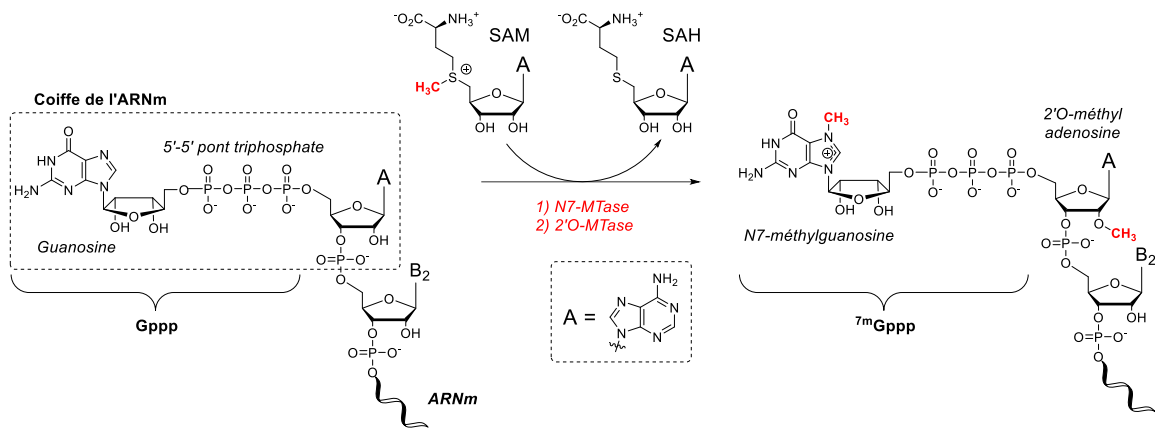


Figure 1 - Méthylations de la coiffe de l'ARNm viral. Chez l'Humain, les Coronavirus et les Flavivirus, la N7-méthylation précède la 2'O-méthylation.

La stratégie bisubstrat pour la conception de puissants inhibiteurs

Un des objectifs fondamentaux de cette recherche a été de développer des analogues de la SAM ayant une meilleure affinité avec la MTase que la SAM n'a avec la MTase dans le but d'inhiber l'enzyme. En d'autres termes, l'inhibiteur doit entrer en compétition avec la SAM dans la MTase virale (principe dit de l'inhibiteur compétitif). De tels inhibiteurs existent tels que la Sinefungin, ou encore de la S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) (Figure 1). Toutefois, ces deux nucléosides, bien qu'ayant été identifiés comme inhibiteurs de multiples MTases virales, affectent l'activité de MTases humaines, dont la N7-MTase humaine (hRNMT), les empêchant ainsi d'être considérés comme des candidats médicaments. Ce manque de sélectivité tient au fait que la plupart des MTases utilisent la SAM comme donneur universel de méthyle quel que soit leur substrat (protéines, acides nucléiques, etc..). Pour s'affranchir de ce problème de spécificité, nos travaux ont été focalisés sur la conception, la synthèse et l'évaluation de composés bisubstrats analogues de la SAM, mimes de l'état de transition de la 2'O-méthylation de l'ARNm par la SAM afin de cibler spécifiquement les 2'O-MTases. L'état de transition est la structure hautement énergétique où l'ARNm et la SAM sont logés dans la 2'O-MTase dans leurs sites de reconnaissance respectifs (Figure 2).

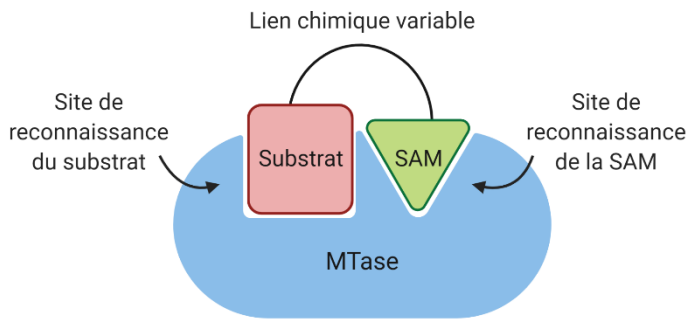


Figure 2 - Mode d'action des inhibiteurs bisubstrats

A ce stade de la catalyse enzymatique, la SAM et le substrat sont assez proches pour que le transfert du groupement méthyle ait lieu et la réaction évolue spontanément vers un état énergétique plus faible où le substrat méthylé est libéré de la MTase (Figure 3A) [4]. D'un point de vue structurel, les analogues bisubstrats construits ont été obtenus en liant de façon covalente un motif nucléosidique mimant la SAM (en vert) à la position 2'*O* d'un autre motif nucléosidique mimant l'ARNm (en bleu), plus précisément le premier nucléoside transcrit de la coiffe (Figure 3B). Le lien covalent entre ces deux nucléosides porte dans la plupart des cas un groupement méthylène mimant le groupement méthyle issu de la SAM. En modifiant la longueur du lien chimique internucléosidique, sa flexibilité ou en y insérant d'autres motifs chimiques, on peut ainsi créer une librairie d'analogues bisubstrats. Ces composés, de par leur structure, sont théoriquement conçus pour interagir de façon spécifique avec la MTase étudiée car ils n'ont pas la configuration requise pour interagir avec d'autres MTases [5]

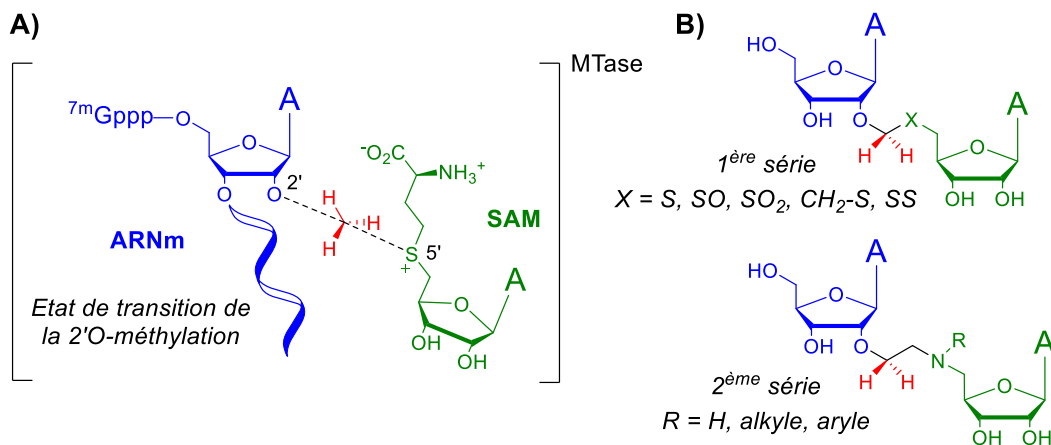


Figure 3 - A) Etat de transition de la 2'*O*-méthylation de l'ARNm par la SAM. B) Dinucléosides potentiels inhibiteurs de 2'*O*-MTases, mimes de l'état de transition de la 2'*O*-méthylation

Cette stratégie bisubstrat devrait ainsi permettre de contourner le problème de spécificité des inhibiteurs mono-substrats (Sinefungin, SAH, etc...). En effet, en comparaison d'un ligand monosubstrat qui ne cible qu'un seul site de reconnaissance de la protéine, les analogues bisubstrats visent deux sites à la fois (dont un spécifique du substrat) et induisent ainsi à une augmentation de la sélectivité [6]. A noter que l'effet catalytique d'une enzyme découle, en partie, du fait qu'il existe de multiples interactions entre les substrats et la protéine. Les contributions de l'ensemble de ces interactions entraînent ainsi une diminution de l'énergie d'activation de la réaction. Une autre conséquence de la stratégie bisubstrat est l'augmentation de l'affinité par réduction de l'entropie. En effet, lors du processus biochimique de méthylation, le système implique trois entités : la MTase, le substrat et la SAM. D'un point de vue thermodynamique, ce système ternaire doit ainsi dépenser de l'énergie pour amener l'ARNm et la SAM dans la configuration requise pour qu'il y ait transfert du groupement méthyle. Ce coût entropique est réduit lors d'une interaction mettant en jeu un système binaire composé de la MTase et du bisubstrat. Dans ce cas où le ligand et la SAM sont préorganisés grâce au lien chimique qui les unit, le système est binaire et doit donc dépenser moins d'énergie.

Dans les Flavivirus et les SARS-CoVs, le premier nucléotide transcrit de l'ARNm est une adénosine et la SAM est un analogue de l'adénosine. L'objectif premier de ces travaux de thèse a donc été de concevoir des inhibiteurs bisubstrats de 2'*O*-MTases virales, sous forme de dinucléosides d'adénine. Dans ces bisubstrats, les deux adénosines sont reliées entre la position 2' du nucléoside mime du premier nucléoside transcrit de l'ARNm et la position 5' de l'autre nucléoside mime de la SAM par un lien internucléosidique dont la composition chimique a été variée. Deux séries de dinucléosides d'adénine ont été obtenues : une première série incluant comme dans la SAM, au moins un atome de soufre dans le lien internucléosidique (Figure 3, 1^{ère} série) [7] et une deuxième série incluant un atome d'azote à la place de l'atome de soufre

de la SAM (Figure 3, 2^{ème} série) [8]. Les substitutions sur l'atome d'azote ont été variées pour tenter d'augmenter l'affinité avec les résidus des protéines virales. Avec de tels bisubstrats, on pouvait penser raisonnablement que l'adénosine représentée en bleu dans la Figure 3 irait se loger dans le site de fixation de l'ARNm dans la 2'*O*-MTase tandis que l'adénosine représentée en vert irait se loger dans le site de fixation de la SAM. En fait, il n'en a rien été et ce travail a réservé de nombreuses surprises.

Les activités inhibitrices des dinucléosides ont été évaluées à Marseille, au laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB) dans l'équipe du Dr. Etienne Decroly. Ces expériences ont été réalisées sur les 2'*O*-MTases du virus Zika (NS5-ZIKV), du virus de la Dengue (NS5-DENV) [9], de la Vaccinie (VP39) [10] et du SARS-CoV (nsp10/nsp16), le coronavirus à l'origine de l'épidémie de 2002 – 2004 [11]. Pour mesurer l'efficacité des dinucléosides, le taux de méthylation en position 2'*O* d'un court ARN viral *N7*-méthylé a été étudié en présence de concentrations décroissantes de chacun de ces dinucléosides. Pour chaque inhibiteur, on détermine alors la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀), c'est à dire la concentration en dinucléoside nécessaire pour inhiber 50% de l'activité 2'*O*-méthylation de l'ARNm. On considère empiriquement que vis-à-vis de ces MTases virales, une valeur d'IC₅₀ à l'échelle du micromolaire est un résultat satisfaisant et qu'une valeur à l'échelle du nanomolaire est un résultat recherché et très apprécié (la Sinefungin en comparaison a des IC₅₀ vis-à-vis de 2'*O*-MTases de l'ordre de 10-100 nM). De façon surprenante, les résultats se sont avérés décevants car aucun des dinucléosides synthétisés n'a montré d'inhibition des 2'*O*-MTases virales et ce même à des concentrations de 50 µM.

L'inhibition inattendue de la *N7*-MTase du SARS-CoV

Pour déterminer la sélectivité d'action des dinucléosides vis-à-vis de 2'*O*-MTases, des expériences ont été menées en parallèle avec des *N7*-MTases, enzymes qui méthylent la position *N7* de la guanosine dans la coiffe de l'ARNm. De façon très inattendue, une enzyme de cette

famille a été inhibée. Ainsi, un des *N*-dinucléosides portant un motif 4-nitrobenzenesulfonamide sur le lien internucléosidique (composé **1**, Figure 4) qui n'avait montré aucune activité sur une 2'*O*-MTase virale inhibe de façon spécifique la *N7*-MTase nsp14 du SARS-CoV avec une IC₅₀ de 3.0 μM. Ce résultat a été obtenu en 2019, à l'aube de l'épidémie engendrée par le SARS-CoV-2, ce qui explique le choix des MTases du SARS-CoV. Toutefois, l'étude menée avec les MTases de ce coronavirus n'est pas dénuée d'intérêt puisque la *N7*-MTase nsp14 de SARS-CoV présente une grande analogie structurale avec celle du SARS-CoV-2 (similarité de 95% entre les protéines nsp14 du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 [12]). Afin d'améliorer l'IC₅₀ de 3.0 μM obtenu avec le dinucléoside **1**, les substituants du motif arylsulfonamide ont été variés pour conduire à 16 nouveaux dinucléosides parmi lesquels le composé **2** avec le motif 4-chloro-3-nitrobenzenesulfonamide inhibe SARS-CoV nsp14 avec un IC₅₀ de 0.6 μM. Ce composé montre également un fort indice de sélectivité (SI) puisqu'il est 412 fois plus actif sur la MTase virale que sur la *N7*-MTase humaine hRNMT (SI = IC₅₀ hRNMT / IC₅₀ SARS-CoV nsp14). En comparaison, la Sinefugin inhibe mieux hRNMT que SARS-CoV nsp14. Cette étude a également permis de montrer l'importance du motif arylsulfonamide et du groupement nitro en position *meta*. Des composés contrôles, exempts de ces motifs, ont en effet montré des inhibitions plus faibles.

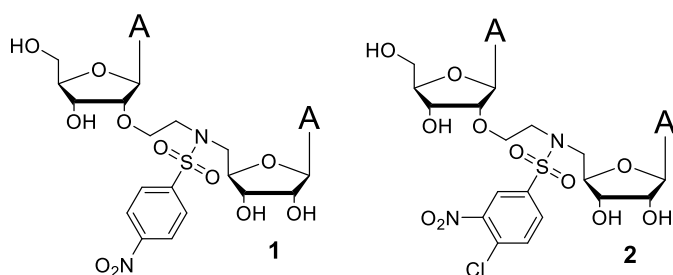


Figure 4 - Inhibiteurs dinucléosidiques de SARS-CoV nsp14 (**1** – **2**)

La modélisation moléculaire au service du chimiste organicien

A ce stade, il paraissait important de comprendre comment des composés « imaginés » pour être des inhibiteurs de 2'*O*-MTases ne l'étaient pas et par contre, pourquoi ils étaient des

inhibiteurs d'une *N7*-MTase virale. Pour répondre à la deuxième question, nous avons eu recours à la technique d'amarrage moléculaire (souvent appelé « docking moléculaire»). Le docking moléculaire est une méthode empirique informatique qui permet de prédire la conformation la plus favorable que va adopter un ligand dans une protéine, ainsi que son affinité. En amont de la synthèse chimique, cet outil, très utilisé par les équipes de recherches impliquées dans la découverte de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, permet d'évaluer rapidement une librairie de molécules et d'identifier les plus prometteuses. Le docking permet d'émettre des hypothèses quant à l'efficacité d'un ligand par rapport à un autre (relations structure-activité). Cet outil de modélisation moléculaire permet enfin d'explorer les différentes régions de la protéine qui sont à proximité du ligand et ainsi essayer d'optimiser celui-ci par l'ajout d'atomes ou groupements d'atomes susceptibles de créer des interactions favorables avec les acides aminés de ces poches de proximité [13]. Le docking ne doit cependant être utilisé qu'à des fins prédictives/explicatives et ne rend pas compte à 100% de la réalité [14]. La caractérisation par rayons X d'une protéine cristallisée en présence d'un ligand est une technique plus robuste pour comprendre comment le ligand s'amarre dans la protéine mais implique des manipulations beaucoup plus contraignantes que le docking. La structure cristalline référencée dans la base de données PDB de SARS-CoV nsp14 co-cristallisée avec la SAM a été utilisée comme modèle de cette étude (PDB ID : 5C8T) du composé **2** dans la MTase. Les résultats montrent que le dinucléoside **2** s'adapte aux sites de fixation de la SAM et de la coiffe de l'ARNm. Toutefois, ce n'est pas le nucléoside 2'*O* substitué qui est impliqué mais le motif arylsulfonamide du lien internucléosidique qui interfère avec le cycle aromatique de l'acide aminé F426 (F = phénylalanine) de la protéine nsp14 par une interaction de π - π stacking. Durant le processus naturel de méthylation en *N7* dans nsp14, F426 effectue une interaction similaire avec le motif guanosine de la coiffe de l'ARNm viral [15]. Cet acide aminé F426 est même crucial pour la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm viral [16] et se retrouve par ailleurs conservé dans nsp14 de SARS-CoV-2. En plus de cette interaction de π - π stacking,

deux liaisons hydrogènes se forment entre les deux oxygènes du groupement nitro (NO_2) en position *meta* et deux atomes d'hydrogène en bout de la chaîne latérale du résidu R310 (R = arginine), acide aminé qui interagit avec le pont 5'5'-triphosphate dans la structure coiffe durant le processus de méthylation naturelle. Une autre liaison hydrogène se forme entre un des atomes d'oxygène du groupement nitro (NO_2) porté par le résidu arylsulfonamide et l'atome d'hydrogène de la chaîne latérale du résidu N386 (N = asparagine). Enfin, une liaison halogène a lieu entre l'atome de chlore en position *para* et le résidu N386. De fait, le motif arylsulfonamide se substitue à la guanosine de la coiffe dans le site de reconnaissance de la coiffe par la *N7*-MTase virale et ces composés peuvent être alors considérés comme des analogues bisubstrats de la *N7*-MTase SARS-CoV nsp14.

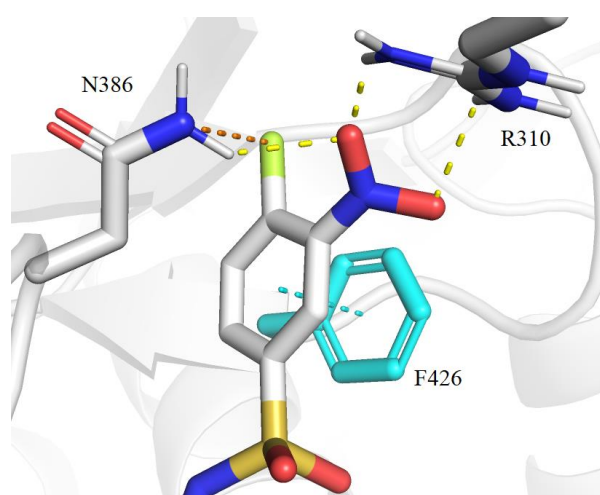


Figure 5 - Interactions de la chaîne latérale du dinucléoside **2** avec la protéine nsp14 déterminées par docking moléculaire : (en cyan) Interaction π - π stacking et F426. (En jaune) Liaisons hydrogènes. (En orange) Liaison halogène. Seul le motif arylsulfonamide de **2** a été représenté pour plus de clarté.

Inhiber l'infection virale SARS-CoVs en cellules

A la fin du travail de thèse, de nouveaux composés analogues de la SAM, portant un motif arylsulfonamide et dans lesquels l'adénosine en 2' a été enlevée ont été synthétisés et testés. En conséquence, la masse molaire de ces composés a été diminuée par rapport aux dinucléosides initiaux et leur lipophilie s'en est trouvée augmentée. Ces critères masse et lipophilie sont

importants à considérer pour une pénétration cellulaire efficace. De plus, l'inhibition enzymatique n'a pas été fortement impactée par la suppression de l'adénosine en 2' et donc la réduction de taille. Les résultats d'inhibition *in vitro* sur ces premiers analogues d'une nouvelle série ont semblé prometteurs pour envisager la continuation du projet qui a été financé en 2021 par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CO14-0004, projet MetInCoV). La synthèse et l'évaluation de 50 nouveaux composés nucléosidiques *in vitro* (Dr. E. Decroly) et en cellules infectées par SARS-CoV-2 (Pr. Bruno Coutard, Unité des Virus Emergents, Université Aix-Marseille) ayant été effectuées après le contrat doctoral, ces travaux en cours de publication [17] ne seront pas plus détaillés ici mais constituent un point de départ pour l'identification de nouveaux candidats médicaments contre les infections liées aux SARS-CoVs.

Corriger l'absence d'inhibition de 2'O-MTases virales

Cette étude a permis de montrer pourquoi les dinucléosides étaient des inhibiteurs d'une N7-MTase virale. Restait à comprendre pourquoi ils n'étaient pas des inhibiteurs de 2'O-MTases. L'explication la plus plausible est que ce résultat « négatif » résulterait d'une erreur d'appréciation : celle de considérer que l'adénosine de ces dinucléosides soit suffisante pour mimer l'extrémité 5' de l'ARNm. En effet, les 2'O-MTases sont des enzymes coiffe-dépendantes. Ainsi la protéine NS5 du virus Zika ou de la Dengue ne reconnaît que des ARNm 5'O-triphosphate (5'ppp-ARNm) ou des ARNm 5'-coiffés (5'Gppp-ARNm) [18]. Les 2'O-MTases nsp16 du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 ne reconnaissent quant à elles que des ARNm avec une coiffe N7-méthylée (5'^{7m}Gppp-ARNm) [19]. L'adénosine seule serait alors une molécule trop simple pour rivaliser avec la coiffe (^{7m}GpppA) dans le site de fixation de l'ARNm aux 2'O-MTases. Afin de vérifier cette hypothèse, de courts oligoribonucléotides (ORNs) portant un dinucléoside modifié dans leur coiffe en guise de nucléotide 5'-terminal de l'ARNm ont été synthétisés par voie chimique [20]. Ainsi, le dinucléoside situé à l'extrémité 5' de l'ORN dont la séquence correspond à la séquence de l'ARNm viral permet de mieux respecter l'état

de transition de la 2'*O*-méthylation de l'ARNm par la SAM. Pour clarifier, les 6 premiers nucléotides de la séquence de l'ARNm des virus Dengue/Zika sont 5'-AGUUGU-3' et ceux de l'ARNm de SARS-CoV-2 sont 5'-AUUAAA-3'. Dans ces ORNs synthétiques, le 1^{er} nucléotide transcrit de l'ARNm qui est naturellement une adénosine a donc été remplacé par un dinucléoside, où le lien chimique, séparant les deux adénosines, a été varié (Figure 6).

Encadré 2

La synthèse d'ORN sur support solide avec un synthétiseur automatique s'effectue en utilisant des blocs de construction constitués de nucléosides présentant une fonction phosphoramidite qui permet le couplage des nucléosides entre eux. L'assemblage se fait à partir d'un premier nucléoside fixé à un support solide grâce à un lien succinyle attaché sur le 3'OH du ribose. L'élongation de l'ORN s'effectue donc de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' (contrairement à la biosynthèse d'ARN qui se fait de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3') et suit un cycle de quatre étapes (Détritylation, Condensation, Capping, Oxydation) qui se répète suivant le nombre d'incorporations de nucléosides que demande la séquence de l'ORN. C'est lors de l'étape de condensation que le nucléoside du support solide réagit via son 5'OH sur la fonction phosphoramidite située en position 3' d'un autre nucléoside, conduisant à l'élongation de l'ORN. En fin d'élongation, un traitement basique à l'ammoniaque est appliqué pour obtenir l'ORN exempt de toutes protections et coupé de son support.

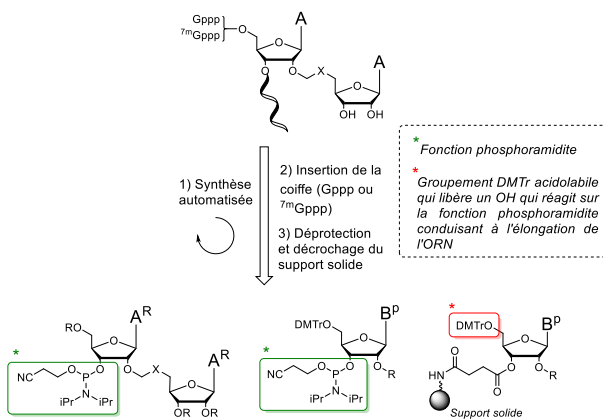


Figure 6 – (A gauche) Analyse rétrosynthétique des oligoribonucléotides ARNm/SAM à partir de monomères phosphoramidites. (A droite) Synthétiseur automatique d'oligonucléotide, modèle MerMade 6 BioAutomation.

Certains ORNs construits sur la séquence ARNm du virus de la Dengue se sont avérés être de bons inhibiteurs de la protéine NS5, avec des IC_{50} de l'ordre de la centaine de nanomolaire. Ces mêmes ORNs inhibent d'ailleurs, avec le même ordre de grandeur, la protéine NS5 du virus Zika, ce qui s'explique en partie par l'homologie de séquence génomique entre ces deux Flavivirus. Les ORNs de séquence du SARS-CoV-2 se sont montrés être de bons inhibiteurs du complexe protéique nsp10/nsp16 (activité 2'*O*-MTase) du SARS-CoV-2 avec des IC_{50} de l'ordre de la centaine de nanomolaire également. Des ORNs contrôles non coiffés (5'*OH*) n'ont par ailleurs montré aucune inhibition de ces 2'*O*-MTases, ce qui corrobore l'importance de la structure coiffe sur les ARNm dans l'action de ces MTases.

Cette voie d'inhibition des 2'*O*-MTases est prometteuse. La spécificité de reconnaissance de la protéine ciblée est assurée par la séquence de l'ORN spécifique de chaque virus. A l'heure actuelle, le projet est de mesurer l'inhibition de l'infection virale SARS-CoV-2 et Dengue/Zika dans des cellules. La stratégie se heurte toutefois aux inconvénients rencontrés avec les oligonucléotides dans des applications thérapeutiques que sont leur dégradation dans les fluides biologiques et leur faible pénétration cellulaire. Pour pallier ces inconvénients, la stratégie privilégiée consiste à complexer ces ORNs avec des peptides vecteurs, entraînant la formation de nanoparticules capables de traverser les membranes cellulaires. Ces travaux en cours sont effectués en collaboration avec l'équipe du Dr. Prisca Boisguerin du laboratoire PhyMedExp de Montpellier. Les tests d'inhibition virale en cellules seront faits par l'équipe du Pr. Bruno Coutard dans l'Unité des Virus Emergents à Marseille.

Si les vaccins représentent une façon préventive de combattre les pandémies, le taux de mutation élevé des virus entraîne l'apparition de variants et la constante remise en question de l'efficacité de vaccins construits sur une version précédente du virus. De fait, il est encore

aujourd'hui important de mettre au point des médicaments antiviraux à action directe. En effet, de tels médicaments ciblent un mécanisme de réplication virale conservé entre plusieurs souches. Dans le cas présent, des nucléosides et dinucléosides, conçus pour cibler SARS-CoV nsp14 ont inhibé dans le même ordre de grandeur SARS-CoV-2 nsp14 [17]. La connaissance intime des virus, y compris ceux dont les épidémies se sont éteintes, reste un sujet d'étude fondamental dans la lutte antivirale. Il paraît indispensable de financer de telles recherches afin d'anticiper de nouvelles crises sanitaires liées aux virus émergents.

- [1] Bouvet, M.; Ferron, F.; Imbert, I.; Gluais, L.; Selisko, B.; Coutard, B.; Canard, B.; Decroly, E. Stratégies de formation de la structure coiffe chez les virus à ARN. *MS Médecine Sci.* **2012**, *28* (4), 423-429.
- [2] Furuichi, Y.; Shatkin, A. J. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virus Res.* **2000**, *55*, 135-184.
- [3] Lewis, J. D.; Izaure, E. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247* (2), 461-469.
- [4] Schramm, V. L. Enzymatic transition states, transition-state analogs, dynamics, thermodynamics, and lifetimes. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 703-732.
- [5] Ahmed-Belkacem, R.; Vasseur, J.-J.; Debart, F., Bisubstrate strategies to target methyltransferases. *Eur. J. Org. Chem.*, **2022**, e202101481.
- [6] Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 23-34.
- [7] Ahmed-Belkacem, R.; Sutto-Ortiz, P.; Decroly, E.; Vasseur, J.-J.; Debart, F., Synthesis of adenine dinucleosides 2',5'-bridged by sulfur-containing linkers as bisubstrate SAM analogues for viral RNA 2'-O-methyltransferases. *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**, 6486-6495.
- [8] Ahmed-Belkacem, R.; Sutto-Ortiz, P.; Guiraud, M.; Canard, B.; Vasseur, J.-J.; Decroly, E.; Debart, F., Synthesis of adenine dinucleosides SAM analogs as specific inhibitors of SARS-CoV nsp14 RNA cap guanine-N7-methyltransferase. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112557.
- [9] Egloff, M.-P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J.-L.; Canard, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* **2002**, *21* (11), 2757-2768.
- [10] Hodel, A. E.; Gershon, P. D.; Shi, X.; Quijcho, F. A. The 1.85 Å structure of vaccinia protein VP39: a bifunctional enzyme that participates in the modification of both mRNA ends. *Cell* **1996**, *85* (2), 247-256.
- [11] Ziebuhr, J. *Advances in Virus Research - Coronaviruses*; Elsevier: Institute of Medical Virology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, **2016**; Vol. 96, 1, 97-101.
- [12] Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; Bi, Y.; Ma, X.; Zhan, F.; Wang, L.; Hu, T.; Zhou, H.; Hu, Z.; Zhou, W.; Zhao, L.; Chen, J.; Meng, Y.; Wang, J.; Lin, Y.; Yuan, J.; Xie, Z.; Ma, J.; Liu, W. J.; Wang, D.; Xu, W.; Holmes, E. C.; Gao, G. F.; Wu, G.; Chen, W.; Shi, W.; Tan, W., Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* **2020**, *395*, 565-574.
- [13] Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, *7* (2), 146-157.

- [14] Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65* (1), 15-26.
- [15] Ma, Y.; Wu, L.; Shaw, N.; Gao, Y.; Wang, J.; Sun, Y.; Lou, Z.; Yan, L.; Zhang, R.; Rao, Z. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (30), 9436-9441.
- [16] Ogando, N. S.; El Kazzi, P.; Zevenhoven-Dobbe, J. C.; Bontes, B. W.; Decombe, A.; Posthuma, C. C.; Thiel, V.; Canard, B.; Ferron, F.; Decroly, E.; Snijder, E. J. Structure–function analysis of the nsp14 N7–guanine methyltransferase reveals an essential role in Betacoronavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* (49), e2108709118.
- [17] Ahmed-Belkacem, R.; Hausdorff, M.; Delpal, A.; Sutto-Ortiz, P.; Colmant M. G., A.; Touret, F.; Ogando S., N.; Snijder J., E.; Canard, B.; Vasseur, J.-J.; Coutard, B.; Decroly, E.; Debart, F., Potent inhibition of SARS-CoV-2 cap N7-methyltransferase nsp14 by sulfonamide-based bisubstrates. *J. Med. Chem.* **2022**, *manuscript under revision* (jm-2022-00120f).
- [18] Coutard, B.; Barral, K.; Lichière, J.; Selisko, B.; Martin, B.; Aouadi, W.; Lombardia, M. O.; Debart, F.; Vasseur, J.-J.; Guillemot, J. C.; Canard, B.; Decroly, E. Zika virus methyltransferase: structure and functions for drug design perspectives. *J. Virol.* **2017**, *91* (5), e02202-16.
- [19] Decroly, E.; Imbert, I.; Coutard, B.; Bouvet, M.; Selisko, B.; Alvarez, K.; Gorbalenya, A. E.; Snijder, E. J.; Canard, B. Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2′O)-methyltransferase activity. *J. Virol.* **2008**, *82* (16), 8071-8084.
- [20] Broom, A. D.; Amarnath, V. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chem. Rev.* **1977**, *77* (2), 183 - 217.

Rostom AHMED-BELKACEM*, **Jean-Jacques VASSEUR^a**, directeur de recherche CNRS et **Françoise DEBART^a**, directrice de recherche CNRS.

^aInstitut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier.

Rostom AHMED-BELKACEM a reçu le prix de thèse 2021 de la SCF Section Occitanie Méditerranée. Ses travaux ont été réalisés dans l'équipe ChemBioNAC au sein de l'IBMM, sous la direction de Françoise DEBART et Jean-Jacques VASSEUR.

*rostom38240@gmail.com