



HAL
open science

Identification d'analogues d'adénosine, inhibiteurs de l'activité méthyltransférase du SARS-CoV-2

Adrien Delpal, Marcel Hausdorff, Sarah Barelier, Jean-Jacques Vasseur, Bruno Canard, Étienne Decroly, Françoise Debart

► To cite this version:

Adrien Delpal, Marcel Hausdorff, Sarah Barelier, Jean-Jacques Vasseur, Bruno Canard, et al.. Identification d'analogues d'adénosine, inhibiteurs de l'activité méthyltransférase du SARS-CoV-2. Journées Francophones de Virologie, Apr 2023, Paris, France. <hal-04740528>

HAL Id: hal-04740528

<https://hal.science/hal-04740528v1>

Submitted on 16 Oct 2024

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.

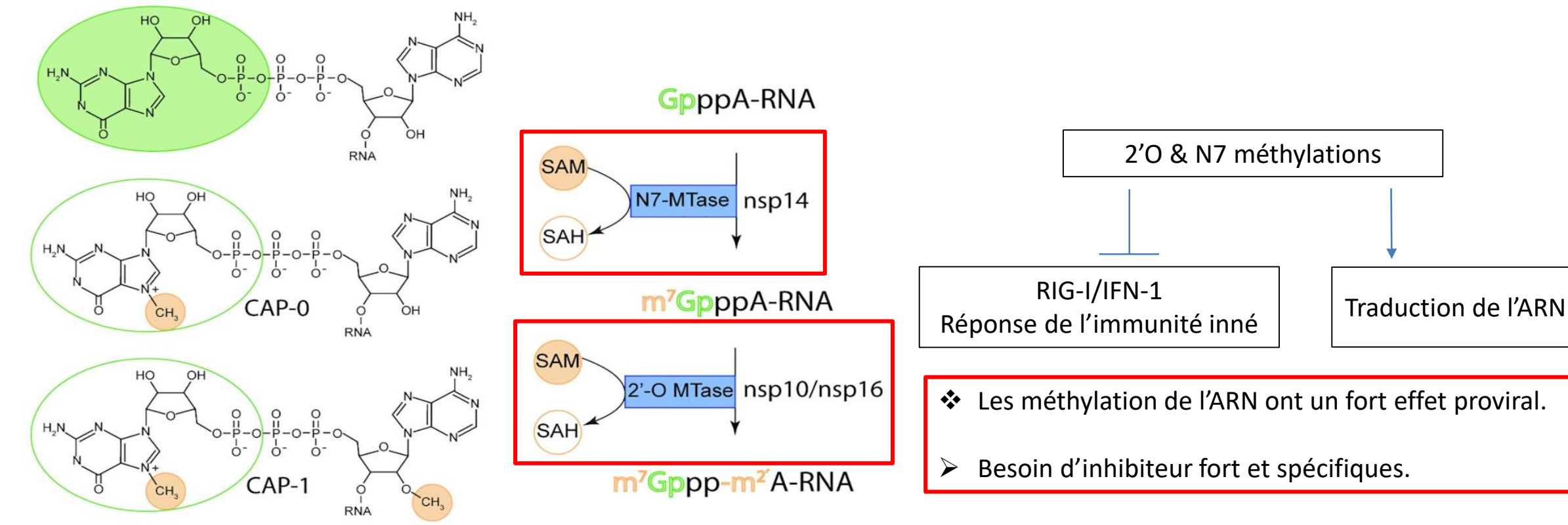
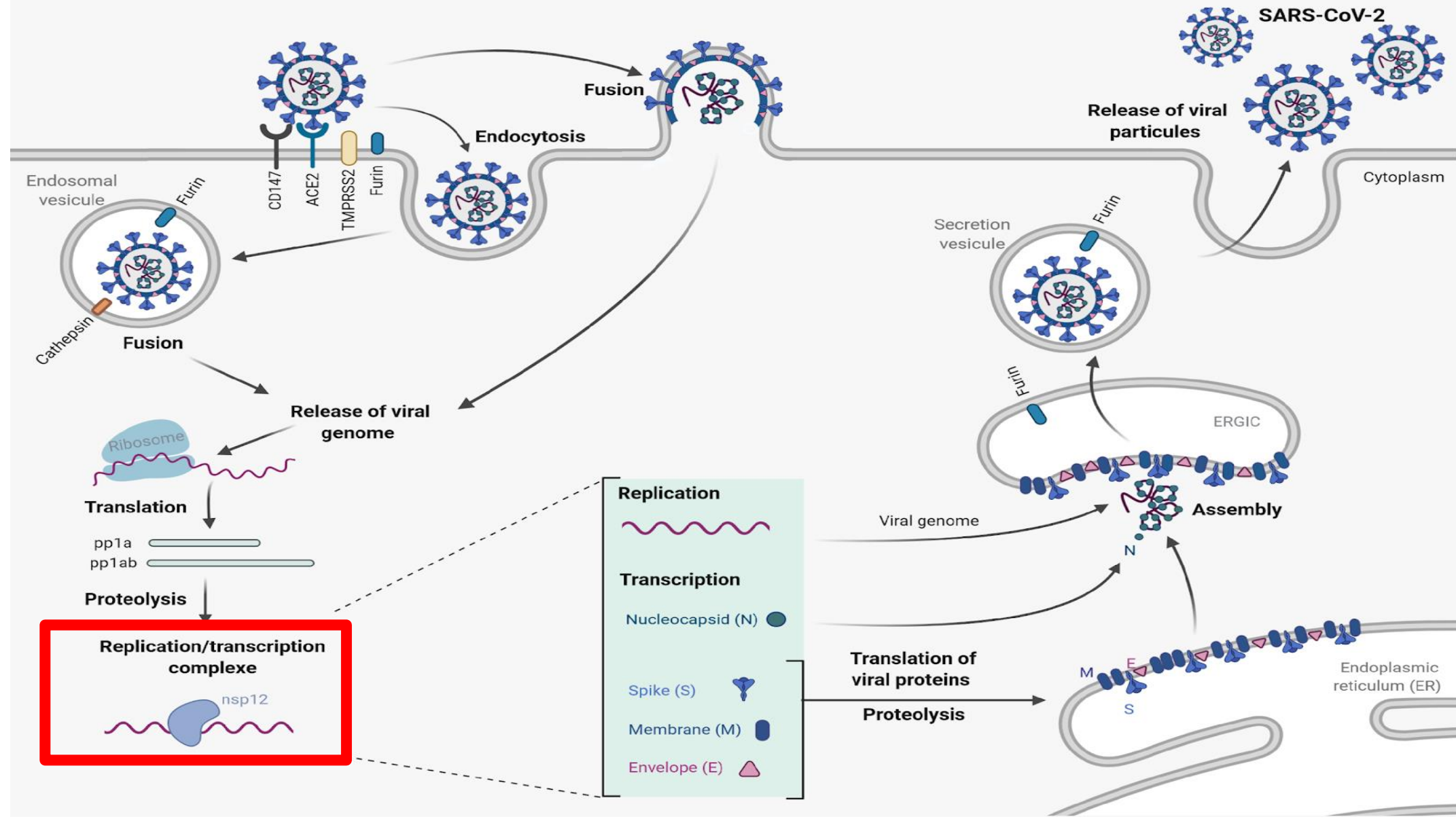


HAL Authorization

Abstract

- Le SARS-CoV-2 est l'agent infectieux responsable de la pandémie de Covid-19 apparu en 2019. Afin d'endiguer la pandémie, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est un enjeu crucial.
- Le génome du SARS-CoV-2 contient des modifications épitranscriptomiques, méthylations, essentielles pour la traduction et l'échappement au système de l'immunité innée et au bon déroulement de la réplication virale.
- Ces méthylations réalisées en N7 de la coiffe et en 2'O du premier nucléotide impliquent respectivement par 2 protéines virales : nsp14 et nsp16 en complexe avec le cofacteur nsp10.
- Les enzymes nsp14 et nsp16 utilisent un substrat SAM (S-AdénosylMéthionine) comme donneur du groupement méthyl.
- L'utilisation d'analogues du SAM en tant qu'inhibiteurs de l'activité méthyltransférase est une piste intéressante en tant que stratégie thérapeutique et montre une activité inhibitrice forte et spécifique des méthyltransférases virales.

Cycle de réplication du SARS-CoV-2



Objectifs

- Exprimer et purifier les 2 méthyltransférases virales nsp14 et nsp16 fonctionnelle ainsi que le cofacteur nsp10.
- Mettre au point une méthode de screening permettant d'identifier et caractériser les inhibiteurs mimant le SAM et déterminer leurs IC₅₀.
- Réaliser des expériences de « docking » et produire des cristaux des méthyltransférases en complexe avec les inhibiteurs afin de résoudre des structures permettant de mieux comprendre le positionnement de l'inhibiteur au sein des poches catalytiques de l'enzyme.

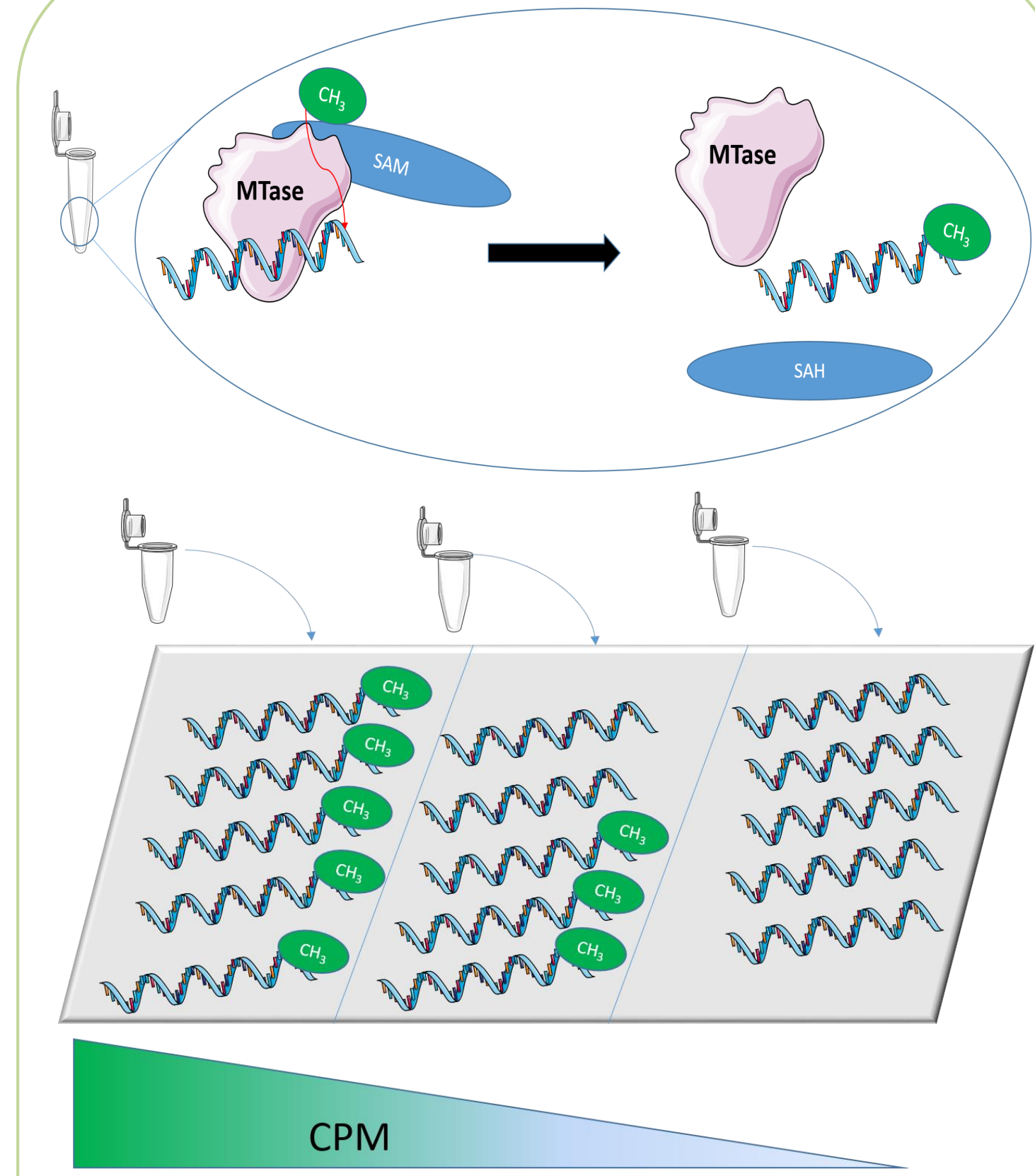
Substrats utilisés

Cap	RNA
5'OH-RNA	5'-OH-AUU AAA GGU
Gppp-RNA	5'-Gppp-AUU AAA GGU
GpppAm-RNA	5'-Gppp-AmUU AAA GGU
7mGppp-RNA	5'-7mGppp-AUU AAA GGU
7mGpppAm-RNA	5'-7mGppp-AmUU AAA GGU
7mGpppAC4	5'-7mGpppACCCC
GpppAC4	5'-GpppACCCC

Les ARNs utilisés sont des ARN de synthèse coiffés ou non coiffés, méthylés ou non méthylés aux positions N7 (7m) de la coiffe et 2'O (Am) du premier nucléotide afin de contrôler la spécificité des activités enzymatiques des méthyltransférases.

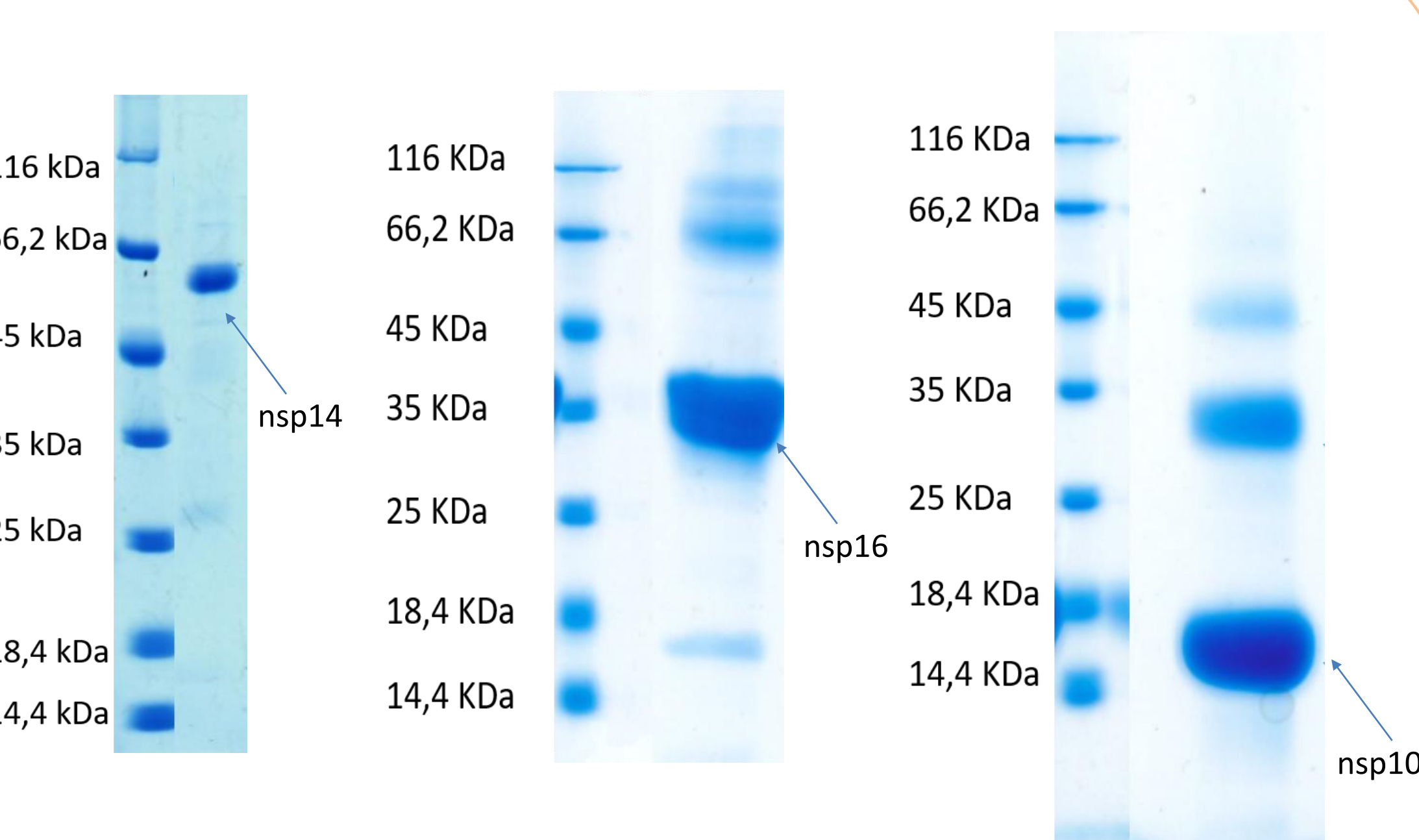
Les ARNs 7mGpppAC₄ et GpppAC₄ sont utilisés pour les tests d'inhibition et la détermination des IC₅₀.

Méthode de détection de l'activité méthyltransférase



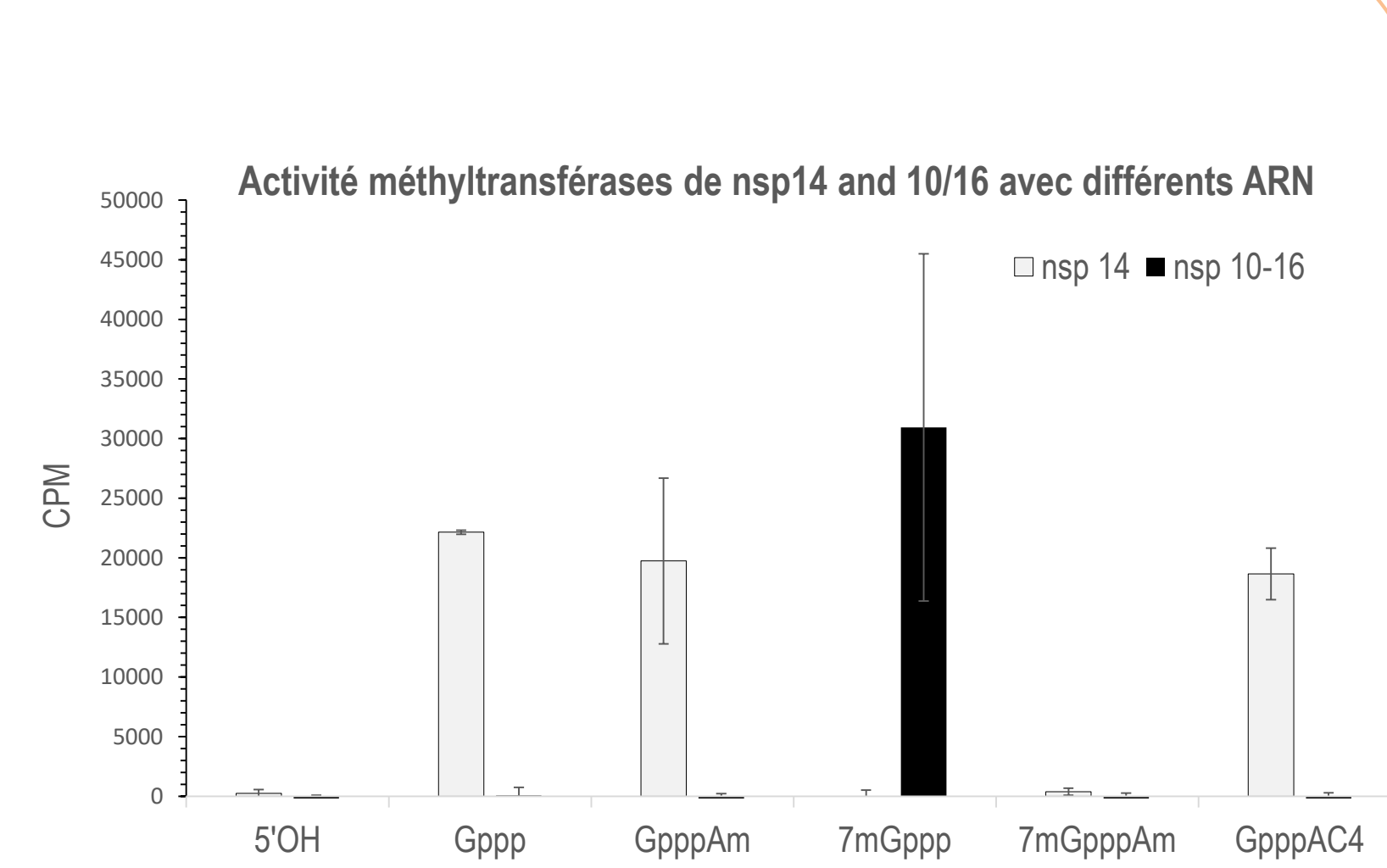
Cette méthode de Filter Binding Assay (FBA) utilise le SAM dont le groupement méthyl donneur est tritié (³H-SAM) afin de suivre la réaction de méthylation en détectant le niveau de radioactivité associé aux ARN substrats.

Purification des MTase du SARS-CoV-2



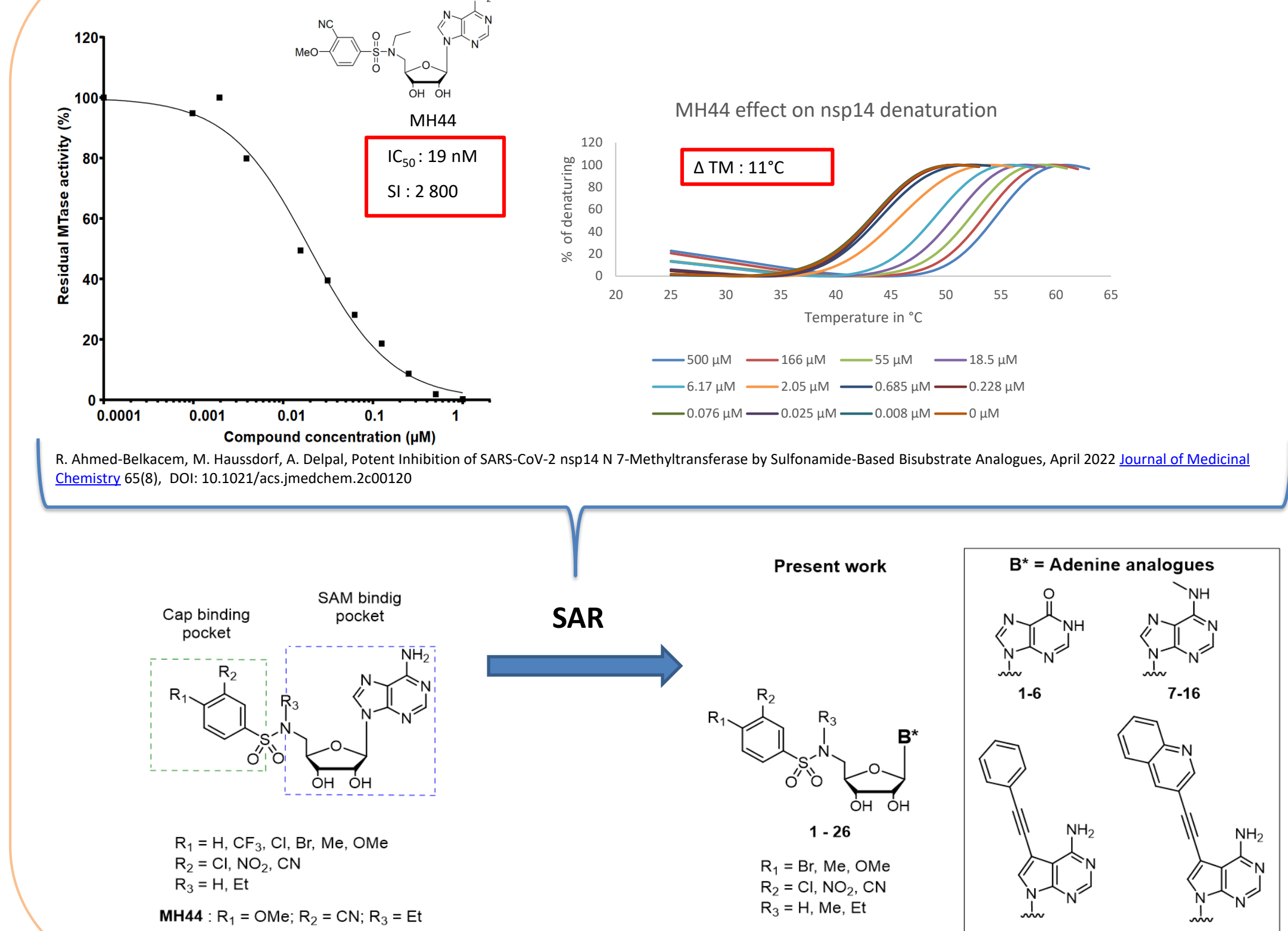
Les protéines sont purifiées par affinité sur billes de cobalt. La quantité et la pureté des protéines sont évaluées sur gel SDS-PAGE avant de tester les activités enzymatiques des méthyltransférases par FBA.

Spécificité des activités enzymatiques des méthyltransférases virales



Les essais enzymatiques permettent de détecter les activités enzymatiques de chaque méthyltransférase sur différents substrats et confirmer que nsp14 porte l'activité N7-MTase et nsp10/nsp16 l'activité 2'O-MTase.

Développement d'une première série d'inhibiteur



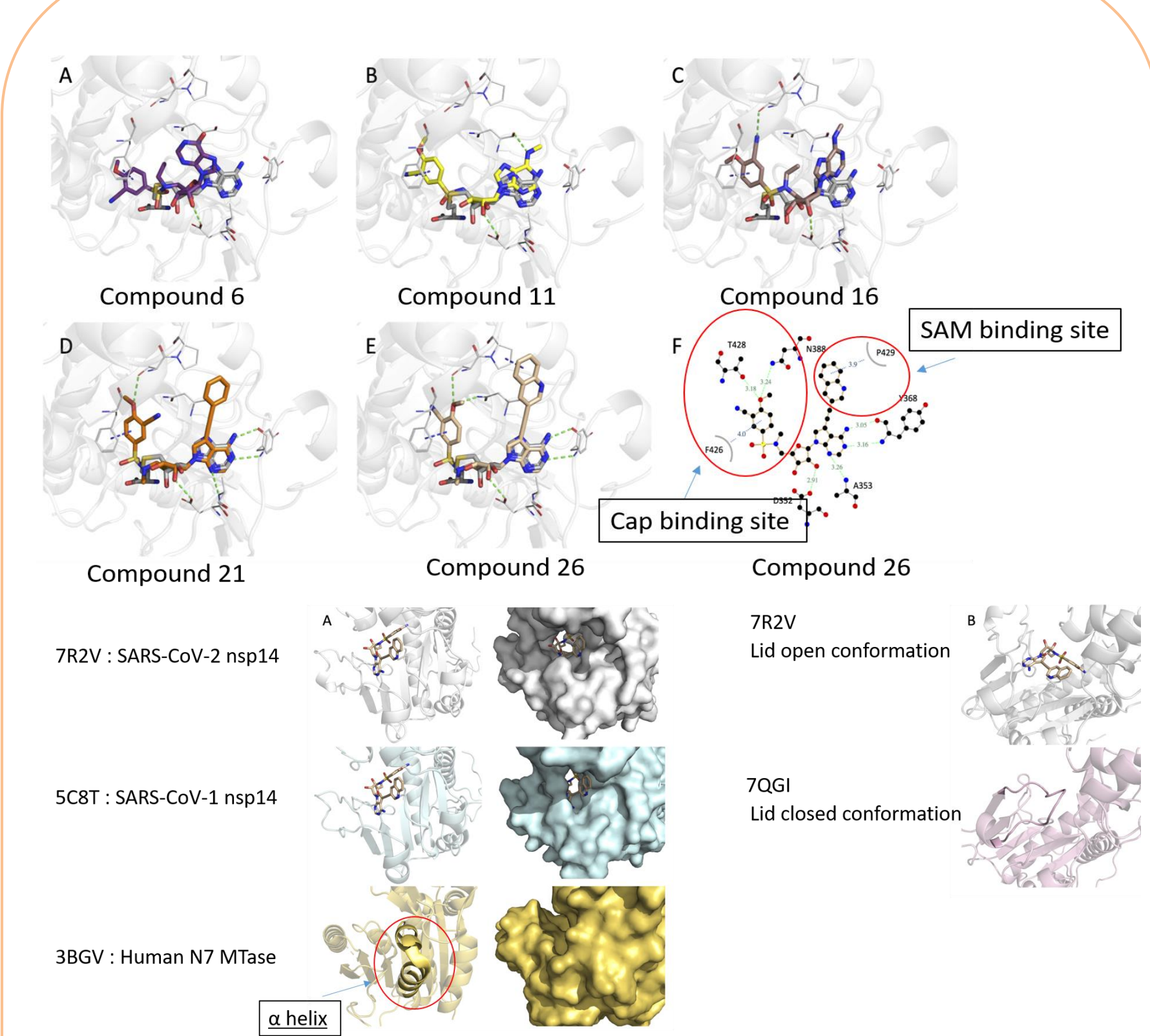
R. Ahmed-Belkacem, M. Haussdorf, A. Delpal, Potent Inhibition of SARS-CoV-2 nsp14 N7-Methyltransferase by Sulfonamide-Based Bisubstrate Analogues, April 2022 *Journal of Medicinal Chemistry* 65(8), DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00120

Activité inhibitrice des composés issus de la SAR sur différentes MTase de coronavirus

Compounds	SARS-CoV-2 nsp14		SARS-CoV-2 nsp14		Inhibition efficiency
	Docking ΔG (kcal/mol)	N7-MTase IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ ^a (nM)	IC ₅₀ ^b (nM)	
7	-9.4	3408 ± 1837	3-NO ₂ , 4-Br	3-NO ₂ , 4-OMe	Inhibition efficiency
8	-9.0	2850 ± 1467	3-Cl, 4-Me	3-NO ₂ , 4-OMe	
9	-9.8	2180 ± 120	3-NO ₂ , 4-OMe	3-CN, 4-OMe	Inhibition efficiency
10	-9.0	573 ± 122	3-Cl, 4-Me	3-CN, 4-OMe	
11	-9.6	468 ± 150	3-Cl, 4-Me	3-CN, 4-OMe	Inhibition efficiency
12	-9.1	383 ± 56	3-NO ₂ , 4-Br	3-NO ₂ , 4-OMe	
13	-8.7	187 ± 46	3-NO ₂ , 4-Me	3-Cl, 4-Me	Inhibition efficiency
14	-9.1	130 ± 89	3-NO ₂ , 4-OMe	3-CN, 4-OMe	
15	-8.3	274 ± 165	3-Cl, 4-Me	3-CN, 4-OMe	Inhibition efficiency
16	-8.9	62 ± 2	3-Cl, 4-Me	3-Cl, 4-Me	
17	-10.2	17.3 ± 0.6	3-NO ₂ , 4-Br	3-NO ₂ , 4-Br	Inhibition efficiency
18	-10.9	9.5 ± 0.6	3-NO ₂ , 4-Br	3-NO ₂ , 4-Br	
19	-10.5	25.6 ± 1.0	3-NO ₂ , 4-Me	3-NO ₂ , 4-OMe	Inhibition efficiency
20	-10.1	2.8 ± 1.2	3-NO ₂ , 4-OMe	3-Cl, 4-Me	
21	-10.1	1.2 ± 0.25	3-NO ₂ , 4-OMe	3-CN, 4-OMe	Inhibition efficiency
22	-12.0	3.5 ± 1.8	3-Cl, 4-Me	3-Cl, 4-Me	
23	-10.9	2.1 ± 1.3	3-NO ₂ , 4-Br	3-NO ₂ , 4-Br	Inhibition efficiency
24	-11.1	2.07 ± 0.5	3-NO ₂ , 4-Me	3-NO ₂ , 4-OMe	
25	-11.3	1.3 ± 1	3-NO ₂ , 4-OMe	3-NO ₂ , 4-OMe	Inhibition efficiency
26	-11.5	0.72 ± 0.4	3-CN, 4-OMe	3-CN, 4-OMe	

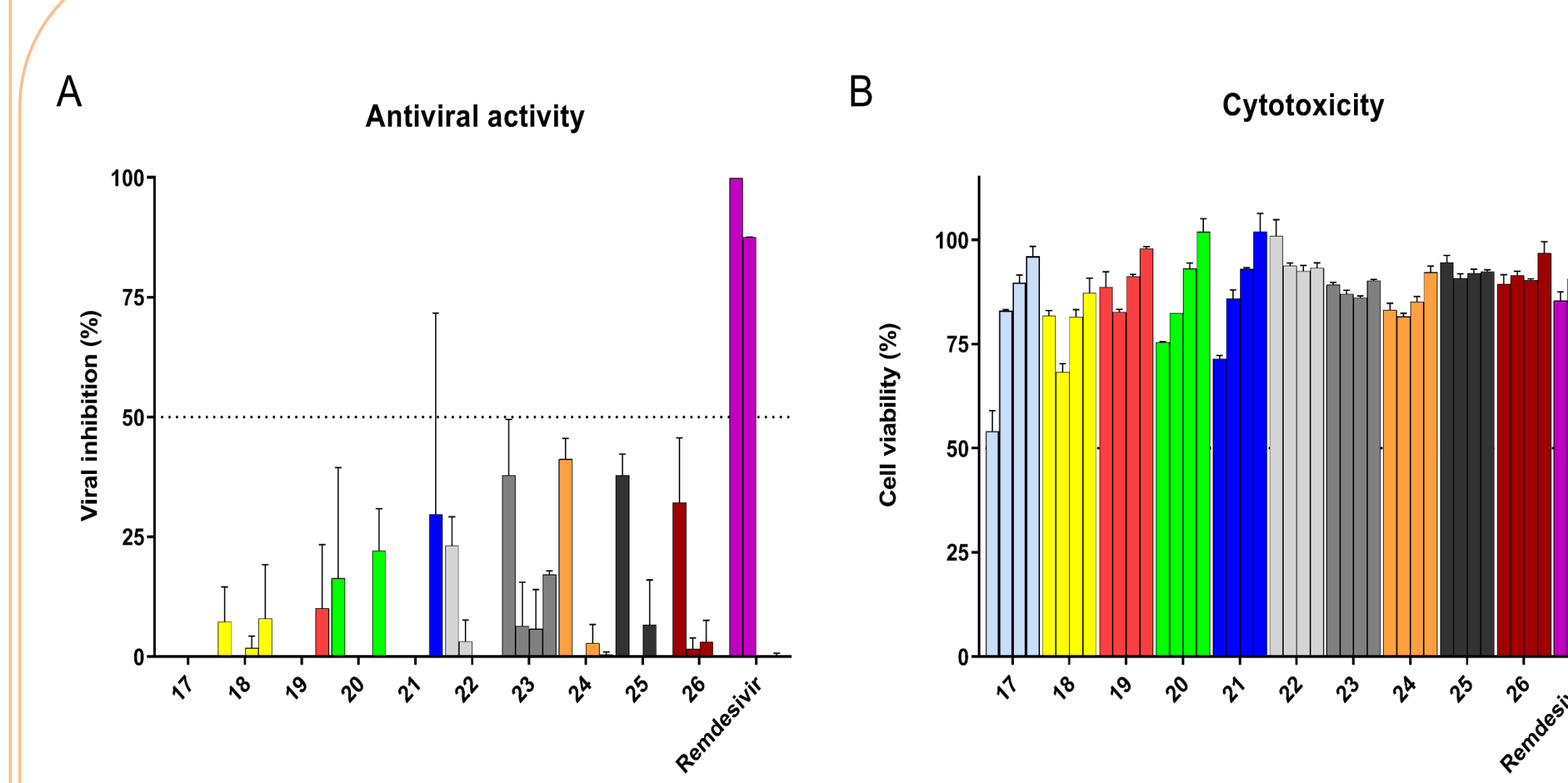
- Le groupement aromatique en C7 en complément du groupement méthoxy en R1 augmentent significativement l'effet inhibiteur des composés.
- Les composés sont très efficaces sur les coronavirus SARS-CoV-1 et CoV-2 et Mers et inactif sur la N7-MTase humaine et la MTase (NS5) du virus de la dengue

Expérience de « docking » des composés dans la structure de nsp14



- De nombreux π stacking et liaisons hydrogènes sont prédis dans les poches reconnaissant le SAM et la coiffe des ARN.
- Le composé semble bloquer le tunnel d'entrée du SAM.
- La présence d'une hélice α dans la N7 MTase humaine crée un encombrement stérique qui explique l'absence d'activité de ces composés sur la MTase humaine.

Activité antivirale des meilleurs composés en cellules Vero E6



L'effet antiviral des composés en cellule (Vero-E6) est faible par rapport à ceux des résultats *in-vitro*. La faible efficacité en cellule pourrait résulter de i) l'instabilité de molécules, ii) de la faible perméabilité du composé, iii) de l'inaccessibilité des composés au complexe de réplication viral (localisé dans des DMV).

Conclusions

- Les méthyltransférases du SARS-CoV-2 sont produites et purifiées au laboratoire sous forme active.
- La mise au point d'une méthode permettant de mesurer leurs activités enzymatiques a abouti à la caractérisation de 20 molécules inhibitrice pan-coronavirale ayant une IC₅₀ de l'ordre du nM.
- Les expériences de « docking » réalisées explicitent le mode d'action possible des composés.

Perspectives

- Etudier la pénétration cellulaire de ces composés et synthétiser des « prodrogues » afin de les faire pénétrer efficacement en cellules.
- Réaliser des cristaux de nsp14 en complexe ou non avec nsp10 et les composés afin de valider les modèles issus des expériences de « dockings ».

Références

R. Ahmed-Belkacem, M. Haussdorf, A. Delpal, Potent Inhibition of SARS-CoV-2 nsp14 N7-Methyltransferase by Sulfonamide-Based Bisubstrate Analogues, April 2022 *Journal of Medicinal Chemistry* 65(8), DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00120
M. Haussdorf, A. Delpal, Structure-guided optimization of adenosine mimetics as selective and potent inhibitors of coronavirus nsp14 N7-methyltransferases, April 2023 *Journal of Medicinal Chemistry* ongoing publication.