NNT : 2024AIXM0621

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 12 décembre 2024 par

Hugo ROUX

Synthèse de nouveaux inhibiteurs des Entérovirus à large spectre

Discipline
Sciences chimiques

École doctorale
ED 250 – Sciences Chimiques de Marseille

Laboratoire/Partenaires de recherche
UMR 7273 Institut de Chimie Radicalaire
Aix-Marseille Université

Composition du jury

Yves BLACHE Université de Toulon	Rapporteur
Carine MASQUEFA Université de Montpellier	Rapporteuse
Laurent BOURGUIGNON Université Claude Bernard 1	Président du jury
Patrice VANELLE Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
Manon ROCHE Aix-Marseille Université	Co-directrice de thèse
Franck TOURET Aix-Marseille Université	Membre invité

Affidavit

Je soussigné, Hugo ROUX, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Patrice VANELLE et Manon ROCHE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 22 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Témoin luttant pour un avenir dégagé,
Harmonie à trouver entre espèces vivantes.
Energie contre un virus qui peut saccager,
Société à panser, hors des questions clivantes.
Ecrire une thèse, témoignage imagé.

Remerciements

Si j'ai pu réussir à produire ce manuscrit, il est le résultat de trois ans de recherche dans un laboratoire, ayant eu l'assistance de mes pairs, qu'ils soient au sein du laboratoire, à Marseille ou ailleurs.

C'est pourquoi, je voudrais, tout d'abord, remercier ma direction de thèse. Elle est incarnée par mon directeur de thèse, le Professeur **Patrice Vanelle**, qui a su me rassurer, me motiver là où je me sentais en difficulté et à proposer un chemin pour atteindre ce moment dans les meilleures conditions ; mais aussi la Docteure **Manon Roche**, qui a toujours été là pour me guider, à l'écoute de mes propositions et de mes émotions durant ces trois années. Elle a aussi su être le moteur d'un travail qu'elle a commencé depuis dix ans maintenant, et, avec sa confiance, me le remettre afin que j'écrive avec elle la suite.

Je tenais aussi à remercier les membres du jury qui m'honorent en ayant accepté de lire et d'évaluer mon travail, que ce soit en tant que président (Professeur **Laurent Bourguignon**) ou en tant que rapporteur·e (Professeur **Yves Blache** et Professeure **Carine Masquefa**).

Je voulais aussi remercier la Docteure **Julie Broggi** et le Docteur **Omar Khoumeri** pour les différents conseils et discussions que nous avons eu lors de cette thèse. Plus précisément **Omar** pour l'apport au projet et l'assistance lors des différentes expériences, que ce soit lors de mon arrivée au laboratoire jusqu'à la préparation de ma soutenance, et **Julie** pour, dans un premier temps, la chance qu'elle m'a donné en acceptant mes différentes demandes de stages, son encadrement et le soutien apporté, personnel et professionnel.

En outre, je voulais remercier aussi la Docteur **Marion Casanova**, pour son encadrement lors de mes trois premières semaines de stage au laboratoire, qui s'est prolongé par de longues discussions plongées dans une amitié qui m'est chère ; le Docteur **Vincent Monteiro**, pour sa présence lors de ma première année, cela m'a été très bénéfique tant à l'apprentissage des différentes pratiques au laboratoire, pour faire de ce dernier ma pièce où je me sens à l'aise, confiance que je lui porte lorsqu'il était à l'Institut de Chimie Radicalaire et désormais qu'il vole dans d'autres sphères.

Je voulais aussi remercier les membres de mon Comité de Suivi de Thèse (la Professeure **Sandrine Alibert**, le Docteur **Hervé Clavier**, le Docteur **Malek Nechab**, la Docteure **Séverine Girard Queyroy** et le Docteur **Pierre Stocker**) qui m'ont accompagnée lors de ma thèse ainsi que préparée à ma soutenance de thèse.

Que serais-je sans les différentes personnes qui sont ou sont passées par le 6ème étage de la Faculté de Pharmacie de Marseille. Comment ne pas commencer par la Docteure **Fanny Mathias**, toujours là lorsque j'avais besoin, d'une bienveillance et d'une joie sans borne, que ce soit au laboratoire ou sur l'esplanade J4 pour assister au concert de *Juliette Armanet* ; le Professeur **Pascal Rathelot**, pour son écoute, son aide et le récit de ses différentes rencontres caprines dans le Champsaur ; la Docteure **Karine Barral**, pour son engagement et son énergie mis dans la mise en place d'une LC-MS effective mais aussi sa disponibilité et sa sympathie, et nos conseils cinématographiques ; **Coline Babel**, pour son assistance contre ma panique administrative ; la Docteure **Caroline Ducros**, sa gestion efficace et collective lors du déménagement ; **Maximilien Fil**, **Safeh Khemiri** et **Saïd Ait Taleb**, pour leur sympathie ; le Docteur **Maxime Crozet**, la gestion du système administratif ; les Docteur·es **Marc Montana** et **Martine Maillard-Boyer**, leur présence.

Il ne faut pas oublier les différents membres du 5ème étage de la Faculté de Pharmacie de Marseille : en commençant par le Docteur **Vincent Remusat**, pour sa gestion du matériel, des achats et de la sécurité au laboratoire, avec parfois des envolées émotionnelles ; les Docteurs **Youssef Kabri**, **Sébastien Redon** et le Professeur **Thierry Terme**, pour leurs conseils m'ayant permis d'avance sur mon projet de thèse ; **Françoise Arrechi**, pour son appui administratif ; **Cédric Spitz**, pour la gestion des balances ; **Nicolas Primas**, pour son implication et son invitation au GP_2A; **Nadhrata Assani**, **Arona Fall**, **Ines Jacquet** (et sa voix comme celle de *Laure Grandbesançon*) et **Tataye Mousskoumb**, pour leurs appuis et leurs sympathies.

Car je suis loin d'être corporatiste, ce projet n'aurait pas pu être mené à ce stade sans les différents partenaires avec lesquel·les nous avons pu coopérer : le Docteur **Franck Touret** a été déterminant autant par les compétences et le temps consacré au projet qu'à celui pris afin de me guider, me relire et faire de mon manuscrit, une version qui peuvent m'inspirer de la fierté ; ainsi qu'**Hawa Bouzidi**, doctorante ayant rejoint le projet en cours. Desidero esprimere la mia gratitudine al professor **Antonio Coluccia** per il sostegno, la gentilezza ed il supporto offertomi nello svolgimento di questo progetto di tesi. Sebbene non abbia avuto l'opportunità di incontrarlo di persona, considero un grande onore la possibilità di farlo in futuro. Lo stesso vale per il dottor **Pietro Sciò**, dottorando del professor Coluccia, al quale auguro una serena discussione della tesi e una futura carriera ricca di soddisfazioni. Infine, desidero ringraziare anche il professor **Romano Silvestri**. Je voulais aussi remercier la Professeure **Carole di Giorgio**, pour sa disponibilité et son entrain. Si j'ai pu me former et comprendre les enjeux de la pharmacocinétique, ce n'est pas sans l'aide de la Docteure **Florence Gattacceca**, de ma découverte en assistant à un de ses TP jusqu'en Allemagne lors d'une Université d'été, mais aussi le travail si précieux de la Professeure **Florence Fanciullino** et de la Docteure **Sarah Giacometti**, que ce soit dans leur explication que pour réaliser les tests *in vitro*. Je souhaite aussi saluer la participation du Docteur **Edouard Lamy** ainsi que celles de la Professeure **Caroline Solas** et de la Docteur **Madeleine Giocanti**, qui ont sauvé cette partie de ma thèse en réussissant à nous proposer des solutions afin d'obtenir des dosages de nos composés fiables. Je pense aussi au Professeur **David Berger-Lefranc**, au Docteur **Pascal Prindère** et à la Docteure **Florence Chaspoul**, pour leur entrée récente dans le projet. Je voulais enfin remercier le Professeur **Laurent Bourguignon**, pour sa motivation, son énergie et sa sympathie mis à disposition de mon projet de thèse dès son commencement. Je souhaite le début d'une longue coopération entre l'intégralité de ces parties afin de continuer de porter la méthode innovante développée dans ce projet.

Pour conclure, je souhaiterais remercier **Pauline Brochard**, pour l'autorisation à utiliser ces aquarelles dans mon manuscrit.

Outre cet aspect professionnel, la thèse est aussi une aventure personnelle. Il a fallu passé par des périodes d'immense bonheur et d'abyssale dépression. Dans toutes ces émotions, j'ai pu compter sur des proches qui, à travers ces lignes, se rencontrent pour la première fois pour certain·es.

Je voulais tout d'abord remercier ma famille, avec ma sœur, ma mère, mon père, mes oncles, mes grands-parents qui ont forgé en premier la personne qui je suis, entre engagement militant et sensibilité affectueuse ; venant de deux pays différents, apprenant la tolérance, la solidarité et l'espoir ; inondé de mélancolie comme d'émotion qui rassemble, touche afin de former des liens qui se veulent forts avec ces étranges protagonistes que j'ai rencontré·es par la suite.

Je remercie aussi la famille Fine-Falcy qui a toujours été à mes côtés dès ma naissance.

Mon autre jambe qui, en grandissant, m'a permis de me tenir debout, fièrement et avec détermination, est évidemment les différentes personnes, que j'ai choisi d'aimer. Le premier fut **Evan**, qui dès le collège m'a fait intégrer sa vie et ne m'a jamais lâché, rapidement suivi de **Charley** et de **Sarah**, qui m'ont accompagné·e lors des difficiles années de classes préparatoires. En arrivant dans ce terrible monde de l'école d'ingénieur·es, j'ai pu reprendre mon souffle en m'impliquant dans *Ingénieurs sans frontières*, où j'ai pu rencontrer **Margaux**, **Fédora**, **Chloé**, **Nicolas**, **Annouk**, **Hélène**, **Emilie**, **Margot**, **Eglantine**, **Laura**, **Vincent**, **Mehdi**, les **Benjamin**s et plus récemment **Julia** et **Nova**, personnes qui ont déjà illuminé ma vie, et qui brilleront toujours dans le ciel comme des guides stellaires.

Je remercie sincèrement **Cécilia**, **Julie-Anne**, **Valentine**, **Julie**, **Manon**, **Cassandre**, **Ella**, de m'avoir fait vivre de doux et tendres moments, qui m'ont fait sentir ce que c'est que.

Je n'aurais pas pu réaliser ma thèse dans de telles conditions confortables sans, en les citant de nouveau, **Manon Roche**, **Marion Casanova**, **Vincent Monteiro** et **Julie Broggi**, qui en dehors de l'aspect professionnel ont partagé aussi des moments sensibles et délicats, pris le temps de parler de sujets sociaux afin d'en enlever tristesse, révolte ou déception, et m'ont toujours soutenue. De plus, je n'aurais pu découvrir et apprécier autant la recherche scientifique, et me déterminer à faire une thèse sans le Professeur **Olivier Dangles**.

Je terminerai par remercier les personnes qui ne me connaissent pas et que j'effleure de loin leur personnalité, mais qui par leurs œuvres m'ont grandement soutenue, m'ont nourrie et m'ont fait vivre de nouvelles expériences avec leurs performances si vivantes : *Jeanne Added*, *Adé*, *Angèle*, *Juliette Armanet*, *Luàna Bajrami*, *Beach House*, *Laure Calamy*, *Monia Chokri*, *Clio*, *Clou*, *Constance*, *Wally Dia*, *Audrey Diwan*, *Tania Dutel*, *Virginie Effira*, *Annie Ernaux*, *La Femme*, *Fishbach*, *Franz Ferdinand*, *French 79*, *Indochine*, *Izïa*, *Jain*, *Sandrine Kiberlain*, *Khyan Kojandi*, *Aymeric Lompret*, *Clara Luciani*, *Mahaut Drama*, *Ben Mazué*, *Noémie Merlant*, *Guillaume Meurice*, *The National*, *Pi ja ma*, *Pomme*, *Queens of the Stone Age*, *Colline Rio*, *Zaho de Sagazan*, *Neige Sinno*, *Suzane*, *Tallisker*, *Thérapie Taxi*, *Charline Vanhoenacker*, *Maud Ventura*, *Anamaria Vortolomei*, *Lilly Wood and The Prick*, *Clara Ysé*, *Alice Zeniter*.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. H. Roux, F. Touret, A. Coluccia, P. Sciò, H.S. Bouzidi, C. Di Giorgio, F. Gattacceca, O. Khoumeri, R. Silvestri, P. Vanelle, M. Roche, **Design and Synthesis of Novel Thioether Analogs as Promising Antiviral Agents: Evaluation of *In Vitro* Activity against Enteroviruses of Interest**, *Eur. J. Med. Chem*. **2025**, *288*, 117395. DOI: 10.1016/j.ejmech.2025.117395.

2. H. Roux, F. Touret, P. Rathelot, P. Sciò, A. Coluccia, P. Vanelle, M. Roche, **Non-Polio Enterovirus Inhibitors: Scaffold, Targets, and Potency, What's New?**, *ACS Infect. Dis.* **2025**, *11* (1), 21-46. DOI: 10.1021/acsinfecdis.4c00606.

3. H. Roux, F. Touret, P. Rathelot, P. Vanelle, M. Roche, From the "One Molecule – One Target – One Disease" Concept towards looking for Multi-Target Therapeutics for Treating Non-Polio Enterovirus (NPEV) Infections, *Pharmaceuticals*. 2024, *17* (9), 1218. DOI: 10.3390/ph17091218 .

4. H. Roux, F. Touret, A. Coluccia, O. Khoumeri, C. Di Giorgio, C. Majdi, P. Sciò, R. Silvestri, P. Vanelle, M. Roche, **New Potent EV-A71 Antivirals Targeting Capsid**, *Eur. J. Med. Chem*. **2024**, *276*, 116658. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116658 .

5. H. Roux, et al. From *in silico* model to an *in vitro* validated A.I. optimization of pharmacokinetic parameters for enterovirus inhibitors, *En cours de preparation*.

2) Participation aux conférences / écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. Université d'été + Communication orale – **CIVIS: BIP – D3HT5**, 22-26/07/2024, *Tübingen*, *Allemagne*.
2. Communication orale – **31st Young Research Fellow Meeting**, 22-23/02/2024, *Grenoble*, *France*.
3. Poster – **31st Annual GP2A Medicinal Chemistry Conference**, 23-25/08/2023, *Marseille*, *France*.
4. Poster – 57ème Rencontre Internationales Chimie Thérapeutiques, 05-07/07/2023, *Lille*, *France* – poster.
5. Présentation Flash + Poster – **30th Young Research Fellow Meeting**, 0103/03/2023, *Paris*, *France*.
6. Communication orale – **Journée Pharm'Industrie 2022**, 02/12/2022 *Marseille*, *France*.
7. Poster – **20ème Journée de la Recherche en Pharmacie**, 23/09/2022, *Marseille*, *France*.
8. Poster – 10ème Journées Franco Italiennes de la Chimie, 26-27/04/2022, *Toulon*, *France*.
9. Communication orale – **Journée Pharm'Industrie 2021**, 26/11/2021, *Marseille*, *France*.

Résumé

Le terme Entérovirus désigne un genre de virus rassemblant quinze espèces dont sept pathogènes pour l'être humain (les entérovirus A-D et les rhinovirus A-C). Du fait de leur grande diversité, ils peuvent provoquer une multitude d'infections, souvent bénignes. Les rhinovirus, présentent un tropisme particulier pour le système respiratoire. Les entérovirus, quant à eux, infectent des systèmes très variables. Ils sont la cause principale de la maladie pieds-mains-bouche, de méningites ou encéphalites, de paralysies ou de conjonctivites hémorragiques aiguës. Malgré le besoin exprimé, aucun traitement curatif n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché. C'est pourquoi, à partir des travaux précédemment effectués pour lutter contre les rhinovirus, ce projet de thèse porté par l'équipe de Pharmaco-Chimie Radicalaire de l'Institut de Chimie Radicalaire s'intéresse à la synthèse de nouveaux « *capsid binders* » des Entérovirus à large spectre. Pour cela, une stratégie réflexive a été développée alliant des prédictions par de la modélisation au sein de notre cible, la poche hydrophobe située dans le canyon de la capside entérovirale, et l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité sur différentes lignées cellulaires de nos composés après leur synthèse. Une première étude pilote a été menée afin d'identifier les principales interactions que pouvaient avoir nos composés avec la poche hydrophobe de la capside sur EVA-71. Dans un second temps, nous avons élargi le spectre d'action de nos composés en combinant les pharmacophores des deux séries que nous avions précédemment réalisées. En parallèle, une étude afin d'optimiser les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés a été menée. Elle repose aussi sur une boucle réflexive impliquant des prédictions de ces paramètres, une vérification *in vitro* des paramètres les plus importants puis une génération *de novo* de composés optimisés avec l'aide de l'intelligence artificielle. Enfin, une discussion sera ouverte afin d'évaluer les possibilités pour passer d'un inhibiteur mono-cible à une molécule pléiotrope.

Mots clés : *Capsid-binder*, Entérovirus, Inhibiteur, Large-Spectre, Médicament, Réaction de couplage de Suzuki-Miyaura.

Abstract

Enterovirus refers to a genus of viruses comprising fifteen species, seven of which are pathogenic for humans (enteroviruses A-D and rhinoviruses A-C). Due to their great diversity, they can cause a multitude of infections, many of them benign. Rhinoviruses have a particular tropism for the respiratory system. Enteroviruses, on the other hand, infect a wide variety of systems. They are the main cause of hand-foot-and-mouth disease, meningitis or encephalitis, paralysis, or acute hemorrhagic conjunctivitis. Despite the expressed need, no curative treatment has been granted market authorization. That's why, building on previous work to combat rhinoviruses, this thesis project by the Pharmaco-Chimie Radicalaire team at the Institut de Chimie Radicalaire focuses on the synthesis of new broad-spectrum capsid binders for Enteroviruses. To this end, a reflexive strategy has been developed, combining modeling predictions within our target, the hydrophobic pocket located in the canyon of the enteroviral capsid, and evaluation of the efficacy and toxicity on different cell lines of our compounds after their synthesis. An initial pilot study was carried out to identify the main interactions of our compounds with the hydrophobic capsid pocket on EVA-71. In the second phase, we broadened the spectrum of action of our compounds by combining the pharmacophores of the two series we had previously produced. In parallel, a study was carried out to optimize the physicochemical and pharmacokinetic parameters of our compounds. It is also based on a reflexive loop involving predictions of these parameters, *in vitro* verification of the most important parameters, and *de novo* generation of optimized compounds with the help of artificial intelligence. Finally, a discussion will be opened to assess the possibilities of moving from a single-target inhibitor to a pleiotropic molecule.

Keywords: Broad-spectrum, Capsid-binder, Drug, Enterovirus, Inhibitor, Suzuki-Miyaura cross-coupling.

Abréviations

AcCoA1 : acyl-conenzyme A oxydase 1.

AcS : acide scialique.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AKT : protéine kinase B.

AnxII : annexine II.

ARN : acide ribonucléique.

ATC : absorption et de transit compartimental, modèle d'.

ATCA : absorption et de transit compartimental avancé, modèle d'.

ATGI : absorption du transit gastro-intestinal.

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive.

Caco-2 : *Cancer coli 2*.

CC_{50} : concentration toxique médiane.

Ccl : cyclophiline.

CD55/DAF : facteur accélérant le déclin.

Cdh : cadhérine.

CE_{50} : concentration efficace médiane.

CHA : conjonctivite hémorragique aiguë.

CHO : Chinese Hamster Ovary.

CO_2 : dioxyde de carbone.

CRCM : Centre de Recherche de Cancérologie de Marseille.

Csp : caspase.

CV : coxsackievirus.

CYP450 : cytochrome P450.

E : échovirus (Enteric Cytophatogenic Human Orphan virus).

ecr : élément cis-régulateur viral.

ENPEN : Réseau Européen des Entérovirus Non-Polio.

ERC : ECHO 28-Rhinovirus-Coryzavirus.

EV : entérovirus.

FAr : facteurs d'ADP-rybosylation.

FASMIFRA : Fast Assembly of (Deep) SMILES Fragments.

Fbn : fibronectine.

rFnC : récepteur du fragment néonatal cristallisable.

GPGT : galactosylxylosyl protéine 3-β-glucuronosyltranférase 3.

GS : glycanes sialytatés.

HATU : hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N*,*N*-diméthyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)méthaniminium.

Hsp90 : protéine de choc thermique 90.

ICAM 1/CD54 : *InterCellular Adhesion Molecule* 1.

ICAM 5 : *InterCellular Adhesion Molecule* 5.

ICR : Institut de Chimie Radicalaire.

ICTV : Comité international de taxonomie des virus.

IFN : interféron.

IRES : Internal ribosome entry site.

IUMS : Union internationale des sociétés de microbiologie.

LB : lymphocytes B.

LBD : lipoprotéines à basse densité.

LBD-pro : lipoprotéines à basse densité relatifs aux protéines.

LCR : liquide céphalo-rachidien.

LTBD : lipoprotéines à très basse densité.

LT_{Aux} : lymphocytes T auxiliaires.

LT_{Cyt} : lymphocytes T cytotoxiques.

$LT_{Rég}$: lymphocytes T régulateurs.

MDA : modèle de données d'analyse.

MFA : myélites flasques aigües.

MPMB : maladie pieds-mains-bouche.

MRC-5 : Medical Research Council cell strain 5.

MTDL : composés uniques ciblant plusieurs molécules à la fois / molécules pléiotropes.

Ncl : nucléolines.

NF-κβ : facteur nucléaire kappa B.

NPEV : Entérovirus non-polio.

NTP : nucléoside triphosphate.

OR : organites de réplication.

OSBP 1 : protéine fixant l'oxystérol 1.

P_{app} : perméabilité apparente.

pARNi : petit ARN interférent.

PChol : phosphatidylcholine.

PCR : réaction de polymérase en chaîne.

PFA : paralysies flasques aiguës.

PFAS : per et polyfluoroalkyles.

Phb : prohibitine.

PIK4IIIβ : phosphophatidylinositol 4-kinase béta.

PI3K : phosphoinositide-3-kinase.

PI4P : phosphatidylinositol 4-phosphate.

Pro-2A : protéase 2A.

Pro-2B : protéine 2B.

Pro-2BC : protéine 2BC.

Pro-2C : protéine 2C.

Pro-3A : protéine 3A.

Pro-3AB : protéine 3AB.

Pro-3B / PVg : protéine 3B / protéine virale liée au génome.

Pro-3C : protéase 3C.

Pro-3CD : protéase 3CD.

Pro-3D / RdRp : protéine 3D / ARN polymérase ARN-dépendante.

PSGL-1 : récepteur ligand de la glycoprotéine *p*-sélectine 1.

PV : poliovirus.

RD : rhabdomyosarcome.

RE : réticulum endoplasmique.

RPMI : Roswell Park Memorial Institute.

RT-PCR : transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (reverse transcription-polymerase chain reaction).

RV : rhinovirus.

SH : sulfane d'héparane.

TAPP : transporteur d'adénosine 3'-phospho-5'-phosphosulfate 1.

T-ARNt-S : tryptophanyl-ARNt synthétase.

TDAE : tétrakis (diméthylamino)éthylène.

TRIF : facteur de croissance de transformation beta 1.

Tst : tyrosylsulfotransférase.

VDM : vésicule à double membrane.

Vmt : vimentine.

VPX (X = 1, 2, 3, 4, 0) : protéine virale X, composante de la capside.

Liste des Figures

Figure 1. Evolution de la taxonomie des Entérovirus au cours du temps.

Figure 2. Répartition géographique des espèces majoritaires d'EV.

Figure 3. Maladies pouvant être provoquées par des infections à RV.

Figure 4. Maladies pouvant être provoquées par des infections à EV.

Figure 5. Le Coût du rhume et de la grippe.

Figure 6. Structure des têtes de série ciblant les protéines structurales des Entérovirus.

Figure 7. Structure des têtes de série ciblant les protéines non structurales des Entérovirus.

Figure 8. Structure des dendrimères développés par l'Instituto de Química Médica (Madrid).

Figure 9. Constituants des dendrimères 28, 44 et 27.

Figure 10. Structure du fullerène 10.

Figure 11. Plantes, champignons procurant des composés anti-entéroviraux, et leur principal composé actif.

Figure 12. Flavonoïdes présentant une activité antivirale.

Figure 13. Structure des antiviraux inorganiques évalués contre les RV à ce jour.

Figure 14. Structure du sulfate d'héparane et de ses analogues efficaces contre les EV.

Figure 15. Structure des séquences peptidiques synthétisées pour cibler les Entérovirus.

Figure 16. Structure des autres molécules d'origine biologique inhibant respectivement l'entrée et la réplication virale des Entérovirus.

Figure 17. Structure des co-facteurs identifiés de la poche hydrophobe dite 'classique'.

Figure 18. Structure du composé LPCRW_0005 et ses relations structures-activité associées.

Figure 19. Représentation du mode de liaison du composé LPCRW_0005 dans la capside d'un RV-B14 à partir de la co-cristallisation réalisée.

Figure 20. Représentation des côtés *toe-end* et *pore* de la capside.

Figure 21. Présentation du cycle d'optimisation de notre stratégie de pharmacomodulation de nos composés à visée antivirale.

Figure 22. Présentation du cycle d'optimisation de notre stratégie d'optimisations des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés à visée antivirale.

Figure 23. Différents couplages pallado-catalysés menant à la formation de liaison carbone – carbone.

Figure 24. Mécanisme réactionnel global du couplage de Suzuki-Miyaura.

Figure 25. Deux mécanismes envisagés pour l'activation du pré-catalyseur π – aryle de Nolan.

Figure 26. Détail de chaque étape du cycle réactionnel selon les différents mécanismes décrits dans la littérature.

Figure 27. Réactions de Substitution Nucléophile Bimoléculaire 2 (S_N2).

Figure 28. Différents mécanismes possibles pour les substitutions nucléophiles bimoléculaires.

Figure 29. Réactions de Substitution Nucléophile Aromatique (S_NAr).

Figure 30. Complexe d'activation de la nucléophilie et réactivité acido-basique des alcools et thiols par une base carbonate.

Figure 31. Produits de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) intramoléculaire facilitant une seconde S_NAr.

Figure 32. Nomenclature et charte graphique des composés présentés pour ce projet de thèse.

Figure 33. Substrats pour laquelle la chloration du processus A n'a pas donné le produit attendu.

Figure 34. Conjugaisons les plus fréquentes durant la deuxième phase de métabolisation hépatique.

Figure 35. Structure des potentiels métabolites des 3 composés les plus prometteurs prédit par ADMET Predictor™.

Figure 36. Fragments identifiés comme ayant des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques favorables.

Figure 37. Structure de composés dont les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques sont optimisés.

Figure 38. Structure des différents sels hydrochlorés, méthylé ou ester de phosphate synthétisés.

Figure 39. Stratégie de synthèse du dérivé d'ester de phosphate 12.

Figure 40. *Linkers* déjà testés avec l'ordre de grandeur de leur activité virale contre RV-B14, évaluée sur la lignée cellulaire HeLa.

Figure 41. Modulations du *linker* avec ou sans hétéroatome à considérer.

Figure 42. Effet mésomère et conjugaison des systèmes aromatiques par la fonction amide.

Figure 43. Stratégie de synthèse des *linkers* ayant une amine secondaire ou tertiaire.

Figure 44. Stratégie de synthèse des *linkers* méthylsulfone et éthane.

Figure 45. Stratégie de synthèse du *linker* éthène (double liaison carbone-carbone).

Figure 46. Stratégie de synthèse du *linker* amide.

Figure 47. Stratégie de synthèse du *linker* thioester.

Figure 48. Pharmacomodulations du cycle aromatique B par différents cycles fusionnés, avec la possibilité de cyclisation du *linker*.

Figure 49. Synthèse de l'intermédiaire boronique pour obtenir le composé 27.

Figure 50. Réactions de cyclisation du *linker* envisagé.

Figure 51. Structure des métabolites des composés OM1260 et HR-568 prédites par ADMET_Predictor™.

Figure 52. Stratégie de synthèse des métabolites des composés OM1260 et HR-568 possédant une pyridinone, une isoquinolinone ou une 1,2,4-triazol-3-one.

Figure 53. Stratégie de synthèse des métabolites des composés OM1260 et HR-568 possédant un *linker* oxydé.

Liste des Graphiques

Graphique 1. Représentation qualitative des différents pics d'infections à entérovirus et à rhinovirus au cours de l'année.

Graphique 2. Biodisponibilité des composés évalués pour leur efficacité contre EV-A71, en fonction de leur solubilité et leur perméabilité.

Graphique 3. Evolution des concentrations d'AB113 des différents compartiments selon leur position, à différentes concentrations initiales et en fonction du temps.

Graphique 4. Spectres à différents pH du composé AB113 et de son dérivé hydrochloré.

Graphique 5. Biodisponibilité, perméabilité et solubilité calculé par GastroPlus™ des composés de la chimiothèque.

Liste des Schémas

Schéma 1. Structure schématique des Entérovirus, comportant la capside et l'ARN, dont l'extrémité 5', les parties codantes pour les protéines structurales et non-structurale et l'extrémité 3'.

Schéma 2. Structure de la capside de la souche 11316 de l'EV-A71.

Schéma 3. Assemblage des protéines virales VP1, VP2 et VP3, brique élémentaire pour former les capsides des Entérovirus.

Schéma 4. Structure de l'ARN entéroviral.

Schéma 5. Cycle de réplication des Entérovirus.

Schéma 6. Capside annotée des différents sites de liaison avec les récepteurs des membranes plasmiques, ainsi que les zones ciblées par les inhibiteurs d'entrée.

Schéma 7. Mécanismes induits par le virus liés au détournement du système de traduction de la cellule hôte, inspiré de la référence 52.

Schéma 8. Différents sites de clivage de la polyprotéine des Entérovirus.

Schéma 9. Formation des vésicules à double membrane, inspiré de la référence 78.

Schéma 10. Complexe de réplication virale, inspiré de la référence 94.

Schéma 11. Mécanismes d'exacerbation ou d'inhibition de l'apoptose par les Entérovirus.

Schéma 12. Mécanismes de sortie de la cellule non-lytiques.

Schéma 13. Réponse immune innée et inhibition par les Entérovirus.

Schéma 14. Réponse immune adaptive et réponse des Entérovirus.

Schéma 15. Evolution des techniques d'identification d'un virus pour le choix de classification au sein des Entérovirus.

Schéma 16. Système de classification des Entérovirus (1940 – 1970).

Schéma 17. Système de classification des Entérovirus (1970 – 2000).

Schéma 18. Système de classification des Entérovirus (2000 jusqu'à aujourd'hui).

Schéma 19. Schéma des différents modes de contamination par la voie fécale.

Schéma 20. Schéma des différents moyens de contamination par aérosols.

Schéma 21. Interactions identifiées entre le sommet de l'axe quintuple de la capside et les dendrimères.

Schéma 22. Interactions identifiées entre le sommet de l'axe quintuple de la capside et le dendrimère 28.

Schéma 23. Différentes conformations de l'alcool secondaire et ses interactions avec la capside.

Schéma 24. Représentation du modèle d'absorption et de transit compartimental avancé.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Taxonomie des Entérovirus selon le 10ème rapport de l'ICTV.

Tableau 2. Co-récepteurs d'attachement entéroviral à la membrane cellulaire.

Tableau 3. Récepteurs permettant l'attachement et l'endocytose des virus dans les cellules.

Tableau 4. Récepteurs membranaires déclenchant le changement de conformation de la capside nécessaire pour le relargage de l'ARN dans le cytoplasme.

Tableau 5. Système et périodicité d'EV détectés aux Etat-Unis (1970 – 2020).

Tableau 6. Age majoritaire observé chez les patient·es infecté·es par des EV (1970 – 2005, Etats-Unis).

Tableau 7. Résumé des activités antivirales des macromolécules.

Tableau 8. Comparaison des activités et des cytotoxicités des différents composés les plus efficaces issus de la modulation de la fonction cyanure avec celles du LPCRW_0005.
Tableau 9. Comparaison des activités et des cytotoxicités des énantiomères (*S*) des molécules du tableau 8.

Tableau 10. Comparaison des activités et des cytotoxicités des composés possédant un linker éther.

Tableau 11. Liste non exhaustive des solvants, des bases, des métaux, des fonctions contenant du bore et des substrats fonctionnalisés avec du bore généralement utilisés dans les couplages de Suzuki-Miyaura.

Tableau 12. Classement selon la présence d'effet α, neutre ou inverse.

Tableau 13. Différentes activités contre HRV-B14 des inhibiteurs les plus actifs précédemment synthétisés.

Tableau 14. Comparaison de six paramètres liés à l'absorption pour les composés actifs, évalués *in silico* grâce au logiciel GastroPlus™.

Tableau 15. Comparaison de la solubilité, de la perméabilité et de la biodisponibilité des composés les plus prometteurs, évalués *in silico* grâce au logiciel GastroPlus™, au site internet SwissADME et à l'algorithme FAFDrugs4.1.

Tableau 16. Absorbance mesurée pour les pics à 245 nm et 334 nm de chaque molécule.

Tableau 17. Masses pesées et concentrations molaires pour les différentes solutions.

Tableau 18. Activité des différents sels hydrochlorés, méthylé ou ester de phosphate synthétisés contre EV-A71 sur les lignées cellulaires MRC-5 et RD.

Table des matières

Introduction Générale 39

Chapitre I : Introduction 45

A. Entérovirus – Un Genre de petits virus à ARN. 46

1) Structure des Entérovirus. 46

Présentation générale. 46

Structure de la capside. 47

Structure et fonctionnalité du génome viral. 50

2) Cycle de réplication virale. 51

Etape 1 – Entrée du virus dans la cellule. 51

Etape 2 – Relargage de l'ARN au sein du cytoplasme. 58

Etape 3 – Traduction de l'ARN viral. 60

Etape 4 – Réplication de l'ARN viral. 64

Etape 5 – Assemblage des nouveaux virions. 70

Etape 6 – Sortie ou expulsion de la cellule. 72

3) Réponse et résistance au système immunitaire. 75

Réponse immune innée. 75

Réponse immune adaptative. 76

Réponse des Entérovirus aux systèmes immunitaires. 76

4) Historique – Evolution de la classification entérovirale. 79

Découverte des premiers Entérovirus. 80

Première méthode pour classifier les types de virus. 82

Seconde classification et extension des types d'Entérovirus. 84

Classification actuelle et découverte des derniers Entérovirus. 87

B. Entérovirus – Virus ubiquitaires et pathologies associées. 92

1) Répartition mondiale des Entérovirus. 92

Répartition des espèces et des génotypes dans le monde. 92

2) Méthodes de diagnostic des infections à Entérovirus. 97

Principes des méthodes de diagnostic. 97

Recommandations européennes. 98

3) Mode de transmission des Entérovirus liés à l'hôte et à l'environnement...99

Voies de transmission. 99

Paramètres environnementaux. 103

4) Saisonnalité des Entérovirus.....104

Evolution des comportements saisonniers et annuels des Entérovirus. 104

Périodicité des épidémies selon les génotypes. 106

5) Effets de la pandémie de SARS-Cov2 sur les infections à EV/RV. 108

Chute des infections à Entérovirus en 2020. 108

Réémergence des Entérovirus exacerbée en période post-pandémie. 109

Limite des mesures « barrières » contre les Entérovirus. 111

6) Entérovirus d'intérêts : tableaux cliniques et patient·es.....112

Tableau clinique des RV. 112

Tableau clinique des EV. 115

7) Cout économique et social des Entérovirus. 125

C. Thérapeutiques contre les Entérovirus.....128

1) Traitements prophylactiques contre les Entérovirus. 128

Gestes barrières avant contamination entérovirale. 128

Vaccins contre les Entérovirus. 129

2) Traitement curatif pour lutter contre les Entérovirus. 132

Chapitre II : Recherches actuelles contre les Entérovirus – Positionnement du projet 133

A. Recherches d'inhibiteurs des Entérovirus en 2024. 135

1) Composés organiques de synthèse inhibant les Entérovirus. 135

Têtes de série par mécanisme d'action. 135

Petites molécules récemment développées. 140

"Non-Polio Enterovirus inhibitors: scaffold, targets, and potency, what's new?" Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Sciò, P.; Coluccia, A.; Vanelle, P.; Roche, M.**...140**

Molécules macromolaires inhibant les Entérovirus. 167

2) Composés biosourcés inhibant les Entérovirus. 177

Herbes médicinales provenant de la tradition chinoise. 177

Extraits de plantes non utilisées dans la médecine traditionnelle. 177

Composés de la famille des flavonoïdes. 179

3) Composés inorganiques inhibant les Entérovirus. 183

4) Biomédicaments et autres inhibiteurs des Entérovirus. 185

Biomédicaments. 185

Séquences nucléotidiques et peptidiques et leurs analogues. 188

Carbohydrates efficaces contre les Entérovirus. 192

B. Validation de la cible pour ce projet de thèse. 193

1) Accès aux cibles visées par les antiviraux selon l'étape de réplication inhibée. 193

Inhibiteurs de l'entrée du virus au sein des cellules et du relargage de l'ARN viral. 193

Inhibiteurs de la réplication, de la traduction de l'ARN viral et de l'assemblage des nouveaux virus. 195

2) Sélectivité des inhibiteurs. 196

Sélectivité trop importante – Spectre de virus inhibés restreints. 196

Manque de sélectivité et effets secondaires. 198

3) Résistances virales. 199

Caractère hautement recombinant des Entérovirus. *199*

Résistances acquises et sélection d'un virus résistant. *199*

Chapitre III : Contexte et méthodes utilisées dans ce projet 203

A. Présentation des travaux précédents à ce projet de thèse. 204

1) Contexte d'initiation du projet. 204

2) Mécanisme d'action du LPCRW_0005. 205

3) Pharmacomodulations réalisées pour augmenter l'affinité du LPCRW_0005 avec la poche hydrophobe de la capside. 207

Modulations des extrémités du LPCRW_0005. ..... *207*

Etudes des différents énantiomères des nouvelles molécules antirhinovirales. *209*

4) Elargissement du spectre des rhinovirus aux Entérovirus. 209

B. Méthodes utilisées. 213

1) Pharmacomodulation de nos composés en vue de l'obtention d'un inhibiteur à large spectre. 213

2) Etude *in silico* et *in vitro* des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de potentiels « *capsid binders* ». 215

3) Ciblage de plusieurs protéines virales à partir de plusieurs inhibiteurs. 217

C. Etude mécanistique et optimisation des conditions des réactions utilisées dans ce projet de thèse. 218

1) Couplage de Suzuki-Miyaura. 218

Principe général. *218*

Mécanisme réactionnel. *219*

Paramètres de réaction. *223*

2) Substitutions nucléophiles. 228

Substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2). *228*

Substitution nucléophile aromatique (S_NAr). *236*

Chapitre IV : Pharmacomodulation et optimisation des composés antiviraux 241

A. Étude pilote sur EV-A71 pour la synthèse d'inhibiteurs des Entérovirus. 243

1) Introduction. 243

"New Potent EV-A71 Antivirals Targeting Capsid." Roux, H.; Touret, F.; Coluccia, A.; Khoumeri, O.; Di Giorgio, C.; Majdi, C.; Sciò, P.; Silvestri, R.; Vanelle, P.; Roche, M. **244**

2) Discussion. 263

B. Étude d'inhibition à large spectre pour des dérivés bicycliques. 264

"Design and Synthesis of Novel Thioether Analogs as Promising Antiviral Agents: Evaluation of *In Vitro* Activity against Enteroviruses of Interest." Roux, H.; Touret, F.; Coluccia, A.; Sciò, P.; Bouzidi, H.S.; Di Giorgio, C.; Gattacceca F.; Khoumeri, O.; Silvestri, R.; Vanelle, P.; Roche, M. **..... 265**

Conclusion. 284

Chapitre V : Étude des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques 285

A. Absorption, distribution, métabolisme, élimination : aspects théoriques. 287

1) Absorption des médicaments par voie orale. 287

Présentation du concept d'absorption. *287*

Présentation de la prédiction informatique de l'absorption. *289*

2) Distribution des médicaments. 291

Paramètres propres aux médicaments. *291*

Paramètres dépendant des tissus infectés. *291*

3) Métabolisme des médicaments. 292

Première phase du métabolisme. *292*

Deuxième phase du métabolisme. *292*

Troisième phase du métabolisme. *293*

4) Élimination des médicaments. 294

Filtration glomérulaire. *294*

Sécrétion tubulaire. *294*

Réabsorption tubulaire. *294*

B. Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques *in silico* des inhibiteurs prometteurs. 295

1) Résultats et discussion. 295

Prédictions des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques par GastroPlus™. *295*

Comparaison de la solubilité, la perméabilité et la biodisponibilité des composés les plus prometteurs. *298*

Métabolites potentiels de nos composés les plus prometteurs. *299*

2) Méthodes utilisées. 301

Prédiction des propriétés physico-chimiques et paramètres pharmacocinétiques. *301*

Comparaison des modèles de GastroPlus™, SwissADME et FAFDrugs 4.1. ..... *301*

Prédictions de métabolites. *301*

C. Mesures *in vitro* de paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques. 302

1) Résultats et discussion. 302

Mesure de la perméabilité. 302

Mesure de la solubilité. 305

2) Méthodes. 307

Culture des cellules. 307

Préparation des solutions filles comportant le composé à étudier. 307

Simulation du passage de la barrière intestinale. 307

Dosage par chromatographie liquide à haute performance. 308

Calcul de la perméabilité apparente à partir des évaluations in vitro. 308

Mesure de l'absorbance d'AB113 et de son sel hydrochloré. 309

D. Génération *De Novo* de Composés aux Paramètres physicochimiques et Pharmacocinétiques Optimisés. 310

1) Résultats et discussion. 310

Rationalisation de la construction de la chimiothèque. 310

Analyse des propositions de composés aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés. 312

2) Méthodes. 314

Génération d'une chimiothèque de référence. 314

Génération de novo de composés aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés. 314

E. Synthèse de sels et autres dérivés avec une meilleure solubilité. 316

1) Résultats et discussion. 316

2) Méthodes de synthèse. 319

Perspectives. 320

1) Particularités pharmacocinétiques de la population pédiatrique. 320

2) Effet de l'alimentation sur l'absorption de médicaments. 320

3) Evaluation de la perméabilité des membranes à AB113. 322

4) Evaluation de la solubilité d'AB113. 322

5) Combinaison de l'optimisation des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques, et celle de l'activité antivirale. 322

Chapitre VI : Passage d'une molécule monocible à un agent inhibant plusieurs protéines 323

Etude de traitements ciblant plusieurs protéines virales à la fois pour dépasser les inconvénients soulignés dans les essais cliniques passés. 324

"From the "One Molecule – One Target – One Disease" Concept towards Looking for Multi-target Therapeutics for Treating Non-polio Enterovirus (Npev) Infections." Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Vanelle, P.; Roche, M. **.....324**

Conclusion. 367

Perspectives et Conclusion générale 369

Perspectives. 370

1) Pharmacomodulations envisagées. 370

Pharmacomodulation du linker. 370

Oxydation simulant les métabolites possibles. 382

2) Expériences biologiques complémentaires à considérer. 386

Évaluation de l'efficacité contre d'autres types de virus. 386

Etudes mécanistiques. 386

Conclusion Générale.....387

Annexes 391

Notes d’écriture :

Le genre **Entérovirus** sera orthographié ainsi, tandis que les différentes espèces d’entérovirus et de rhinovirus seront décrites respectivement par les abréviations **EV** et **RV**.

Les types de virus seront dénommés de la sorte : **AA-BXX**, avec **AA** la catégorie de virus (CV, E, EV, RV), **B** la sous-division de catégorie de virus (A, B, C, D) et **XX** le numéro associé au type de virus.

Les acides aminés seront, s’ils ne sont pas explicitement nommés, décrits par leur abréviation à lettre unique **X** suivie de leur numéro ### (**X###**).

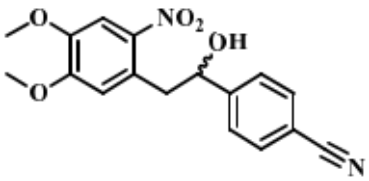
Introduction Générale

Les Entérovirus regroupent deux grands groupes de virus, les entérovirus (EV) et les rhinovirus (RV). Compte-tenu de la diversité au sein de leur classification, de la variabilité de leur répartition géographique et du nombre élevé de maladies qu'ils causent, les Entérovirus sont des virus importants à surveiller. Le paradoxe entre la multiplicité de leurs propriétés et leur ressemblance structurelle explique tout l'intérêt de ces agents pathogènes.

Ce sont des virus ubiquitaires avec des tableaux cliniques proches. Si l'on sait que l'agent pathogène appartient à ce genre, il n'est donc pas nécessaire de savoir quel type de virus précis déclenche l'infection virale.

Des épidémies sont régulièrement détectées depuis 2012. Par exemple, les entérovirus A71 et D68 ont été responsables d'importants clusters touchant de nombreux patient·es pédiatriques, respectivement en 2012 en Chine et en 2014 en Californie, avec des cas se multipliant depuis chaque année ou tous les deux ans. D'autres Entérovirus sont aussi observés localement. Les mesures appliquées lors de la pandémie du SARS-Cov2 ont permis la suspension de leur prolifération. Cependant, depuis deux ans, une recrudescence des infections en métropole responsables de différentes pathologies a été identifiée avec la création du Réseau Européen des Entérovirus Non-Polio, associant trente entités de dix-sept pays. En 2023, les niveaux de contamination étaient proches de ceux avant la pandémie de SARS-Cov2. Les ECHOvirus 9 et Coxsackievirus B5 ont été le plus fréquemment détectés durant cette année. Souvent, une vague d'infections est suivie d'autres ressacs. Ainsi, une alerte aux ECHOvirus 11 a été déclenchée par Santé Publique France en juillet 2023, avec le décès d'un nouveau-né. Elle a été suivie de contaminations à l'ECHOvirus 18 puis 9. Les prévisions de 2024 affirment que les mêmes niveaux, voire au-delà, pourraient être atteints. Deux décès dus à des infections à Entérovirus sont déjà à dénombrer en 2024. De plus, les infections touchent de plus en plus des patient·es ayant plus de quinze ans, ce qui diffère de la cible principale des Entérovirus (nouveaux-né·es, enfants, personnes immunodéprimées).

L'équipe de Pharmaco-Chimie Radicalaire de l'Institut de Chimie Radicalaire porte depuis 2007 un projet ayant pour but la synthèse de molécules à visée antivirale. Après un screening sur la chimiothèque associée du laboratoire, une activité contre le rhinovirus B14 a été identifiée pour le composé **LPCRW_0005**. Des études mécanistiques ont permis d'affirmer que ce composé agissait en se liant de manière non-covalente à une poche hydrophobe de la protéine virale VP1 des virus.

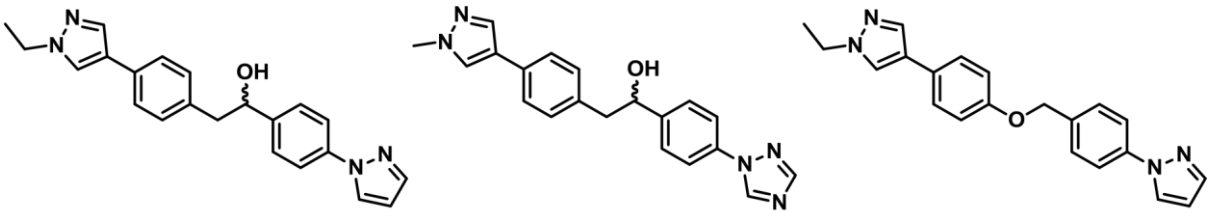


LPCRW_0005

Type de virus	$CE_{50,HeLa}$	Type de virus	$CE_{50,HeLa}$
RV-A9	40 ± 9 µM	RV-B70	46 ± 22 µM
RV-B14	2,0 ± 0.6 µM	RV-B72	7,4 ± 0,5 µM
RV-A59	6 ± 2 µM	RV-B86	3,5 ± 0,8 µM
RV-A63	9 ± 3 µM		

Suite à ces résultats obtenus au sein de notre équipe, des travaux de pharmacomodulation ont été effectuée afin d'augmenter l'affinité de ce composé ainsi que le panel de rhinovirus cibles, en jouant sur les extrémités autant que sur le linker central.

De nouvelles interactions ont ainsi été identifiées, principalement hydrophobes. De même, le rajout de pharmacophores aux extrémités a permis d'augmenter le nombre de rhinovirus ciblés.



78 81 134

Molécules	78	81	134
$CE_{50,HeLa}$ (µM) [RV-B14]	0,042 ± 0,010	0,028 ± 0,013	< 2,4
$CC_{50,HeLa}$ (µM)	> 247	> 256	> 100
IS	> 5881	> 9143	> 41

La poche hydrophobe du canyon est la cible d'un type d'inhibiteur des Entérovirus, les « *capsid binders* ». Il existe différents types d'inhibiteurs. Certains ont une action directe en visant les cibles protéines. D'autres agissent indirectement en empêchant l'activité de facteurs de l'hôte contribuant à la réplication virale. Parmi cette diversité de composés, les « *capsid binders* » restent les plus étudiés avec de nombreux projets de recherches menés en parallèle. Cependant, à ce jour, aucun composé n'a obtenu d'autorisation de commercialisation, malgré la quantité importante de données pré-cliniques. En effet, les nombreux essais cliniques menés dans le cadre de projets contre les Entérovirus n'ont pas été fructueux à cause du manque d'efficacité ou d'une balance bénéfices – risques défavorable.

C’est dans cette optique de répondre à un besoin global que mon projet de thèse s’inscrit avec le sujet suivant :

« Synthèse de nouveaux inhibiteurs des Entérovirus à large spectre »

L’objectif principal de ma thèse sera donc la conception d’une molécule ayant une activité la plus large possible sur l’ensemble des Entérovirus. Afin de limiter les essais et en regroupant les différents types de virus, nous rechercherons une activité sur l’EV-A71, l’E30 et le CVA24, représentant respectivement les EV-A, EV-B et EV-C.
Outre la recherche d’activité antivirale, nous souhaitons aussi faire une évaluation des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés synthétisées.
Ce manuscrit sera présenté sous forme d’une thèse sur articles comprenant quatre publications internationales, respectivement dans le journal *ACS Infectious Diseases*, l’*European Journal of Medicinal Chemistry* et le journal *Pharmaceuticals*.

Le **Chapitre I** sera une introduction précise au contexte dans lequel s’intègre ce projet de thèse. Il est divisé en trois parties.

Une première partie présentera les Entérovirus comme entité virale, à savoir leur structure, leur mode de réplication et l’origine complexe de leur classification.
Une seconde partie s’attardera sur la répartition géographique et les maladies associées aux Entérovirus. Elle regroupera ainsi la répartition entérovirale à travers le monde, les méthodes de détection et leurs limites, les moyens de propagation et les dynamiques saisonnières. Enfin, un dernier paragraphe s’intéressera aux maladies associées aux Entérovirus et les coûts économique et social associés.
Une troisième partie abordera les différents moyens actuels de lutte contre les Entérovirus. Les moyens de prévention seront décrits, à travers les solutions vaccinales et d’hygiène. Enfin, les différents moyens de réponse aux symptômes provoqués par les infections à Entérovirus seront évoqués.

Le **Chapitre II** dressera l'état de l'art de la recherche d'inhibiteurs des Entérovirus la plus récente et présentera comment ce projet de thèse s'y positionne.
Dans une première partie, différents composés évalués ces dernières années seront décrits à la fois dans une publication soumise au journal *ACS Infectious Disease* mais aussi à travers différentes sections rédigées : des composés organiques de synthèse, issus d'organismes vivants, inorganiques et d'origine biologique.
La seconde partie s'intéressera au positionnement de notre projet dans les différentes dynamiques de recherche, mettant en exergue pour chaque section un critère capable de limiter l'efficacité des composés envisagés.

Le **Chapitre III** détaillera le contexte et les méthodes de ce projet de thèse en trois parties.
La première partie s'intéressera aux travaux précédemment réalisés afin de présenter l'historique du projet de synthèse de « *capsid binder* » porté par le laboratoire de PharmacoChimie Radicalaire.
La seconde partie décrira les différentes méthodes utilisées pour la pharmacomodulation des composés à synthétiser, leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques et les perspectives de cibler plusieurs protéines à la fois avec un seul composé.
Enfin, dans une dernière partie, nous décrirons les différentes réactions utilisées pour la pharmacomodulation de nos composés. Nous détaillerons aussi leurs mécanismes réactionnels ainsi que les différents paramètres influençant ces réactions.

Le **Chapitre IV** présentera, quant à lui, les différentes pharmacomodulations effectuées pour atteindre le premier objectif de ce projet de thèse, à savoir la synthèse d'un inhibiteur efficace à large spectre. Il se découpera en deux parties.
Une première partie s'articulera autour de la modulation des pharmacophores aromatiques de nos composés afin d'étudier les interactions et d'obtenir un inhibiteur de l'entérovirus A71.
Une seconde partie décrira les différentes modifications structurelles permettant d'élargir l'activité contre l'entérovirus A71 aux entérovirus B et C, respectivement représentés par l'ECHOvirus 30 et le Coxsackievirus A24.

Le **Chapitre V** s'attachera à l'étude des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés synthétisés à travers six parties.

Une première partie détaillera les connaissances théoriques liées à l'évaluation des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques, dans notre cas, liés à l'absorption et la métabolisation des médicaments lors d'une prise orale.

La seconde partie de ce chapitre sera consacrée aux différents paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques (absorption / métabolisation) calculés avec GastroPlus™ pour chacun de nos composés synthétisés.

La troisième partie décrira les évaluations *in vitro* de la solubilité et la perméabilité de nos composés. La solubilité sera évaluée par spectroscopie UV-visible et régression linéaire. La mesure expérimentale de la perméabilité nécessite la culture de Caco-2 séparant deux compartiments, afin de mimer la barrière intestinale. Le dosage de la concentration de part et d'autre de cette membrane cellulaire nous permet d'atteindre une valeur expérimentale par chromatographie liquide à haute performance.

La quatrième partie décrira les travaux en bio-informatique pour prédire les paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques de nos composés, ainsi que la mise en place d'un algorithme utilisant l'intelligence artificielle afin de proposer des structures de composés ayant les meilleurs critères sur le plan pharmacocinétique.

La cinquième partie détaillera les synthèses de sels effectuées afin de vérifier nos hypothèses de travail sur le lien entre l'activité antivirale de nos composé et leurs paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques.

Enfin, la dernière partie sera consacrée aux perspectives à court terme de ce travail de prédiction, de mesure de ces paramètres et de génération de nouvelles molécules optimisées.

Le **Chapitre VI** possèdera une seule partie.

Elle se tournera vers une étude d'optimisation de la drugabilité des composés et une analyse des stratégies multi-cibles en proposant une analyse innovante sur des molécules combinées, chimériques ou liées. Les différents avantages et contraintes de ces stratégies, ainsi que les alternatives, y seront discutées.

Enfin, une conclusion et des perspectives concluront ce manuscrit centré sur la recherche de composés antientéroviraux à large spectre.

Chapitre I : Introduction

A. Entérovirus – Un Genre de petits virus à ARN.

1) Structure des Entérovirus.

Présentation générale.

Le terme Entérovirus désigne un genre de virus défini selon des caractères génétiques communs.[1] Ils font partie de la famille des Picornavirus. Il s'agit de petits virus, avec un diamètre de 30 à 32 nanomètres.[2] Ils possèdent une capside icosaédrique non enveloppée et à simple brin d'ARN à sens positif [**Schéma 1**].

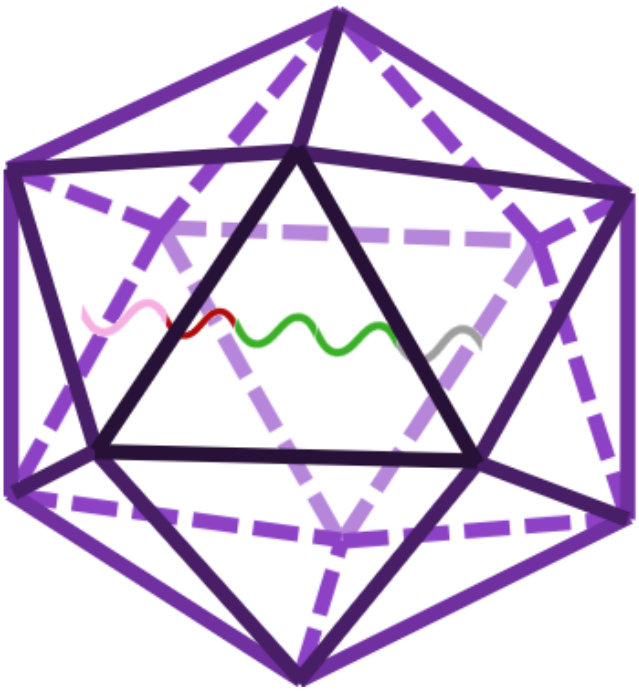


Schéma 1. Structure schématique des Entérovirus, comportant la capside (violet) et l'ARN, dont l'extrémité 5' (rose), les parties codantes pour les protéines structurales (rouge) et nonstructurale (vert) et l'extrémité 3' (gris).

Les Entérovirus sont actuellement composés de quinze espèces, dont sept pathogènes pour l'être humain, rassemblées en deux grands sous-genres [**Tableau 1**]. Les entérovirus (EV) possèdent une grande diversité de virus (EV-A = 23 génotypes dont des Coxsackievirus A (CVA), et les EV-A / EV-B = 60 génotypes dont des CVA, les CVB, les ECHOvirus (E), et les

[1] Page de présentation des Entérovirus. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

[2] Page de présentation des Picornavirus. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

EV-B / EV-C = 23 génotypes dont des CVA, les EV-C, et les Poliovirus (PV) / EV-D = 5 génotypes).[1,3,4,5,6] Les rhinovirus humains (RV) comportent aussi de nombreux virus (RV-A : 80 génotypes / RV-B : 30 génotypes / RV-C : 57 génotypes). Ces génotypes sont aussi divisés en clades, regroupement le plus petit de la classification phylogénétique, nommés par des lettres (EV-A71 A, B, C, D, E par exemple).

Les caractéristiques communes des EV-A à EV-D sont leur densité mesurée dans le chlorure de césium (1.30-1.34 $g.cm^{-3}$), leur température de réplication optimale à 37 °C ainsi que leur résistance aux pH acides (pH 3).[1,7,8] Cette dernière caractéristique permet à ces virus de pouvoir atteindre le tractus intestinal, d'où leur nom d'entérovirus. Pour les RV, la densité est similaire, cependant, leur température optimale de réplication est située autour de 33 °C avec une faible résistance aux pH acides.

Structure de la capside.

Les capsides icosaédriques des Entérovirus sont issues de la polymérisation de blocs essentiels constitués des protéines virales 1, 2, 3 et 4 (VP1-4) [**Schéma 2**]. Ces protéines structurales se rassemblent en 60 tétramères pour former le virion. La protéine VP4 est tournée vers l'intérieur et n'est donc pas exposée à la surface du virus. Les faces visibles des autres protéines structurales peuvent être assimilées à des trapèzes isocèles visibles sur le **Schéma 3**. Quelques structures remarquables de la capside peuvent être observées. En effet, les protéines VP1, une fois assemblées en pentamère, possèdent une dépression circulaire continue appelée « canyon ». Un co-facteur est souvent inséré dans une poche hydrophobe permettant la stabilité conformationnelle de la capside. De même, à la jointure des 5 protéines VP1 du pentamère, se trouve un sommet creux appelé « sommet de l'axe quintuple ». Enfin, à l'opposé des tétramères composés des 4 protéines structurales, la jointure de 3 protéines VP3 forment de la même manière un sommet creux appelé « sommet de l'axe triple ». Ces structures particulières sont importantes pour la stabilité et la réplication du virus, détaillées ci-dessous.

---

[3] Page de présentation de l'espèce Entérovirus-A. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

[4] Page de présentation de l'espèce Entérovirus-B. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

[5] Page de présentation de l'espèce Entérovirus-C. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

[6] Page de présentation de l'espèce Entérovirus-D. International Committee on Taxonomy of Virus. Lien.

[7] Bessaud, M.; Blondel, B.; Joffret, M.L.; Mac Kain, A.; Delpeyroux, F. *Virologie (Montrouge)*. **2018**, *22* (6), 289303. DOI: 10.1684/vir.2018.0756.

[8] Nasukawa, T.; Uchiyama, J.; Taharaguchi, S.; Ota, S.; Ujihara, T.; Matsuzaki, S.; Murakami, H.; Mizukami, K.; Sakaguchi, M. *Arch. Virol*. **2017**, *162* (11), 3523-3528. DOI: 10.1007/s00705-017-3513-z.

Tableau 1. Taxonomie des Entérovirus selon le 10ème rapport de l'ICTV.[1]

Famille	Genre	Espèce	Sous-groupe	Types de virus
Picornavirus	Entérovirus	EV-A	CVA	2-8, 10, 12, 14, 16 71, 76, 89-92, 114, 119-125
		EV-B	CVA	9
			CVB	1-6
			E	1-9, 11-21, 24-27, 29-33 69, 73-75, 77-88, 93, 97-98, 100-101, 106-107, 110-114
		EV-C	CVA	1, 11, 13, 17-22, 24
				95-96, 99, 102, 104-105, 109, 113, 116-118
			PV	1-3
		EV-D		68, 70, 94, 111, 120
		RV-A		1-2, 1B, 7-13, 15-16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 45-47, 49-51, 53-68, 71, 73- 78, 80-82, 85, 88-90, 94, 96, 100-108
		RV-B		3-6, 14, 17, 26-27, 35, 37, 42, 48, 52, 69-70, 72, 79, 83-84, 86, 91-93, 97, 99-104
		RV-C		1-57
		EV non humains		E1-5, F1-7, G1-20, H1, I1-2, J1, J103, J108, J112, J115, J121, K1-2, L1

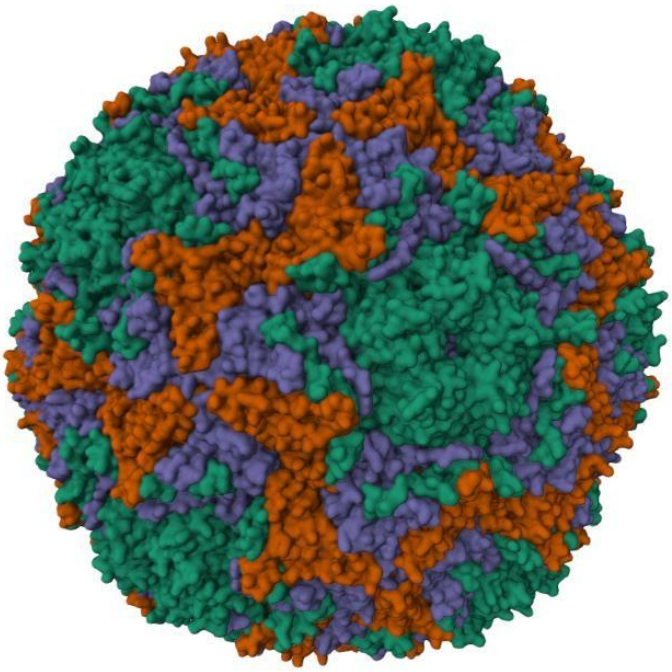


Schéma 2. Structure de la capside de la souche 11316 de l'EV-A71 (code pdb : 6UH1).[9] Les protéines virales 1, 2 et 3 (VP1, VP2, VP3) sont respectivement représentées en vert, orange et violet. La protéine structurale VP4 n'apparait pas à la surface extérieure de la capside.

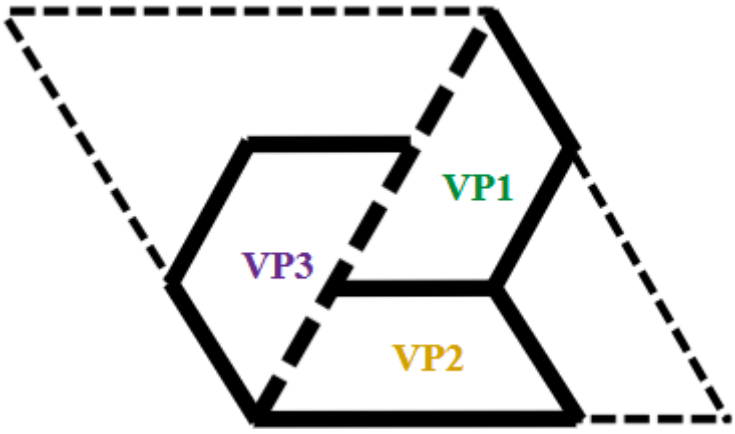


Schéma 3. Assemblage des protéines virales VP1, VP2 et VP3, brique élémentaire pour former les capsides des Entérovirus. Les triangles en traits discontinus représentent une face de la capside.

[9] Structure de l'EVA-71. RCSB Protein Data Bank. Lien.

Structure et fonctionnalité du génome viral.

Les capsides ne contiennent qu'un seul brin d'ARN positif monocaténaire de polarité positive. En plus des extrémités 5' et 3' non traduites, il code pour 4 protéines structurales et 7 protéines non structurales [**Schéma 4**] : la partie 5' non-codante (5'UTR) contenant un *Internal Ribosome Entry Site* (IRES), suivie d'un seul cadre de lecture ouvert codant pour une polyprotéine, puis une partie 3' non codante (3'UTR). Cette poly-protéine est ensuite coupée par les protéases virales en trois précurseurs P1, P2 et P3. La partie P1 code pour les protéines structurales VP14, avec un intermédiaire VP0 rassemblant VP2 et VP4. Les deux autres parties P2 et P3 codent pour les protéines 2A, 2B, 2C et 3A, 3B, 3C et 3D, incluant les intermédiaires 2BC, 3AB et 3CD. Les protéines 2A et 3C ont la particularité d'être des protéases clivant l'ARN à différents endroits. Quant à la protéine 3D, c'est une ARN polymérase ARN-dépendante permettant la réplication virale.

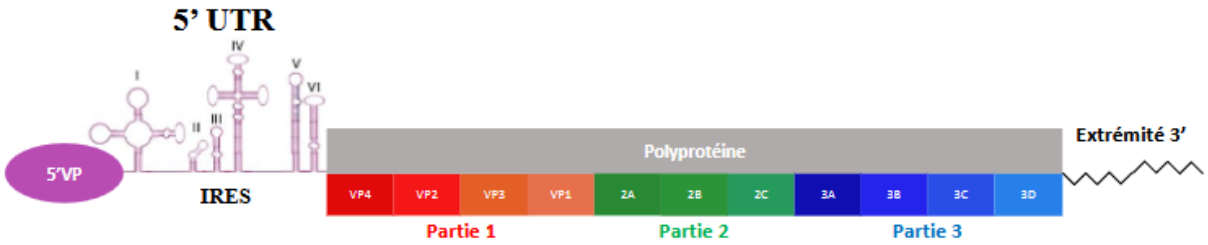


Schéma 4. Structure de l'ARN entéroviral.

Toutes les protéines, qu'elles soient structurales ou non-structurales, sont essentielles au cycle de réplication virale. Ce dernier sera présenté dans la section ci-dessous ainsi que les interactions entre le système immunitaire de l'hôte afin de décrire et contextualiser les différentes cibles des inhibiteurs directs des Entérovirus. De même, les Entérovirus perturbent les mécanismes propres à l'hôte pour exacerber sa réplication. C'est pourquoi ces interactions seront décrites afin d'expliquer les choix d'agents inhibant le métabolisme cellulaire promouvant la réplication virale.

2) Cycle de réplication virale.

Le cycle de réplication des Entérovirus repose sur six étapes : l'entrée, le relargage de l'ARN viral dans les cellules, la réplication et la traduction de l'ARN, puis l'assemblage des nouveaux virions et leur sortie de la cellule [**Schéma 5**].

Etape 1 – Entrée du virus dans la cellule.

La première étape du cycle de réplication virale consiste en l'entrée du virus au sein de la cellule. Elle se découpe en deux étapes : l'attachement du virus à la cellule puis l'entrée à travers la membrane par endocytose. Plusieurs voies d'entrée ont été identifiées selon les types de virus associés [**Schéma 6**]. La reconnaissance du virus par la membrane cellulaire s'effectue par différents récepteurs, dont ceux associés à la superfamille des immunoglobulines. Deux types d'entités seront présentées : celles qui ne participent qu'à l'attachement du virus à la membrane cellulaire, et celles qui permettent aussi d'enclencher l'endocytose du virus.

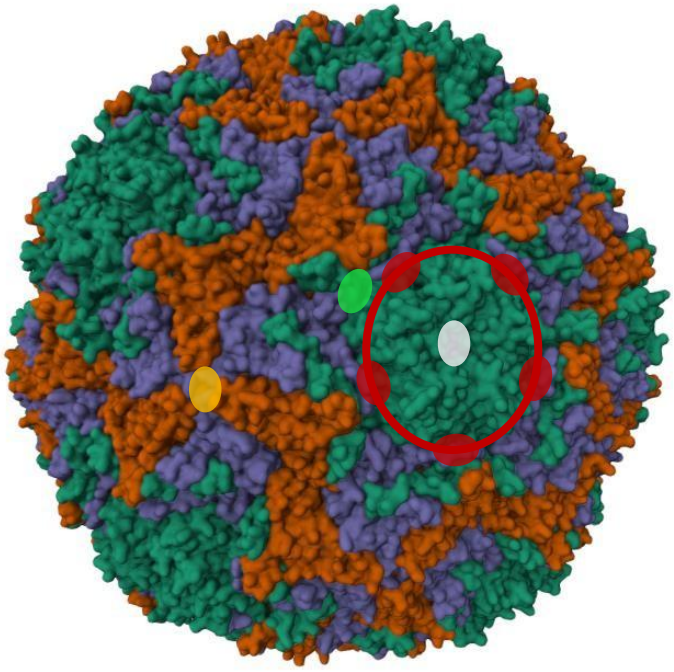


Schéma 6. Capside annotée des différents sites de liaison (trait plein – en rouge foncé, le canyon) avec les récepteurs des membranes plasmiques, ainsi que les zones ciblées par les inhibiteurs d'entrée (zones transparentes – en rouge foncé, la poche hydrophobe classique – en vert pomme, la poche dite R219 – en blanc, le sommet de l'axe quintuple – en orange, le sommet de l'axe triple).[9]

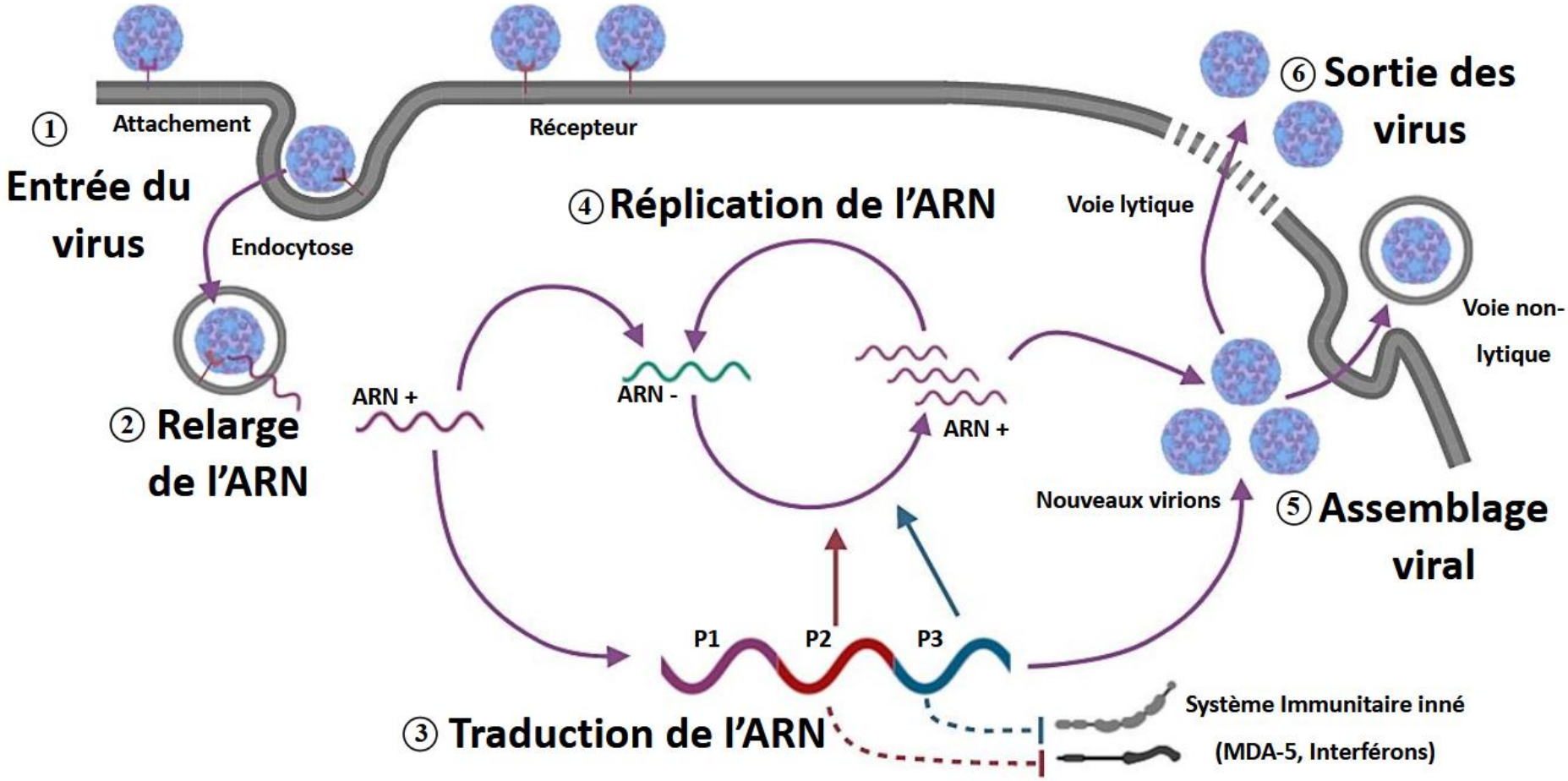


Schéma 5. Cycle de réplication des Entérovirus.

Co-Récepteurs permettant l'attachement du virus à la membrane plasmique.

Les co-récepteurs permettant l'accroche du virus sur les cellules les maintiennent au contact de la membrane ce qui augmente leur opportunité d'y rentrer par endocytose. Elles peuvent cibler différentes parties de la capside, à savoir les protéines VP1 et VP3 [**Tableau 2**].

La cyclophiline (Ccl) et la fibronectine (Fbn) ciblent la boucle H1 de la protéine VP1.[10] La fibronectine cible la boucle virale RGD qui permet de la lier aux intégrines. La nucléoline (Ncl) se lie, quant à elle, au canyon, se situant aussi sur la VP1.[10] Aussi, le sommet de l'axe quintuple, rassemblant 5 protéines VP1, peut se lier à l'acide sialique (AcS) ou aux entités sulfatées, comme le sulfate d'héparane (SH), de la membrane plasmique.[10,11,12]

La protéine VP3 peut se lier par sa boucle BC à l'annexine II (AnxII) ou la vimentine (Vmt).[10]

Enfin, d'autres co-récepteurs ont été identifiés comme augmentant l'accroche virale sans savoir précisemment quelle partie virale est reconnue. Ainsi, les RV peuvent s'attacher à la cellule par les cadhérines (Cdh), les lipoprotéines (à basse densité (LBD), à très basse densité (LTBD), ou relatifs aux protéines (LBDpro)) présentes à sa surface.[13,14] De même, plusieurs virus peuvent utiliser la prohibitine (Phb) et les tryptophanyl-ARNt synthétases (T-ARNt-S) pour se fixer à la membrane.[10,15]

---

[10] Kobayashi, K.; Koike, S. *J. Biomed. Sci*. **2020**, *27* (1), 23. DOI: 10.1186/s12929-020-0615-9.

[11] Baggen, J.; Hurdiss, D.L.; Zocher, G.; Mistry, N.; Roberts, R.W.; Slager, J.J.; Guo, H.; van Vliet, A.L.W.; Wahedi, M.; Benschop, K.; Duizer, E.; de Haan, C.A.M.; de Vries, E.; Casasnovas, J.M.; de Groot, R.J.; Arnberg, N.; Stehle, T.; Ranson, N.A.; Thibaut, H.J.; van Kuppeveld, F.J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2018**, *115* (2), 397-402. DOI: 10.1073/pnas.1713284115.

[12] Yamayoshi, S.; Fujii, K.; Koike, S. *Emerg. Microbes. Infect*. **2014**, *3* (7), e53. DOI: 10.1038/emi.2014.49.

[13] Hofer, F.; Gruenberger, M.; Kowalski, H.; Machat, H.; Huettinger, M.; Kuechler, E.; Blaas, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **1994**, *91* (5), 1839-1842. DOI: 10.1073/pnas.91.5.1839.

[14] Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, Palmenberg AC, Gern JE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2015**, *112* (17), 5485-5490. DOI: 10.1073/pnas.1421178112.

[15] Baggen, J.; Thibaut, H.J.; Strating, J.R.P.M.; van Kuppeveld, F.J.M. *Nat. Rev. Microbiol*. **2018**, *16* (6), 391. DOI: 10.1038/s41579-018-0022-3.

Tableau 2. Co-récepteurs d'attachement entéroviral à la membrane cellulaire.

Co-récepteur de liaison	Types de virus confirmés	Partie de la capside liée à la membrane
Cyclophiline	EV-A71	Boucle H1 (VP1)
Fibronectine	EV-A71	Canyon (VP1)
Nucléoline	EV-A71	
Acide sialique	CVA24v, EV-A71, EV-D70	Sommet de l'axe quintuple (VP1)
Entités sulfatées	EV-A71	
Tyrosylsulfotranférase	EV-A71	
Sulfate d'héparane	CVA24v, EV-A71, EV-D70	
Annexine II	EV-A71	Boucle BC (VP3)
Vimentine	EV-A71	
Cadhérine	RV	NP
GPGT[a]	EV-A71	
LBD[b]	RV	
LBDpro[c]	RV	
LTBD[d]	RV	
Prohibitine	EV-A71	
TAPP[e]	EV-A71	
T-ARNt-S[f]	CVA6, CVA16, E6, E11, E25, E30, EV-A71, EV-D68	

[a] Galactosylxylosyl protéine 3-β-glucuronosyltranférase 3.

[b] Lipoprotéines à basse densité.

[c] Lipoprotéines à basse densité relatives aux protéines.

[d] Lipoprotéines à très basse densité.

[e] Transporteur d'adénosine 3'-phospho-5'-phosphosulfate 1. [f] Tryptophanyl-ARNt synthétase.

NP = non précisé.

Récemment, l'absence de galactosylxylosyl protéine 3-β-glucuronosyltranférase 3 (GPGS) ou de transporteur d'adénosine 3'-phospho-5'-phosphosulfate 1 (TAPP) a mené à une baisse du nombre de liaisons aux cellules et d'internalisation des virus.[16] Les TAPP régulent aussi la production de sulfate d'héparane. De même, les molécules sulfatées, comme la tyrosylsulfotransférase (Tst), ont aussi été identifiées comme facilitatrices d'attachement viral à la cellule.

Récepteurs permettant l'attachement du virus à la membrane plasmique et son endocytose.

D'autres récepteurs induisent aussi l'endocytose du virus au sein de la cellule, en plus de les lier à la membrane plasmique. Ici, seules certaines parties de la protéine VP1 ont été identifiées comme reconnues par ces récepteurs [**Tableau 3**].

Deux types d'endocytoses ont été identifiées : celle médiée par la cavéole et celle par la clathrine.[17] Dans les deux cas, le cholestérol membranaire joue un rôle important.

L'endocytose médiée par la cavéole est associée au récepteur ligand de la glycoprotéine *p*-sélectine 1 (PSGL-1), permettant l'attachement du virus à la membrane.[17] Ce ligand, par sa région *N*-terminale, reconnait le sommet de l'axe quintuple, grâce à sa ressemblance aux immunoglobulines.[18] Les leucocytes sont ainsi infectés du fait de leur forte expression de PSGL-1. Les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_6$ impliquent aussi cette voie d'entrée.[19,20,21] Les deux dernières intégrines reconnaissent le motif RGD de la boucle H1 de la protéine VP1.

---

[16] Guo, D.; Yu, X.; Wang, D.; Li, Z.; Zhou, Y.; Xu, G.; Yuan, B.; Qin, Y.; Chen, M. *J. Virol*. **2022**, *96* (9), e0204221. DOI: 10.1128/jvi.02042-21.

[17] Lin, H.Y.; Yang, Y.T.; Yu, S.L.; Hsiao, K.N.; Liu, C.C.; Sia, C.; Chow, Y.H.. *J. Virol*. **2013**, *87* (16), 90649076. DOI: 10.1128/JVI.00573-13.

[18] Nishimura, Y.; Shimojima, M.; Tano, Y.; Miyamura, T.; Wakita, T.; Shimizu, H. *Nat. Med*. **2009**, *15* (7), 794797. DOI: 10.1038/nm.1961.

[19] Marjomäki, V.; Pietiäinen, V.; Matilainen, H.; Upla, P.; Ivaska, J.; Nissinen, L.; Reunanen, H.; Huttunen, P.; Hyypiä, T.; Heino, J. *J. Virol*. **2002**, *76* (4), 1856-1865. DOI: 10.1128/jvi.76.4.1856-1865.2002.

[20] Williams, C.H.; Kajander, T.; Hyypiä, T.; Jackson, T.; Sheppard, D.; Stanway, G. *J. Virol*. **2004**, *78* (13), 6967-6973. DOI: 10.1128/JVI.78.13.6967-6973.2004.

[21] Bergelson, J.M.; St John, N.; Kawaguchi, S.; Chan, M.; Stubdal, H.; Modlin, J.; Finberg, R.W. *J. Virol*. **1993**, *67* (11), 6847-6852. DOI: 10.1128/JVI.67.11.6847-6852.1993.

Une autre voie implique la β2-microglobuline, la dynamine et le facteur de ribosylation de l'ADP 6 qui permettent l'endocytose de ces virus. [22]

Tableau 3. Récepteurs permettant l'attachement et l'endocytose des virus dans les cellules.

Récepteur membranaire	Types de virus confirmés	Partie de la capside liée à la membrane
Intégrine $\alpha_V\beta_3$	CVA9, EV-A71	Boucle H1 (VP1)
Intégrine $\alpha_V\beta_6$	CVA9, EV-A71	
LIMP2/SCARB2[a]	EV-A71	
CD54/ICAM1[b]	CVA21, CVA24, RV-B14, RV-A16	Canyon (VP1)
PSGL-1[c]	CVA16, EV-A71	Sommet de l'axe quintuple (VP1)
KREMEN1	CVA10	NP
Intégrine $\alpha_2\beta_1$	EV-A71, E1, E8	
CD55/DAF[d]	E1, E6, E7, E8, E11, E12, E13, E18, E20, E21, E29,	
rFnC[e]	E33	

[a] Protéine membranaire intégrale lysosomale 2.

[b] Molécule d'adhésion intercelullaire 1.

[c] Ligand de la glycoprotéine *p*-sélectine 1.

[d] Facteur accélérant le destin.

[e] Récepteur du fragment néonatal cristallisable.

D'autres récepteurs se lient, quant à eux, au canyon de la capside virale. La protéine membranaire intégrale lysosomale 2 (LIMP-2 ou SCARB2) sollicite la voie médiée par la clathrine.[23,24]

[22] Heikkilä, O.; Susi, P.; Tevaluoto, T.; Härmä, H.; Marjomäki, V.; Hyypiä, T.; Kiljunen, S. *J. Virol*. **2010**, *84* (7), 3666-3681. DOI: 10.1128/JVI.01340-09.

[23] Yamayoshi, S.; Yamashita, Y.; Li, J.; Hanagata, N.; Minowa, T.; Takemura, T.; Koike, S. *Nat. Med*. **2009**, *15* (7), 798-801. DOI: 10.1038/nm.1992.

[24] Tseligka, E.D.; Sobo, K.; Stoppini, L.; Cagno, V.; Abdul, F.; Piuz, I.; Meylan, P.; Huang, S.; Constant, S.; Tapparel, C. *PLoS Pathog*. **2018**, *14* (8), e1007190. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007190.

De même, la protéine ICAM-1 (ou CD54) participe aussi à cette voie, notamment pour les RV.[11,25,26,27] C'est la partie *N*-terminale de la protéine qui permet de se lier au canyon. La protéine inter-membranaire KREMEN1 reconnait aussi la protéine VP1 grâce à son domaine extracellulaire.[28] Aussi, le récepteur Fc (rFnC) permet l'attachement des Entérovirus en interagissant avec son canyon.[29,30] Enfin, le facteur accélérant le déclin (CD55/DAF) permet aux E de rentrer dans les cellules hôtes sans que l'on connaisse avec précision le mécanisme d'action.[31,32,33] Les endophilines, les substrats de la voie reconnaissant la toxine botulique C3 liés au protéines RAS 1 ou les rFnC permettent aussi le déclenchement de l'endocytose du virus et son entrée.[20,24,25,34,35] Les vésicules formées ont un pH neutre, notamment avec l'action de KREMEN1.[19,34,36] Elles sont ensuite maturées pour permettre la prochaine étape du cycle viral, le relargage de l'ARN au sein du cytoplasme.

---

[25] Kolatkar, P.R.; Bella, J.; Olson, N.H.; Bator, C.M.; Baker, T.S.; Rossmann, M.G. *EMBO J.* **1999**, *18* (22), 6249–6259. DOI: 10.1093/emboj/18.22.6249.

[26] Olson, N.H.; Kolatkar, P.R.; Oliveira, M.A.; Cheng, R.H.; Greve, J.M.; McClelland, A.; Baker, T.S.; Rossmann, M.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **1993**, *90* (2), 507–511. DOI: 10.1073/pnas.90.2.507.

[27] Xiao, C.; Bator, C.M.; Bowman, V.D.; Rieder, E.; He, Y.; Hébert, B.; Bella, J.; Baker, T.S.; Wimmer, E.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. *J. Virol*. **2001**, *75* (5), 2444-2451. DOI: 10.1128/JVI.75.5.2444-2451.2001.

[28] Staring, J.; van den Hengel, L.G.; Raaben, M.; Blomen, V.A.; Carette, J.E.; Brummelkamp, T.R. C*ell Host Microbe*. **2018**, *23* (5), 636-643, e5. DOI: 10.1016/j.chom.2018.03.019.

[29] Chen, X.; Qu, X.; Liu, C.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Han, P.; Duan, Y.; Li, Q.; Wang, L.; Ruan, W.; Wang, P.; Wei, W.; Gao, G.F.; Zhao, X.; Xie, Z. *mBio*. **2022**, *13* (4), e0116622. DOI: 10.1128/mbio.01166-22.

[30] Royston, L.; Tapparel, C. *Viruses*. **2016**, *8* (1), 16. DOI: 10.3390/v8010016.

[31] Bergelson, J.M.; Chan, M.; Solomon, K.R.; St John, N.F.; Lin, H.; Finberg, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **1994**, *91* (13), 6245-6248. DOI: 10.1073/pnas.91.13.6245.

[32] Ward, T.; Pipkin, P.A.; Clarkson, N.A.; Stone, D.M.; Minor, P.D.; Almond, J.W. *EMBO J.* **1994**, *13* (21), 50705074. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06836.x.

[33] He, Y.; Lin, F.; Chipman, P.R.; Bator, C.M.; Baker, T.S.; Shoham, M.; Kuhn, R.J.; Medof, M.E.; Rossmann, M.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2002**, *99* (16), 10325-10329. DOI: 10.1073/pnas.152161599.

[34] Yuan, M.; Yan, J.; Xun, J.; Chen, C.; Zhang, Y.; Wang, M.; Chu, W.; Song, Z.; Hu, Y.; Zhang, S.; Zhang, X. *Virol. J*. **2018**, *15* (1), 1. DOI: 10.1186/s12985-017-0913-3.

[35] Dun, Y.; Yan, J.; Wang, M.; Wang, M.; Liu, L.; Yu, R.; Zhang, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2020**, *529* (1), 97-103. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.058.

[36] Huttunen, M.; Waris, M.; Kajander, R.; Hyypiä, T.; Marjomäki, V. *J. Virol*. **2014**, *88* (9), 5138-5151. DOI: 10.1128/JVI.03275-13.

Etape 2 – Relargage de l'ARN au sein du cytoplasme.

L'étape de relargage de l'ARN au sein du cytoplasme s'effectue en 3 étapes. Tout d'abord, la vésicule contenant le virus s'acidifie. Puis, la capside change de conformation pour libérer l'ARN viral. Enfin, la protéine VP4 intervient afin de permettre d'atteindre le cytoplasme.

Acidification de la vésicule.

Après l'endocytose des particules virales, l'acidification dans l'endosome est l'étape clé du réarrangement de la structure de la capside virale, ce qui entraîne la libération de l'ARN viral des particules pour la réplication.[17,37,38]

Un prétraitement des cellules PSGL-1-L929 et RD par de la chloroquine ou de la bafilomycine A_1 permet d'empêcher leur acidification, agissant comme des bases faibles.[17] La réplication virale a diminué de manière dose-dépendante sans mesurer aucune cytotoxicité des composés. Cela confirme la nécéssité de l'acidification des vésicules dans les voies dépendantes de la cavéole (PSGL-1-L929) et de la clathrine (RD).

Changement de conformation de la capside.

Plusieurs récepteurs au sein du lysosome déclenchent le signal de relargage de l'ARN par liaison au virus [**Tableau 4**]. Cela permet la translocation de l'ARN. Elle est réalisée en plusieurs étapes complexes.[39] En effet, la capside doit se déformer pour former des canaux permettant la sortie du brin d'ARN contenu en son sein.

Si les Entérovirus en possèdent un, l'expulsion du co-facteur, évoqué plus tôt, permet d'augmenter la flexibilité de la capside. Cela peut être lié à l'acidification de la vésicule ou la reconnaissance par des récepteurs membranaires.

Cité précédemment, SCARB2 est un des récepteurs le plus documenté pour cette fonction.[23,40] Il a été identifié comme déclencheur pour plusieurs EV-A. De même, l'acide sialique et la

---

[37] Knipe, T.; Rieder, E.; Baxt, B.; Ward, G.; Mason, P.W. *J. Virol*. **1997**, *71* (4), 2851-2856. DOI: 10.1128/JVI.71.4.2851-2856.1997.

[38] Li, C.C.; Yang, M.Y.; Chen, R.F.; Lin, T.Y.; Tsao, K.C.; Ning, H.C.; Liu, H.C.; Lin, S.F.; Yeh, W.T.; Chu, Y.T.; Yang, K.D. *Scand. J. Infect. Dis*. **2002**, *34* (2), 104-109. DOI: 10.1080/00365540110077119.

[39] Marjomäki, V.; Turkki, P.; Huttunen, M. *Viruses*. **2015**, *7* (12), 6387-6399. DOI: 10.3390/v7122945.

[40] Yamayoshi, S.; Iizuka, S.; Yamashita, T.; Minagawa, H.; Mizuta, K.; Okamoto, M.; Nishimura, H.; Sanjoh, K.; Katsushima, N.; Itagaki, T.; Nagai, Y.; Fujii, K.; Koike, S. *J. Virol*. **2012**, *86* (10), 5686-5696. DOI: 10.1128/JVI.00020-12.

protéine ICAM5 sont connus pour provoquer l'ouverture d'EV-D68.[41,42] La protéine ICAM1 a aussi été identifiée dans ce rôle pour d'autres types de virus de l'espèce EV-C et des RV.[25,41,43] Un récepteur spécifique pour les CVB, nommé récepteur des Coxsacikievirus et des Adénovirus, a aussi été découvert, remplissant cette fonction.[44] Enfin, les rFnC déjà cités, ont aussi cet effet pour la majorité des EV-B.[25,29,45]

Tableau 4. Récepteurs membranaires déclenchant le changement de conformation de la capside nécessaire pour le relargage de l'ARN dans le cytoplasme.

Récepteur membranaire	Types de virus concernés
Acide scialique	EV-D68
ICAM 1/CD54 [a]	CVA21, CVA24, RV
ICAM 5[b]	EV-D68
R-CVADV[c]	CVB1-6
rFnC[d]	CVA9, E1, E3, E6-9, E11-14, E20-21, E25-26, E29-30, E33, EV-B85
LIMP2 / SCARB2[e]	CVA7, CVA14, CVA16, EV-A71

[a] *InterCellular Adhesion Molecule 1*.

[b] *InterCellular Adhesion Molecule 5*.

[c] Récepteurs des Coxsackievirus et des Adénovirus.

[d] Récepteur du fragment néonatal cristallisable.

[41] Wei, W.; Guo, H.; Chang, J.; Yu, Y.; Liu, G.; Zhang, N.; Willard, S.H.; Zheng, S.; Yu, X.F. *Cell Host Microbe*. **2016**, *20* (5), 631-641. DOI: 10.1016/j.chom.2016.09.013.

[42] Baggen, J.; Thibaut, H.J.; Staring, J.; Jae, L.T.; Liu, Y.; Guo, H.; Slager, J.J.; de Bruin, J.W.; van Vliet, A.L.; Blomen, V.A.; Overduin, P.; Sheng, J.; de Haan, C.A.; de Vries, E.; Meijer, A.; Rossmann, M.G.; Brummelkamp, T.R.; van Kuppeveld, F.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2016**, *113* (5), 1399-1404. DOI: 10.1073/pnas.1524498113.

[43] Liu, Y.; Sheng, J.; Baggen, J.; Meng, G.; Xiao, C.; Thibaut, H.J.; van Kuppeveld, F.J.; Rossmann, M.G. *Nat. Commun*. **2015**, *6*, 8865. DOI: 10.1038/ncomms9865.

[44] Martino, T.A.; Petric, M.; Weingartl, H.; Bergelson, J.M.; Opavsky, M.A.; Richardson, C.D.; Modlin, J.F.; Finberg, R.W.; Kain, K.C.; Willis, N.; Gauntt, C.J.; Liu, P.P. *Virology*. **2000**, *271* (1), 99-108. DOI: 10.1006/viro.2000.0324.

[45] Zhao, X.; Zhang, G.; Liu, S.; Chen, X.; Peng, R.; Dai, L.; Qu, X.; Li, S.; Song, H.; Gao, Z.; Yuan, P.; Liu, Z.; Li, C.; Shang, Z.; Li, Y.; Zhang, M.; Qi, J.; Wang, H.; Du, N.; Wu, Y.; Bi, Y.; Gao, S.; Shi, Y.; Yan, J.; Zhang, Y.; Xie, Z.; Wei, W.; Gao, G.F. **2019**, *177* (6), 1553-1565.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.035.

Rôle de la protéine VP4.

Hormis la modification conformationnelle de la surface de la capside permettant une distorsion de la structure générale ouvrant des canaux pour le passage de l'ARN en dehors de la capside, la protéine virale VP4 de la capside semble jouer un rôle actif dans la translocation de l'ARN au sein du cytoplasme.[39,46] Des liposomes, génétiquement modifiés pour capturer le pigment fluorophore YoPro-1, a permis d'évaluer les paramètres associés (temps de translocation : 3,7 min à 37 °C ; taux global de translocation : 0,33 min^{-1}).[47] Le suivi a été réalisé par microscopie électronique à transmission lors d'un essai de particule seule. Le taux global de translocation étant corrélé au nombre de virus présent, cela prouve qu'une structure virale soluble la favorise. La protéine VP4 par sa myristoylation est externalisée. [48] La partie *N*-terminale de VP4 permet de créer des pores sélectifs sur la paroi du lysosome.[49] La myristoylation augmente cette activité.

Etape 3 – Traduction de l'ARN viral.

Une fois l'ARN viral présent dans le cytoplasme, deux activités virales concurentielles rentrent en compte, à savoir la traduction et la réplication de l'ARN viral. Dans cette section, nous traiterons la traduction. La réplication sera abordée dans la section suivante.

La traduction possède deux mécanismes : les étapes de traduction elle-même et son exacerbation par des protéines virales.

Détournement des mécanismes de traduction cellulaire par le virus.

Arrivé au sein du cytoplasme de la cellule hôte, l'ARN viral est traduit en une polyprotéine. Plusieurs voies sont possibles. L'ARN de l'EV-A71, n'ayant pas de coiffe 5' (m7GpppN), est traduite selon un mécanisme cap-indépendant médié par l'*Internal ribosome entry site* (IRES).[50] Les Entérovirus, en plus de leur propre traduction, inhibent la traduction cap-dépendante de la

---

[46] Danthi, P.; Tosteson, M.; Li, Q.H.; Chow, M. *J. Virol*. **2003**, *77* (9), 5266-5274. DOI: 10.1128/jvi.77.9.52665274.2003.

[47] Karunatilaka, K.S.; Filman, D.J.; Strauss, M.; Loparo, J.J.; Hogle, J.M. *mBio*. **2021**, *12* (1), e03695-20. DOI: 10.1128/mBio.03695-20.

[48] Brandenburg, B.; Lee, L.Y.; Lakadamyali, M.; Rust, M..J; Zhuang, X.; Hogle, J.M. *PLoS Biol*. **2007**, *5* (7), e183. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050183.

[49] Panjwani, A.; Asfor, A.S.; Tuthill, T.J. *J. Gen. Virol*. **2016**, *97* (12), 3238-3242. DOI: 10.1099/jgv.0.000629.

[50] Thompson, S.R.; Sarnow, P. *Virology*. **2003**, *315* (1), 259-266. DOI: 10.1016/s0042-6822(03)00544-0.

cellule lors de l'infection pour donner la priorité à la sienne [**Schéma 7**].[51] L'inhibition de la traduction cap-dépendante se fait à plusieurs niveaux. Au sein du noyau, les protéases 2A et 3C clivent divers facteurs d'initiation eucaryote (eIF4G, eIF4A et eIF5B).[52,53,54,55]

La traduction de l'ADN de la cellule hôte peut aussi être perturbée par des protéases (pro-2A,pro-3C).[56] Ces protéases inhibent aussi la traduction de l'ARN de l'hôte, tout comme la protéine 3D (pro-3D), ou ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), au sein du noyau.[57,58] Elles peuvent aussi former des granules de stress ou induire un stress au niveau du réticulum endoplasmique.[59] Ce dernier stoppe la traduction de l'ARN messager de la cellule hôte, tout comme le clivage par ces protéases de poly (A)-binding protein.[60,61]

De plus, excepté l'inhibition de la traduction cap-dépendante, les Entérovirus promeuvent aussi la traduction virale. Cela passe par la pro-3D en interagissant avec le ribosome.[62] Enfin, un produit de clivage du facteur eIF5B permet l'activation sélective de la traduction virale.[63]

---

[51] Lloyd, R.E.; Jense, H.G.; Ehrenfeld, E. *J. Virol*. **1987**, *61* (8), 2480-2488. DOI: 10.1128/JVI.61.8.2480-2488.

[52] Haghighat, A.; Svitkin, Y.; Novoa, I.; Kuechler, E.; Skern, T.; Sonenberg, N. *J. Virol*. **1996**, *70* (12), 8444-8450. DOI: 10.1128/JVI.70.12.8444-8450.1996.

[53] Lamphear, B.J.; Yan, R.; Yang, F.; Waters, D.; Liebig, H.D.; Klump, H.; Kuechler, E.; Skern, T.; Rhoads, R.E. J. *Biol. Chem*. **1993**, *268* (26), 19200-19203. PMID: 8396129.

[54] Li, W.; Ross-Smith, N.; Proud, C.G.; Belsham, G.J. *FEBS Lett*. **2001**, *507* (1), 1-5. DOI: 10.1016/s00145793(01)02885-x.

[55] de Breyne, S.; Bonderoff, J.M.; Chumakov, K.M.; Lloyd, R.E.; Hellen, C.U. *Virology*. **2008**, *378* (1), 118-122. DOI: 10.1016/j.virol.2008.05.019.

[56] Clark, M.E.; Lieberman, P.M.; Berk, A.J.; Dasgupta, A. *Mol. Cell Biol*. **1993**, *13* (2), 1232-1237. DOI: 10.1128/mcb.13.2.1232-1237.1993.

[57] Yalamanchili, P.; Banerjee, R.; Dasgupta, A. *J. Virol*. **1997**, *71* (9), 6881-6886. DOI: 10.1128/JVI.71.9.68816886.1997.

[58] Liu, Y.C.; Kuo, R.L.; Lin, J.Y.; Huang, P.N.; Huang, Y.; Liu, H.; Arnold, J.J.; Chen, S.J.; Wang, R.Y.; Cameron, C.E.; Shih, S.R. *PLoS Pathog*. **2014**, *10* (6), e1004199. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004199.

[59] Wu, S.; Wang, Y.; Lin, L.; Si, X.; Wang, T.; Zhong, X.; Tong, L.; Luan, Y.; Chen, Y.; Li, X.; Zhang, F.; Zhao, W.; Zhong, Z. *Virol. J*. **2014**, 11, 192. DOI: 10.1186/s12985-014-0192-1.

[60] Jheng, J.R.; Lau, K.S.; Tang, W.F.; Wu, M.S.; Horng, J.T. *Cell Microbiol*. **2010**, 12 (6), 796-813. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01434.x.

[61] Kuyumcu-Martinez, N.M.; Joachims, M.; Lloyd, R.E. *J. Virol*. **2002**, 76 (5), 2062-2074. DOI: 10.1128/jvi.76.5.2062-2074.2002.

[62] Lee, K.M.; Wu, C.C.; Wu, S.E.; Lin, Y.H.; Wang, L.T.; Chang, C.R.; Huang, P.N.; Shih, S.R.; Kuo, R.L. *RNA Biol*. **2020**, *17* (4), 608-622. DOI: 10.1080/15476286.2020.1722448.

[63] White, J.P.; Reineke, L.C.; Lloyd, R.E. *J. Virol*. **2011**, 85 (17), 8884-8893. DOI: 10.1128/JVI.00792-11.

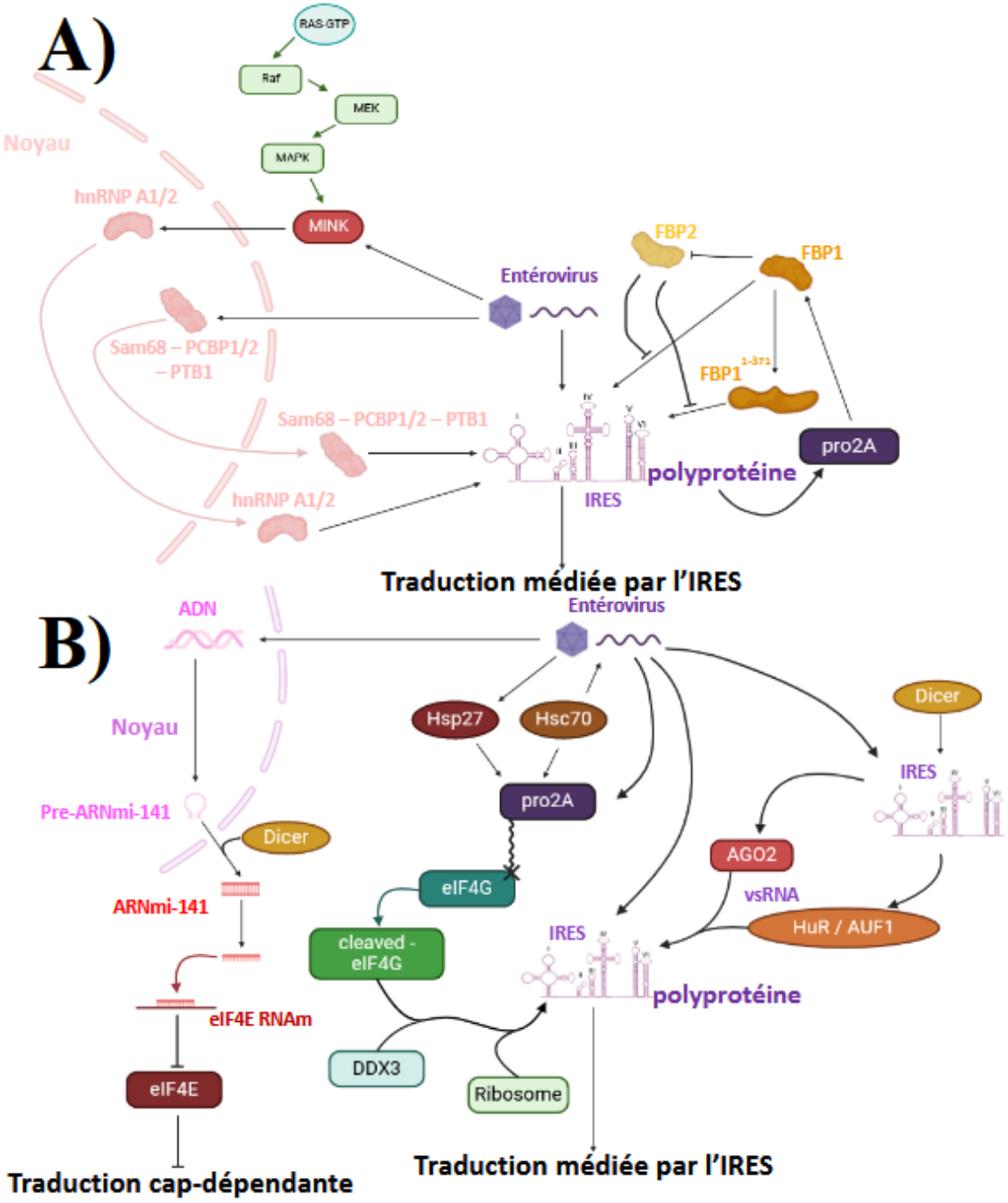


Schéma 7. Mécanismes induits par le virus liés au détournement du système de traduction de la cellule hôte, inspiré de la référence 64. A) Mécanismes associés aux facteurs de trans-action de l'IRES cellulaire. Attachement à l'IRES viral : hnRNP A1/2 (II et VI) – Sam68 / PCBP1/2 (liaison entre IV et V) – PTB1 (VI) – FBP1 + FBP11-371 (Linker entre VI et polyprotéine). B) Mécanismes associés aux Heat Shock Cognate 70 et Protein 27, à la protéine DDX3 et aux ARN viraux et antisens 141. Attachement à l'IRES viral : AGO2 / AUF1 / HuR (II) – eIF4G clivé + DDX3 + ribosome (liaison entre le V et le VI).

---

[64] Lai, M.C.; Chen, H.H.; Xu, P.; Wang, R.Y.L. *J. Biomed. Sci*. **2020**, *27* (1), 22. DOI: 10.1186/s12929-019-0607-9.

Traduction du génome entéroviral.

La traduction de l'ARN viral commence au niveau de son IRES.[57] Le domaine VI de l'IRES contient un motif Y_n-X_m-AUG (Y_n = région riche en pyrimidine, X_m = espaceur possédant entre 15 et 25 nucléotides) présent dans de nombreux Entérovirus. Il semble aussi être le site d'entrée du ribosome.[65] Le codon de départ de la traduction se situe autour de 750 nucléotides après l'extrémité 5'. Outre la reconnaissance des ribosomes, l'IRES permet la reconnaissance d'autres protéines cellulaires pour faciliter la traduction de l'ARN viral [**Schéma 7B)**]. Ainsi, des facteurs d'initiation eucaryote et leurs résidus post clivage par les protéases virales, mais aussi d'autres protéines humaines telles que la *heat shock protein 27* (Hsp27), la variante d'*heat shock cognate 70kDa protein 8* (Hsc70) et l'ARN hélicase ATP-dépendante (DDX3), exacerbent la traduction des protéines virales.[66,67,68]

Au contraire, des boucles d'inhibition de la réplication virale sont aussi engagées. En effet, l'enzyme Dicer forme des petits dérivés d'ARN viraux qui, comme les éléments riches en adénylate et uridylate, ont pour but de réguler voire réduire l'activité de traduction de l'ARN.

Une fois la polyprotéine synthétisée, cette dernière est ensuite clivée par l'ARN viral ainsi que différentes protéases virales (2A et 3C) [**Schéma 8**]. Cependant, les protéases clivent durant l'étape de traduction, alors que l'ARN intervient dans la maturation des nouveaux virus formés en fin de cycle.

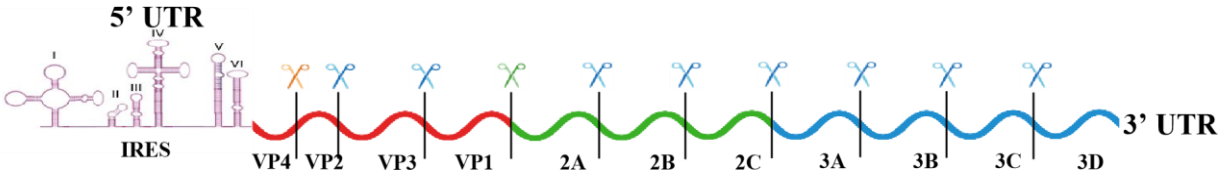


Schéma 8. Différents sites de clivage de la polyprotéine des Entérovirus : par la protéase 3C (ciseaux bleus), la protéase 2A (ciseaux verts), l'ARN viral (ciseaux oranges).

---

[65] Nicholson, R.; Pelletier, J.; Le, S.Y.; Sonenberg, N. *J. Virol.* **1991**, 65 (11), 5886-5894. DOI: 10.1128/JVI.65.11.5886-5894.1991.

[66] Dan, X.; Wan, Q.; Yi, L.; Lu, J.; Jiao, Y.; Li, H.; Song, D.; Chen, Y.; Xu, H.; He, M.L. *J. Virol.* **2019**, *93* (9), e02322-18. DOI: 10.1128/JVI.02322-18.

[67] Dong, Q.; Men, R.; Dan, X.; Chen, Y.; Li, H.; Chen, G.; Zee, B.; Wang, M.H.T.; He, M.L. *Antiviral Res.* **2018**, *150*, 39-46. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.11.020.

[68] Su, Y.S.; Tsai, A.H.; Ho, Y.F.; Huang, S.Y.; Liu, Y.C.; Hwang, L.H. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1324. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01324.

La protéase 2A clive la polyprotéine entre la partie codante pour la protéine VP1 et celle de sa propre partie codante, séparant les deux protéines au niveau d'un enchaînement tyrosine – glycine (STKDLTTYGFGHQNKA).[69] Le clivage de la pro-3C intervient entre une glutamine et une glycine. C'est donc elle qui sépare les parties de la partie P1 de la polyprotéine, excepté la maturation de la protéine VP0. De même, tous les clivages des parties P2 et P3 sont effectués par la protéase 3C.[70,71] Le site actif de cette dernière est composé de trois acides aminés : cystéine – histidine – acide glutamique.[72] Après avoir subi une mutation empêchant son propre clivage, son précurseur, avec l'ARN polymérase RNA-dépendante (RdRp), la protéine 3CD (pro-3CD), a aussi sectionné les parties P1 et P2 de la polyprotéine entérovirale au niveau des sites de clivage de la pro-3C. Il en résulte que le précurseur possède une activité proche de la pro-3C. Aucune activité de polymérase n'a été observée pour pro-3CD.

Etape 4 – Réplication de l'ARN viral.

Concurrence entre traduction et réplication de l'ARN viral.

Pendant qu'une partie de l'ARN viral présent dans le cytoplasme est traduit, les protéines virales effectuent et favorisent sa réplication afin de former de nouveaux virus. Les ribosomes traduisent l'ARN de l'extrémité 5' à 3', en reconnaissant l'IRES viral, alors que les polymérases ARN débutent depuis l'extrémité 3' en sens opposé pour initier la réplication virale. Des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence ce phénomène de concurrence.[73]

---

[69] Hwang, Y.C.; Chen, W.; Yates, M.V. *Appl. Environ. Microbiol*. **2006**, *72* (5), 3710-3715. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3710-3715.2006.

[70] Toyoda, H.; Nicklin, M.J.; Murray, M.G.; Anderson, C.W.; Dunn, J.J.; Studier, F.W.; Wimmer, E. *Cell*. **1986**, *45* (5), 761-770. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90790-7.

[71] Shih, S.R.; Chiang, C.; Chen, T.C.; Wu, C.N.; Hsu, J.T.; Lee, J.C.; Hwang, M.J.; Li, M.L.; Chen, G.W.; Ho, M.S. *J. Biomed. Sci*. **2004**, *11* (2), 239-248. DOI: 10.1007/BF02256567.

[72] Wen, W.; Qi, Z.; Wang, J. *Curr. Microbiol*. **2020**, *77* (9), 1968-1975. DOI: 10.1007/s00284-020-02082-4.

[73] Barton, D.J.; Morasco, B.J.; Flanegan, J.B. *J. Virol*. **1999**, *73* (12), 10104-10112. DOI: 10.1128/JVI.73.12.10104-10112.1999.

Différentes parties de l'ARN influent ce choix, telles que le trèfle à l'extrémité 5', complexé avec la protéase 3CD, la poly (rC)-binding protein 1 et 2 (PCBP1 et 2).[74] Ce complexe favorise la réplication. D'autres mécanismes de régulation inverse existent aussi. Il existe en effet des interactions des protéines avec l'ARN polymérase ARN-dépendante priorisant la production de protéine au détriment de la réplication de l'ARN.[75]

Formation de vésicules à double membrane.

Pour protéger l'ARN, facilement hydrolysable, celui-ci est intégré à des vésicules. Plusieurs protéines virales ont été décrites pour favoriser ce phénomène. De plus, ces vésicules permettent de cacher l'ARN viral des « senseurs » de la cellule déclenchant la réponse virale dès qu'ils repèrent de l'ARN double brin, présent lors de la réplication virale uniquement.[76]

Ces vésicules, lors des infections entérovirales, sont caractérisées par une double membrane pour assurer la protection du complexe de réplication et l'assemblage de nouveaux virions.[77] La vésicule à double membrane (VDM) se forme en passant par différentes étapes [**Schéma 9**]. Tout d'abord, l'organite donneur se déforme, avec une courbe positive de la membrane. Ainsi une vésicule à simple membrane est produite. Ensuite, la membrane de la vésicule mûrit pour former une cisterne qui se courbe elle-même pour former une VDM. La membrane interne possède une courbure négative et celle extérieure une courbure positive. Cependant, d'autres structures protectrices ont été identifiées, telles que des tubules fermés détectées sur CVB3.

---

[74] Perera, R.; Daijogo, S.; Walter, B.L.; Nguyen, J.H.; Semler, B.L. *J. Virol*. **2007**, *81* (17), 8919-8932. DOI: 10.1128/JVI.01013-07.

[75] Han, Y.; Wang, L.; Cui, J.; Song, Y.; Luo, Z.; Chen, J.; Xiong, Y.; Zhang, Q.; Liu, F.; Ho, W.; Liu, Y.; Wu, K.; Wu, J. *J. Cell. Sci*. **2016**, *129* (24), 4534-4547. DOI: 10.1242/jcs.193698.

[76] Kowalinski, E.; Louber, J.; Gerlier, D.; Cusack, S. *Med. Sci. (Paris)*. **2012**, *28* (2), 136-138. DOI: 10.1051/medsci/2012282006.

[77] Wolff, G.; Melia, C.E.; Snijder, E.J.; Bárcena, M. *Trends Microbiol*. **2020**, *28* (12), 1022-1033. DOI: 10.1016/j.tim.2020.05.009.

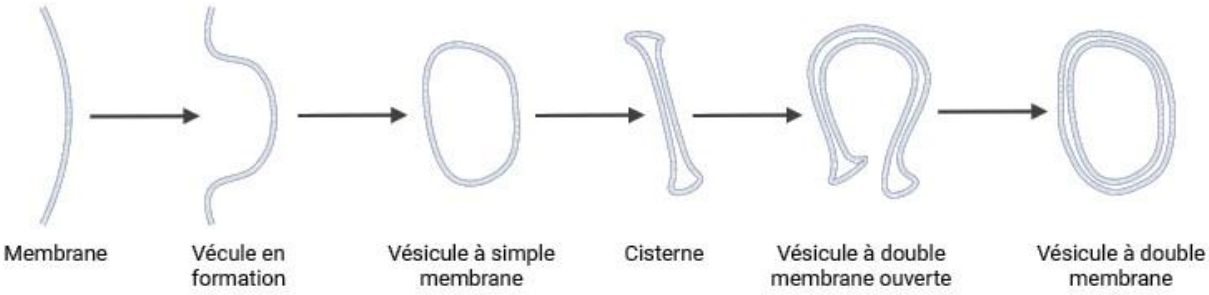


Schéma 9. Formation des vésicules à double membrane, inspiré de la référence [78].

La protéine virale 2B (pro-2B) et son précurseur 2BC (pro-2BC) provoquent la formation des VMD.[79] Ce sont les régions hydrophobes des pro-2B et pro-2BC qui permettent cette activité, en intégrant et perturbant la membrane du complexe de Golgi et du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule.[80] La protéine 3A (pro-3A) ou la protéine 3D (pro-3D) participent aussi à cette activité.[81]

La pro-3A, qui joue un rôle de protéine membranaire, possède de nombreuses autres fonctions. Elle inhibe, par exemple, de nombreuses protéines de l'hôte (production et médiation). La pro3A, tout comme la protéase 3CD, interfère avec la circulation entre le Golgi et le réticulum endoplasmique (RE) *via* une redistribution des facteurs d'ADP-rybosylation (FAr).[82,83] Ces FAr participent ensuite à la réplication virale notamment en favorisant la création de VDM.[82,84]

---

[78] Limpens, R.W.; van der Schaar, H.M.; Kumar, D.; Koster, A.J.; Snijder, E.J.; van Kuppeveld, F.J.; Bárcena, M. *mBio*. **2011**, *2* (5), e00166-11. DOI: 10.1128/mBio.00166-11.

[79] van Kuppeveld, F.J.; Hoenderop, J.G.; Smeets, R.L.; Willems, P.H.; Dijkman, H.B.; Galama, J.M.; Melchers, W.J. *EMBO J*. **1997**, *16* (12), 3519-3532. DOI: 10.1093/emboj/16.12.3519.

[80] de Jong, A.S.; Melchers, W.J.; Glaudemans, D.H.; Willems, P.H.; van Kuppeveld, F.J. *J. Biol. Chem*. **2004**, *279* (19), 19924-19935. DOI: 10.1074/jbc.M314094200.

[81] Suhy, D.A.; Giddings, T.H. Jr.; Kirkegaard, K. *J. Virol*. **2000**, *74* (19), 8953-8965. DOI: 10.1128/jvi.74.19.89538965.2000.

[82] Belov, G.A.; Fogg, M.H.; Ehrenfeld, E. *J. Virol*. **2005**, *79* (11), 7207-16. DOI: 10.1128/JVI.79.11.72077216.2005.

[83] Belov, G.A.; Altan-Bonnet, N.; Kovtunovych, G.; Jackson, C.L.; Lippincott-Schwartz, J.; Ehrenfeld, E. *J. Virol*. **2007**, *81* (2), 558-567. DOI: 10.1128/JVI.01820-06.

[84] Cuconati, A.; Molla, A.; Wimmer, E. *J. Virol*. **1998**, *72* (8), 6456-6464. DOI: 10.1128/JVI.72.8.6456-6464.1998.

Assemblage du complexe de réplication virale.

La réplication virale a besoin d'une structure spécifique pour être initiée. Cette structure est appelée organite de réplication (OR). Il permet la phosphorylation du phosphophatidylinositol. Une fois phosphorylé, il permet de fixer l'ARN polymérase ARN-dépendante virale (RdRp), ou sa précurseur la protéine 3CD (pro-CD), au sein de la vésicule pour protéger les nouveaux brins d'ARN synthétisés.[85].

Le précurseur 3AB (pro-3AB) initie l'assemblage de l'OR en se fixant sur le phosphophatidylinositol des VMD, en se liant par leurs parties hydrophobes [**Schéma 10**].[86] Le pro-AB se lie au précurseur de la pro-3CD, en forme de trèfle sur l'ARN, pour l'ancrer et faciliter l'amorce de la RdRp.[87]

La protéine 3A (pro-3A) recrute la protéine GBF1 pour exacerber la réplication virale.[88] GBF1 est nécessaire pour la formation de vésicules à l'interface entre le RE et le Golgi. Sa partie *N*terminale lui permet d'être incluse dans les OR. La protéine ADCB3 peut se substituer à la GBF1 dans le recrutement de la PIK4IIIβ par la pro-3A.[89] La protéine 3D (pro-3D) avec la pro-3A recrute la phosphophatidylinositol 4-kinase béta (PIK4IIIβ) pour aider à la formation des OR. [90] La PIK4IIIβ synthétise le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) qui favorise l'accroche de la pro-3D aux OR et régule son activité. L'annexine II se lie à la PIK4IIIβ et à la pro-3D pour assurer son accroche sur les OR.[91] Le complexe Régulateur-Rag GTPAse effectue

---

[85] Hope, D.A.; Diamond, S.E.; Kirkegaard, K. *J. Virol*. **1997**, *71* (12), 9490-9498. DOI: 10.1128/JVI.71.12.94909498.1997.

[86] Fujita, K.; Krishnakumar, S.S.; Franco, D.; Paul, A.V.; London, E.; Wimmer, E. *Biochemistry*. **2007**, *46* (17), 5185-5199. DOI: 10.1021/bi6024758.

[87] Xiang, W.; Harris, K.S.; Alexander, L.; Wimmer, E. *J. Virol*. **1995**, *69* (6), 3658-3667. DOI: 10.1128/JVI.69.6.3658-3667.1995.

[88] Belov, G.A.; Sztul, E. *J. Virol*. **2014**, *88* (17), 9478-89. DOI: 10.1128/JVI.00922-14.

[89] Lyoo, H.; van der Schaar, H.M.; Dorobantu, C.M.; Rabouw, H.H.; Strating, J.R.P.M.; van Kuppeveld, F.J.M. *mBio*. **2019**, *10* (1), e02742-18. DOI: 10.1128/mBio.02742-18.

[90] Xiao, X.; Lei, X.; Zhang, Z.; Ma, Y.; Qi, J.; Wu, C.; Xiao, Y.; Li, L.; He, B.; Wang, J. *J. Virol*. **2017**, *91* (19), e00791-17. DOI: 10.1128/JVI.00791-17.

[91] Zhang, Q.; Li, S.; Lei, P.; Li, Z.; Chen, F.; Chen, Q.; Wang, Y.; Gong, J.; Tang, Q.; Liu, X.; Lan, K.; Wu, S. *Virol. Sin*. **2021**, 36 (6), 1387-1399. DOI: 10.1007/s12250-021-00417-4.

la même fonction en fixant la pro-3D à la surface de la vésicule.[92] En se liant au complexe pro-3D-PIK4IIIβ, une augmentation de la production entérovirale est observée.[92]

La protéine fixant l'oxystérol 1 (OSBP 1) en régulant le cycle d'échange PI4P-cholestérol, permet d'alimenter le flux lipidique nécessaire pour la réplication virale.[93]

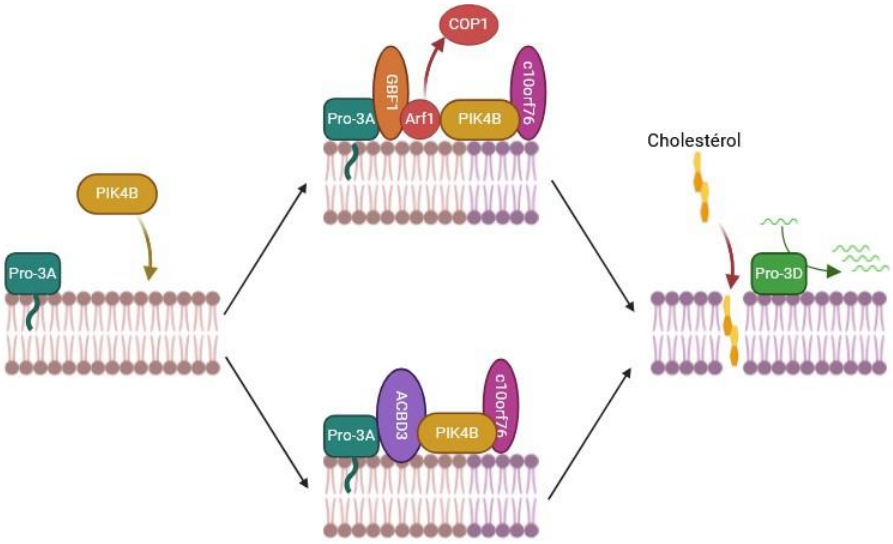


Schéma 10. Complexe de réplication virale, inspiré de la référence 94. La couche bilipidique est constituée de phosphoinositol (en brun) et sa version phosphorylée (en mauve).

D'autres fonctions sont assurées par la pro-3D. Elle peut être liée à des protéines SUMO ou à l'ubiquitine par la protéine UBC9 afin d'augmenter sa stabilité intracellulaire.[95] La méthyltransférase METTL3 régule la liaison avec les SUMO et les ubiquitines.[96]

---

[92] Wang, X.; Hu, Z.; Zhang, W.; Wu, S.; Hao, Y.; Xiao, X.; Li, J.; Yu, X.; Yang, C.; Wang, J.; Zhang, H.; Ma, F.; Shi, W.; Wang, J.; Lei, X.; Zhang, X.; He, S. *J. Cell Biol*. **2023**, *222* (12), e202303108. DOI: 10.1083/jcb.202303108.

[93] Nchoutmboube, J.; Ford-Siltz, L.A.; Belov, G.A. *Trends Microbiol*. **2015**, *23* (4), 183-184. DOI: 10.1016/j.tim.2015.02.008.

[94] Li, X.; Wang, M.; Cheng, A.; Wen, X.; Ou, X.; Mao, S.; Gao, Q.; Sun, D.; Jia, R.; Yang, Q.; Wu, Y.; Zhu, D.; Zhao, X.; Chen, S.; Liu, M.; Zhang, S.; Liu, Y.; Yu, Y.; Zhang, L.; Tian, B.; Pan, L.; Chen, X. *Front. Microbiol*. **2020**, *11*, 1817. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01817.

[95] Liu, Y.; Zheng, Z.; Shu, B.; Meng, J.; Zhang, Y.; Zheng, C.; Ke, X.; Gong, P.; Hu, Q.; Wang, H. *J. Virol*. **2016**, *90* (23), 10472-10485. DOI: 10.1128/JVI.01756-16.

[96] Hao, H.; Hao, S.; Chen, H.; Chen, Z.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wang, H.; Zhang, B.; Qiu, J.; Deng, F.; Guan, W. *Nucleic Acids Res*. **2019**, *47* (1), 362-374. DOI: 10.1093/nar/gky1007.

Cependant, des résistances aux inhibiteurs de la GFB1 et de la PIK4IIIβ ont été observées. Cela implique d'autres voies de fabrication de VDM. Ainsi, il a été constaté que les Entérovirus modifient le mécanisme de métabolisme des lipides. En effet, la voie de dégradation des acides gras, à savoir le stockage sous forme de triglycérides, est inhibée au profit de la synthèse de phosphatidylcholine (PChol). Le taux élevé de PChol semble être favorable à la réplication virale par exacerbation de production de VDM. Cette réassignation implique d'autres réajustements, notamment au niveau de l'estérification du cholestérol.

Synthèse de nouveaux brins d'ARN au sein du complexe de réplication virale.

La protéine 3D (pro-3D), ou ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), est peut-être la protéine la plus importante de la réplication virale en reconnaissant spécifiquement l'ARN viral. Elle présente une activité d'élongation, ce qui permet la synthèse du brin complémentaire, négatif puis positif, de l'ARN viral.[97]

L'initiation de la réplication se fait par reconnaissance de la protéine 3B (pro-3B) qui, une fois urydylée, joue le rôle de protéine virale liée au génome (PVg).[98] Elle est liée par une liaison covalente avec une tyrosine de la partie non-codante de l'extrémité 5'. Elle sert donc d'amorce dans la synthèse des brins d'ARN viral, tandis que le pro-3AB sert de substrat.[99,100] L'élément cis-régulateur viral (*ecr*) facilite la reconnaissance des PVg en tant que substrat. Il est situé sur la protéine 2C des EV mais sa position varie pour chaque génotype de RV.[101]

Deux étapes sont clefs dans ce processus : avant la liaison peptique, la fermeture du site actif de la pro-3D additionnant un nucléotide à la chaîne peptidique en cours de formation et, après, la translocation déplaçant le site actif vers le nucléotide de l'ARN viral en aval. Ces deux étapes ne sont pas couplées pour les Entérovirus.[102]

---

[97] Van Dyke, T.A.; Flanegan, J.B. *J. Virol*. **1980**, 35 (3), 732-740. DOI: 10.1128/JVI.35.3.732-740.1980.

[98] Paul, A.V.; van Boom, J.H.; Filippov, D.; Wimmer, E. *Nature*. **1998**, 393 (6682), 280-4. DOI: 10.1038/30529.

[99] Pettersson, R.F.; Ambros, V.; Baltimore, D. *J. Virol*. **1978**, 27 (2), 357-365. DOI: 10.1128/JVI.27.2.357365.1978.

[100] Richards, O.C.; Spagnolo, J.F.; Lyle, J.M.; Vleck, S.E.; Kuchta, R.D.; Kirkegaard, K. *J. Virol*. **2006**, *80* (15), 7405-7415. DOI: 10.1128/JVI.02533-05.

[101] Cordey, S.; Gerlach, D.; Junier, T.; Zdobnov, E.M.; Kaiser, L.; Tapparel, C. *RNA*. **2008**, *14* (8), 1568-1578. DOI: 10.1261/rna.1031408.

[102] Shu, B.; Gong, P. *RNA Biol*. **2017**, *14* (10), 1314-1319. DOI: 10.1080/15476286.2017.1300221.

Un acide aspartique (D238 pour EV-A71) et une sérine (S288 pour EV-A71) sont nécessaires pour fermer le site actif par création d'un réseau de liaisons hydrogène.[103] Un autre acide aspartique (D233 pour EV-A71), appelé universel, permet la catalyse de la liaison peptidique du brin complémentaire par des ions magnésium.[104] Enfin, la boucle B semble être à l'origine de la réouverture et de la translocation de la RdRp.[103]

Puis, servant de substrat, le brin négatif synthétisé permet de former un nouveau brin d'ARN viral positif utilisé pour de nouveaux virions. Il faut noter qu'un seul brin d'ARN est encapsulé dans chaque virus.

Les autres protéines virales peuvent aussi intervenir dans l'étape de réplication de l'ARN. Le pro-3CD contribue à la réplication de l'ARN en cyclisant le brin par ses extrémités 3' et 5'.[83] La pro-3AB déstabilise les hélices de l'ARN viral, ce qui améliore aussi l'hybridation des acides nucléiques.[105]

Etape 5 – Assemblage des nouveaux virions.

Les vésicules permettant la réplication et la traduction de l'ARN viral sont les mêmes que celles favorisant l'assemblage de nouveaux virions. La transition et le changement de fonctionnement semblent induits par une acidification de ces vésicules.[106]

Lors de l'assemblage des nouveaux virions, plusieurs mécanismes sont activés conjointement. D'une part, la capside se forme par autoassemblage des différentes protéines la composant. Cette étape est médiée par différents facteurs et protéines. D'autre part, l'ARN récemment synthétisé est inclus au sein des nouvelles capsides. A ce jour, il reste cependant des processus complexes et non définis.

La myristoylation de la protéine VP4 initie la formation de la capside. La protéine de choc thermique 90 (Hsp90) reconnait cette partie fonctionnalisée, jouant ici le rôle de protéine

---

[103] Gong, P.; Peersen, O.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2010**, *107* (52), 22505-22510. DOI: 10.1073/pnas.1007626107.

[104] Shu, B.; Gong, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2016**, *113* (28), e4005-14. DOI: 10.1073/pnas.1602591113.

[105] DeStefano, J.J.; Titilope, O. *J. Virol*. **2006**, *80* (4), 1662-1671. DOI: 10.1128/JVI.80.4.1662-1671.2006.

[106] Galitska, G.; Jassey, A.; Wagner, M.A.; Pollack, N.; Miller, K.; Jackson, W.T. *mBio*. **2023**, *14* (5), e0214123. DOI: 10.1128/mbio.02141-23.

chaperon.[107] Elle permet le repliement des protéines structurales qui sont par la suite clivées par la pro-3C.

Les protéines virales de la capside VP0, VP1 et VP3 libérées s'auto-assemblent pour former des protomères. Ces derniers se regroupent en pentamères. La myristoylation stabilise ces différentes structures.[108] Le glutathion, pour certains types d'Entérovirus, se lient à l'interface entre la protéine VP1 et la protéine VP3 (pro-VP3) d'un protomère avec la pro-VP3 d'un autre protomère. [109] Une fois les pentamères formés, ils s'agglutinent autour de l'ARN viral et se lient pour former les isocahèdres des virus en devenir.

Contrairement à d'autres virus, aucun signal d'encapsulation n'a été décrit pour les Entérovirus.[110] L'hypothèse la plus probable est l'existence d'une interaction entre la protéine VP3 et la pro-2C, dans le complexe de réplication. Les phosphatidylinositol 3-kinases de classe III permettent la fin de l'encapsulation de l'ARN viral.[111]

Après formation des virions, la maturation de ces provirus est réalisée par l'ARN viral luimême qui clive la protéine VP0.[112] Cette action permet une meilleure stabilisation de la capside. En effet, dans les capsides vides, la protéine VP4 ainsi que les parties *N*-terminales des VP1 et VP2 sont désordonnées.[112]

---

[107] Geller, R.; Vignuzzi, M.; Andino, R.; Frydman, J. *Genes Dev*. **2007**, *21* (2), 195-205. DOI: 10.1101/gad.1505307.

[108] Paul, A.V.; Schultz, A.; Pincus, S.E.; Oroszlan, S.; Wimmer, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **1987**, *84* (22), 7827-7831. DOI: 10.1073/pnas.84.22.7827.

[109] Duyvesteyn, H.M.E.; Ren, J.; Walter, T.S.; Fry, E.E.; Stuart, D.I. *Commun. Biol*. **2020**, *3*, 9. DOI: 10.1038/s42003-019-0722-x.

[110] Liu, Y.; Wang, C.; Mueller, S.; Paul, A.V.; Wimmer, E.; Jiang, P. *PLoS Pathog*. **2010**, *6* (8), e1001066. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001066.

[111] Dahmane, S.; Kerviel, A.; Morado, D.R.; Shankar, K.; Ahlman, B.; Lazarou, M.; Altan-Bonnet, N.; Carlson, L.A. *Nat. Commun*. **2022**, *13* (1), 5986. DOI: 10.1038/s41467-022-33483-7.

[112] Basavappa, R.; Syed, R.; Flore, O.; Icenogle, J.P.; Filman, D.J.; Hogle, J.M. *Protein Sci*. **1994**, *3* (10), 16511669. DOI: 10.1002/pro.5560031005.

Etape 6 – Sortie ou expulsion de la cellule.

Une fois formés, les nouveaux virus peuvent sortir de la cellule selon plusieurs voies, lytiques ou non-lytiques, à travers des exocytes.

Mécanismes lytiques de sortie des Entérovirus.

Exacerbation de la mort cellulaire.

La lyse des cellules peut se faire selon différentes manières, comme l'apoptose. Elle est définie par la mort cellulaire programmée de façon non-inflammatoire.

Les mécanismes lytiques impliquent de multiples facteurs. La modification du système enzymatique, du processus cellulaire de l'hôte ou l'altération de la membrane plasmatique entrainent la lyse cellulaire. Plusieurs protéines virales sont impliquées, avec des différences décrites selon le type d'Entérovirus [**Schéma 11**].

Les protéases 2A (pro-2A) et 3C (pro-3C) induisent l'apoptose cellulaire par les voies classiques : l'activation des caspases (Csp) ou l'autophagie. [113] Les Csp 3 et 9 sont activées par la Csp 8 ce qui stoppe la réparation de l'ADN et donc provoque la mort cellulaire. [114] La région hydrophobe de la protéine 2B (pro-2B), et son précurseur 2BC (pro-2BC), interfère avec le réticulum endoplasmique, le complexe de Golgi et la membrane plasmique, induisant la mort cellulaire.[79,80,][115]

En dégradant l'acyl-coenzyme A oxydase 1 (AcCoA1), la protéine 3D (pro-3D) réduit le nombre de peroxysomes et induit l'apoptose ou l'autophagie de la cellule. [116] Elle interagit aussi avec la protéine NLRP3 qui favorise l'assemblage du complexe inflammasome.[117]

---

[113] Calandria, C.; Irurzun, A.; Barco, A.; Carrasco, L. *Virus Res*. **2004**, *104* (1), 39-49. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.02.042.

[114] Chau, D.H.; Yuan, J.; Zhang, H.; Cheung, P.; Lim, T.; Liu, Z.; Sall, A.; Yang, D. *Apoptosis*. **2007**, *12* (3), 513524. DOI: 10.1007/s10495-006-0013-0.

[115] Weng, K.F.; Li, M.L.; Hung, C.T.; Shih, S.R. *PLoS Pathog*. **2009**, *5* (9), e1000593. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000593.

[116] You, L.; Chen, J.; Liu, W.; Xiang, Q.; Luo, Z.; Wang, W.; Xu, W.; Wu, K.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Wu, J. *Virulence*. **2020**, *11* (1), 537-553. DOI: 10.1080/21505594.2020.1766790.

[117] Wang, W.; Xiao, F.; Wan, P.; Pan, P.; Zhang, Y.; Liu, F.; Wu, K.; Liu, Y.; Wu, J. *PLoS Pathog*. **2018**, *14* (3), e1006921. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006921.

La protéine VP2 agit aussi sur les mécanismes d'apoptose, en interagissant avec la protéine cellulaire Siva, notamment lors d'une infection du variant H3 du CVB3. [118]

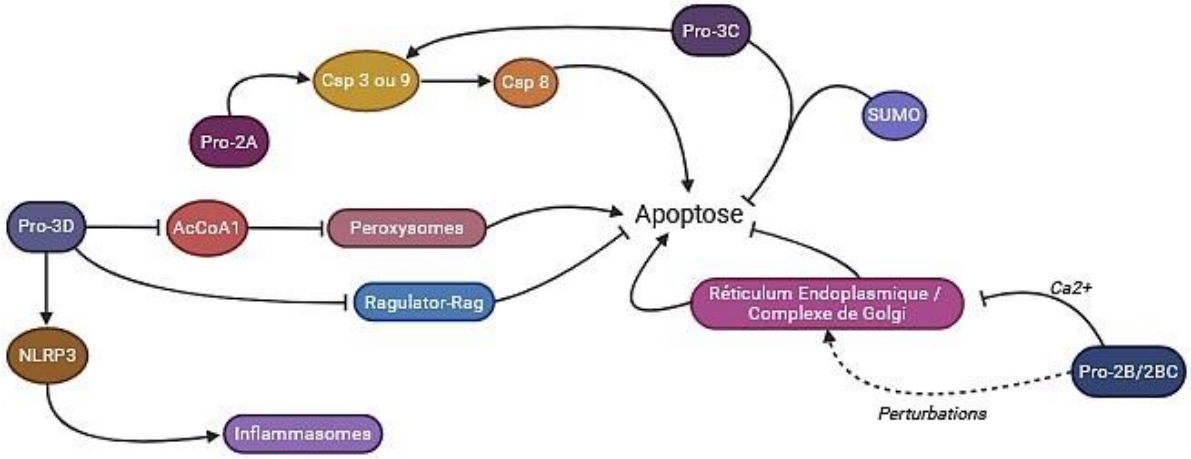


Schéma 11. Mécanismes d'exacerbation ou d'inhibition de l'apoptose par les Entérovirus.

Inhibition de la mort cellulaire.

Néanmoins, il existe aussi une voie de régulation de la mort de ce mécanisme [**Schéma 11**]. En effet, il existe un équilibre entre laisser la cellule en vie pour continuer à produire de nouveaux virions et provoquer sa mort pour disperser ces mêmes nouveaux virions. Elle est principalement médiée par le complexe de protéines 2B/2BC (complexe 2B/ 2BC) mais aussi les protéines 3C (pro-3C) et 3D (pro-3D).

Le complexe 2B/2BC réduit le niveau d'ion calcium (Ca^{2+}) dans le réticulum endoplasmique et le complexe de Golgi.[79,115] Ce déséquilibre du Ca^{2+} intracellulaire bloque l'apoptose.[119] La pro3C, après ubiquitination par les SUMO, favorise aussi à réduire l'apoptose cellulaire.[120] Enfin, l'inhibition du complexe Régulateur-Rag GTPAse par la pro-3D réduit les risques d'apoptose liée à la présence du virus ou la pyroptose associée aux effets pathogènes de l'infection virale.[92]

---

[118] Henke, A.; Nestler, M.; Strunze, S.; Saluz, H.P.; Hortschansky, P.; Menzel, B.; Martin, U.; Zell, R.; Stelzner, A.; Munder, T. *Virology*. **2001**, *289* (1), 15-22. DOI: 10.1006/viro.2001.1082.

[119] de Jong, A.S.; de Mattia, F.; Van Dommelen, M.M.; Lanke, K.; Melchers, W.J.; Willems, P.H.; van Kuppeveld, F.J. *J. Virol*. **2008**, *82* (7), 3782-3790. DOI: 10.1128/JVI.02076-07.

[120] Chen, S.C.; Chang, L.Y.; Wang, Y.W.; Chen, Y.C.; Weng, K.F.; Shih, S.R.; Shih, H.M. *J. Biol. Chem*. **2011**, *286* (36), 31373-31384. DOI: 10.1074/jbc.M111.254896.

Mécanismes non-lytiques de sortie des Entérovirus.

Comme décrit précédemment, des mécanismes non-lytiques permettent la propagation des Entérovirus hors de la cellule [**Schéma 12**]. La principale voie est médiée par les autophagosomes, cependant, une autre voie implique les viroporines.

Cette nouvelle voie a récemment été décrite. Les autophagosomes absorbent les virions nouvellement assemblés.[121] La dégradation des Entérovirus est inhibée non pas en empêchant la liaison avec des lysosomes mais en fusionnant avec la membrane plasmique. C'est ainsi qu'une vésicule est formé pour libérer les nouveaux virions. Malgré leur capacité à pouvoir rentrer de nouveau dans d'autres cellules, la reconnaissance de la capside du virus a été décrite comme nécessaire pour son entrée. [122] Ces vésicules extracellulaires protègent les virus des immunoglobulines pouvant les reconnaitre.

Les pro-2B et 2BC permettent aussi la formation de complexes avec les viroporines de l'hôte permettant leur expulsion hors de la cellule.[80]

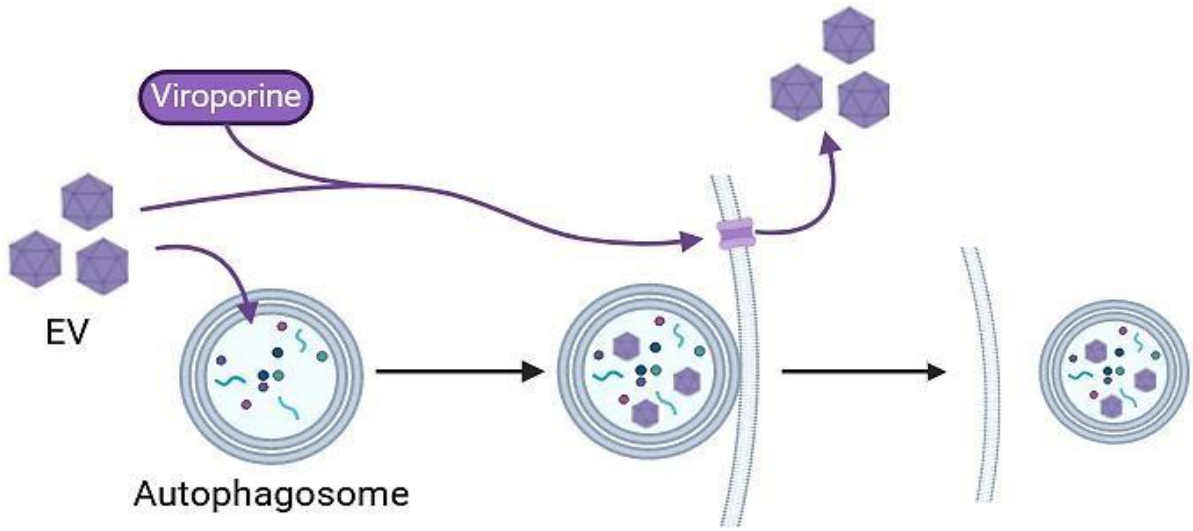


Schéma 12. Mécanismes de sortie de la cellule non-lytiques.

[121] Jackson, W.T.; Giddings, T.H. Jr.; Taylor, M.P.; Mulinyawe, S.; Rabinovitch, M.; Kopito, R.R.; Kirkegaard, K. *PLoS Biol*. **2005**, *3* (5), e156. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030156.

[122] Chen, Y.H.; Du, W.; Hagemeijer, M.C.; Takvorian, P.M.; Pau, C.; Cali, A.; Brantner, C.A.; Stempinski, E.S.; Connelly, P.S.; Ma, H.C.; Jiang, P.; Wimmer, E.; Altan-Bonnet, G.; Altan-Bonnet, N. *Cell*. **2015**, *160* (4), 619630. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.032.

Outre le cycle de réplication, d'autres interactions entre les Entérovirus et les agents du métabolisme cellulaire ont été décrites, notamment celles régulant le système immunitaire de l'hôte. Dans la section qui suit, nous les décrivons afin de justifier le choix de cibler certains mécanismes cellulaires, activant la réponse immunitaire de l'hôte, inhibés par les Entérovirus.

3) Réponse et résistance au système immunitaire.

Dès la traversée des barrières intestinales, l'organisme peut reconnaitre un corps étranger en son sein. Ainsi, il déclenche plusieurs réponses immunitaires se divisant en deux catégories : le système immunitaire inné et l'immunité adaptative. Les Entérovirus interagissent avec les différents membres de ces deux systèmes dans un but de les favoriser ou de les réguler.

Réponse immune innée.

Le système immunitaire inné est principalement constitué par les interférons (IFN) qui servent de signaux d'alarme. Ces derniers sont principalement médiés par les macrophages et les cellules dendritiques, qui permettent la phagocytose et activent la réponse immunitaire adaptative.[123]

En effet, ils sont constitués des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires. Les Entérovirus sont reconnus par les récepteurs de type Toll, du gène I inductible par l'acide rétinoique (RLR) et de type NOD.[124] Ceux-ci identifient les composants viraux propres aux pathogènes et déclenchent une réponse pro-inflammatoire. L'inflammation libère des IFN et, stimulant des gènes associés, induit un état antiviral.[125] Cela active la phosphorylation de la protéine IRF3, qui déclenche la production d'INF de type I. En parallèle, la production de facteur nucléaire kappa B est exacerbée, tout autant que l'expression de cytokines.[126] Le fait que l'immunité innée agisse en premier semble en faire un paramètre important pour la suite de l'évolution de la sévérité de l'infection entérovirale.[127] Cependant, outre cette réponse primaire,

---

[123] McComb, S.; Thiriot, A.; Akache, B.; Krishnan, L.; Stark, F. *Methods Mol. Biol*. **2019**, *2024*, 1-24. DOI: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1.

[124] Yan, N.; Chen, Z.J. *Nat. Immunol*. **2012**, *13* (3), 214-222. DOI: 10.1038/ni.2229.

[125] Devasthanam, A.S. *Virulence*. **2014**, *5* (2), 270-277. DOI: 10.4161/viru.27902.

[126] Hayden, M.S.; Ghosh, S. *Cell*. **2008**, *132* (3), 344-362. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.020.

[127] Chang, L.Y.; Hsiung, C.A.; Lu, C.Y.; Lin, T.Y.; Huang, F.Y.; Lai, Y.H.; Chiang, Y.P.; Chiang, B.L.; Lee, C.Y.; Huang, L.M. *Pediatr. Res*. **2006**, *60* (4), 466-471. DOI: 10.1203/01.pdr.0000238247.86041.19.

un autre mécanisme de défense de l'organisme est mis en place : le système immunitaire adaptatif.

Réponse immune adaptative.

Le système adaptatif est lui-aussi complexe et organisé autour de plusieurs cellules, appelées lymphocytes, assurant diverses fonctions. Les lymphocytes T cytotoxiques (LT_{Cyt}) assurent la lyse des cellules lors de la réaction à médiation cellulaire pour stopper la réplication et la traduction virale. Les lymphocytes T auxiliaires (LT_{Aux}) produisent des cytokines puissantes, mais exacerbent à la fois les LT_{cyt} et les lymphocytes B (LB), communément appelés « globules blancs ». Les LB produisent des anticorps, qui ciblent spécifiquement l'agent pathogène détecté et favorise son élimination durant la réaction humorale, et les garde en mémoire pour de futures infections. Enfin, les lymphocytes T régulateurs ($LT_{Rég}$) inhibent la réponse inflammatoire et immunitaire pour les agents ciblés par les autres lymphocytes qui ne présentent pas de danger pour les cellules.[123]

Parmi le système immunitaire adaptatif, les anticorps neutralisants augmentent en atteignant un pic entre deux et quatorze jours après l'apparition de symptômes de la maladie, sans variations selon la sévérité.[127,128] De même, des augmentations des immunoglobulines G et M ont été observées chez des souris infectées ou des enfants atteints d'encéphalites.[129] L'immunité adaptative permet une réponse plus rapide et plus efficace, venant assister celle innée, tout en ciblant spécifiquement les agents pathogènes. Cependant, une réponse excessive cause une dérégulation immunitaire systémique avec une composante neurogène.

Réponse des Entérovirus aux systèmes immunitaires.

Réponse contre le système immunitaire inné.

Les Entérovirus ont aussi développé des inhibiteurs de la réponse immunitaire [**Schéma 13**]. La protéase 3C (pro-3C) inhibe le domaine TIR contenant la molécule adaptatrice 1, le facteur de croissance de transformation beta 1 (TRIF), et la protéine IRF7 inhibant respectivement la production de facteur nucléaire kappa B (NF-κβ) et d'IFN de type 1.[130] De même, elle inhibe

---

[128] Qiu, Q.; Zhou, J.; Cheng, Y.; Zhou, Y.; Liang, L.; Cui, P.; Xue, Y.; Wang, L.; Wang, K.; Wang, H.; Li, P.; Chen, J.; Li, Y.; Turtle, L.; Yu, H. *EBioMedicine*. **2021**, *68*, 103398. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103398.

[129] Lin, Y.L.; Lu, M.Y.; Chuang, C.F.; Kuo, Y.; Lin, H.E.; Li, F.A.; Wang, J.R.; Hsueh, Y.P.; Liao, F. *Front. Immunol*. **2021**, *11*, 614743. DOI: 10.3389/fimmu.2020.614743.

[130] Xiang, Z.; Li, L.; Lei, X.; Zhou, H.; Zhou, Z.; He, B.; Wang, J. *J. Virol*. **2014**, *88* (12), 6650-6659. DOI: 10.1128/JVI.03138-13.

les MDA-5, qui promeuvent l'activité des caspases en reconnaissant l'IRES viral, le différenciant de celui de l'hôte.[131,132] La pro-3C clive aussi les RIG-I, autres récepteurs qui participent à la réponse immunitaire innée. La protéase 2A (pro-2A), quant à elle, inhibe les granules de stress et la transcription des IFN-β.[133] Enfin, la pro-3C et la pro-2A clivent la protéine NLRP3, agoniste de l'interleukine IL-1β provoquant l'inflammation de la cellule.[134]

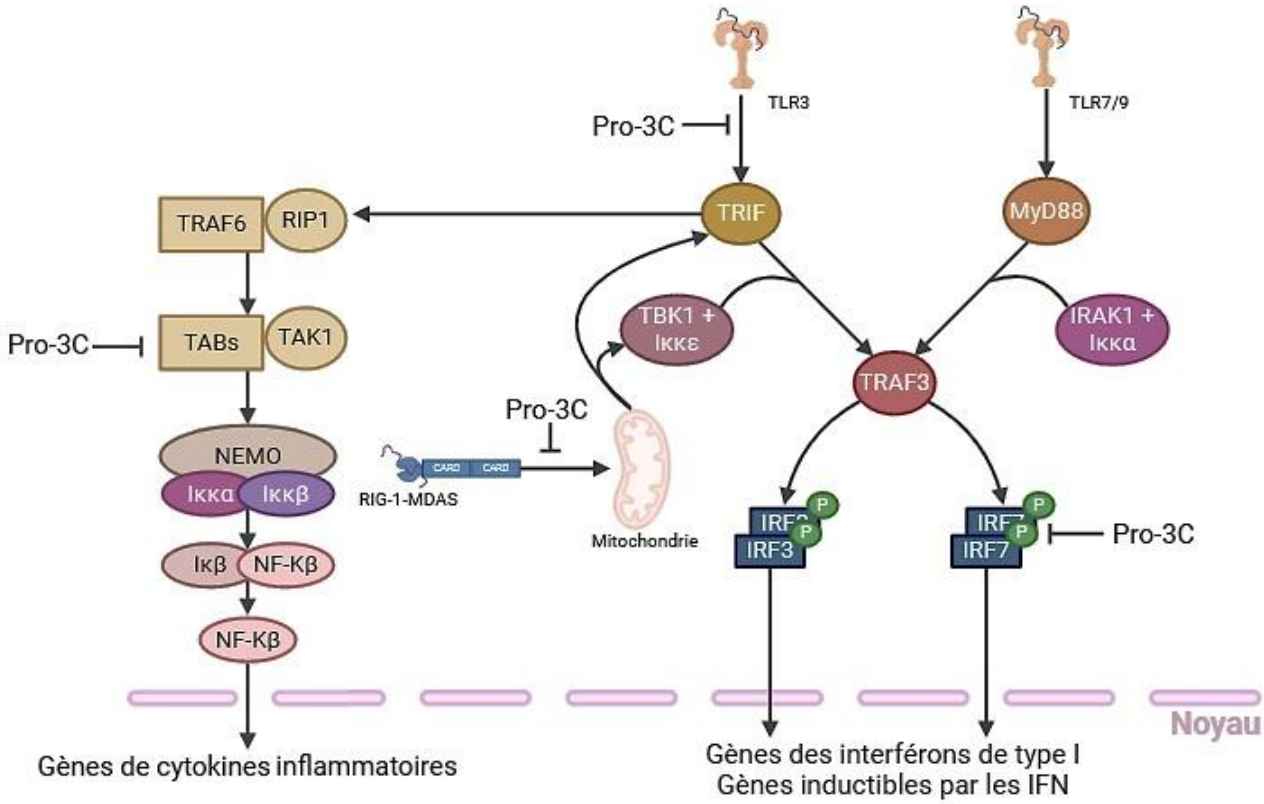


Schéma 13. Réponse immune innée et inhibition par les Entérovirus.[135]

---

[131] Xiang, Z.; Liu, L.; Lei, X.; Zhou, Z.; He, B.; Wang, J. *J. Virol*. **2015**, *90* (3), 1613-1621. DOI: 10.1128/JVI.02395-15.

[132] Xu, C.; He, X.; Zheng, Z.; Zhang, Z.; Wei, C.; Guan, K.; Hou, L.; Zhang, B.; Zhu, L.; Cao, Y.; Zhang, Y.; Cao, Y.; Ma, S.; Wang, P.; Zhang, P.; Xu, Q.; Ling, Y.; Yang, X.; Zhong, H. *J. Virol*. **2014**, *88* (19), 11356-11368. DOI: 10.1128/JVI.01400-14.

[133] Visser, L.J.; Langereis, M.A.; Rabouw, H.H.; Wahedi, M.; Muntjewerff, E.M.; de Groot, R.J.; van Kuppeveld, F.J.M. *J. Virol*. **2019**, *93* (10), e00222-19. DOI: 10.1128/JVI.00222-19.

[134] Wang, H.; Lei, X.; Xiao, X.; Yang, C.; Lu, W.; Huang, Z.; Leng, Q.; Jin, Q.; He, B.; Meng, G.; Wang, J. *Cell Rep*. **2015**, *12* (1), 42-48. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.05.047.

[135] Sun, J.; Hu, X.Y.; Yu, X.F. *Viruses*. **2019**, *11* (6), 490. DOI: 10.3390/v11060490.

Réponse contre le système immunitaire adaptatif.

Les Entérovirus, comme tout agent viral, agissent aussi sur la réponse immunitaire adaptative [**Schéma 14]**. Une baisse des LT_{Aux}, des LT_{Cyt} et des $LT_{Rég}$ est observée, malgré une augmentation spécifique des LT_{Aux} 2 et 17, ainsi que des LB.[136] Dans d'autres cas, ce sont les productions de LT_{Aux} 1 avec des LT_{Cyt} 1, ainsi que des LT_{Aux} 17 avec des $LT_{Rég}$, qui ont été identifiées.[137]

C'est pour se protéger de ces mécanismes que les Entérovirus forment à la fois les vésicules à double membrane lors de la réplication de leur ARN viral ainsi que leur sortie non-lytique au travers d'autres vésicules.[79,121]

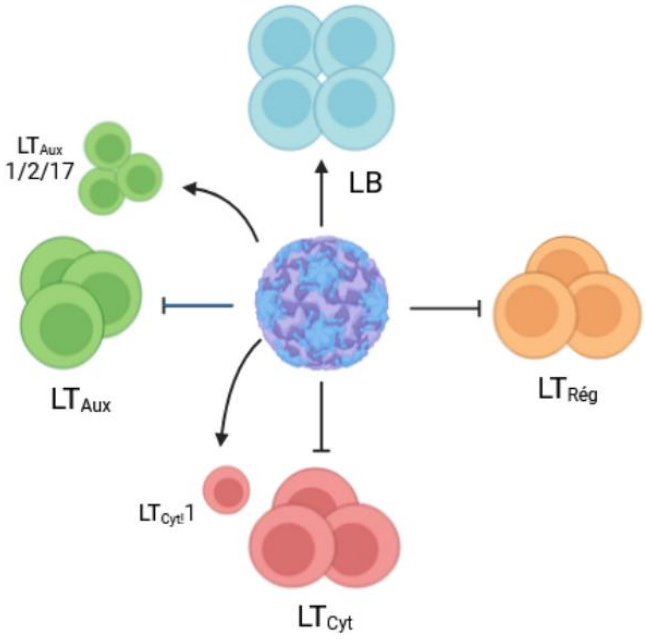


Schéma 14. Réponse immune adaptive et réponse des Entérovirus.

[136] Zhao, M.Q.; Wang, L.H.; Lian, G.W.; Lin, Z.F.; Li, Y.H.; Guo, M.; Chen, Y.; Liu, X.M.; Zhu, B. *J. Microbiol Immunol. Infect*. **2020**, *53* (5), 705-714. DOI: 10.1016/j.jmii.2019.03.001.

[137] Li, Q.; Wang, Y.; Bian, Z.; Gao, Y.; Zeng, Y.; Tang, L.; Tang, T.; Tian, Y.; Guo, W. *Virology*. **2020**, *551*, 36-45. DOI: 10.1016/j.virol.2020.08.017.

4) Historique – Evolution de la classification entérovirale.

La classification des Entérovirus a évolué selon les découvertes successives des différents agents pathogènes mais aussi avec les différents progrès techniques permettant de les analyser. A ce jour, ce genre est divisé en deux groupes : les entérovirus (avec douze espèces – quatre humaines : A, B, C, D ; et huit animales : E, F, G, H, I, J, K, L) et les rhinovirus (avec trois espèces : A, B, C) [**Figure 1**].

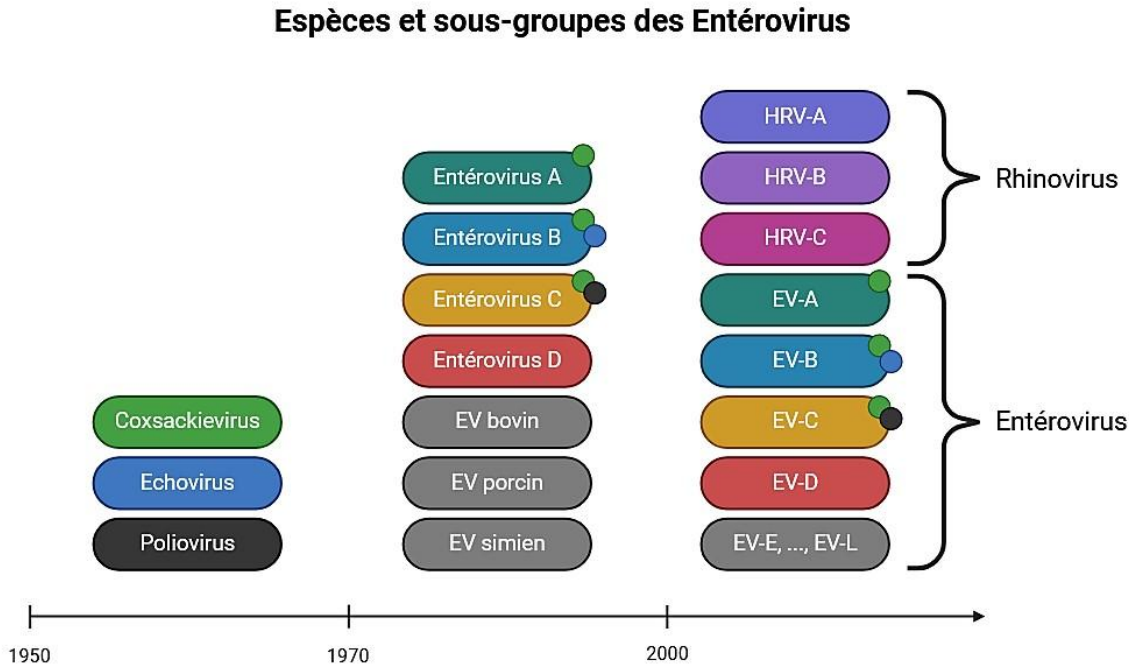


Figure 1. Evolution de la taxonomie des Entérovirus au cours du temps.

Les symptômes associés à chaque agent et leur infectiosité ont permis tout d'abord de définir les différents types de virus, puis leur réponse face au système immunitaire présent dans différents sérums contaminés, et enfin l'analyse de leur séquence nucléotidique ont contribué à les classer [**Schéma 15**].

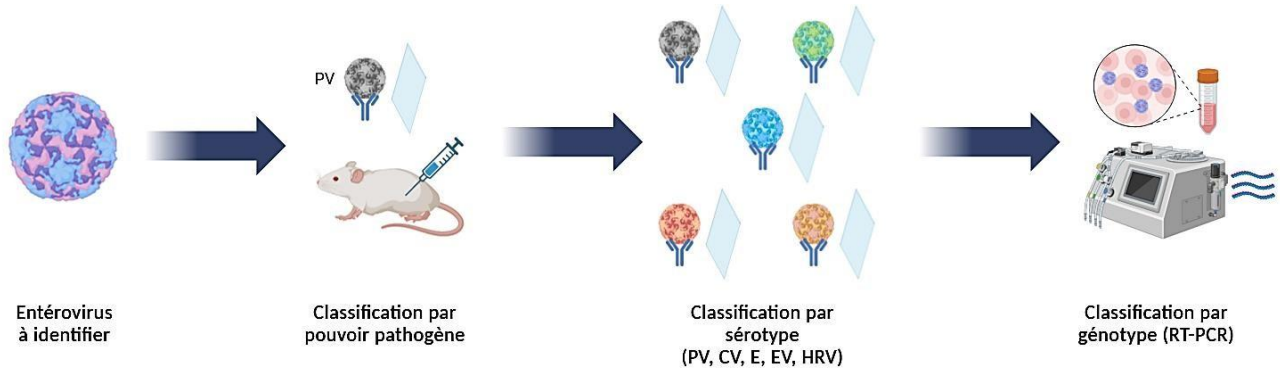


Schéma 15. Evolution des techniques d'identification d'un virus pour le choix de classification au sein des Entérovirus.

Ainsi, la caractérisation s'est faite d'une observation macroscopique des symptômes sur modèle animal jusqu'à une approche moléculaire.

Grâce à cette progression technique et méthodologique, les limites de chaque système ont pu être surpassées ou amoindries.

Cependant, cet essor technologique n'a pas été la seule raison à ce changement. En effet, l'éthique vis-à-vis des tests sur modèle animal mais aussi des aspects économiques et de structure sont rentrés en jeu pour actuellement utiliser le classement des Entérovirus selon leur génotype. Ces techniques ne peuvent pas être déployées uniformément dans le monde sachant que la précision reste coûteuse en termes de développement technologique pour obtenir les techniques nécessaires ainsi que leur coût en énergie et besoins de précaution sanitaire pour éviter les contaminations.

Découverte des premiers Entérovirus.

Dans un premier temps, les Entérovirus ont été divisé en trois sous-groupes, à savoir les poliovirus (PV), les coxsackievirus (CV) et les échovirus (E), selon une classification tenant compte de leur pouvoir pathogène, que nous détaillerons par la suite.

La première identification d'entérovirus semble avoir été enregistrée en 1897, lors d'une épidémie de syndrome pieds-mains-bouche.[138] Cependant, le virus associé n'ayant pas été isolé, cela reste une date possible d'identification. Le premier entérovirus ayant été isolé a été un

[138] Loeffler, F.; Frosch, P. *Centralbl. Bakteriol. 1. Abt*. **1897**, *22*, 257–259. Lien.

poliovirus (PV).[139,140] Les travaux, effectués entre 1907 et 1908, ont permis d'identifier l'origine virale de la poliomyélite. Un des deux chercheurs, Landsteiner, a réussi en reproduisant les caractéristiques de la poliomyélite par injection de cellules spinales infectées d'un·e patient·e décédé·e de poliomyélite à un singe.

En 1947, un autre entérovirus a été identifié dans la ville de Coxsackie (New-York, Etats-Unis) dans le cadre d'une étude de cas.[141] Les deux patients pédiatriques atteints avaient comme principal symptôme une faiblesse sans rigidité des deux jambes, accompagnée de fièvre, de nausées et de fortes céphalées. Ces symptômes sont communs avec le tableau clinique de la poliomyélite. Cependant, avec l'absence de résultats concluants de la méthodologie de réplication virale sur modèle animal, il a été considéré comme un nouveau type de virus. C'est ainsi que cette petite ville de l'état de New-York a donné son nom pour cet autre groupe d'entérovirus, les coxsackievirus (CV). En 1950, Dalldorf identifia deux groupes au sein des CV (CVA et CVB respectivement) en fonction de leur tableau clinique.[142] Le groupe A réunit les CV provoquant des myosites généralisées alors le groupe B rassemble ceux provoquant des paralysies spasmodiques localisées, pouvant atteindre le système nerveux.[7,143]

En 1955, une publication permet de regrouper différents virus, à savoir les « virus orphelins [*orphan virus*] » et les « virus entériques humains [*human enteric virus*] », sous le nom *Enteric Cytophatogenic Human Orphan* virus (abrégé en ECHOvirus).[144] L'abréviation est devenue le nom utilisé : échovirus (E).

---

[139] Wickman, I. *Die akute Poliomyelitis bzw*. ***Heine-Medinsche Krankheit***. Berlin, Germany. Julius Springer. **1911**. DOI: 10.1007/978-3-662-39480-9_1.

[140] Landsteiner, K.; Popper, E. *Z. Immunitätsforsch*. **1909**, *2*, 377–390. Lien.

[141] Dalldorf, G.; Sickles, M.G. *Science*. **1948**, *108*, 61-62. DOI: 10.1126/science.108.2794.61.

[142] Dalldorf, G. *Fed. Proc*. **1950**, *9* (3), 569. PMID: 14784067.

[143] Godman, G.C.; Bunting, H.; Melnick, J.L. *Am. J. Pathol*. **1952**, *28* (2), 223-257. PMID: 14903053.

[144] Committee on the ECHO Viruses, National Foundation for Infantile paralysis. *Sciences*. **1955**, *122* (3181), 1187-1188. PMID: 13274079.

Première méthode pour classifier les types de virus.

Classement selon leur pouvoir pathogène.

Classer un virus dans le genre Entérovirus par évaluation de son pouvoir pathogène peut passer par trois tests d'identification [**Schéma 16A**].[145] Le premier consiste en un test sérologique ciblant les poliovirus. Ces virus, découverts très tôt, ont bien été caractérisés. Des sérums portant des anticorps spécifiques, prélevés sur des individus contaminés par les PV, sont mis en contact avec le virus à identifier. Puis après filtration, le filtrat est analysé pour vérifier la présence de virus restant.[146] Si le test est négatif, alors le second critère est la pathogénicité du virus chez la souris. Si le virus ne l'est pas, il est caractérisé comme échovirus. Si le test est positif, alors il est placé dans le groupe des CV.

La classification entre les deux sous-groupes (CVA ou CVB) se faisait selon six critères : sa période d'incubation, le type de paralysies provoquées (flasque ou spasmodique), la localisation des myosites (absentes, locales ou généralisées) chez les nouveau-né·es, et sa capacité à causer des panniculites, des encéphalites chez les nouveau-né·es lors de sa détection, ou des pancréatites lorsque le virus est injecté à des souriceaux sevrés [**Schéma 16B**].[147,148]

---

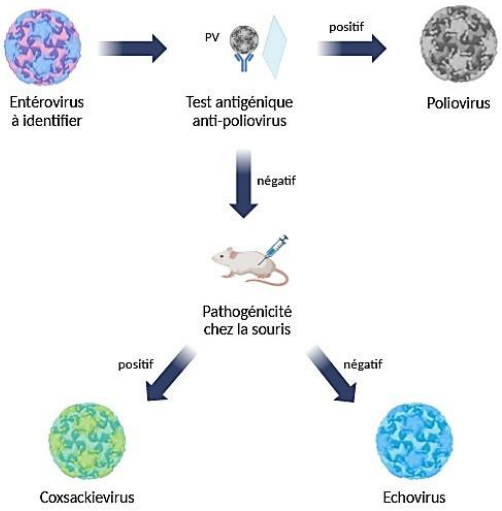
[145] Committee on the *Enteroviruses*, National Foundation for Infantile Paralysis. *Amer. J. Public Health*. **1957**, *47*, 1556-1566. PMID: 13487867.

[146] Melnick, J.L.; Hampil, B. *Bull. World Health Organ*. **1970**, *42* (6), 847-863. PMID: 4320132.

[147] Crowell R.L., Landau B.J. A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. Curr Top Microbiol Immunol. 1997; 223:1-11. PMID: 4320132.

[148] Pallansch, M.; Roos, R. *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses*. ***A Practical Guide to Clinical Virology***. 2nd Edition. Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A. Lippincott Williams and Wilkins. **2007**. *839-893*. DOI: 10.1002/0470857285.ch6.

A)



B)

Critères	Coxsackievirus A	Coxsackievirus B
Période d'incubation	2 à 6 jours	4 à 12 jours
Type de paralysies	Flasques	Spasmodiques
Myosites (nouveau-nés)	Généralisées	Focales si présentes
Panniculites (nouveau-nés)	/	Marquées
Encéphalites (nouveau-nés)	/	Fréquentes
Pancréatites (souriceau sevré)	/	Fréquentes

Schéma 16. Système de classification des Entérovirus (1940 – 1970). A) Arbre des décisions pour identifier et classer les Entérovirus. B) Tableau clinique sur souriceau identifié pour les Coxsackievirus A ou B.

Limites de la classification par pathogénicité.

Cependant, le pouvoir pathogène ne permet pas de classer efficacement les virus, compte-tenu de l'incohérence de certains résultats. En effet, avec la multiplication des sérums de référence possédant des anticorps directement prélevés sur des individus ou chevaux infectés, de nombreux virus identifiés comme différents se révèlent être identiques d'un point de vue sérotypique.

Par exemple, l'échovirus 8 (E8) est maintenant considéré comme un variant de l'échovirus 1 (E1).[149] De même, l'échovirus 34 (E34) possède le même sérotype que le coxsackievirus-A24 (CVA24),[149 (E1)] tout comme l'échovirus 28 (E28) et le rhinovirus-1A (RV-1A).[150] Enfin, *a posteriori*, les échovirus 22 et 23 ont été réévalués comme appartenant à un nouveau genre, à savoir les paréchovirus.[151]

Le fait qu'E34 et CVA24 soient le même virus remet en question l'intérêt de cette classification puisque E34 ne devrait pas être pathogène pour les souriceaux alors que CVA24 devrait l'être.

---

[149] Rosen, L.; Melnick, J.L.; Schmidt, J.; Wenner, H.A. *Arch. Gesamte Virusforsch* **1970**, *30* (1), 89-92. DOI: 10.1007/BF01262587.

[150] International Enterovirus Study Group, Melnick J.L; Cockburn, W.C.; Dalldorf, G.; Gard, S.; Gear, J.H.S.; Hammon, W.M.; Kaplan, M.M.; Nagler, F.P.; Oker-Blom, N.; Rhodes, A.J.; Sabin, A.B.; Verlinde, J.D.; von Magnus, H. *Virology*. **1963**, *19* (1), 114-116. DOI: 10.1016/0042-6822(63)90034-5.

[151] Joki-Korpela, P.; Hyypia, T. *Ann. Med*. **2001**, *33* (7), 466-471. DOI: 10.3109/07853890109002095.

De même, le critère pathologique n'est pas viable pusique les pathologies provoquées par l'ensemble de chaque groupe (hormis PV) ne sont pas homogènes au sein de chaque groupe. Certaines sont très spécifiques de quelques virus, telles les conjonctivites hémorragiques (CVA24v, E7, EV-D70) ou le syndrome pieds-mains-bouche (CVA6, CVA10, CVA16, EV-A71). Au contraire, d'autres sont communes à tous les groupes, comme les atteintes respiratoires ou celles du système nerveux, majoritairement la méningite lymphocytaire.

Seconde classification et extension des types d'Entérovirus.

Classement selon leurs sérotypes.

C'est pourquoi dans les années 60, la classification selon le pouvoir pathogène a été abandonnée pour un classement selon les sérotypes des virus. Les virus à identifier sont ainsi mis en contact à des sérums de référence de patient·es ayant été infecté·es par un type de virus connu [**Schéma 17**]. A partir d'un test d'agglutination, il est donc possible de tester les différents antigènes des virus connus. Ainsi, le virus est reconnu ou décrit comme nouveau sérotype d'Entérovirus.

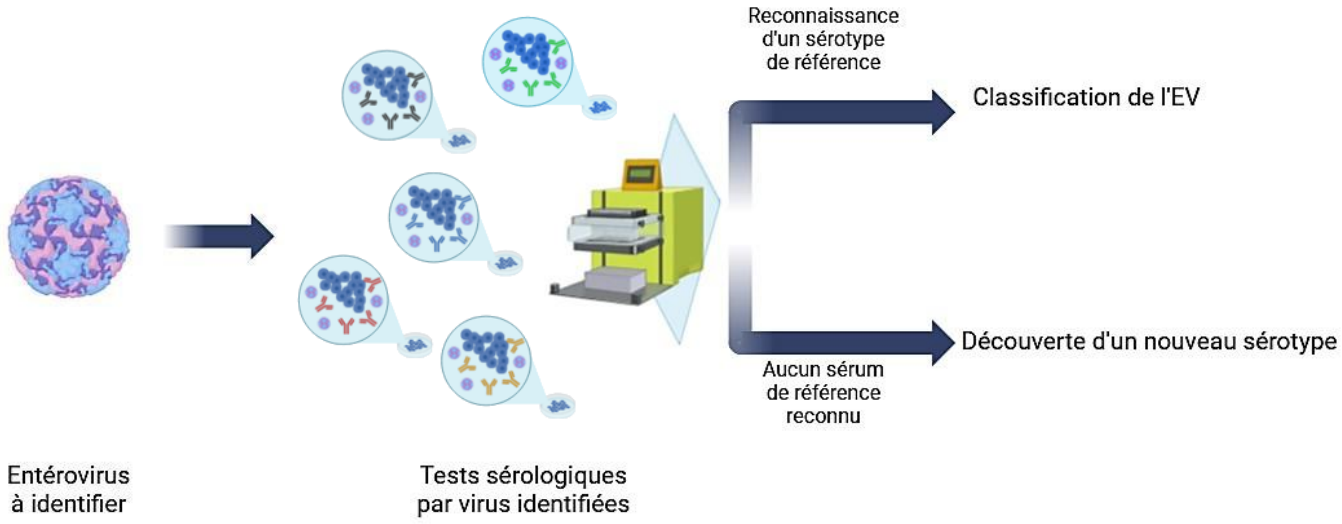


Schéma 17. Système de classification des Entérovirus (1970 – 2000).

Les différents sérotypes identifiés précédemment ayant été analysés, de nombreuses similarités ont été identifiées. La découverte de nouveaux Entérovirus n'a plus fait l'objet de différenciations en coxsackievirus, échovirus ou poliovirus, mais selon des espèces d'entérovirus, noté de A à D, suivie d'une numérotation dans l'ordre de découverte des nouveaux types de virus.

Par exemple, en 1962, l'entérovirus D68 (EV-D68) a été isolé en Californie, ouvrant la nouvelle classification selon le genre Entérovirus (EV), substituant les sous-groupes CV, E et PV pour les espèces EV-A, B, C et D.[152,153] Les entérovirus 69, 70 et 71 ont respectivement été découverts en 1959 (Mexique), 1971 (Japon, Maroc, Singapour) et 1970 (Californie, Etats-Unis).[154] L'entérovirus 72, tout d'abord inscrit dans le genre Entérovirus, a par la suite été reclassé en virus de l'Hépatite A. D'autres EV ont été identifiés comme étant non pathogènes chez l'être humain. Pour ces virus nouvellement isolés, infectant principalement l'animal, ils ont été classés selon l'animal porteur où il a été prélevé (EV bovin, EV porcin, EV simien).
Durant la fin du XXème siècle, la famille des Picornavirus a été divisée en deux : les entérovirus et les rhinovirus (RV). En 1956, lors de la transition entre la classification selon le pouvoir pathogène et selon le sérotypage, une première publication décrivit un autre type de virus associé à des maladies respiratoires.[155] C'est la première identification d'un rhinovirus dans la littérature scientifique. Ce virus a été déclaré comme appartenant à un nouveau groupe du fait de la caractérisation d'anticorps impliqués dans la réponse immunitaire, non identifiés auparavant, de la spécificité des symptômes détectés sur les patient·es portant le virus venant d'être isolé et l'absence de détection du virus chez des personnes n'ayant pas les mêmes signes cliniques. Dans un premier temps, les rhinovirus ont été appelés ERC virus (pour *ECHO 28Rhinovirus-Coryzavirus*) puisque le virus de référence ayant servi à caractériser ce nouveau genre viral fut l'échovirus 28 (E28).[156] Cependant, la terminologie ne fut pas retenue et la classification fut refaite pour obtenir 55 types de rhinovirus, avec une numérotation similaire à celle des entérovirus. C'est à ce moment que l'E28 devint le rhinovirus 1A (RV-1A). Le terme « rhinovirus » (RV) fut retenu car ces virus sont particulièrement adaptés à la zone nasopharyngée.[157] Contrairement aux EV, les RV se répliquent plus efficacement à 33 °C,

---

[152] Weston, S.; Frieman, M.B. *Respiratory Viruses*. ***Encyclopedia of Microbiology***. Fourth Edition. Academic Press. **2019**. 85-101. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.66161-5.

[153] Zhang, L.; Zhao, N.; Huang, X.; Jin, X.; Geng, X.; Chan, T.C.; Liu, S.-L. *Sci. Rep*. **2017**, *7*, 45202. DOI: 10.1038/srep45202.

[154] Melnick, J.L.; Tagaya, I.; von Magnus, H. *Intervirology*. **1974**, *4* (6), 369-370. DOI: 10.1159/000149872.

[155] Price, W.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **1956**, *42* (12), 892-896. DOI: 10.1073/pnas.42.12.892.

[156] Ketler, A.; Hamparian, V.V.; Hilleman, M.R. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1962**, *110*, 821-831. DOI: 10.3181/00379727-110-27662.

[157] Cordey, S.; Schibler, M.; Tapparel, C.; Kaiser, L. *Virologie*. **2008**, *12* (5), 361-373. DOI: 10.1684/vir.2011.12135.

température de la zone qu'ils infectent. De plus, les RV sont sensibles aux pH acides, et ne peuvent atteindre le tractus intestinal.

Limites de la classification par sérotypes.

Cependant, la démultiplication des virus entrant dans le genre Entérovirus a rendu difficile l'identification de nouveau virus par comparaison avec les sérotypes des virus déjà classifiés. En effet, pour chaque nouvelle souche, des tests d'immunodétection grâce aux anticorps de patient·es infecté·es avec les virus classés sont effectués pour identifier le type d'agent infectieux. Cela demande donc d'avoir un stock conséquent de ces solutions, ce qui est coûteux en temps, en espace et en moyen financier. Des combinaisons sérologiques ont donc, dans un premier temps, étaient suggérées, mélangeant les anticorps associés à plusieurs entérovirus, afin de réduire le nombre de solutions à stocker.[158,159] Malgré cela, le nombre important de solutions à posséder et le manque de laboratoires en capacité d'effectuer le sérotypage et leur géodistribution restaient des inconvénients importants.[160] En dépit des tentatives de mélanges de sérums pour réduire leur nombre, de nombreux inconvénients subsistèrent pour continuer avec cette méthode. De même, le nombre croissant de virus identifiés impliquait la recherche de nouveaux mélanges à créer et à stocker ce qui aggravait l'inconvénient précédent.[161,162] Une autre problématique est apparue lors des prélèvements : les entérovirus sont rarement uniques lors des infections. Il arrive plus fréquemment d'avoir des infections d'agents infectieux multiples. Isoler différents entérovirus dans un mélange s'avérait alors difficile, ayant beaucoup de caractéristiques en commun. Enfin, les tests sérologiques manquaient de reproductibilité pour certains variants.[163] Certains virus circulants n'étaient pas reconnus par les sérums antigéniques de référence, alors que le virus de référence était inhibé par le sérum antigénique prélevé sur la·e patient·e infecté·e.

---

[158] Lim, K.A.; Benyesh-Melnick, M. *J. Immunol*. **1960**, *84*, 309-317. PMID: 14416964.

[159] Kenny, G.E.; Cooney, M.K.; Thompson, D.J. *Am. J. Epidemiol*. **1970**, *91* (4), 439-445. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121154.

[160] Melnick, J.L.; Wimberly, I.L. *Bull. World Health Organ*. **1985**, *63* (3), 543-550. PMID: 2994900.

[161] Melnick, J.L.; Rennick, V.; Hampil, B.; Schmidt, N.J.; Ho, H.H. *Bull. World Health Organ*. **1973**, *48* (3), 263268. PMID: 4355401.

[162] Melnick, J.L.; Schmidt, N.J.; Hampil, B.; Ho, H.H. *Intervirology*. **1977**, *8* (3), 172-181. DOI: 10.1159/000148892.

[163] van Loon, A.M.; Cleator, G.C.; Ras, A. *Bull. World Health Organ*. **1999**, *77* (3), 217-23. PMID: 10212511.

Classification actuelle et découverte des derniers Entérovirus.

Avantages de la biologie moléculaire.

Ces paradoxes et ces difficultés matérielles ont pu être dépassées avec l'arrivée dans les années 2000 d'une nouvelle technique de typage moléculaire. En effet, les critères génétiques sont plus efficaces que ceux sérologiques afin de classer et identifier les différents virus au sein du genre Entérovirus [**Schéma 18**].[7] En effet, au vu des inconvénients cités ci-dessus, la séquence nucléotidique des génomes des Entérovirus semble plus précise pour les classer plutôt que les tests d'immunodétection indirects. Le typage moléculaire permet donc d'analyser des mélanges d'Entérovirus sans avoir à isoler chaque virus les uns des autres. De plus, il n'est plus nécessaire d'avoir l'intégralité des sérums de référence pour pouvoir identifier les différents types de virus. Cela permet donc un gain d'espace et supprime les coûts de maintenance tout en accélérant l'identification grâce à la transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Enfin, le séquençage évite les aléas expérimentaux en utilisant les séquences nucléotidiques numérisées et en évitant la multiplication des tests d'identification par confrontation à de multiples références.

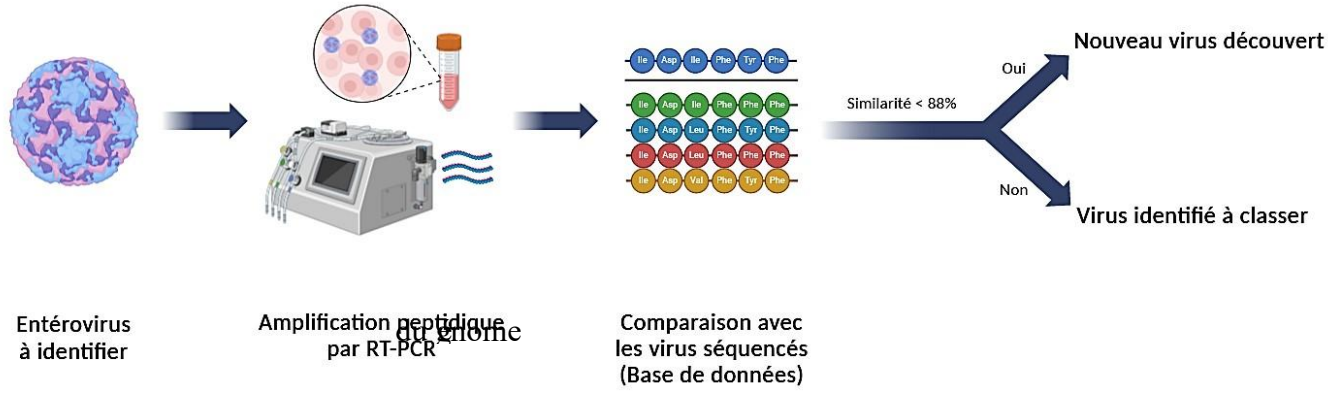


Schéma 18. Système de classification des Entérovirus (2000 jusqu'à aujourd'hui).

Du fait que les EV soient des virus non enveloppés, nous pouvons penser à un rapprochement entre le sérotypage et la structure de la capside, notamment la protéine VP1 qui possède de nombreux sites reconnus par des récepteurs cellulaires.[164] C'est pour cela que le séquençage génétique s'intéresse à un segment particulier de la partie codante pour la VP1, ne tenant aucun compte de celles codantes pour les protéines non structurales ou non traduites.

---

[164] Oberste, M.S.; Maher, K.; Kilpatrick, D.R.; Pallansch, M.A. J. Virol. 1999, 73 (3), 1941-1948. DOI: 10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

Une problématique du séquençage des virus pour leur identification vient du fait des mutations qui peuvent advenir naturellement ou au contact d'agents antiviraux, avec une pression de sélection. Afin de ne pas avoir de nouveau une démultiplication des types de virus à identifier, une marge de divergence a été introduite pour rassembler certains variants ensemble. Dans le cas des rhinovirus, la marge de divergence nucléotidique pour la région codant pour la protéine VP1 admise est comprise entre 12 et 13%.[165,166,167] Pour les autres entérovirus, la marge est plus grande (25% au niveau nucléotidique et 12% au niveau peptidique).[168]

Découverte des derniers Entérovirus connus à ce jour.

Grâce à cette nouvelle technique d'identification, des virus considérés comme différents se sont vu être reclassés comme un même et unique type de virus. En effet, les séquences nucléotidiques des CVA11 et CVA15, ainsi que des CVA13 et CVA18, se sont révélés semblables avec une divergence inférieure à celle limite pour différencier deux types de virus. Au contraire, à partir des différents virus isolés, classifiés comme étant des CVA24, un autre type de virus a été observé. Les séquences nucléotidiques du CVA24 ont été donc divisées en gardant une partie sous le même type de virus et l'autre en devenant celles de l'EV-C99, nouvellement identifié.[169]

Classement selon leur séquençage nucléotidique.

Depuis le début du 20ème siècle, le Conseil international des unions scientifiques* a fondé plusieurs unions scientifiques dont une pour promouvoir le progrès de la santé et le bien-être, l'Union internationale des sociétés de microbiologie (IUMS). Depuis 1971, le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) a été chargé par l'IUMS de créer, d'organiser et

---

[165] McIntyre, C.L.; McWilliam Leitch, E.C.; Savolainen-Kopra, C.; Hovi, T.; Simmonds, P. *J. Virol*. **2010**, *84* (19), 10297–10310. DOI: 10.1128/JVI.00962-10.

[166] Simmonds, P.; McIntyre, C.; Savolainen-Kopra, C.; Tapparel, C.; Mackay, I.M.; Hovi, T. *J. Gen. Virol*. **2010**, *91* (Pt 10), 2409–2419. DOI: 10.1099/vir.0.023994-0.

[167] McIntyre, C.L.; Knowles, N.J.; Simmonds, P. *J. Gen. Virol*. **2013**, 94 (Pt 8), 1791-806. DOI: 10.1099/vir.0.053686-0.

[168] Oberste, M.S.; Maher, K.; Kilpatrick, D.R.; Pallansch, M.A. *J. Virol*. **1999**, *73* (3), 1941-1948. DOI: 10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

[169] Brown, B.A.; Maher, K.; Flemister, M.R; Naraghi-Arani, P.; Uddin, M.; Oberste, M.S.; Pallansch, M.A. *J. Gen. Virol*. **2009**, *90* (Pt 7), 1713-1723. DOI: 10.1099/vir.0.008540-0.

* Ancien nom du Conseil international pour la science, organisation non gouvernementale, maintenant Conseil international des sciences par fusion avec le Conseil international des sciences sociales.

maintenir à jour une taxonomie internationale pour les virus.[170] A ce jour, l'ICTV a publié dix rapports pour mettre à jour cette taxonomie. Actuellement, la composition du genre Entérovirus comporte quinze espèces : sept sont pathogènes pour l'être humain, les entérovirus EV-A à D et les rhinovirus RV-A à C [**Tabeau 1**].[1] En effet, de nouvelles espèces ont été découvertes dans les années 2000 grâce au séquençage génétique. Parmi ces espèces, les RV-C et les EV-C (EV-C109, EV-C117, EV-C118) n'avaient pas pu être détectées par analyse sérologiques car elles ne peuvent pas être cultivées dans une des lignées cellulaires standard. La plupart des virus récemment découverts ont le même tableau clinique que les RV. Cela avait conduit à des confusions lors des classifications précédentes. Par exemple, dans un premier temps, EV-D68 avait été référencé sous le nom RV-87.[171] Ces erreurs historiques de classification ont emmené à regrouper les entérovirus et les rhinovirus comme membre du genre Entérovirus malgré les différences de résistance à l'acidité ou de la température idéale de réplication. Il faut aussi savoir que EV et RV possèdent des paramètres sérotypiques et génomiques proches. Au sein des espèces entérovirus, dans leur globalité, une ressemblance nucléotidique est observée entre 58 et 63%.[168] De même, pour les espèces rhinovirales, elle est entre 53 et 56%.[167] Afin de garder les différentes appellations historiques, les rhinovirus n'ont pas été renommés en entérovirus, tout comme les oxsackievirus, les échovirus ou les poliovirus.

Limites de la classification par typage moléculaire.

Certes, il est beaucoup plus rapide d'utiliser la méthode de séquençage d'une partie de la protéine virale VP1 de la capside des Entérovirus en comparaison aux autres techniques connues. De plus, elle permet d'identifier les différents Entérovirus même présents dans un mélange sans devoir séparer et cultiver chacun des virus. Cela a permis de découvrir de nouveaux virus (RV-C) non cultivables sur des cellules *in vitro* standard.

Cependant, ce modèle de typage moléculaire possède lui-aussi quelques inconvénients et incertitudes. En effet, que ce soit au sein d'une espèce ou même d'un seul type de virus, il reste une marge d'erreur pour pouvoir rassembler plusieurs séquences génétiques au sein d'un même groupe et ne pas démultiplier les virus à classer. Cette limite est choisie de manière arbitraire. Ainsi, une certaine variation nucléotidique est autorisée pour caractériser un seul et même type de virus. Cette diversité provient de légères mutations dont l'origine est difficile à déterminer.

---

[170] Page de présentation des missions. Internation Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Lien.

[171] Blomqvist, S.; Savolainen, C.; Raman, L.; Roivainen, M.; Hovi, T. *J. Clin. Microbiol*. **2002**, 40 (11), 42184223. DOI: 10.1128/JCM.40.11.4218-4223.2002.

Elles peuvent provenir d'une erreur faite par la polymérase lors de la RT-PCR ou directement provenir du virus analysé, portant une mutation initialement. Certaines de ces mutations d'origine semblent avoir été sélectionnées provenant de lieux assez refermés sur eux-mêmes. En effet, des variants d'EV-A71 propres à des communautés indiennes, malgaches et d'Afrique subsaharienne ont été détectés uniquement dans un périmètre très défini.[172,173] Il arrive parfois que les Entérovirus soient aussi identifiés sans que l'infection associée n'ait débuté, ou par contamination extérieure lors de la mise de l'échantillon à analyser dans la RT-PCR.

De plus, un biais de sélection des virus les plus pathogènes pour l'homme a été observé dans l'étude des entérovirus.[174] En effet, plus un virus est considéré comme dangereux, plus le nombre de recherches pour le caractériser est élevé. Au contraire, certains EV n'ont à ce jour qu'une séquence génétique connue partielle (EV-A119, E1 Bryson (ex-E8), EV-B78, EV-B93, EV-B110, EV-C95, EV-C104, EV-D68 F02-3607-Com, EV-D111, EV-D120…).[1] Il faut aussi bien séparer la variation nucléotidique de la diversité peptidique au sein d'un même type de virus. Par exemple, CVA13 possède une forte variation nucléotidique mais une diversité peptidique semblable aux autres virus de son espèce.[174]

Certaines parties de l'ARN viral semblent posséder des séquences nucléotidiques uniques pour chaque génotype, telle que celle codant pour l'*ecr*. Cela pourrait être une alternative à la classification actuelle prenant en compte uniquement la séquence de la VP1.

De plus, la correspondance entre génotype et sérotype est actuellement vérifiée la plupart du temps.[175] Cependant, cette concordance a été réalisée il y a plus d'une vingtaine d'années. Les virus ayant naturellement mutés et de nouveaux ayant été découverts, il faudrait la réévaluer pour la valider de nouveau.[174] Le typage moléculaire n'est assuré que sur une certaine partie du gène de la capside, celui de la protéine VP1. Or, cette classification ne prend en aucun cas les séquences nucléotidiques des autres protéines structurales, ni celles non-structurantes ou non codantes. En effet, il a été observé la production de chimères regroupant protéine VP1 de CVB3

---

[172] Saxena, V.K.; Sane, S.; Nadkarni, S.S.; Sharma, D.K.; Deshpande, J.M. Genetic diversity of enterovirus A71. India. Emerg Infect Dis 2015 ; 21 : 123-6. DOI: 10.3201/eid2101.140743.

[173] Bessaud,; Razafindratsimandresy, R.; Nougairede, A.; Joffret, M.L.; Deshpande, J.M.; Dubot-Pérès, A.; Héraud, J.M.; de Lamballerie, X.; Delpeyroux, F.; Bailly, J.L. *PLoS One*. **2014**, *9* (3), e90624. DOI: 10.1371/journal.pone.0090624.

[174] Lukashev, A.N.; Vakulenko, Y.A. *J. Gen. Virol*. **2017**, *98* (12), 2968-2981. DOI: 10.1099/jgv.0.000966.

[175] Oberste, M.S.; Maher, K.; Kilpatrick, D.R.; Pallansch, M.A. *J. Virol*. **1999**, *73* (3), 1941-1948. DOI: 10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

et protéine VP2 de CVB4 lors d'infections conjointes.[176] Cette chimère était neutralisée par le sérum de référence anti-CVB4 mais pas celui anti-CVB3. Cela remet donc en cause la correspondance entre sérotype et génotype, se concentrant sur la protéine VP1. Enfin, n'oublions pas que l'utilisation de RT-PCR est coûteuse que ce soit en besoin de ressources techniques, d'énergie et de savoirs.

En conclusion, il reste difficile d'avoir une classification permettant de prendre en compte toute la diversité des Entérovirus. La classification actuelle semble être la plus efficace malgré son analyse partielle de la séquence nucléotidique virale.

[176] Bouslama, L.; Nasri, D.; Chollet, L.; Belguith, K.; Bourlet, T.; Aouni, M.; Pozzetto, B.; Pillet, S. J. Virol. 2007. 81 (17), 8944-8952. DOI: 10.1128/JVI.00180-07.

B. Entérovirus – Virus ubiquitaires et pathologies associées.

1) Répartition mondiale des Entérovirus.

Répartition des espèces et des génotypes dans le monde.

Les Entérovirus (EV et RV) sont ubiquitaires. Ils sont présents sur tous les continents. Les RV ont une répartition plutôt homogène autour du monde même si quelques types de virus ont été décrits dans des régions spécifiques.[177] Les EV, quant à eux, sont présents sur tous les continents avec une distribution qui diffère selon des régions bien définies.[178]

Répartitions des rhinovirus.

A ce jour, nous n'avons des données uniquement provenant d'Afrique, d'Asie et d'Europe.[177] Peu de différences ont été identifiées dans la répartition des différentes espèces sur ces trois continents. Les RV-A12, RV-A78 et RV-C2 ont été détectés dans de grandes proportions sur ces trois continents. Les variations de distribution sont à détailler selon chaque type de virus.
Ainsi, le RV-A43 est peu présent en Asie alors qu'il est très représenté ailleurs. De même, les RV-B sont très peu représentés, par comparaison aux autres espèces de RV, mais les RV-B48, RV-B69, RV-B70 et RV-B84 sont parmi les vingt-cinq types de virus les plus détectés en Afrique. Cela peut s'expliquer soit par la prévalence plus haute sur ce continent des RV-B ou par une sensibilité accrue des populations y habitant à cette espèce de RV.

Répartitions des entérovirus.

La distribution des EV est, quant à elle, plus divisée, avec des régions rassemblant certains types de virus. Les espèces majoritaires de celles-ci sont représentées sur la **Figure 2**.

---

[177] Esneau, C.; Duff, A.C.; Bartlett, N.W. *Viruses*. **2022**, *14* (1), 141. DOI: 10.3390/v14010141.

[178] Brown, D.M.; Zhang, Y.; Scheuermann, R.H. *Microorganisms*. **2020**, *8* (12), 1856. DOI: 10.3390/microorganisms8121856.

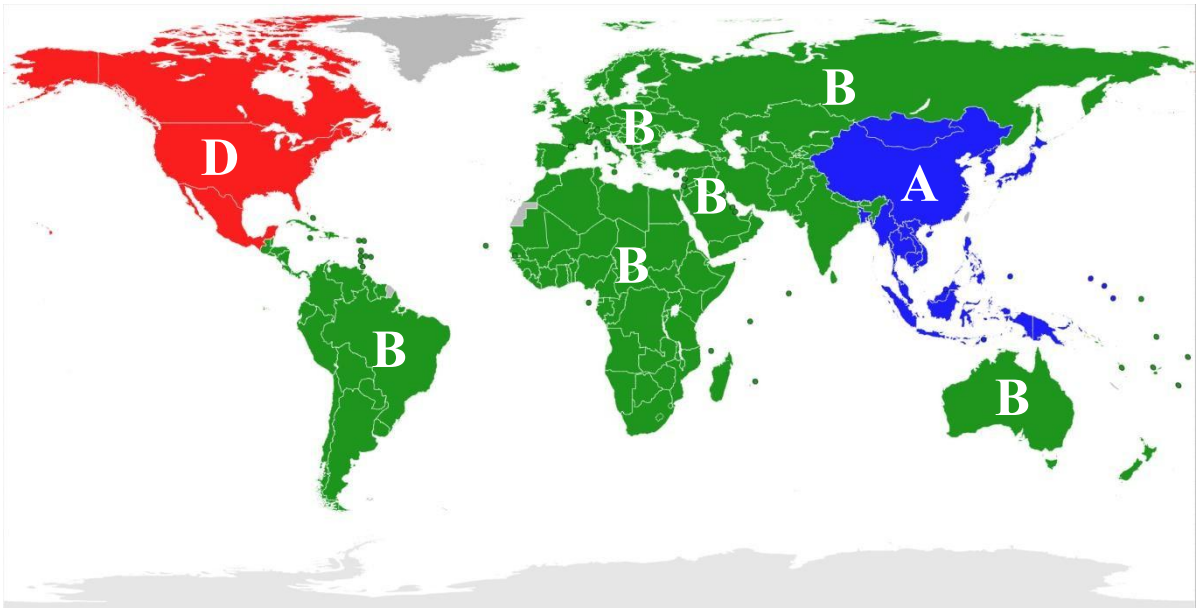


Figure 2. Répartition géographique des espèces majoritaires d'EV.

Les EV-A sont très présent en Asie du Sud-Est. Les types prévalents sont, dans l'ordre décroissant, l'EV-A71, l'EV-A6, l'EV-A16, puis l'EV-A10. Cela explique pourquoi la majorité des cas de syndrome pieds-mains-bouche sont observés dans cette région et plus particulièrement en Chine.[179] De plus, plusieurs cas de paralysie flasque aigüe ont été détectés en Asie et en Australie, du fait d'une infection à EV-A71.[180,181]

L'Amérique du Nord est principalement touchée par les EV-D, avec un nombre de séquençage identique à celui observé en Europe. Cependant, alors qu'ils représentent plus des trois quarts des infections en Amérique du Nord, ils représentent environ un dixième des infections à EV en Europe. Parmi les types de virus les plus inquiétants, l'EV-D68 a été classifié depuis 2015 comme pathogène ré-émergent préoccupant pour la santé publique.[182] En 2014, un cluster important avait été observé aux Etats-Unis, lié à des infections respiratoires sévères, avec des

[179] Liu, J.; Xiang, X.; Pu, Z.; Long, Y.; Xiao, D.; Zhang, W.; Li, Q.; Li, X.; Li, S.; Shao, Z.; Yang, X.; Xiong, Y. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19* (1), 19. DOI: 10.1186/s12879-018-3624-5.

[180] Teoh, H.L.; Mohammad, S.S.; Britton, P.N.; Kandula, T.; Lorentzos, M.S.; Booy, R.; Jones, C.A.; Rawlinson, W.; Ramachandran, V.; Rodriguez, M.L.; Andrews, P.I.; Dale, R.C.; Farrar, M.A.; Sampaio, H. *JAMA Neurol.* **2016**, *73* (3), 300-307. DOI: 10.1001/jamaneurol.2015.4388.

[181] McMinn, P.; Stratov, I.; Nagarajan, L.; Davis, S. *Clin. Infect. Dis*. **2001**, *32* (2), 236–242. DOI: 10.1086/318454.

[182] Imamura, T.; Oshitani, H. *Rev. Med. Virol*. **2015**, *25* (2), 102–114. DOI: 10.1002/rmv.1820.

retombées moindres en Europe, en Amérique du Sud et en Asie.[183,184,185,186] Du fait de son schéma biannuel, d'autres épidémies importantes ont été recensées en 2016 et 2018. Néanmoins, au Japon, des épidémies conséquentes ont été observées en 2013 et 2015, respectant la même saisonnalité mais avec une année de retard.[187] Cependant, une aggravation des symptômes liés à ce type de virus a été observée avec des cas de myélite flasque aigüe notamment lors de l'épidémie d'EV-D68 en 2014.[188]

Les EV-B sont les virus les plus observés dans le reste du monde. L'E30 est uniquement observé en Océanie et en Europe, avec une haute prévalence dans ce dernier continent. Plus de la moitié des infections à E30 (57 %) proviennent de patient·es y vivant. Quant aux EV-C, hormis les poliovirus, ils ne dominent aucun continent mais ont été principalement recensés en Afrique et en Amérique du Sud. CVA24 est celui majoritairement identifié, avec une prévalence pour cette dernière région, notamment en Guyane Française et au Brésil.[189,190] Il faut savoir que le nombre absolu de détections y est du même ordre que dans les pays asiatiques (Chine, Inde), même si,

---

[183] Holm-Hansen, C.C.; Midgley, S.E.; Fischer, T.K. *Lancet Infect. Dis*. **2016**, *16* (5), e64–e75. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00543-5.

[184] Kramer, R.; Sabatier, M.; Wirth, T.; Pichon, M.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; Josset, L. *Eurosurveillance*. **2018**, *23* (37), 1700711. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.37.1700711.

[185] Carballo, C.; Erro, M.G.; Sordelli, N.; Vazquez, G.; Mistchenko, A.S.; Cejas, C.; Rodriguez, M.; Cisterna, D.M.; Freire, M.C.; Contrini, M.M.; Lopez, E.L. *Emerg. Infect. Dis*. **2019**, *25* (3), 573-576. DOI: 10.3201/eid2503.170897.

[186] Knoester, M.; Helfferich, J.; Poelman, R.; van Leer-Buter, C.; Brouwer, O.F.; Niesters, H.G.M. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **2019**, *38* (1), 16–21. DOI: 10.1097/INF.0000000000002188.

[187] Pellegrinelli, L.; Giardina, F.; Lunghi, G.; Uceda Renteria, S.C.; Greco, L.; Fratini, A.; Galli, C.; Piralla, A.; Binda, S.; Pariani, E.; Baldanti, F. *Euro. Surveill*. **2019**, *24* (7), 1900090. DOI: 10.2807/15607917.ES.2018.24.7.1900090.

[188] Messacar, K.; Schreiner, T.L.; Maloney, J.A.; Wallace, A.; Ludke, J.; Oberste, M.S.; Nix, W.A.; Robinson, C.C.; Glodé, M.P.; Abzug, M.J.; Dominguez, S.R. *Lancet*. **2015**, *385* (9978), 1662-1671. DOI: 10.1016/S01406736(14)62457-0.

[189] Medina, N.H.; Haro-Munoz, E.; Pellini, A.C.; Machado, B.C.; Russo, D.H.; Timenetsky, M.D.; Carmona, R.D.C.C. *Rev. Panam. Salud Publica*. **2016**, *39* (2), 137–141. PMID: 27754516.

[190] Enfissi, A.; Joffret, M.L.; Delaune, D.; Delpeyroux, F.; Rousset, D.; Bessaud, M. *Intervirology*. **2017**, *60* (6), 271–275. DOI: 10.1159/000489339.

pour ces derniers, il représente un pourcentage faible des infections à EV.[191,192,193] L'Afrique occidentale présente aussi plusieurs foyers de CVA24.[194] Avec un pourcentage de séquençage entre 3 et 10%, les CVA13 (9,5%), CVA20 (4,1%), et EV-C99 (3,1%) sont les EV-C les plus répandus en Afrique. La prévalence des différents EV au sein d'une même région peut aussi varier au fil de l'année. Du fait des différences de temporalité de pics d'infections pour les types de virus, en Ohio, les EV-A sont majoritaires au printemps puis ce sont les EV-B en été et en automne.[195]

Limites de la détection pour déterminer la répartition des Entérovirus.

Cependant, cette distribution peut présenter des limites du fait de la qualité des données et des multiples paramètres influant sur la détection des différents Entérovirus. Des facteurs socioéconomiques peuvent expliquer cette différence de répartition des types de virus parmi lesquels la densité, l'industrialisation et la démographie des zones d'habitation.[196] Les Entérovirus se propagent par contamination des gouttelettes de salives projetées lors de la respiration ou de prise de parole, ainsi que par contamination des selles des personnes infectées. En effet, les Entérovirus se propageant par voie féco-orale ou *via* des aérosols, dans des espaces à forte densité, la circulation entérovirale se trouve donc favorisée. Au contraire, certaines souches de virus n'ont été identifiées que dans certaines zones isolées, du fait du peu de connexion avec le reste du monde.[172,173] De plus, dans le cas des symptômes respiratoires, il a été démontré que la pollution de l'air a des effets pro-inflammatoires et exacerbe l'asthme rendant plus vulnérables les populations qui y sont exposées.[197] De même, des polluants, comme les substances contenant des per et polyfluoroalkyles (PFAS), engendrent une

---

[191] Tavares, F.; Campos, R.D.M.; Burlandy, F.; Fontella, R.; De Melo, M.M.M.; Da Costa, E.V.; Da Silva, E.E. *PLoS ONE*. **2011**, *6* (8), e23206. DOI: 10.1371/journal.pone.0023206.

[192] Zhang, Y.; Sun, Q.; Cui, H.; Yan, D.; Fan, Q.; Song, Y.; Zhu, S.; Li, X.; Huang, G.; Ji, T.; Hu, L.; Wang, D.; Yang, Q.; Xu, W. *Sci. Rep*. **2016**, 6, 33595. DOI: 10.1038/srep33595.

[193] Shukla, D.; Kumar, A.; Srivastava, S.; Dhole, T.N. *Arch. Virol*. **2013**, 158 (3), 679–684. DOI: 10.1007/s00705012-1520-7.

[194] Burr, S.E.; Sillah, A.; Joof, H.; Bailey, R.L.; Holland, M.J. *BMC Res. Notes*. **2017**, 10 (1), 692. DOI: 10.1186/s13104-017-3007-9.

[195] Brinkman, N.E.; Fout, G.S.; Keely, S.P. *mSphere*. **2017**, *2* (3), e00099-17. DOI: 10.1128/mSphere.00099-17.

[196] Bo, Y.C.; Song, C.; Wang, J.F.; Li, X.W. *BMC Public Health*. **2014**, 14, 358. DOI: 10.1186/1471-2458-14358.

[197] Glencross, D.A.; Ho, T.R.; Camiña, N.; Hawrylowicz, C.M.; Pfeffer, P.E. *Free Radic. Biol. Med*. **2020**, 151, 56-68. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179.

immunotoxicité lors de contacts répétés.[198] Cela se traduit par une diminution des anticorps liés aux vaccinations ainsi qu'une immunité acquise par contact direct avec l'agent pathogène, avec une augmentation des risques face aux maladies communes. Enfin, les différentes catégories socio-professionnelles ne sont pas réceptives aux messages de prévention de la même manière, selon le mode de communication utilisé par exemple, conduisant à des comportements plus ou moins à risque.

Enfin, les moyens dédiés à la surveillance des Entérovirus n'est pas la même selon les politiques nationales ou régionales ainsi que les moyens donnés aux différents pays, le suivi des différents Entérovirus détectés étant plus développé en Asie du Sud-Est et en Europe. Par exemple, la maladie pieds-mains-bouche (MPMB) est une maladie à déclaration obligatoire dans certains pays asiatiques, notamment la Chine.[199] Cela peut expliquer le fait que la moitié des séquençages réalisés dans le monde (54,6%) provient de cette région. Dans un autre registre, un réseau académique d'étude et de suivi des Entérovirus a été mis en place pour évaluer leur danger en Europe.[200] Au contraire, malgré la quasi-élimination des PV, l'Afrique et l'Asie centrale ont concentré la lutte anti-entérovirale contre ces types de virus. Cela peut donc expliquer le peu de séquençage de NPEV issus de la région, dû à cette stratégie antivirale. Dans le cas des RV, les symptômes associés sont souvent bénins ce qui n'implique pas le séquençage systématique du virus associé à une infection. Ainsi, seules les infections les plus sévères nécessitant un dépistage peuvent être décrites comme présentes, là où d'autres ne sont pas identifiées. Enfin, l'immunité ou au contraire la sensibilité sélective de différentes populations peuvent aussi expliquer la répartition géographique des différents types de virus.

---

[198] Ehrlich, V.; Bil, W.; Vandebriel, R.; Granum, B.; Luijten, M.; Lindeman, B.; Grandjean, P.; Kaiser, A.M.; Hauzenberger, I.; Hartmann, C.; Gundacker, C.; Uhl, M. *Environ. Health*. **2023**, *22* (1), 19. DOI: 10.1186/s12940022-00958-5.

[199] Wang, J.; Zhang, S. *Front. Public Health*. **2023**, 11, 1162209. DOI: 10.3389/fpubh.2023.1162209.

[200] Harvala, H.; Benschop, K.S.M.; Berginc, N.; Midgley, S.; Wolthers, K.; Simmonds, P.; Feeney, S.; Bailly, J.L.; Mirand, A.; Fischer, T.K. *Microorganisms*. **2021**, *9* (9), 1827. DOI: 10.3390/microorganisms9091827.

2) Méthodes de diagnostic des infections à Entérovirus.

Différentes méthodes de détection des infections à Entérovirus ont été développées aujourd'hui. La principale méthode de diagnostic utilisée est le diagnostic direct de détection de matériel génétique par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RTPCR).[201] Elle est plus rapide et sensible que la culture virale comme système de détection.[202] L'ARN à analyser provient du sang, du sérum, du liquide cérébrospinal, d'urine ou de biopsies d'une personne potentiellement infectée. Le fait d'utiliser cette méthode permet, outre le fait de détecter la présence d'Entérovirus, son génotypage et donc son identification directe. De plus, il a été démontré que certains virus ne peuvent être cultivés (RV-C).

Principes des méthodes de diagnostic.

La RT-PCR a besoin d'une séquence ARN initiale.[203] Celle-ci sert de modèle pour la transcriptase inverse. L'ADN ainsi rétro-transcrit est ensuite amplifié comme substrat dans une polymérisation en chaîne. En ajoutant des amorces spécifiques reconnaissant la partie que l'on veut amplifier, les réactions sont plus efficaces. Les réactions peuvent se faire via une ou deux enzymes différentes.

La détection par culture virale est faite par coloration par immunofluorescence ou par l'utilisation d'antisérum. Elle peut provenir d'échantillons provenant du sérum, du rectum, des selles, du liquide cérébrospinal, de la gorge, du nasopharynx, des urines ou du sang de la personne dont on soupçonne l'infection à Entérovirus.[204,205] La culture virale permet une vérification en trois à huit jours.

---

[201] de Crom, S.C.; Rossen, J.W.; van Furth, A.M.; Obihara, C.C. *Eur. J. Pediatr*. **2016**, 175 (8), 1023-1029. DOI: 10.1007/s00431-016-2725-7.

[202] de Crom, S.C.; Obihara, C.C.; de Moor, R.A.; Veldkamp, E.J.; van Furth, A.M.; Rossen, J.W. *J. Clin. Virol*. **2013**, *58* (2), 449-454. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.07.017.

[203] Bachman, J. *Methods Enzymol*. **2013**, *530*, 67-74. DOI: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.

[204] Chuang, Y.Y.; Huang, Y.C. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. **2019**, *52* (6), 851-857. DOI: 10.1016/j.jmii.2019.08.018.

[205] Abzug, M.J. *Paediatr. Drugs*. **2004**, *6* (1), 1-10. DOI: 10.2165/00148581-200406010-00001.

Recommandations européennes.

Après la formation du Réseau Européen des Entérovirus Non-Polio (ENPEN), les scientifiques membres ont émis des prescriptions pour le diagnostic des Entérovirus.[206] La partie non-codante

5' de l'ARN viral semble être la partie la plus favorable à la détection. En effet, elle permet de reconnaître la présence de tous les types d'EV et de RV tout en pouvant donner une semiquantification de la charge virale. L'analyse des gènes codant pour les protéines VP1 et VP4 permet la rapide identification des EV. Le typage des virus peut se faire soit avec une séquence d'au moins 350 nucléotides du gêne de la VP1, ou si cela n'a pas été possible, avec une analyse conjointe des gènes des protéines VP2 et VP4. Enfin, la dernière solution est le séquençage de la totalité du génome. L'isolement du virus ne nécessite pas la possession de matériel coûteux mais a besoin de l'intervention de personnels qualifiés exerçant dans des laboratoires de référence. Leur sérologie peut être évaluée en utilisant des anticorps propres à leur capside et en utilisant les méthodes de détermination citées précédemment dans la section de l'historique de la classification des Entérovirus.

[206] Harvala, H;, Broberg, E.; Benschop, K.; Berginc, N.; Ladhani, S.; Susi, P.; Christiansen, C.; McKenna, J.; Allen, D.; Makiello, P.; McAllister, G.; Carmen, M.; Zakikhany, K.; Dyrdak, R.; Nielsen, X.; Madsen, T.; Paul, J.; Moore, C.; von Eije, K.; Piralla, A.; Carlier, M.; Vanoverschelde, L.; Poelman, R.; Anton, A.; López-Labrador, F.X.; Pellegrinelli, L.; Keeren, K.; Maier, M.; Cassidy, H.; Derdas, S.; Savolainen-Kopra, C.; Diedrich, S.; Nordbø, S.; Buesa, J.; Bailly, J.L.; Baldanti, F.; MacAdam, A.; Mirand, A.; Dudman, S.; Schuffenecker, I.; Kadambari, S.; Neyts, J.; Griffiths, M.J.; Richter, J.; Margaretto, C.; Govind, S.; Morley, U.; Adams, O.; Krokstad, S.; Dean, J.; Pons-Salort, M.; Prochazka, B.; Cabrerizo, M.; Majumdar, M.; Nebbia, G.; Wiewel, M.; Cottrell, S.; Coyle, P.; Martin, J.; Moore, C.; Midgley, S.; Horby, P.; Wolthers, K.; Simmonds, P.; Niesters, H.; Fischer, T.K. *J. Clin. Virol*. **2018**, *101*, 11-17. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.01.008.

3) Mode de transmission des Entérovirus liés à l'hôte et à l'environnement.

Voies de transmission.

Deux voies principales de transmission des Entérovirus dominent, à savoir la voie féco-orale pour les EV ainsi que par des aérosols pour les RV et quelques EV.

Voie féco-orale (EV principalement).

La principale voie de transmission des EV est la voie fécale.[207] Peu d'études ont étudié ce moyen de transmission. Les hypothèses s'appuient sur leurs propriétés physiques (résistance aux pH acides, température de réplication idéale à 37 °C) ainsi que la présence d'EV dans les fèces de personnes infectées. La contamination peut se faire soit de manière directe soit indirecte [**Schéma 19**].

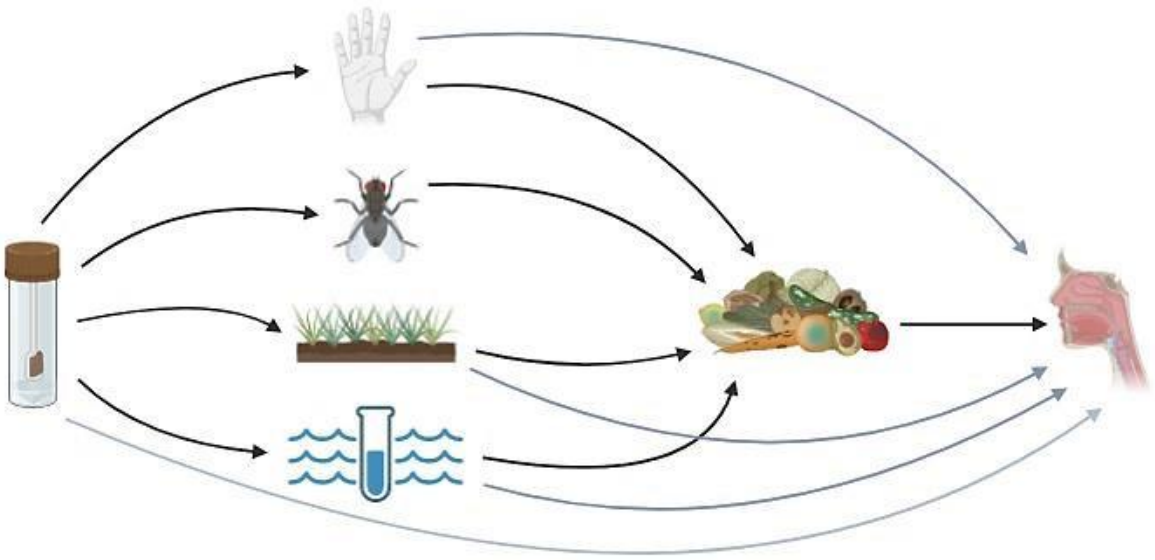


Schéma 19. Schéma des différents modes de contamination par la voie fécale. La couleur des flèches exprime le risque de contamination (noir – élevé ; gris foncé – moyen ; gris clair – faible).

La voie indirecte reste la principale avec une contamination par ingestion de nourriture ou d'eau contaminées, ainsi que *via* la peau, les doigts, des objets, ou la terre infectées.[208] Tout d'abord, la nourriture peut être vectrice de ces virus par contamination par de l'eau souillée, de la terre

[207] Hawkes, M.T.; Vaudry, W. *Paediatr. Child Health*. **2005**, *10* (7), 383-388. PMID: 19668644.

[208] Wagner, E.G.; Lanoix, J.N. *Monogr. Ser. World Health Organ*. **1958**, 39, 1-182. PMID: 13581743.

où ils sont présents ou par contact direct avec des excréments. Les mouches et autres insectes coprophages peuvent aussi contaminer l'alimentation. L'eau souillée peut être aussi directement ingérée, avec un mauvais traitement du réseau d'eau potable. De plus, l'infection *via* la terre est souvent due à la géophagie infantile bien que certaines pratiques aient été observées chez l'adulte.[209] La peau, et plus particulièrement les doigts, ou bien des objets ayant été contaminés peuvent également transmettre les virus à l'être humain. Ils peuvent directement être insérés dans la bouche, mais la voie la plus courante est la mise en contact de ces entités portant le virus avec de la nourriture qui sera elle-même contaminée puis ingérée, propageant l'infections virale.

Certaines pratiques, notamment thérapeutiques ou sexuelles, liées à un risque ou une volonté de coprophagie, représentent un mode de transmission peu courant.

Transmission par des aérosols (RV principalement).

La voie de transmission par aérosols peut, elle aussi, se faire de manière directe ou indirecte, par contamination de fomites [**Schéma 20**].

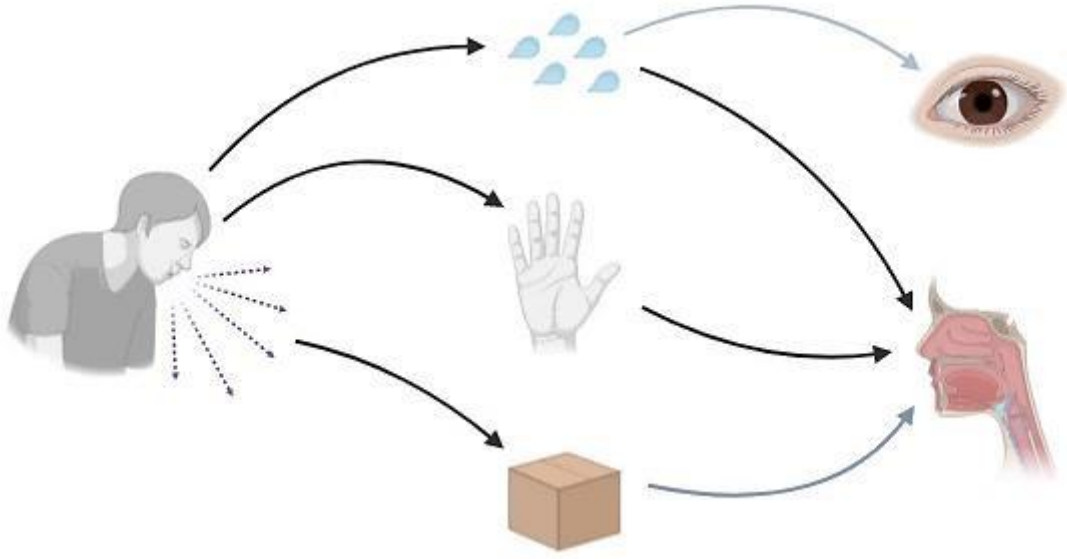


Schéma 20. Schéma des différents moyens de contamination par aérosols. La couleur des flèches exprime le risque de contamination (noir – élevé ; gris – faible).

[209] Henry, J.; Kwong, A.M. **2003**, *24* (4), 353–371. DOI: 10.1080/01639620390195222.

La contamination se fait la plus couramment par inhalation de gouttelettes contenant le virus, libérées en aérosol par une personne infectée.[210] Les chances de transmission sont d'autant plus élevées que les pièces sont mal aérées ou ventilées.[211] Les yeux sont aussi une surface exposée à ces vecteurs de RV. Cependant, après une courte exposition par sprays d'aérosol contaminé par des RV-A39, aucun des volontaires n'a été par la suite infecté.[212] Cela permet de conclure que l'infectiosité se fait principalement par contact direct avec les muqueuses nasales. Un autre moyen courant identifié de vecteur des infections à RV est la peau, et plus précisément les doigts, directement mis en contact avec les muqueuses conjonctivales ou nasales. Les virus, mêmes séchés, ont réussi à infecter des individus dans plusieurs études.[213,214] Pour ce qui est des objets, les résultats diffèrent. Certaines études ne constatent pas d'infection, si ce n'est *via* des fomites restés humides sans interruption, en céramique ou en plastique.[213,214] La durée de vie des RV est de maximum une heure sur les surfaces en coton, le papier, la rayonne, et de trois heures sur l'acier inoxydable, le bois verni, le formica, le nylon, l'acétate de cellulose, la laine ou la soie. Enfin certaines sécrétions en elles-mêmes, si suffisamment infectées, peuvent être le vecteur de l'infection.[213,214]

En conclusion, plusieurs études semblent désigner la contamination directe comme seule voie de transmission probable. En effet, les conditions par voie indirecte semblent trop spécifiques pour envisager la propagation des RV. Cela a été vérifié par la réduction de la charge virale circulante dans des communautés fortement sensibilisées, par le lavage des mains ou le nettoyage fréquent des objets utilisés.[215,216,217]

---

[210] Cate, T.R.; Couch, R.B.; Fleet, W.F.; Griffith, W.R.; Gerone, P.J.; Knight, V. *Am. J. Epidemiol*. **1965**, 81, 95105. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120501.

[211] Kolarik, B.; Andersen, Z.J.; Ibfelt, T.; Engelund, E.H.; Møller, E.; Bräuner, E.V. *Indoor Air*. **2016**, *26* (2), 157167. DOI: 10.1111/ina.12202.

[212] Bischoff, W.E. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. **2010**, *31* (8), 857-859. DOI: 10.1086/655022.

[213] Reed, S.E. J. Hyg. (Lond.). **1975**, *75* (2), 249-258. DOI: 10.1017/s0022172400047288.

[214] Hendley, J.O.; Gwaltney, J.M. Jr. *Epidemiol. Rev*. **1988**, 10, 243-258. PMID: 2852117.

[215] Gudnason, T.; Hrafnkelsson, B.; Laxdal, B.; Kristinsson, K.G. *Scand. J. Infect. Dis*. **2013**, *45* (5), 397-403. DOI: 10.3109/00365548.2012.749424.

[216] Zomer, T.P.; Erasmus, V.; Looman, C.W.; Tjon-A-Tsien, A.; van Beeck, E.F.; de Graaf, J.M.; van Beeck, A.H.; Richardus, J.H.; Voeten, H.A. *Epidemiol. Infect*. **2015**, *143* (12), 2494-2502. DOI: 10.1017/S095026881400329X.

[217] Ibfelt, T.; Engelund, E.H.; Schultz, A.C.; Andersen, L.P. *J. Hosp. Infect*. **2015**, *89* (2), 109-115. DOI: 10.1016/j.jhin.2014.10.007.

Autres moyens de transmission.

D'autres moyens non courants de transmission ont aussi été identifiés. Ainsi, des cas ont été observés après contact avec de l'eau de mer ou de piscine, porteuse d'EV.[218,219] Des cas de contamination de nouveau-né·es pendant la grossesse ont été signalés.[220,221] La principale cause de transmission, hormis le passage transplacentaire, est la mise en contact des nouveau-né·e avec le virus *via* le sang maternel, les selles, le liquide amniotique ou les sécrétions cervicales et vaginales. En 2018, une étude en France a mesuré une prévalence d'infections à EV de 13% chez les femmes de 4 à 9,5 mois de grossesse ayant de la fièvre.[222] Les nouveau-né·es ont eu une méningite sévère au 5ème jour, ainsi que des myocardites. La transmission par le lait maternel est discutée. En effet, malgré le fait qu'une étude ait décrit la prévention des infections à Entérovirus par la présence d'anticorps, une infection au CVB3, ainsi qu'une à E19, *via* ce mode de transmission, ont aussi été reportées.[223,224,225] Enfin, les Entérovirus peuvent se transmettre *via* des infections nosocomiales.[226]

---

[218] Leveque, N.; Andreoletti, L. *Clin. Infect. Dis*. **2008**, *47* (9), 1244. DOI: 10.1086/590563.

[219] Keswick, B.H.; Gerba, C.P.; Goyal, S.M. *Am. J. Public Health*. **1981**, 7i1 (9), 1026-1030. DOI: 10.2105/ajph.71.9.1026.

[220] Modlin, J.F. *Rev. Infect. Dis*. **1986**, *8* (6), 918-926. DOI: 10.1093/clinids/8.6.918.

[221] Hunt, J.C.; Schneider, C.; Menticoglou, S.; Herath, J.; del Bigio, M.R. *AJP Rep*. **2012**, *2* (1), 1-6. DOI: 10.1055/s-0031-1296027.

[222] Khediri, Z.; Vauloup-Fellous, C.; Benachi, A.; Ayoubi, J.M.; Mandelbrot, L.; Picone, O. *Virol. J*. **2018**, *15* (1), 70. DOI: 10.1186/s12985-018-0978-7.

[223] Sadeharju, K.; Knip, M.; Virtanen, S.M.; Savilahti, E.; Tauriainen, S.; Koskela, P.; Akerblom, H.K.; Hyöty, H.; Finnish TRIGR Study Group. *Pediatrics*. **2007**, *119* (5), 941-946. DOI: 10.1542/peds.2006-0780.

[224] Chang, M.L.; Tsao, K.C.; Huang, C.C.; Yen, M.H.; Huang, C.G.; Lin, T.Y. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **2006**, *25* (10), 955-957. DOI: 10.1097/01.inf.0000235686.50060.2b.

[225] Maus, M.V.; Posencheg, M.A.; Geddes, K.; Elkan, M.; Peñaranda, S.; Oberste, M.S.; Hodinka, R.L. *J. Clin. Microbiol*. **2008**, 46 (3), 1137-1140. DOI: 10.1128/JCM.01991-07.

[226] Civardi, E.; Tzialla, C.; Baldanti, F.; Strocchio, L.; Manzoni, P.; Stronati, M. *Am. J. Infect. Control*. **2013**, *41* (10), 854-856. DOI: 10.1016/j.ajic.2013.01.026.

Paramètres environnementaux.

Plusieurs études ont été réalisées sur les conditions climatiques favorisant la propagation des Entérovirus. Alors que certains paramètres sont discutés selon les lieux d'études, il semble y avoir un consensus sur le fait que la propagation est favorisée là où la vitesse des vents est la plus faible.[172,173,227,228] De même, que ce soit la présence d'humidité, ou un point de rosée élevé, cela semble privilégier la dispersion des Entérovirus, hormis une étude qui n'y voit aucun effet.[172,173,227,228,229,230,231] Cependant, certains RV ont été propagés plus facilement lors de saisons sèches.[232] Alors que la pression atmosphérique semble ne pas être corrélée à la vitesse de propagation, l'effet de la température est débattu selon les différentes études. Le rôle de la chaleur est encore à définir avec des études contraires menées en Chine, à Hawaï, en Suède et au Vietnam, avec des corrélations positives, négatives ou nulles.[172,173,227,230,231]

---

[227] Marcelo, R.Z.; Lustik, M.B.; Jones, M.U. *Mil. Med*. **2024**, *189* (1-2), e34-e39. DOI: 10.1093/milmed/usad125.

[228] Sundell, N.; Andersson, L.M.; Brittain-Long, R.; Lindh, M.; Westin, J. *J. Clin. Virol*. **2016**, 84, 59-63. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.10.005.

[229] Megremis, S.; Demetriou, P.; Makrinioti, H.; Manoussaki, A.E.; Papadopoulos, N.G. *PLoS One*. **2012**, *7* (9), e44557. DOI: 10.1371/journal.pone.0044557.

[230] Ng, K.T.; Oong, X.Y.; Lim, S.H.; Chook, J.B.; Takebe, Y.; Chan, Y.F.; Chan, K.G.; Hanafi, N.S.; Pang, Y.K.; Kamarulzaman, A.; Tee, K.K. *Clin. Infect. Dis*. **2018**, *67* (2), 261-268. DOI: 10.1093/cid/ciy063.

[231] Althouse, B.M.; Flasche, S.; Minh, L.N.; Thiem, V.D.; Hashizume, M.; Ariyoshi, K.; Anh, D.D.; Rodgers, G.L.; Klugman, K.P.; Hu, H.; Yoshida, L.M. *Int. J. Infect. Dis*. **2018**, *75*, 18-25. DOI: 10.1016/j.ijid.2018.08.001.

[232] Zhao, Y.; Shen, J.; Wu, B.; Liu, G.; Lu, R.; Tan, W. *Front. Microbiol*. **2018**, *9*, 1836. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01836.

4) Saisonnalité des Entérovirus.

Pour considérer la présence et les dynamiques de la circulation des Entérovirus sur le long terme, il faut distinguer deux cas de systèmes de fonctionnement : les systèmes endémique et épidémique.[233] Pour le premier, les virus sont présents toute l'année avec une faible virulence et des infections constantes mais peu nombreuses. La plupart du temps, les cas présentant ces contaminations ne sont pas ou peu détectés. Au contraire, le second système repose sur des pics d'infections autour de certaines périodes courtes qui sont le plus souvent cycliques au cours du temps.

Evolution des comportements saisonniers et annuels des Entérovirus.

Dans les régions tempérées, le cycle saisonnier impose des pics dépendant du climat : [**Graphique 1**]. Les EV possèdent un pic épidémique principal en juillet et un secondaire en septembre, alors que ceux des RV sont respectivement en automne et au printemps.[227,234,235] Hawaï, ayant le même système épidémique en termes d'EV que ces régions, possède cependant un pic supplémentaire en février, sûrement dû au tourisme plus fort en cette période.[236] Les pics d'été entéroviraux peuvent être expliqués par la fin des périodes scolaire et donc un taux de contamination plus important.[237] Les RV-A et RV-C sont les plus prévalents mais le pic hivernal est dominé par les RV-C, alors que pour le reste de l'année, les RV-A sont majoritaires.[238] Pour les régions tropicales, la dépendance aux saisons est moins marquée.[236]

---

[233] Khetsuriani, N.; Lamonte-Fowlkes, A.; Oberst, S.; Pallansch, M.A. *MMWR Surveil. Summ*. **2006**, 55 (8), 1–20. PMID: 16971890.

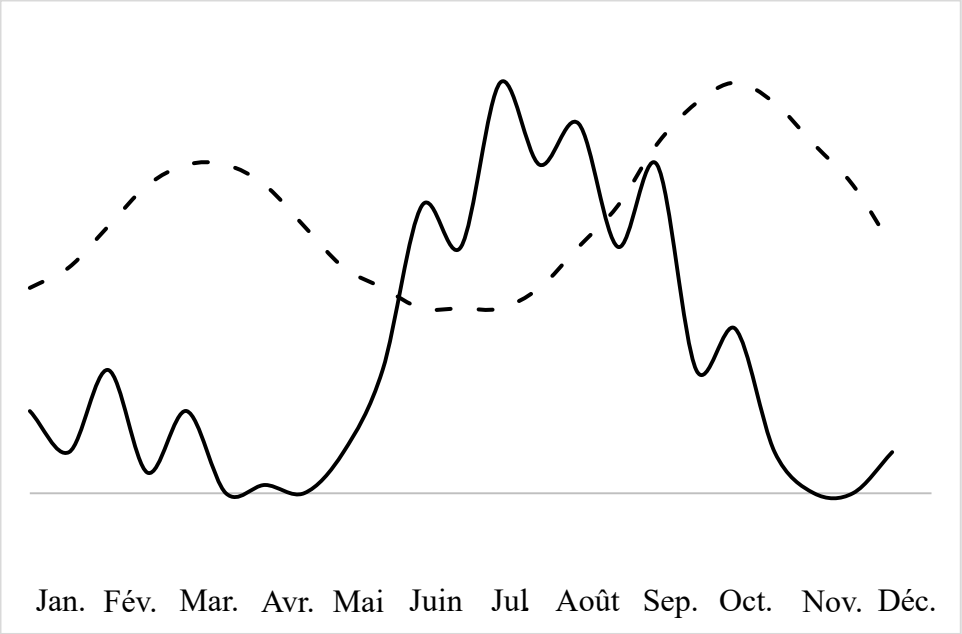
[234] Pons-Salort, M.; Oberste, M.S.; Pallansch, M.A.; Abedi, G.R.; Takahashi, S.; Grenfell, B.T.; Grassly, N.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **2018**, *115* (12), 3078–3083. DOI: 10.1073/pnas.1721159115.

[235] Bizzintino, J.; Lee, W.M.; Laing, I.A.; Vang, F.; Pappas, T.; Zhang, G.; Martin, A.C.; Khoo, S.K.; Cox, D.W.; Geelhoed, G.C.; McMinn, P.C.; Goldblatt, J.; Gern, J.E.; Le Souëf, P.N. *Eur. Respir. J*. **2011**, 37 (5), 1037-1042. DOI: 10.1183/09031936.00092410.

[236] Hawaii Tourism Authority. *Excel spreadsheets 2016–2019*. ***Annual Visitor Research Report***., **2022**. Lien.

[237] Winther, B. *Proc. Am. Thorac. Soc*. **2011**, *8* (1), 79–89. DOI: 10.1513/pats.201006-039RN.

[238] Morobe, J.M.; Nyiro, J.U.; Brand, S.; Kamau, E.; Gicheru, E.; Eyase, F.; Otieno, G.P.; Munywoki, P.K.; Agoti, C.N.; Nokes, D.J. *Wellcome Open Res*. **2019**, *3*, 128. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14836.2.



Graphique 1. Représentation qualitative des différents pics d'infections à entérovirus (en trait plein) et à rhinovirus (en pointillés) au cours de l'année.

Souvent, les nouveaux types de virus ne sont pas détectés, suivant un système endémique de contaminations. Lorsqu'un premier pic d'infection est détecté, leur système change souvent en système épidémique. Une stratégie de lutte est alors mise en place en réaction au premier cluster observé. C'est ainsi que les EV-D68 et EV-A71 ont été identifiés pour atteindre maintenant des cycles biannuels ou annuels.[239,240]

La seconde phase épidémique permet souvent aux types de virus de se diversifier avec l'émergence de différents clades.[240] Paradoxalement, les périodes épidémiques peuvent aussi avoir l'effet inverse avec la sélection de certains clades dans un principe d'autolimitation. Par exemple, la majorité des Entérovirus recensés aujourd'hui proviennent d'ancêtres communs présents il y a une centaine d'années.[174] Cette sélection lors des cycles épidémiques permet aussi d'expliquer la disparition de clades dans certaines régions, voire dans le monde entier.

[239] Tee, K.K.; Lam, T.T.; Chan, Y.F.; Bible, J.M.; Kamarulzaman, A.; Tong, C.Y.; Takebe, Y.; Pybus, O.G. *J. Virol*. **2010**, *84* (7), 3339–3350. DOI: 10.1128/JVI.01019-09.

[240] Tokarz, R.; Firth, C.; Madhi, S.A.; Howie, S.R.; Wu, W.; Sall, A.A.; Haq, S.; Briese, T.; Lipkin, W.I. *J. Gen. Virol*. **2012**, *93* (Pt 9), 1952–1958. DOI: 10.1099/vir.0.043935-0.

Les clades E, F et H de l'E30 font partie des premiers Entérovirus pour lequel une alternance de cycle d'extension puis d'extinction a été observée en Russie.[241] De même, parmi EV-A71, le clade A, découvert en 1974, est désormais considéré comme disparu.[239]

Périodicité des épidémies selon les génotypes.

La plupart des Entérovirus présentent des cycles épidémiques dont la durée et le moment du pic de contamination changent selon le type de virus. Une étude menée sur le long terme aux Etats-Unis a permis d'identifier le comportement de nombreux Entérovirus durant la fin du XXème siècle [**Tableau 5**].[233] D'autres études plus récentes sont ensuite venues actualiser le comportement de certains types de virus.

Pour le CVB5, la saisonnalité est très marquée avec la plupart des infections observées en été et début automne. De même, le CVB1 a une forte sensibilité aux saisons et un pic épidémique en été – début automne. Au contraire, le CVA16 a une plus faible sensibilité aux saisons, avec 60% des infections détectées dans la période habituelle des Entérovirus. Aux Etats-Unis, la période des années 90 semble avoir été un moment épidémiologique clef avec la diminution (CVA16, E5) ou l'extinction (E3) de certains types de virus, ou au contraire leur augmentation (CVB1, CVB4) ou leur apparition (E13).

Le changement de temporalité des épidémies peut varier selon des critères géographiques ou climatiques, comme nous avons pu le constater ci-dessus. Cependant, ce ne sont pas les seuls critères. Il faut aussi s'informer sur les pratiques d'hygiène mises en place, l'immunité collective au cours du temps pour chaque type de virus ainsi que le renouvellement de patient·es potentiels ou la venue de nouvelles sensibilités. Des facteurs liés aux virus, de manière intrinsèque, peuvent aussi expliquer des changements de mode épidémiologique.

[241] Yarmolskaya, M.S.; Shumilina, E.Y.; Ivanova, O.E.; Drexler, J.F.; Lukashev, A. *Infect. Genet. Evol*. **2015**, *30*, 244–248. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.12.033.

Tableau 5. Système et périodicité d'EV détectés aux Etat-Unis (1970 – 2020).

Virus	Système*	Périodicité (années)	Virus	Système*	Périodicité (années)
CVA4	Epidémique	1 puis 2 [242]	CVA9	Endémique	/
CVA16	Endémique	/	CVA24	Endémique	/
CVB1	End. Puis Epi.	/ puis 5 (90')	CVB2	Endémique	/
CVB3	Epidémique	3 ou 6	CVB4	End. Puis Epi.	/ puis 4 (90') [244]
CVB5	Epidémique	3 ou 6	E3	Epidémique	3 – 4 ou 5, 6 – 7
E4	Epidémique	7	E5	Epidémique	3 – 4 ou 5, 6 – 7
E6	Epidémique	2 ou 4	E7	Epidémique	/ (plat.)°
E9	Epidémique	3 – 4 ou 5, 6 – 7	E11	Epidémique	3 – 4 ou 5, 6 – 7
E18	Epidémique	3 – 4 ou 5, 6 – 7	E30	Epidémique	/ puis 5 (90') puis 3 [243]
EV-A71	End. Puis Epi.	/ † et 1 ou 3 ‡ [244,245]	EV-D68	End. Puis Epi.	/ puis 2 (2014) [178,183,184]

* End. = endémique, Epi. = épidémique.

° plat. : plateaux épidémiques, les pics épidémiques peuvent durer plusieurs années successives empêchant d'établir de vraies périodicités.

† Aux Etats-Unis

‡ En Asie : EV-A71 (annuel en Chine, triannuel au Japon, Malaisie)

[242] Pons-Salort, M.; Grassly, N.C. *Science*. **2018**, *361* (6404), 800–803. DOI: 10.1126/science.aat6777.

[243] McWilliam Leitch, E.C.; Cabrerizo, M.; Cardosa, J.; Harvala, H.; Ivanova, O.E.; Kroes, A.C.; Lukashev, A.; Muir, P.; Odoom, J.; Roivainen, M.; Susi, P.; Trallero, G.; Evans, D.J.; Simmonds, P. *J. Virol*. **2010**, *84* (18), 92929300. DOI: 10.1128/JVI.00783-10.

[244] Yang, B.; Liu, F.; Liao, Q.; Wu, P.; Chang, Z.; Huang, J.; Long, L.; Luo, L.; Li, Y.; Leung, G.M.; Cowling, B.J.; Yu, H. *Euro. Surveill*. **2017**, *22* (50), 16-00824. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.16-00824.

[245] Foot and Mouth Disease in Japan, 2002–2011. National Institute of Infectious Diseases Hand. Lien.

5) Effets de la pandémie de SARS-Cov2 sur les infections à EV/RV.

Chute des infections à Entérovirus en 2020.

L'année 2020 a été marquée par la diffusion du SARS-Cov2 à l'échelle mondiale. Cela a impliqué dans de nombreux pays un changement radical de comportement, notamment sanitaire. Le SARS-Cov2 se propageant grâce aux expulsions de salive générées en respirant ou discutant, comme les Entérovirus, la lutte contre la propagation du premier a eu un impact sur celle des seconds. Des études ont aussi associé une transmission du SARS-Cov2 *via* la voie féco-orale comme transmission mineure.[246] Cet effet a été mesuré dans plusieurs pays avec une nette baisse des infections à Entérovirus. Ainsi la distanciation sociale imposée, le rappel de mesures d'hygiène et l'incitation à les pratiquer de manière stricte, les restrictions sociales, les dépistages infectieux ainsi que le ralentissement des communications aux échelles nationales et internationales ont pu contribuer à réduire la circulation entérovirale. Par exemple, alors que le rythme biannuel des épidémies d'EV-D68 avait été établi depuis 2014 aux Etats-Unis, aucune épidémie ne fut détectée durant l'été 2020.[178] Les infections ont été particulièrement réduites lors des périodes de confinement et de campagne de première vaccination, à savoir de mars à mai 2020 et de janvier à mai 2021, notamment en France.[247,248] De même, en Australie, au cours de l'année 2020, le nombre d'infections à Entérovirus a diminué de 82,4%, comparativement aux années de la décennie précédente.[249] Enfin, à Taiwan, les infections à Entérovirus ont aussi radicalement chuté durant la pandémie de SARS-Cov2.[250] Cependant, la circulation des RV ne semble pas avoir été autant éliminée que pour les EV. En effet, en Italie, là où il y avait une

---

[246] Arslan, M.; Xu, B.; Gamal El-Din, M. *Sci. Total Environ*. **2020**, *743*, 140709. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140709.

[247] Olsen, S.J.; Winn, A.K.; Budd, A.P.; Prill, M.M.; Steel, J.; Midgley, C.M.; Kniss, K.; Burns, E.; Rowe, T.; Foust, A.; Jasso, G.; Merced-Morales, A.; Davis, C.T.; Jang, Y.; Jones, J.; Daly, P.; Gubareva, L.; Barnes, J.; Kondor, R.; Sessions, W.; Smith, C.; Wentworth, D.E.; Garg, S.; Havers, F.P.; Fry, A.M.; Hall, A.J.; Brammer, L.; Silk, B.J. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **2021**, *70* (29), 1013-1019. DOI: 10.15585/mmwr.mm7029a1.

[248] Bilan annuel 2023 des infections à entérovirus et bilan provisoire 2024. Santé Publique France. Lien.

[249] Bruggink, L.D.; Garcia-Clapes, A.; Tran, T.; Druce, J.D.; Thorley, B.R. *Commun. Dis. Intell. (2018)*. **2021**, *45*. DOI: 10.33321/cdi.2021.45.5.

[250] Huang, Y.B.; Lin, Y.R.; Hung, S.K.; Chang, Y.C.; Ng, C.J.; Chen, S.Y. *Children (Basel)*. **2022**, *9* (1), 32. DOI: 10.3390/children9010032.

baisse moyenne de 94% des infections respiratoires pédiatriques (hors RV et EV) et de 92% pour celles à EV, il n'y a eu que 56% de moins de détection de RV durant l'année 2020.[251]

Réémergence des Entérovirus exacerbée en période post-pandémie.

Cependant, alors qu'on aurait pu croire à une diminution permanente de la circulation des EV grâce à la mise en place des mesures « barrières » contre le SARS-Cov2, l'année 2021 a produit un rebond entéroviral plus sévère que les années de référence prépandémie. De multiples types de virus, dont EV-D68, ont vu leur nombre augmenter en Europe.[252] L'EV-D68 cause des infections respiratoires avec de possibles atteintes neurologiques. D'autre part, en Italie, en octobre 2021, il y a eu 10 fois plus de patient·es infecté·es par des Entérovirus qu'en octobre 2019.[253] En France, une épidémie d'herpangine a été soudainement été observée en 2021 chez les jeunes enfants de moins de 4 ans.[254] Une augmentation de plus de 50% en été (> 600 cas au lieu de 400 à son apogée) et d'un peu moins du double en automne (> 500 cas au lieu de 300 à son apogée) ont été observées. Il est important de noter que la période d'infection entérovirale en automne est arrivée plus précocement qu'en 2018 ou 2019. Avant la pandémie, ce type d'épidémie aurait pu être anticipée. En parallèle, plus de 3.400 cas de maladie pieds-mains-

---

[251] Vittucci, A.; Piccioni, L.; Coltella, L.; Ciarlitto, C.; Antilici, L.; Bozzola, E.; Midulla, F.; Palma, P.; Perno, C.F.; Villani, A. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2021**, *18* (18), 9550. DOI: 10.3390/ijerph18189550.

[252] Benschop, K.S.; Albert, J.; Anton, A.; Andrés, C.; Aranzamendi, M.; Armannsdóttir, B.; Bailly, J.L.; Baldanti, F.; Baldvinsdóttir, G.E.; Beard, S.; Berginc, N.; Böttcher, S.; Blomqvist, S.; Bubba, L.; Calvo, C.; Cabrerizo, M.; Cavallero, A.; Celma, C.; Ceriotti, F.; Costa, I.; Cottrell, S.; Del Cuerpo, M.; Dean, J.; Dembinski, J.L.; Diedrich, S.; Diez-Domingo, J.; Dorenberg, D.; Duizer, E.; Dyrdak, R.; Fanti, D.; Farkas, A.; Feeney, S.; Flipse, J.; De Gascun, C.; Galli, C.; Georgieva, I.; Gifford, L.; Guiomar, R.; Hönemann, M.; Ikonen, N.; Jeannoël, M.; Josset, L.; Keeren, K.; López-Labrador, F.X.; Maier, M.; McKenna, J.; Meijer, A.; Mengual-Chuliá, B.; Midgley, S.E.; Mirand, A.; Montes, M.; Moore, C.; Morley, U.; Murk, J.L.; Nikolaeva-Glomb, L.; Numanovic, S.; Oggioni, M.; Palminha, P.; Pariani, E.; Pellegrinelli, L.; Piralla, A.; Pietsch, C.; Piñeiro, L.; Rabella, N.; Rainetova, P.; Uceda Renteria, S.C.; Romero, M.P.; Reynders, M.; Roorda, L.; Savolainen-Kopra, C.; Schuffenecker, I.; Soynova, A.; Swanink, C.M.; Ursic, T.; Verweij, J.J.; Vila, J.; Vuorinen, T.; Simmonds, P.; Fischer, T.K.; Harvala, H. *Euro. Surveill*. **2021**, *26* (45), 2100998. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2100998.

[253] Mattana, G.; Albitar-Nehme, S.; Cento, V.; Colagrossi, L.; Piccioni, L.; Raponi, M.; Raucci, U.; Vittucci, A.C.; Reale, A.; Villani, A.; Bernaschi, P.; Perno, C.F. *J. Glob. Antimicrob. Resist*. **2022**, 28, 223-225. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.01.010.

[254] Cohen, P.R.; Rybak, A.; Werner, A.; Béchet, S.; Desandes, R.; Hassid, F.; André, J.M.; Gelbert, N.; Thiebault, G.; Kochert, F.; Cahn-Sellem, F.; Vié Le Sage, F.; Angoulvant, P.F.; Ouldali, N.; Frandji, B.; Levy, C. *Lancet. Reg. Health Eur*. **2022**, 22, 100497. DOI: 10.1016/j.lanepe.2022.100497.

bouche dus au CVA6 ont été reportés en France, soit quasiment 50% de plus qu'en 2018/2019.[255] De même, de nouvelles souches d'EV-D68 dérivées du clade B3 ont été identifiées post-pandémie en France.[256] Après une régulation plus souple sur les interventions non-pharmaceutiques, le Brésil a connu une épidémie de maladie pieds-mains-bouche causée, elle-aussi, par CVA6.[257] Enfin, aux Etats-Unis, alors que les autres virus respiratoires avaient une circulation réduite, les Entérovirus sont rapidement réapparus, devenant la principale cause des visites des soins pédiatriques, détectés dans environ 75% des cas.[258] Cette sensibilité peut

---

[255] Mirand, A.; Cohen, R.; Bisseux, M.; Tomba, S.; Sellem, F.C.; Gelbert, N.; Béchet, S.; Frandji, B.; Archimbaud, C.; Brebion, A.; Chabrolles, H.; Regagnon, C.; Levy, C.; Bailly, J.L.; Henquell, C. *Euro. Surveill*. **2021**, *26* (43), 2100978. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.43.2100978.

[256] Simoes, M.P.; Hodcroft, E.B.; Simmonds, P.; Albert, J.; Alidjinou, E.K.; Ambert-Balay, K.; Andrés, C.; Antón, A.; Auvray, C.; Bailly, J.L.; Baldanti, F.; Bastings, C.; Beard, S.; Pereira, C.B.; Berginc, N.; Bloemen, M.; Blomqvist, S.; Bosma, F.; Böttcher, S.; Bubba, L.; Buderus, S.; Cabrerizo, M.; Calvo, C.; Celma, C.; Ceriotti, F.; Clark, G.; Costa, I.; Coste-Burel, M.; Couderé, K.; Cremer, J.; Del Cuerpo Casas, M.; Daehne, T.; de Beer, J.; de Ceano-Vivas, M.; De Gascun, C.; de Rougemont, A.; Dean, J.; Dembinski, J.L.; Diedrich, S.; Diez-Domingo, J.; Dillner, L.; Dorenberg, D.H.; Ducancelle, A.; Dudman, S.; Dyrdak, R.; Eis-Huebinger, A.M.; Falces-Romero, I.; Farkas, A.; Feeney, S.; Fernandez-Garcia, M.D.; Flipse, J.; Franck, K.T.; Galli, C.; Garrigue, I.; Geeraedts, F.; Georgieva, I.; Giardina, F.; Guiomar, R.; Hauzenberger, E.; Heikens, E.; Henquell, C.; Hober, D.; Hönemann, A.; Howson-Wells, H.; Hruškar, Ž.; Ikonen, N.; Imbert, B.; Jansz, A.R.; Jeannoël, M.; Jiřincová, H.; Josset, L.; Keeren, K.; Kramer-Lindhout, N.; Krokstad, S.; Lazrek, M.; Le Guillou-Guillemette, H.; Lefeuvre, C.; Lind, A.; Lunar, M.M.; Maier, M.; Marque-Juillet, S.; McClure, C.P.; McKenna, J.; Meijer, A.; Menasalvas Ruiz, A.; MengualChuliá, B.; Midgley, S.; Mirand, A.; Molenkamp, R.; Montes, M.; Moreno-Docón, A.; Morley, U.; Murk, J.L.; Navascués-Ortega, A.; Nijhuis, R.; Nikolaeva-Glomb, L.; Nordbø, S.A.; Numanovic, S.; Oggioni, M.; Oñate Vergara, E.; Pacaud, J.; Pacreau, M.L.; Panning, M.; Pariani, E.; Pekova, L.; Pellegrinelli, L.; Petrovec, M.; Pietsch, C.; Pilorge, L.; Piñeiro, L.; Piralla, A.; Poljak, M.; Prochazka, B.; Rabella, N.; Rahamat-Langendoen, J.C.; Rainetova, P.; Reynders, M.; Riezebos-Brilman, A.; Roorda, L.; Savolainen-Kopra, C.; Schuffenecker, I.; Smeets, L.C.; Stoyanova, A.; Stefic, K.; Swanink, C.; Tabain, I.; Tjhie, J.; Thouault, L.; Tumiotto, C.; Uceda Renteria, S.; Uršič, T.; Vallet, S.; Van Ranst, M.; Van Wunnik, P.; Verweij, J.J.; Vila, J.; Wintermans, B.; Wollants, E.; Wolthers, K.C.; Xavier López-Labrado, F.; Fischer, T.K.; Harvala, H.; Benschop, K.S.M. *J. Infect. Dis*. **2024**, jiae154. DOI: 10.1093/infdis/jiae154.

[257] Carmona, R.C.C.; Machado, B.C.; Reis, F.C.; Jorge, A.M.V.; Cilli, A.; Dias, A.M.N.; Morais, D.R.; Leme, L.; Yu, A.L.F.; Silva, M.R.; Carvalhanas, T.R.M.P.; Timenetsky, M.C.S.T. *J. Clin. Virol*. **2022**, *154*, 105245. DOI: 10.1016/j.jcv.2022.105245.

[258] 257 Rankin, D.A.; Spieker, A.J.; Perez, A.; Stahl, A.L.; Rahman, H.K.; Stewart, L.S.; Schuster, J.E.; Lively, J.Y.; Haddadin, Z.; Probst, V.; Michaels, M.G.; Williams, J.V.; Boom, J.A.; Sahni, L.C.; Staat, M.A.; Schlaudecker, E.P.; McNeal, M.M.; Harrison, C.J.; Weinberg, G.A.; Szilagyi, P.G.; Englund, J.A.; Klein, E.J.; Gerber, S.I.;

provenir des déficits immunitaires accumulés lors de la pandémie de SARS-Cov2 et la reprise plus rapide que prévue de la circulation entérovirale.

Limite des mesures « barrières » contre les Entérovirus.

Cependant, bien que cela aide à la prévention de la contamination aux Entérovirus, la pandémie de SARS-Cov2 a révélé, certes une chute des infections à EV, mais aussi une circulation courante des RV avec l'application de mesures « barrières ».[251]

Or, des mesures d'urgence ont été mises en place qui ne seraient pas viables de maintenir en dehors d'un critère sanitaire extrême. D'un point de vue économique, en France, plus de 25% de la population ont eu une restriction d'activité dont plus de 20% lié au chômage partiel.[259] De plus, la répartition des tâches a été largement genrée, notamment du point de vue de la prise en charge des enfants.[259] Le nombre de tentative d'homicide ainsi que les violences dans le cadre intrafamilial ont tous les deux augmentés progressivement durant le confinement.[260] Les catégories sociales les moins privilégiés ont aussi eu plus de difficultés que ce soit pour le suivi scolaire ou bien dû à l'augmentation des inégalités des situations financière entre les moins et les plus aisé·es.[258] Enfin, la santé mentale a été mise à rude épreuve entre peur de l'agent pathogène, exacerbation des inégalités sociales, économiques et financières, ainsi que la propagation du sentiment de solitude.[261,262,263]

Le confinement n'étant pas applicable sur de longues périodes malgré une efficacité relative, notamment contre les RV, d'autres solutions de traitement ont dû être envisagées. Les lavages des mains et le maintien d'une hygiène de vie restent la première barrière pour lutter contre les Entérovirus.

McMorrow, M. ; Rha, B. ; Chappell, J.D. ; Selvarangan, R. ; Midgley, C.M. ; Halasa, N.B. ; NVSN Network Investigators. JAMA Netw. Open. 2023, 6 (2), e2254909. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.54909.

[259] Conditions de vie pendant le confinement : des écarts selon le niveau de vie et la catégorie socioprofessionnelle. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. Lien.

[260] Les Violences Conjugales pendant le Confinement : Evaluation, Suivi et Proposition. Mission Interministérielle pour le Protection des Femmes contre les Violences et la Lutte contre la Traite des Etres Humains. Lien.

[261] Sordes, F.; Guillemot, C.; Croiset, A.; Cipriani, E. *Eur. J. Trauma Dissociation*. **2021**, *5* (2), 100189. DOI: 10.1016/j.ejtd.2020.100189.

[262] Foucault, M. Crise Sanitaire et Isolement Social. Centre de Recherche Politiques à Sciences Po. Lien.

[263] Traber, D.; Jauffret-Roustide, M.; Roumian, J.; Morgiève, M.; Vellut, N.; Briffault, X.; Clot, C. *L'information psychiatrique*. **2020**, *8-9* (96), 632-638. DOI: 10.1684/ipe.2020.2164.

6) Entérovirus d'intérêts : tableaux cliniques et patient·es.

Les Entérovirus par leur diversité et leur nombre sont associés à de multiples pathologies chez les êtres humains. Cependant, seule une petite partie est réellement impactée. En effet, chez l'adulte, les symptômes sont bénins, comme l'apparition de fièvre, d'états grippaux voire de nausées. Cependant, chez les personnes immunodéprimées, ou les enfants et les nouveau-né·es, ceux-ci peuvent être plus sévères. Cela a été vérifié lors de la compilation d'infections à EV observées chez des patient·es aux Etats-Unis entre 1970 et 2005 [**Tableau 6**] avec un tropisme particulier de certains virus pour des organes ou des systèmes.[233]

Tableau 6. Age majoritaire observé chez les patient·es infecté·es par des EV (1970 – 2005, Etats-Unis).[233]

Entérovirus observés (1970-2005, Etats-Unis)	Age majoritaire des patient·es infecté·es	Entérovirus observés (1970-2005, Etats-Unis)	Age majoritaire des patient·es infecté·es
E3	< 12 mois	E4	< 5 ans (< 50%) 5 – 19 ans (36 %)
E5	< 12 mois	E6	< 12 mois
E7	< 12 mois	E9	5 – 19 (> 50%)
E13	< 12 mois	E18	< 12 mois
E30	< 5 ans (30 %)	CVA9	< 12 mois
CVA16	< 5 ans	CVA24	> 19 ans (50%)
CVB1	< 12 mois	CVB2	< 12 mois
CVB3	< 12 mois	CVB4	< 12 mois
CVB5 EV-D68	< 5 ans (50%) < 5 ans / > 19 ans (25%)	EV-A71	< 12 mois / < 5 ans (75%)

Nous présenterons plusieurs maladies associées aux Entérovirus. Cette liste n'est pas exhaustive du fait du large panel de pathologies pouvant être induits par une infection à Entérovirus.

Tableau clinique des RV.

Les rhinovirus, étant sensibles aux pH inférieurs à 5 – 6 et se répliquant mieux autour de 33 °C, ne peuvent infecter que le système respiratoire, sans pouvoir aller au-delà de l'œsophage dans le système digestif, du fait de l'acidité de l'estomac et la température trop élevée du corps humain.[1] La plupart des infections sont localisées dans les voies respiratoires supérieures [**Figure 3**].

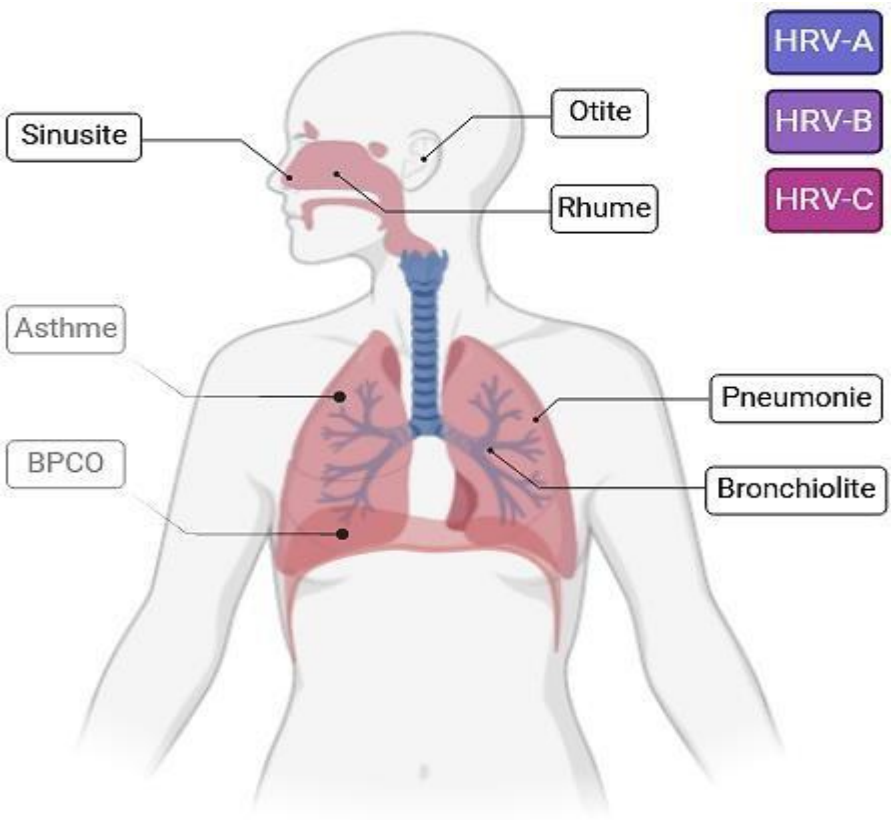


Figure 3. Maladies pouvant être provoquées par des infections à RV. L'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ne sont pas provoquées mais exacerbées par les infections à RV.

Il semblerait que les infections à rhinovirus endommagent peu l'épithélium respiratoire.[264] La libération et l'activation indirecte de cytokines et de chimiokines seraient donc à l'origine des différents symptômes liés aux infections rhinovirales. De manière générale, la majorité des infections ont été identifiées comme étant provoquées par des RV-A (45% - 65%). Les RV-C sont la seconde cause d'infections rhinovirales (30 – 50%) alors que les RV-B ont rarement été observés (2 – 13%).[265,266]

---

[264] Heikkinen, T.; Jarvinen, A. *Lancet*. **2003**, *361* (9351), 51–59. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12162-9.

[265] Arakawa, M.; Okamoto-Nakagawa, R.; Toda, S.; Tsukagoshi, H.; Kobayashi, M.; Ryo, A.; Mizuta, K.; Hasegawa, S.; Hirano, R.; Wakiguchi, H.; Kudo, K.; Tanaka, R.; Morita, Y.; Noda, M.; Kozawa, K.; Ichiyama, T.; Shirabe, K.; Kimura, H. *J. Med. Microbiol*. **2012**, *61* (Pt 3), 410-419. DOI: 10.1099/jmm.0.035006-0.

[266] Tapparel, C.; Cordey, S.; Junier, T.; Farinelli, L.; Van Belle, S.; Soccal, P.M.; Aubert, J.D.; Zdobnov, E.; Kaiser, L. *PLoS One*. **2011**, *6* (6), e21163. DOI: 10.1371/journal.pone.0021163.

Quelle que soit l'espèce, les RV sont la cause principale du rhume. Ce dernier est l'une des maladies les plus courantes chez l'adulte comme chez l'enfant. Cela provoque principalement de la toux, de la fièvre, des frissons, des céphalées, de la nausée...

Malgré des symptômes bénins, plusieurs complications peuvent être associées à des infections par des RV. Des sinusites peuvent se développer lorsqu'ils se répliquent au sein des sinus.[264] De plus, pour certains patient·es, des infections respiratoires inférieures ou des otites ont été détectées. Lors de complications, les RV peuvent être co-facteurs de diverses maladies comme de l'asthme, de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), des pneumonies ou des bronchiolites [**Figure 3**].[267,268,269] Dans ces cas-là, les symptômes sont plus sévères avec des difficultés plus ou moins grandes à la respiration observées. Dans le cas des pneumonies, les cellules alvéolaires des poumons ont été affectées d'hyperplasies ou de desquamation.[270]

Enfin, certaines infections à RV de longue durée ont été observées post transplantation chez des personnes immunodéprimées, entraînant parfois le décès.[266,271] Ces RV ont été détectés 2 ans après leur date d'infection. Plusieurs mutations virales, notamment des protéines externes de la capside (VP1, VP2, VP3), signes d'adaptation, ont été identifiées. Le taux de mutation est similaire à celui d'une infection aigüe. Le déclenchement de ces infections de longue durée n'est pas dépendant du type de RV mais bien du fait que la personne soit immunodéprimée.

Enfin, certains éléments sont encore à confirmer comme le lien entre les infections à RV-C et les complications affectant les voies respiratoires inférieures, ou le fait d'avoir retrouvé des RV lors de l'examen virologique de selles de certains patient·es, ce qui impliquerait une résistance au pH acide et le passage dans le système intestinal.

---

[267] Seemungal, T.A.; Harper-Owen, R.; Bhowmik, A.; Jeffries, D.J.; Wedzicha, J.A. *Eur. Respir. J.* **2000**, *16* (4), 677-683. DOI: 10.1034/j.1399-3003.2000.16d19.x.

[268] Renwick, N.; Schweiger, B.; Kapoor, V.; Liu, Z.; Villari, J.; Bullmann, R.; Miething, R.; Briese, T.; Lipkin, W.I. *J. Infect. Dis*. **2007**, *196* (12), 1754-1760. DOI: 10.1086/524312.

[269] Jackson, D.J.; Gern, J.E. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract*. **2022**, *10* (3), 673-681. DOI: 10.1016/j.jaip.2022.01.006.

[270] Imakita, M.; Shiraki, K.; Yutani, C.; Ishibashi-Ueda, H. *Clin. Infect. Dis*. **2000**, 30 (3), 611-612. DOI: 10.1086/313723.

[271] Kaiser, L.; Aubert, J.D.; Pache, J.C.; Deffernez, C.; Rochat, T.; Garbino, J.; Wunderli, W.; Meylan, P.; Yerly, S.; Perrin, L.; Letovanec, I.; Nicod, L.; Tapparel, C.; Soccal, P.M. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **2006**, *174* (12), 1392-1399. DOI: 10.1164/rccm.200604-489OC.

Tableau clinique des EV.

Les EV, quant à eux, sont résistants aux conditions acides du système intestinal. Ils traversent la barrière intestinale, au niveau des ganglions lymphatiques, pour se diffuser dans de nombreux tissus. Avec une forte diversité de génotypes, les tissus infectés par les EV sont multiples. Ici, nous aborderons uniquement les maladies les plus courantes, au vu du grand nombre et de la diversité des pathologies associées à une infection à EV [**Figure 4**].

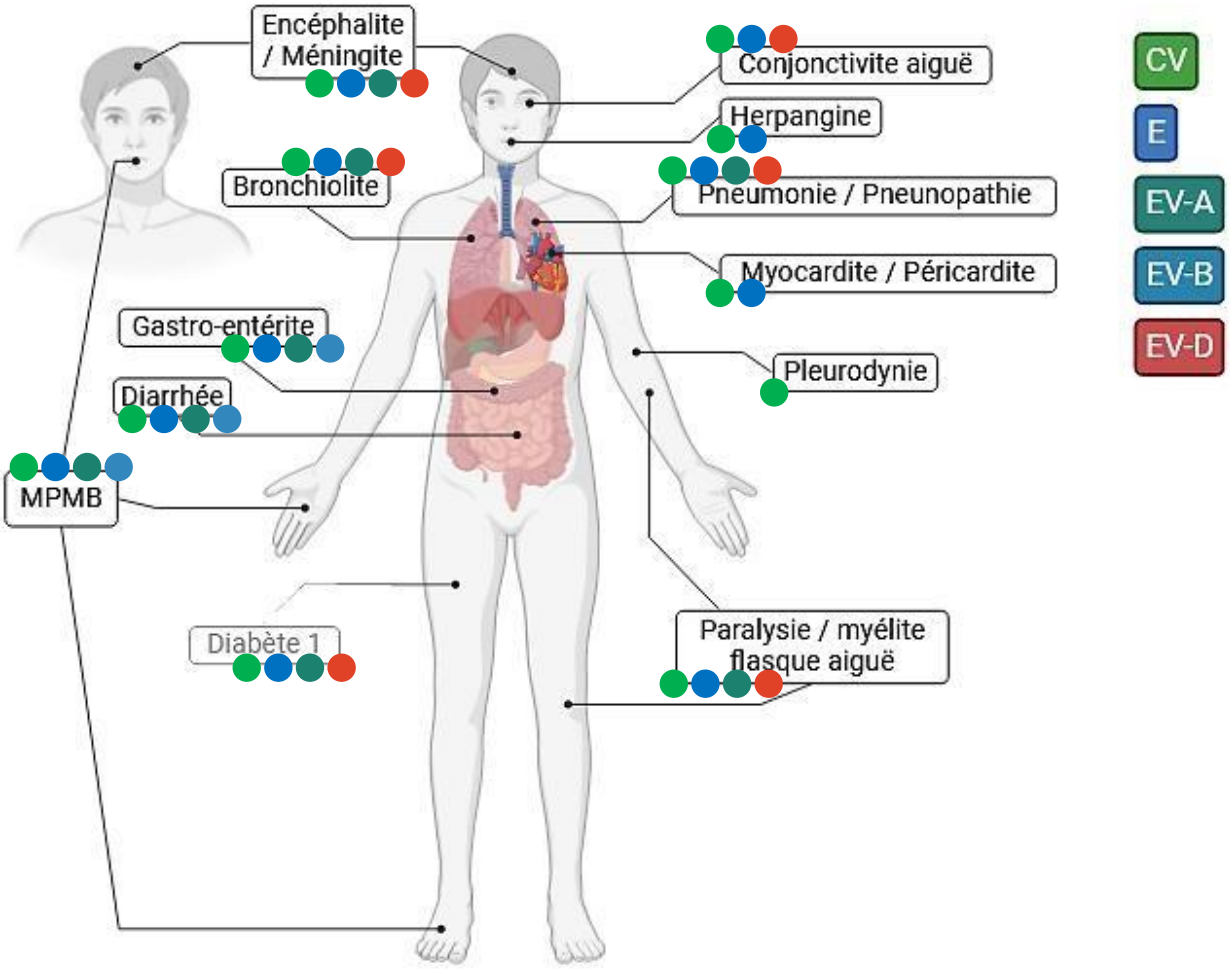


Figure 4. Maladies pouvant être provoquées par des infections à EV. MPMB = maladie pieds-mains-bouche. Le diabète de type 1 n'est pas provoqué mais a probablement une corrélation avec les infections à CVB.

Maladie pieds-mains-bouche.

La maladie pieds-mains-bouche (HFMD) reste la plus répandue et la plus virulente des pathologies liées à une infection aux EV. Les épidémies sont plus fréquentes au printemps. Les EV-A71 et CVA16 sont les principaux responsables des HFMD observées. Certains autres CV, tels que les CVA6 et CVA10, ainsi que des E, dont E4 ou E9, ou l'EV-B84 ont pu être identifiés comme cause des HFMD.[148, 272] Bien que la première apparition ait été observée en Nouvelle-Zélande en 1957, de nombreux cas sont reportés chaque année en Europe et en Amérique du Nord. [273,274,275] Cependant, les clusters saisonniers sont généralement localisés dans le Sud-Est de l'Asie, et notamment en Chine depuis une apparition majeure en 2010.[179,276] Depuis les années 60, les principaux virus responsables de la HFMD observés ont évolués. Entre 1970 et 1990, ce sont les CVA16 qui ont été détectés majoritairement lors de HFMD. Les symptômes associés sont souvent bénins avec une incidence stable. Le CVA16 comme cause a été remplacé dans les années suivantes par l'EV-A71, avec des symptômes plus sévères.[277] Récemment, la prévalence des cas de HFMD causés par CVA6 ou CVA10 a grandement augmenté.[278] Cette maladie contagieuse se transmet facilement par les projections lors d'éternuements ou de toux, les projections de salive et la présence des EV dans les selles ou dans le liquide contenu dans les cloques apparues lors de l'infection.

---

[272] Chonmaitree, T.; Mann, L. *Respiratory infections*. ***Human Enterovirus Infections***. ASM Press. Washington, Columbia, U.S.A. **1995**. *255-270*. DOI: 10.1128/9781555818326.fmatter.

[273] Seddon, J.H.; Duff, M.F. *N. Z. Med. J*. **1971**, *74* (475), 368-373. PMID: 5291880.

[274] Cabrerizo, M.; Tarragó, D.; Muñoz-Almagro, C.; Del Amo, E.; Domínguez-Gil, M.; Eiros, J.M.; López-Miragaya, I.; Pérez, C.; Reina, J.; Otero, A.; González, I.; Echevarría, J.E.; Trallero, G. *Clin. Microbiol. Infect*. **2014**, *20* (3), O150-O156. DOI: 10.1111/1469-0691.12361.

[275] Ramirez-Fort, M.K.; Downing, C.; Doan, H.Q.; Benoist, F.; Oberste, M.S.; Khan, F.; Tyring, S.K. *J. Clin. Virol*. **2014**, *60* (4), 381-386. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.04.023.

[276] Gui, J.; Liu, Z.; Zhang, T.; Hua, Q.; Jiang, Z.; Chen, B.; Gu, H.; Lv, H.; Dong, C. *PLoS One*. **2015**, *10* (9), e0139109. DOI: 10.1371/journal.pone.0139109.

[277] Wang, J.; Teng, Z.; Cui, X.; Li, C.; Pan, H.; Zheng, Y.; Mao, S.; Yang, Y.; Wu, L.; Guo, X.; Zhang, X.; Zhu, Y. *Emerg. Microbes Infect*. **2018**, *7* (1), 8. DOI: 10.1038/s41426-017-0011-z.

[278] Wang, S.H.; Wang, A.; Liu, P.P.; Zhang, W.Y.; Du, J.; Xu, S.; Liu, G.C.; Zheng, B.S.; Huan, C.; Zhao, K.; Yu, X.F. *J. Virol*. **2018**, *92* (11), e00303-18. DOI: 10.1128/JVI.00303-18.

Présente chez les enfants en bas âge, et rarement chez l'adulte, l'HFMD provoque des vésicules aux pieds, aux mains et sur la bouche.[279,280] Ces vésicules éclatent rapidement pour former des ulcères semblables à des aphtes. Parfois, des tâches peuvent apparaitre au niveau de l'aine ou du postérieur. La fièvre, les céphalées et maux de gorge, les douleurs abdominales ou les diarrhées peuvent précéder les irritations cutanées. Certaines complications peuvent apparaitre comme une déshydratation liée à une perte d'appétit et le refus de boire chez les nourrissons, ou une chute des ongles temporaire. Dans les cas les plus sévères, des atteintes virales du système pulmonaire ou neurologique peuvent entraîner des pneumopathies, des méningites ou des encéphalites.

Méningites et encéphalites.

Bien que le moyen d'accès au système nerveux central ne soit pas totalement identifié pour tous les EV, trois chemins distincts sont proposés. Le premier est le passage de la barrière hématoencéphalique par les entérovirus *via* des vésicules extracellulaires.[281] Ils infectent les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau. Le second chemin est appelé route du cheval de Troie. En effet, le passage se fait au sein de leucocytes infectés.[282] Enfin, ils peuvent aussi utiliser le transport axonal rétrograde, après avoir infecté un tissu musculaire autre.[283] Les principales inflammations nerveuses à la suite d'infections à EV sont les méningites aseptiques et les encéphalites.

Bien que les méningites soient souvent d'origine bactérienne, certains EV (CV, E, EV-A71, EV-D68 et EV-D70) peuvent en être aussi la cause.[284] Ils sont même responsables de la majeure partie des méningites aseptiques détectées à l'échelle mondiale, par infection directe ou en complication d'autres maladies, comme la HFMD.[285] Afin d'identifier la nature de la méningite, une ponction lombaire est réalisée avec analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR). Les

---

[279] Hand, foot and mouth disease. National Hearth Service United Kingdom. Lien.

[280] Maladie pieds-mains-bouche : définition, symptômes et évolution. Assurance Maladie / Ameli. Lien.

[281] Gu, J.; Zhao, Y.; Wu, J.; Chen, Y.; Yin, Y.; Jia, X.; Mao, L. *J. Med. Virol*. **2023**, *95* (1). DOI: 10.1002/jmv.28120.

[282] Tabor-Godwin, J.M.; Ruller, C.M.; Bagalso, N.; An, N.; Pagarigan, R.R.; Harkins, S.; Gilbert, P.E.; Kiosses, W.B.; Gude, N.A.; Cornell, C.T.; Doran, K.S.; Sussman, M.A.; Whitton, J.L.; Feuer, R. *J. Neurosci*. **2010**, *30* (25), 8676-8691. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1860-10.2010.

[283] Griffin, D.E. *PLoS Pathog*. **2011**, *7* (3), e1002004. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002004.

[284] Irani, D.N. *Neurol. Clin*. **2008**, 26 (3), 635-655, VII-VIII. DOI: 10.1016/j.ncl.2008.03.003.

[285] Ooi, M.H.; Wong, S.C.; Lewthwaite, P.; Cardosa, M.J.; Solomon, T. *Lancet. Neurol*. **2010**, *9* (11), 1097–1105. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70209-X.

méningites virales se caractérisent par une pléiocytose mononucléaire dans le LCR. Il est possible d'y détecter par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) l'ARN d'EV afin d'infirmer ou de confirmer l'hypothèse d'une méningite par infection entérovirale. La RT-PCR sur le LCR étant difficile, il est cependant compliqué de différencier les deux d'où un traitement antibiotique systématique en prévention et le temps d'identifier la raison de la méningite.

Alors que les pics épidémiques étaient observés en été ou en automne dans les pays tempérés, l'apparition des méningites est devenue, comme dans les pays tropicaux ou subtropicaux, stable toute l'année.[286,287] Les méningites et autres maladies nerveuses ne sont pas des maladies transmissibles en dehors des voies de transmission propres aux EV. Les méningites virales sont principalement observées chez les jeunes enfants, avec une incidence qui baisse ensuite avec l'âge.[55] Cependant, on observe une augmentation des consultations hospitalières de la part d'adultes pour cette pathologie à la suite d'une infection entérovirale. Lors des méningites aigues, les matières blanches et grises du cerveau sont infectées.[288] Cela peut entrainer des paralysies symétriques, des pertes de sens ou des dysfonctionnements de la vessie. L'apparition de fièvre aiguë, de céphalées, de nausées ou de vomissements est aussi associée aux méningites aseptiques. Des raideurs dans la nuque et de la photophobie sont aussi des symptômes fréquents. Les mêmes EV peuvent aussi provoquer des encéphalites, avec une prévalence moindre chez les nouveau-né·es.[289] Elles sont les résultats d'une complication d'une méningite aseptique, souvent pour des personnes ayant des comorbidités. Les encéphalites résultent d'une inflammation du parenchyme cérébral. Elles se caractérisent par des troubles neurologiques de la conscience, des troubles focaux ainsi que des crises d'épilepsie.

Des complications ou autres comorbidités sont fréquentes lors de méningites aseptiques ou encéphalites chez les nouveau-né·es les plus sensibles. Entre autres, des infections systémiques, des nécroses hépatiques, des myocardites ou des entérocolites nécrosantes sont observées.[290]

---

[286] Cantu, R.M.; Das, J.M. *Viral Meningitis*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 31424801.

[287] Peigue-Lafeuille, H. ; Mirand, A. *Feuillets de Biologie*. **2016**, *333*, 17-26. Lien.

[288] Kincaid, O.; Lipton, H.L. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. **2006**, *6* (6), 469-474. DOI: 10.1007/s11910-006-0048-1.

[289] Koskiniemi, M.; Rautonen, J.; Lehtokoski-Lehtiniemi, E.; Vaheri, A. *Ann. Neurol*. **1991**, 29 (5), 492-497. DOI: 10.1002/ana.410290508.

[290] Rotbart, H.A. *Semin. Neurol*. **2000**, 20 (3), 277-292. DOI: 10.1055/s-2000-9427.

Paralysies et myélites flasques aiguës.

Outre l'inflammation des méninges ou de l'encéphale, certaines paralysies ou myélites flasques aiguës (PFA/MFA) peuvent aussi être observées lors d'infections à EV. Les PV sont les principaux EV provoquant ce type de paralysies. Cependant, après leur quasi-extinction, l'EV-A71, l'E11 ou L'EV-D68 ont été reconnus comme étant des causes majeures de PFA non-poliomyélitique, comme d'autres EV provenant des quatre espèces, dont la majorité des CVA, CVB et des E.[291]

Ces pathologies sont identifiées lors de l'observation d'une atteinte de la matière grise et de la corne de la moelle épinière par les EV.[292] L'observation de pléiocytose du LCR associé à l'inflammation de la matière grise est un signe possible de PFA/MFA. Différents signes cliniques peuvent aider à l'exclusion d'autres troubles affectant le névraxe. En effet, l'asymétrie de la paralysie, la présence de douleurs dans le membre paralysé, l'absence ou l'augmentation des manifestations sensorielles ainsi que le dysfonctionnement de la vessie et de l'intestin sont des critères en faveur d'une PFA/MFA induite par des EV. Le principal symptôme est la faiblesse de certains membres. Cela peut atteindre les membres, souvent aux extrémités, mais aussi le visage. Les infections à EV-D68 affectent souvent les membres supérieurs avec une perte moyenne ou totale de mouvement. Parfois, le visage peut être affecté sous forme de faiblesse faciale, de dysphagie (problème de déglutition) ou diplopie (dédoublement de la vision). Les paralysies liées à EV-A71 sont localisées plus fréquemment dans une seule jambe avec des atteintes légères à la liberté de mouvement. Certaines paralysies sont aussi associées à des encéphalites du tronc cérébral ou des encéphalomyélites.

---

[291] Masa-Calles, J.; Torner, N.; López-Perea, N.; Torres de Mier, M.V.; Fernández-Martínez, B.; Cabrerizo, M.; Gallardo-García, V.; Malo, C.; Margolles, M.; Portell, M.; Abadía, N.; Blasco, A.; García-Hernández, S.; Marcos, H.; Rabella, N.; Marín, C.; Fuentes, A.; Losada, I.; Gutiérrez, J.G.; Nieto, A.; Ortúzar, V.G.; Cenoz, M.G.; Arteagoitia, J.M.; Martínez, Á.B.; Rivas, A.; Castrillejo, D.; Spanish AFP Surveillance Working Group. *Euro. Surveill*. **2018**, *23* (47), 1700423. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.47.1700423.

[292] Bitnun, A.; Yeh, E.A. *Curr. Infect. Dis. Rep*. **2018**, *20* (9), 34. DOI: 10.1007/s11908-018-0641-x.

Myocardites et péricardites.

Comme décrit précédemment, les infections à EV peuvent aussi provoquer des inflammations des parois du cœur, que ce soit le myocarde ou le péricarde. Les CVB sont souvent la cause de ces pathologies, même si quelques CVA et la plupart des E peuvent aussi les provoquer.[293] Tout comme les maladies atteignant le système nerveux, celles infectant le cœur ne se transmettent pas d'une autre manière que les moyens classiques de contamination des EV. Les EV atteignent les cellules du myocarde grâce aux récepteurs dit « *Coxsackievirus et Adénovirus* ».[294] Leur protéase 2A (pro-2A) vient ensuite provoquer des effets cytopathiques en clivant notamment les dystrophines de la cellule hôte. Les péricardites à EV, quant à elles, sont caractérisées par une absence de myosite conjointe.

Les biopsies endomyocardiques permettent de déterminer si les myocardites sont induites par un EV ou un adénovirus, ou si elles sont conjointes sans action directe, comme c'est le cas avec les infections latentes du virus de l'herpès.[295] Les principaux symptômes de la myocardite sont les douleurs thoraciques, les fatigues, les dyspnées, la fièvre et les palpitations cardiaques.[296] Des syncopes, des tachycardies et des tachypnées peuvent être aussi observées chez les adultes. Les myocardites infectant enfants et nourrissons causent d'autres types de symptômes comme des rétractations intercostales, des hypoxies accompagnées de cyanose ou des grognements respiratoires, ou des détresses voire des insuffisances respiratoires. Parfois, des arrêts cardiaques subviennent. Les CVB, particulièrement, induisent des inflammations sur plusieurs organes à la fois. Ainsi, ils ont une forte incidence de myocardite en association avec des

---

[293] Tracy, S., Chapman, N.M. *Group B* coxsackievirus *disease*. ***The Picornaviruses***. ASM Press. Washington, DC, U.S.A. **2010**. 353–368. DOI: 10.1128/9781555816698.ch22.

[294] Pinkert, S.; Dieringer, B.; Klopfleisch, R.; Savvatis, K.; Van Linthout, S.; Pryshliak, M.; Tschöpe, C.; Klingel, K.; Kurreck, J.; Beling, A.; Fechner, H. *Circ. Heart Fail*. **2019**, 12 (11), e005250. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.005250.

[295] Tschöpe, C.; Ammirati, E.; Bozkurt, B.; Caforio, A.L.P.; Cooper, L.T.; Felix, S.B.; Hare, J.M.; Heidecker, B.; Heymans, S.; Hübner, N.; Kelle, S.; Klingel, K.; Maatz, H.; Parwani, A.S.; Spillmann, F.; Starling, R.C.; Tsutsui, H.; Seferovic, P.; Van Linthout, S. *Nat. Rev. Cardiol*. **2021**, 18 (3), 169-193. DOI: 10.1038/s41569-020-00435-x.

[296] Kang, M.; Chippa, V.; An, J. *Viral Myocarditis*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 29083732.

pancréatites ou des hépatites.[297] Les péricardites provoquent souvent des douleurs et des gênes thoraciques, dues à une riche innervation de la couche pariétale.[298]

Des complications de la myocardite peuvent survenir provoquant des troubles de la circulation sanguine ainsi que des insuffisances cardiaques. Les CVB sont aussi reconnus pour infecter les cardiomyocytes, créant des lésions menant vers des cardiopathies.[293] Elles peuvent être aiguës, avec une infiltration mononucléaire minimale, subaigües, provoquant parfois des réactions auto-immunes ou des réponses immunitaires trop élevées, ou chroniques, pouvant causer des réponses auto-immunes et de faibles inflammations sur une longue durée, facteurs favorisant une future cardiomyopathie. Certains EV peuvent persister dans les tissus grâce à une croissance lente de l'infection. Des délétions génomiques dans les parties non-codantes peuvent apparaitre rendant inactifs les virus. Cependant, dès que ces parties sont réparées, les virus retrouvent leur pathogénicité.[299]

La principale complication de la péricardite est l'épanchement péricardique, avec l'accumulation de liquide au sein des tissus concernés par l'inflammation. En cas d'accumulation rapide de celui-ci, cela peut provoquer un tamponnement ou l'apparition de tumeurs pouvant être mortelles.

Gastro-entérites.

Les EV se répliquent majoritairement dans le tube intestinal. La principale maladie associée est la gastro-entérite.[300] Elle peut être sévère, voire mortelle, lorsqu'elle se déclare chez les nourrissons, et morbide pour les enfants en bas âge ou dans les pays dits « du Sud ».[301] Les cas de gastro-entérites se manifestent fréquemment sous forme d'épidémies locales au sein de communautés, telles que les établissements de la petite enfance, de soins ou dans des endroits

---

[297] Garmaroudi, F.S.; Marchant, D.; Hendry, R.; Luo, H.; Yang, D.; Ye, X.; Shi, J.; McManus, B.M. *Future Microbiol*. **2015**, *10* (4), 629-653. DOI: 10.2217/fmb.15.5.

[298] Dababneh, E.; Siddiquz, M.S. *Pericarditis*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 28613734.

[299] Chapman, N.M.; Kim, K.S.; Drescher, K.M.; Oka, K.; Tracy, S. *Virology*. **2008**, *375* (2), 480-491. DOI: 10.1016/j.virol.2008.02.030.

[300] Pérez-Martínez, Z.; Álvarez-Argüelles, M.E.; Rojo-Alba, S.; Castello-Abietar, C.; Boga, J.A.; Morilla-Morilla, A.; Vivanco-Allende, A.; Rodríguez-Suárez, J.; Alonso-Álvarez, M.A.; Melón, S. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **2021**, 40 (10), 2185-2190. DOI: 10.1007/s10096-021-04275-6.

[301] Stuempfig, N.D.; Seroy, J. *Viral Gastroenteritis*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 30085537.

clos (croisières, longs séminaires…). Les gastro-entérites sont provoquées par les dérèglements provoqués par les EV, impliquant la production de cytotoxines. Les symptômes associés sont généralement des nausées ou vomissements, des diarrhées, une anorexie ou une perte de poids, ainsi que des déshydratations.[301]

Conjonctivites hémorragique aigües.

Un variant du CVA24, les E7 et EV-D70 sont trois EV ayant provoqué plusieurs épidémies de conjonctivite hémorragique aigüe (CHA).[152, 302 , 303] Cette maladie est très contagieuse, notamment par sa transmission par le toucher des yeux ou des objets contaminés par les sécrétions oculaires.[304,305] Une propagation par voie aérienne est aussi suspectée. Les CHA se caractérisent par une inflammation de la membrane externe de la paupière, accompagnée du saignement de certains vaisseaux sanguins.

Les principaux symptômes sont la gêne due à la sensation d'un corps étranger, l'épiphora, l'œdème des paupières, le chémosis conjonctival et l'hémorragie sous-conjonctivale. Une faible proportion de patient·es se sont aussi plaint·es de fièvre, de fatigue, ou de douleurs dans les membres. En cas de co-infection ou d'aggravation de la maladie, plusieurs complications sont possibles. En effet, l'infection à EV peut affaiblir les défenses immunitaires et permettre une co-infection bactérienne. Des kératites ponctuées, des cicatrices conjonctivales ou des ulcérations de la cornée ont été observées. De plus, l'infection aigüe peut, si elle se prolonge dans le temps, devenir subaiguë voire chronique et affecter durable le fonctionnement oculaire.

---

[302] Wright, P.W.; Strauss, G.H.; Langford, M.P. *Am. Fam. Physician*. **1992**, *45* (1), 173-178. PMID: 1309404.

[303] Sandelin, K.; Tuomioja, M.; Erkkilä, H. *Scand. J. Infect. Dis*. **1977**, *9* (2), 71-73. DOI: 10.3109/inf.1977.9.issue-2.03.

[304] Solano, D.; Fu, L.; Czyz, C.N. *Viral Conjunctivis*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 29262100.

[305] Langford, M.P.; Anders, E.A.; Burch, M.A. *Clin. Ophthalmol*. **2015**, *9*, 1665-1673. DOI: 10.2147/OPTH.S85358.

Pneumonies / pneumopathies.

Par ailleurs, certains EV sont impliqués dans certaines pneumonies.[306] Les pneumonies sont caractérisées par une perturbation des échanges gazeux des alvéoles pulmonaires. Dans un premier temps, les pneumonies bactériennes étaient envisagées avant de conclure à une origine virale.[307] L'apparition et la démocratisation des tests de réaction de polymérase en chaîne (PCR) ont permis d'identifier plus rapidement le virus de l'infection associée.

Les principaux symptômes des pneumonies sont la fièvre, la toux, le manque d'oxygénation ainsi que la déshydratation.[308] Cependant, plusieurs complications sont possibles. En effet, comme pour les CHA, l'aggravation des symptômes peut être observée en cas de surinfection bactérienne. Cela peut entraîner un abcès, un empyème ou un épanchement pleural. De plus, les EV peuvent ensuite provoquer des collapsus cardiovasculaires, des septicémies, des pleurésies et des insuffisances ou détresses respiratoire aiguës.[308,309]

Diverses maladies notables.

Comme précisé ci-dessus, les entérovirus (CV, E, EV-A71, EV-D68) provoquent aussi différents symptômes liés au système respiratoire.[152,306,310,311] Des bronchiolites, infections des voies supérieures ou des exacerbations de l'asthme, comme co-facteurs, sont ainsi observées. Les symptômes résultant de ces infections ne semblent pas être liés à la nature du type de virus mais à l'âge ou les comorbidités présentes chez les patient·es.

---

[306] Jacobson, L.M.; Redd, J.T.; Schneider, E.; Lu, X.; Chern, S.W.; Oberste, M.S.; Erdman, D.D.; Fischer, G.E.; Armstrong, G.L.; Kodani, M.; Montoya, J.; Magri, J.M.; Cheek, J.E. *Pediatr. Infect. Dis. J*. **2012**, *31* (3), 309-312. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182443eaf.

[307] Perk, Y.; Özdil, M. *Turk Pediatri. Ars*. **2018**, *53* (2), 63-70. DOI: 10.5152/TurkPediatriArs.2018.6939.

[308] Freeman, A.M.: Leigh, Jr, T.R.. *Viral Pneumonia*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 30020658.

[309] Pneumonie ou pneumopathie bactérienne : symptômes, diagnostic et évolution. Assurance Maladie / Ameli. Lien.

[310] Jacques, J.; Moret, H.; Minette, D.; Lévêque, N.; Jovenin, N.; Deslée, G.; Lebargy, F.; Motte, J.; Andréoletti, L. *J. Clin. Microbiol*. **2008**, 46 (1), 206-213. DOI: 10.1128/JCM.01414-07.

[311] Tapparel, C.; Siegrist, F.; Petty, T.J.; Kaiser, L. *Infect. Genet. Evol*. **2013**, 14, 282-93. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.

Les parties non visibles de la cavité buccale peuvent, lors d'infections à CV ou E, aussi être atteintes d'herpangine.[312,313] Cette dernière est généralement localisée sur les amygdales ou le palais des patient·es. Des vésicules ou des ulcères apparaissent lors de la contamination, se révélant alors asymptomatiques ou douloureux.

Outre les gastro-entérites, les EV se reproduisant majoritairement au niveau du tractus intestinal, des symptômes bénins associés à leur présence sont parfois observés. Différents cas de diarrhées, aiguës ou persistantes, comme symptômes secondaires, ont été identifiés avec pour cause commune les infections à certains EV-A, EV-B et EV-C.[314] Chez les enfants en bas âge, cela peut induire des déshydratations parfois sévères.

Une fois la barrière intestinale passée, les EV peuvent ensuite infecter un large panel de tissus musculaires *via* la circulation sanguine. Le symptôme le plus bénin lié à ces infections serait la pleurodynie, aussi nommé myalgie épidémique ou maladie de Bornholm, étant provoquée par des CV (souvent CVB) et par une majorité des E. Des douleurs sur le devant du tronc, à la tête, ou de forme grippale sont les principaux symptômes. Dans certains cas, la maladie est associée aux myopéricardite. De plus, tout comme l'EV-A71 et certains E, les CVB peuvent être responsables d'inflammation du pancréas en marge de myopéricardite. Dans les mêmes conditions, les E et les CV des espèces EV-B et C causent, quant à eux, plutôt des inflammations du foie.

Enfin, des corrélations sont toujours discutées entre le développement d'un diabète de type 1 et la présence d'EV. L'infection d'un·e patient·e ayant des prédispositions à cette pathologie semblerait la déclencher lors d'une infection aux E ou aux CV appartenant aux espèces EV-B et EV-C ainsi que les EV-A71 et EV-D70.[315,316]

D'autres maladies ou inflammations peuvent être causées par les EV, cependant, leur fréquence étant moindre, nous ne les avons pas détaillées ici.

---

[312] Corsino, C.B.; Ali, R; Linklater, D.R. *Herpangina*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 29939569.

[313] Chang, Y.K.; Chen, K.H.; Chen, K.T. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **2018**, 8, *60*, e70. DOI: 10.1590/S16789946201860070.

[314] Shen, X.X.; Qiu, F.Z.; Li, G.X.; Zhao, M.C.; Wang, J.; Chen, C.; Zhao, L.; Qi, J.J.; Liu, H.; Zhang, Y.; He, X.Z.; Wang, L.; Feng, Z.S.; Ma, X.J. *Arch. Virol*. **2019**, *164* (1), 63-68. DOI: 10.1007/s00705-018-4021-5.

[315] Hober, D.; Sane, F. *BMJ*. **2011**, *342*, c7072. DOI: 10.1136/bmj.c7072.

[316] Yeung, W.C.; Rawlinson, W.D.; Craig, M.E. *BMJ*. **2011**, *342*, d35. DOI: 10.1136/bmj.d35.

7) Cout économique et social des Entérovirus.

Hormis les conséquences sanitaires des Entérovirus sur le corps humain, ces virus touchent les régions infectées avec pour conséquence une baisse économique liée à une perte de productivité ou des arrêts de travail liés aux maladies susnommées.

Peu d'évaluations de l'impact des EV ont été réalisées, leurs conséquences étant souvent sévères chez les nourrissons. Cependant, l'Asie du Sud-Est a été le lieu de nombreuses épidémies de maladies pieds-mains-bouche (MPMB). De plus, divers gouvernements ont pris des mesures rigoureuses de prévention. C'est pourquoi, plusieurs études ont quantifié les déficits économiques dues aux EV-A71, CV-16, CVA10 et CVA16, en tant que principaux responsables de la MPMB.

En Chine, entre janvier 2017 et mai 2018, 1.348.737 cas de MPMB ont été observés, dont 9.622 cas sévères et 62 décès.[317] Parmi ces cas sévères, 362 patient·es ont rempli un questionnaire avec plusieurs objectifs, dont l'incidence des conséquences économiques pour l'entourage de la personne infectée. La charge économique médiane par habitant de la MPMB a été estimée à 2.065,97 €.[*]

Une autre estimation de l'impact économique de l'EV-A71 a été réalisée en République de Chine (Taiwan) sur la période de 2006 à 2010.[318] Durant ces années, 7,8% des coûts associés aux infections à EV, et 79,1% des infections sévères, sont dus à l'EV-A71. Du point de vue des personnes atteintes, les frais de déplacement et la perte de productivité s'élevaient en moyenne à 34.456.500 € par an, avec un pic à 60.180.300 € annuel, dont 1.720.500 €/an (939.300 €/an lors du pic) pour EV-A71. Les coûts moyens liés aux frais médicaux étaient de 11.141.400 € annuels, dont 1.106.700 € par an pour l'EV-A71. Ce coût est indépendant du nombre d'infections à EV-A71 observées. Parmi les coûts moyens de productivité dus aux décès des nourrissons (734.700 €/an), 96,7 % sont dus aux EV-A71. *In fine*, la moyenne des coûts totaux annuels était de 45.968.720 € pour les EV et de 3.262.869 € pour EV-A71.

---

[317] Han, Y.; Ji, H.; Shen, W.; Duan, C.; Cui, T.; Chen, L.; Hang, H.; Zhang, Z.; Sun, H.; Zhang, X.; Jin, H. *Hum. Vaccin Immunother*. **2022**, *18* (5), 2049168. DOI: 10.1080/21645515.2022.2049168.

[*] Calculés selon les taux moyens de l'année 2024 : 1 RMB (Yuan RenMinbi) = 0,13 € / 1 $ = 0,93 €.

[318] Liu, D.P.; Wang, T.A.; Huang, W.T.; Chang, L.Y.; Wang, E.T.; Cheng, S.H.; Yang, M.C. *Vaccine*. **2016**, *34* (7), 974-980. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.026.

Enfin, une dernière étude a été menée au Vietnam sur l'impact économique de la MPMB.[319] Entre avril 2016 et décembre 2017, 345 patient·es infecté·es ont été recruté·es dont 72 avec une MPMB sévère. Le coût moyen par cas a été estimé à 372,74 €, soit un coût total annuel moyen de 73.308,75 € dont 69.7% provient des coûts médicaux totaux.

Les RV ne sont pas souvent responsables d'hospitalisations. Leur coût économique provient de la prise de rendez-vous médicaux, de l'automédication ou de la sur-prescription d'antibiotiques, pour prévenir ou traiter les surinfections bactériennes.[320] De plus, les infections du système respiratoire supérieur, même bénignes, sont une cause majeure de l'absentéisme professionnelle ou scolaire.[321] De 2000 à 2002, aux Etats-Unis, les infections respiratoires autres que la grippe ont coûté 36.735.000.000 €.[322] Afin de prendre conscience de ce coût, le parallèle avec l'effort de guerre a souvent été utilisé que ce soit récemment avec la pandémie de SARS-Cov2 ou lors de la Seconde Guerre Mondiale [**Figure 5**].[*]

---

[319] Nhan, L.N.T.; Turner, H.C.; Khanh, T.H.; Hung, N.T.; Lien, L.B.; Hong, N.T.T.; Nhu, L.N.T.; Ny, N.T.H.; Nguyet, L.A.; Thanh, T.T.; Van, H.M.T.; Viet, H.L.; Tung, T.H.; Phuong, T.T.L.; Devine, A.; Thwaites, G.; Chau, N.V.V.; Thwaites, L.; van Doorn, H.R.; Tan, L.V. *Open Forum Infect*. Dis. **2019**, *6* (7), ofz284. DOI: 10.1093/ofid/ofz284.

[320] Roelen, C.A.; Koopmans, P.C.; Notenbomer, A.; Groothoff, J.W. *Work*. **2011**, *39* (3), 305-313. DOI: 10.3233/WOR-2011-1178.

[321] Nichol, K.L.; D'Heilly, S.; Ehlinger, E. *Clin. Infect. Dis*. **2005**, *40* (9), 1263-1270. DOI: 10.1086/429237.

[322] Fendrick, A.M.; Monto, A.S.; Nightengale, B.; Sarnes, M. *Arch. Intern. Med*. **2003**, 163 (4), 487-494. DOI: 10.1001/archinte.163.4.487.

[*] "Nous sommes en guerre". Allocultion du Président de la République française du 16 mars 2020, annonçant le confinement strict pour combattre la pandémie du SARS-Cov2.

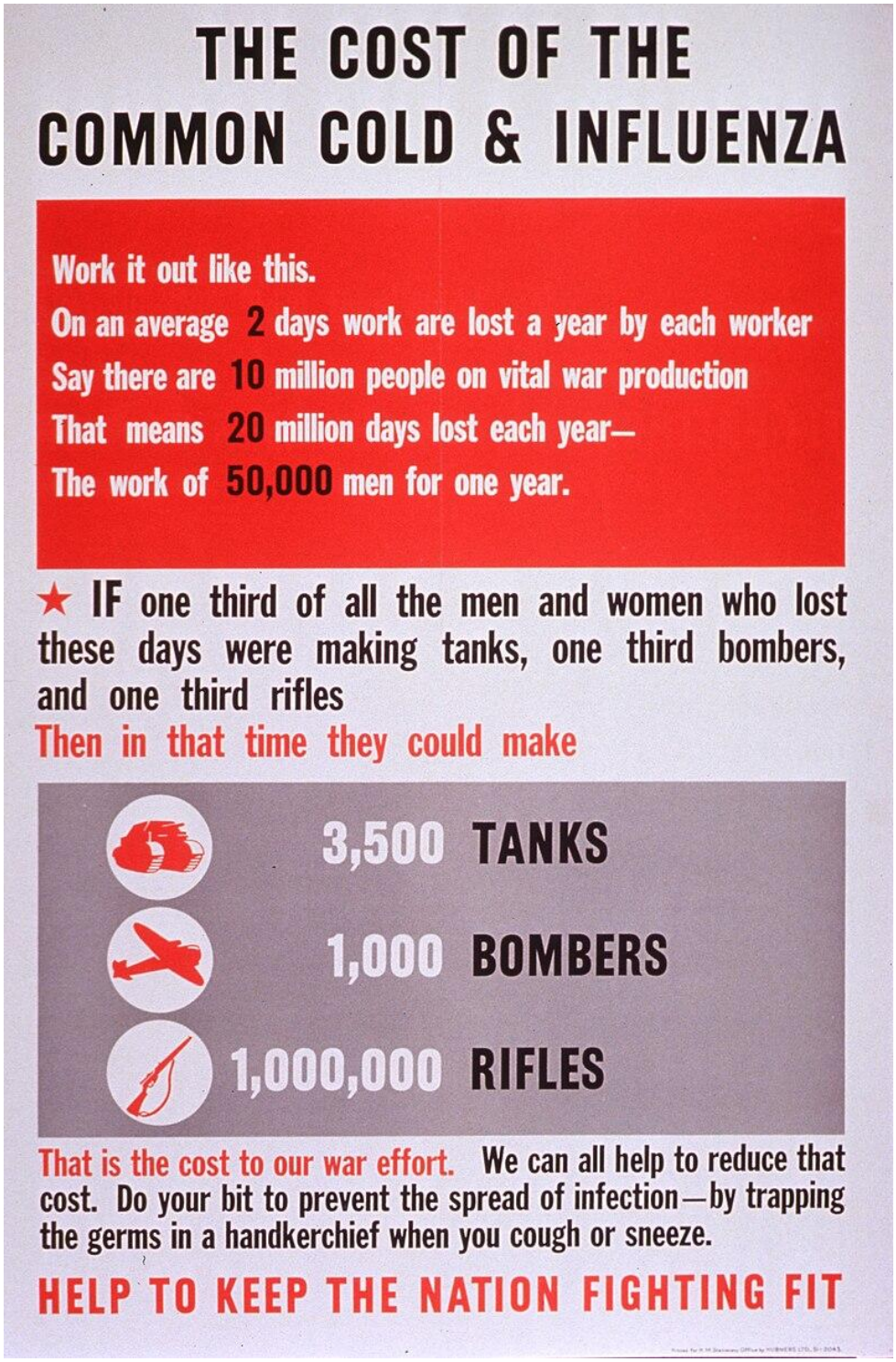


Figure 5. Le Coût du Rhume et de la Grippe. **Affiche de prévention des infections respiratoires virales durant la Seconde Guerre Mondiale aux Etats-Unis. U.S. National Library of Medecine: History of Medecine. The cost of Common Cold & Influenza.**

C. Thérapeutiques contre les Entérovirus.

Après avoir introduit la thématique autour des Entérovirus, des maladies associées ainsi que leur répartition géographique et les paramètres favorisant leur propagation, nous allons nous intéresser aux différents moyens de traitement pour lutter contre ces infections. Actuellement, outre les gestes communs d'hygiène, seulement deux moyens de prévention primaire existent contre les PV et EV-A71. Les autres types de virus n'ont à ce jour aucun moyen de prévention ou de traitement. Les seules solutions contre ces infections sont donc le recours à des thérapies visant à réduire l'intensité des signes cliniques.

1) Traitements prophylactiques contre les Entérovirus.

Gestes barrières avant contamination entérovirale.

Comme précisé dans les paragraphes précédents, les gestes barrières durant la pandémie ont permis de réduire drastiquement les infections à EV mais moins, dans une certaine mesure, les pathologies dues aux RV. Cela s'explique par les voies de transmission différentes de ces deux catégories d'Entérovirus, respectivement le péril fécal et les aérosols.

Recherche de virucides désinfectants ou acides.

Dans tous les cas, plusieurs solutions de virucides externes au corps ont été développées pour répondre à la demande de traitement, surtout contre les rhinovirus, dans les années 70 et 80. Différentes solutions virucides ont été envisagées à base de diiode, pour une protection de quelques heures.[214,323,324] De même, des solutions hydro-alcooliques ont été évaluées avec une inefficacité lors de simples mélanges eau – éthanol, mais à visée antiseptique dès qu'un agent chlorant y est ajouté.[325] Enfin, les mouchoirs, avec ou sans traitement acide – les RV étant sensibles aux faibles pH –, se montrent efficaces en stoppant de manière physique la

[323] Hendley, J.O.; Mika, L.A.; Gwaltney, J.M .Jr. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1978**, *14* (5), 690-694. DOI: 10.1128/AAC.14.5.690.

[324] Gwaltney, J.M. Jr.; Moskalski, P.B.; Hendley, J.O. *J. Infect. Dis*. **1980**, *142* (6), 811-815. DOI: 10.1093/infdis/142.6.811.

[325] Savolainen-Kopra, C.; Korpela, T.; Simonen-Tikka, M.L.; Amiryousefi, A.; Ziegler, T.; Roivainen, M.; Hovi, T. *J. Med. Virol*. **2012**, *84* (3), 543-547. DOI: 10.1002/jmv.23222.

propagation des RV.[326,327] Les lavages classiques de mains avec un mélange d'eau et de savon peuvent éliminer entre 66,7% et 89,9% des virus.

Gestes d'hygiène actuellement mis en place.

Ainsi, le lavage des mains avec du savon ou des solutions désinfectantes représente le premier geste pour stopper la prolifération des Entérovirus.[328] Ces derniers sont considérés comme très résistants du fait de leur absence d'enveloppe.[329] Ils sont d'ailleurs considérés comme référence dans les tests d'efficacité des virucides. Ainsi, si une solution inactive les Entérovirus, il est avéré qu'elle agit aussi contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'inverse n'est pas vrai.

Les virucides commercialisés dans le domaine médical en France doivent répondre à la norme NF EN 14476^{+A2}.[330] Par défaut, ils sont dilués à une concentration de 80% mais certains produits le sont uniquement à 97%, car aucun virucide n'est utilisé de manière pure.

Vaccins contre les Entérovirus.

Outre les gestes barrières, des vaccins ont été développés pour prévenir les infections aux poliovirus (PV) et à l'EV-A71.

Vaccins contre les poliovirus.

Le premier vaccin développé et commercialisé est celui contre les PV. Plusieurs vaccins ont été développés avec un vaccin vivant atténué, par voie orale, ou inactivé, par injection souscutanée. Une évolution des modalités de production du vaccin inactivé contre les PV a permis, en 2022, la commercialisation d'une nouvelle spécialité cultivée sur des cellules simiennes Vero.[331] Depuis 2000, le Comité consultatif sur les pratiques de vaccination aux Etats-Unis (*Advisory*

---

[326] Hayden, G.F.; Hendley, J.O.; Gwaltney, J.M. Jr. *J. Infect. Dis*. **1985**, *152* (2), 403-407. DOI: 10.1093/infdis/152.2.403.

[327] Turner, R.B.; Biedermann, K.A.; Morgan, J.M.; Keswick, B.; Ertel, K.D.; Barker, M.F. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2004**, *48* (7), 2595-2598. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2595-2598.2004.

[328] Prévention des infections à entérovirus non poliomyélitique. Gouvernement du Canada. Lien.

[329] Verdeil. X. *XXXIIIème Congrès National de la SF2H*. Lille, 6-8/06/2012. Lien.

[330] Norme NF EN 14476^{+A2}. Afnor Editions. Lien.

[331] IPOL - Poliovirus Vaccine Inactivated (Monkey Kidney Cell). Food Drug Administration. Lien.

Committee on Immunization Practices ACIP) recommande l'utilisation exclusive de vaccin inactif pour la vaccination usuelle contre les PV.[332]

Cela est dû à différents cas de poliomyélite paralytique observés après la prise de la forme active par voie orale. Celle-ci est cependant utilisée dans de nombreux pays. En effet, l'accès à des conditions sûres pour effectuer une injection par voie intramusculaire ou sous-cutanée n'est pas toujours assuré dans le monde. De plus, la voie orale a pour principale cible le tissu lymphoïde associé au tube digestif, région cruciale pour la réponse immunitaire contre les Entérovirus.

Enfin, le vaccin oral permet aussi de toucher des populations réticentes ou n'ayant pas un accès direct à la vaccination.[333,334]

Vaccin contre l'EV-A71 pour lutter contre la maladie pieds-mains-bouche.

Avec l'omniprésence de la maladie pieds-mains-bouche (MPMB) en Asie du Sud-Est, de nombreux projets de recherches ont été menés pour lutter contre cette maladie. Ainsi, un second vaccin a été récemment développé et commercialisé en Chine ciblant uniquement l'EV-A71. Approuvé fin 2015 en Chine, ce vaccin est destiné à lutter contre les épidémies fréquentes de MPMB qui affectent les enfants.[335] Le vaccin est une forme virale inactivée d'EV-A71 administrée par voie intramusculaire ou sous-cutanée. L'efficacité clinique du vaccin a été évaluée à 90% pour les formes modérées de MPMB, mais est seulement de 80% contre celles les plus sévères.[336] La protection provoquée par le vaccin est cependant une immunité humorale et en aucun cas une immunogénicité à long terme.

Limites de la vaccination contre les Entérovirus.

A ce jour, il n'existe aucun antiviral pour lutter directement contre une infection à Entérovirus. La vaccination permet uniquement de les prévenir. De plus, aucun vaccin unique ne permet de cibler tous les Entérovirus à cause de leur grande variété, car certaines maladies provoquées par des infections à EV ou RV peuvent provenir de différents génotypes. Afin de couvrir l'ensemble

---

[332] Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Regarding Routine Poliovirus Vaccination. Department of Health and Human Services, USA Government. Lien.

[333] Kwong, K.W.; Xin, Y.; Lai, N.C.; Sung, J.C.; Wu, K.C.; Hamied, Y.K.; Sze, E.T.; Lam, D.M. *Vaccines (Basel)*. **2023**, 11 (7), 1232. DOI: 10.3390/vaccines11071232.

[334] Zhu, Q.; Berzofsky, J.A. *Gut Microbes*. **2013**, *4* (3), 246-252. DOI: 10.4161/gmic.24197.

[335] Mao, Q.Y.; Wang, Y.; Bian, L.; Xu, M.; Liang, Z. *Expert. Rev. Vaccines*. **2016**, 15 (5), 599-606. DOI: 10.1586/14760584.2016.1138862.

[336] Yee, P.T.I.; Laa Poh, C. *Virology*. **2017**, *506*, 121-129. DOI: 10.1016/j.virol.2017.03.017.

de ces virus, il faudrait donc développer une multitude de vaccins. Or, cela a un coût financier de développement et de distribution qui serait trop important au vu de la faible incidence propre à chaque génotype. L'intérêt économique de la lutte contre les Entérovirus nécessite une protection de l'ensemble des génotypes par un seul traitement.

Plusieurs limitations à l'usage de vaccins ont été identifiées. Malgré des séquences de la protéine VP1 très bien décrites pour les classifier, tous les types de virus n'ont pas eu leur séquence complète identifiée. Avec l'arrivée des vaccins à ARN, il faudrait séquencer les parties codant pour les protéines non structurales de nombreux types de virus non caractérisés, afin d'avoir une meilleure connaissance et pouvoir développer ce type de vaccin contre les Entérovirus. De plus, la capacité de mutation des Entérovirus étant assez élevée, il est plutôt difficile de prévoir la durée de prévention à long terme, et le besoin de mise à jour des vaccins à l'image de ce qui est fait pour les vaccins contre la grippe chaque année.[306] Cela est néanmoins possible par une surveillance accrue des virus circulants. Les formes orales avec un virus vivant atténué permettent d'anticiper les mutations des souches sauvages et donc d'assurer une meilleure protection, notamment du système intestinal. En effet, dans le cas des Entérovirus, la forte possibilité de recombinaison lors de la réplication des brins d'ARN permet d'anticiper les mutations probables des différentes souches circulantes. Cependant, certains vaccins vivants atténués provoquent des cas d'infections spontanées, notamment chez les personnes immunodéprimées.[337,338] De plus, le fait de prendre une forme orale empêche la combinaison de ce type de vaccin avec un autre.

Un autre frein au développement d'une vaccination entérovirale vient du fait que malgré une distribution mondiale diversifiée, il faudrait envisager la vaccination sur plusieurs régions ou pays pour un même type de virus. Or, les accès à des formes intramusculaires ou orales des vaccins ne sont pas obligatoirement facilités selon la géographie et le niveau économique de certains pays. Enfin, les coûts financiers de développement ne pourront pas être autant rentabilisés dans certaines régions plus ou moins économiquement fortes ou stables.

Un autre enjeu, est la réponse curative aux infections à Entérovirus.

---

[337] Poliomyelitis Prevention in the United States. Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Department of Health and Human Services, USA Government. Lien.

[338] Zimmerman, R.K.; Spann, S.J. *Am. Fam. Physician*. **1999**, *59* (1), 113-118, 125-126. PMID: 9917578.

2) Traitement curatif pour lutter contre les Entérovirus.

A ce jour, il n'existe aucun traitement antiviral direct commercialisé. La seule approche possible est une prise en charge médicamenteuse permettant un traitement symptomatique. Par exemple, les formes bénignes sont ainsi traitées avec des antalgiques ou antipyrétiques (paracétamol…) ainsi que des solutions de réhydratation lors de diarrhées sévères chez les nourrissons.

La prise de principes actifs est donc à développer. Certaines molécules ont été évaluées que ce soit *in vitro* ou *in vivo* mais n'ont pas reçu d'autorisation de mise sur le marché. Elles seront abordées dans le **Chapitre II**. Ici aussi, la voie d'administration est essentielle pour la distribution d'un traitement curatif partout dans le monde. De plus, en s'attardant sur la synthèse d'une petite molécule comme principe actif, le coût de développement peut être réduit permettant une large utilisation.

Ce projet de thèse est centré sur l'obtention d'une solution médicamenteuse contre les Entérovirus.

Chapitre II : Recherches actuelles contre les Entérovirus – Positionnement du projet

Ce chapitre est divisé en deux parties.

La première partie décrit les différents inhibiteurs des Entérovirus envisagés, afin de faire un état de l'art de la recherche actuelle contre ces virus. Elle comporte notamment une revue, intitulée **Non-Polio Enterovirus inhibitors: scaffold, targets, and potency, what's new?** soumise au journal *ACS Infectious Diseases*, s'intéressant aux composés organiques de synthèse. Cette partie est aussi complétée par d'autres types de molécules à visée antivirale, provenant d'organismes vivants, étant inorganiques ou biologiques.

Dans une seconde partie, le positionnement de ce projet sera décrit en discutant des différents avantages et inconvénients de chaque type de cibles et d'inhibiteurs. Ainsi, en comparant l'accès aux différentes cibles virales ou cellulaires, promouvant le cycle de réplication des Entérovirus, les différentes spécificités de chaque type d'inhibiteurs mais aussi la présentation des mutations décrites pour ce genre de virus, nous justifierons l'angle abordé dans ce projet de thèse.

A. Recherches d'inhibiteurs des Entérovirus en 2024.

Chaque étape de la réplication virale décrite précédemment peut être inhibée selon la cible choisie. Dans un souci de synthèse, les différentes entités présentées ci-dessous ne sont pas exhaustives mais représentent de grandes catégories de traitement considérés à ce jour. Dans un premier temps, nous détaillerons les différents composés organiques de synthèse, ayant été évalués *in vitro,* qui ont fait l'objet d'une publication dans le journal *ACS Infectious Diseases*. Dans une seconde section, nous présenterons certaines autres molécules, qu'elles soient biosourcées, inorganiques ou d'origine biologique afin d'avoir un aperçu complet des études menées à ce sujet. Comme les recherches sont très nombreuses, nous exposerons les inhibiteurs les plus notables ci-dessous.

1) Composés organiques de synthèse inhibant les Entérovirus.

Dans cette première section, nous présenterons les principaux LEADs organiques étudiés par mécanismes d'action, afin de développer un antiviral.

Dans un premier temps, nous aborderons les têtes de série dans la recherche d'inhibiteurs à Entérovirus. Dans un second temps, nous nous concentrerons sur l'ensemble des composés récemment synthétisés permettant l'inhibition de ces virus. Une revue a été publiée à ce sujet.

Têtes de série par mécanisme d'action.

Certaines molécules organiques de synthèse, du fait de leur activité, peuvent être considérées comme des LEADs et sont souvent prises comme référence dans les études ultérieures. Nous présenterons les travaux les plus récents dans la publication « *Non-Polio Enterovirus inhibitors: scaffold, targets and potency, what's new?* », soumise au journal ACS Infectious Diseases, cidessous. Nous listerons ici les molécules les plus citées et connues dans les différents articles.

Composés ciblant les protéines structurales.

La capside possède trois cibles décrites dans la littérature. Deux sont des poches hydrophobes voisines, l'une dont l'entrée se situe sur le canyon, l'autre est associée à l'arginine R219 (PDB code : 1COV). Des petits composés organiques peuvent s'y lier afin d'inhiber la prolifération virale. Les composés venant interagir avec la poche hydrophobe, dite « classique », ayant son ouverture dans le canyon de la capside sont prénommés « *capsid binders* ». La troisième cible est le sommet des axes quintuples de la capside, interagissant avec des macromolécules. Le fait de lier un composé à ces structures rigidifie la capside. Ces introductions empêchent l'obtention d'une conformation de la capside propice à la reconnaissance par les récepteurs de la membrane plasmique ou à la libération de l'ARN, une fois au sein de la cellule.[339,340] Ces composés sont présentés ci-dessous [**Figure 6**].

La première molécule historique citée ici est le **pléconaril**. Il a été synthétisé pour la première fois en 1998.[341] Il est dérivé de la série nommée WIN, car développé par Streling–Winthrop, Inc. Il possède une activité submicromolaire à large spectre contre les Entérovirus, inhibant 7 coxsackievirus (CVA9, CVB1, CVB2 CVB3 Nancy, CVB3 M, CVB4, CVB5) et 10 échovirus (E3, E4, E5, E6, E7, E9, E11, E24, E30).[342] Une modulation de la structure du **pléconaril** a mené à une nouvelle série possédant une association pyridazine – imidazolidinone avec le **BPR0Z-194**.

Le **pocapavir**, synthétisé en 1997 sous le nom **SCH 4873**, est aussi un « *capsid binder* » qui a été identifié comme étant un potentiel inhibiteur prometteur des Entérovirus, avec une activité submicromolaire.[343,344] Enfin, le **vapendavir**, un autre « *capsid binder* », a été évalué avec

---

[339] Jan Thibaut, H.; De Palma, A. M.; Neyts, J. *Biochem. Pharmacol*. **2012**, *83* (2), 185-192. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.08.016.

[340] Kolatkar, P.R.; Bella, J.; Olson, N.H.; Bator, C.M.; Baker, T.S.; Rossmann, M.G. *EMBO J.* **1999**, *18* (22), 62496259. DOI: 10.1093/emboj/18.22.6249.

[341] Rotbart HA, Webster AD; Pleconaril Treatment Registry Group. *Clin. Infect. Dis*. **2001**, *32* (2), 228-235. DOI: 10.1086/318452.

[342] Pevear, D.C.; Tull, T.M.; Seipel, M.E.; Groarke, J.M. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1999**, 43 (9), 2109-2115. DOI: 10.1128/AAC.43.9.2109.

[343] Collett, M.S.; Hincks, J.R.; Benschop, K.; Duizer, E.; van der Avoort, H.; Rhoden, E.; Liu, H.; Oberste, M.S.; McKinlay, M.A.; Hartford, M. *J. Infect. Dis*. **2017**, *215* (3), 335-343. DOI: 10.1093/infdis/jiw542.

[344] Buontempo, P.J.; Cox, S.; Wright-Minogue, J.; DeMartino, J.L.; Skelton, A.M.; Ferrari, E.; Albin, R.; Rozhon, E.J.; Girijavallabhan, V.; Modlin, J.F.; O'Connell, J.F. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1997**, *41* (6), 1220-1225. DOI: 10.1128/AAC.41.6.1220.

unemeilleure activité que le **pléconaril**.[345,346,347] Sa première synthèse a été réalisée en 2005, en modulant un autre composé de référence : le **pirodavir**, synthétisé en 1992.[348,349,350]

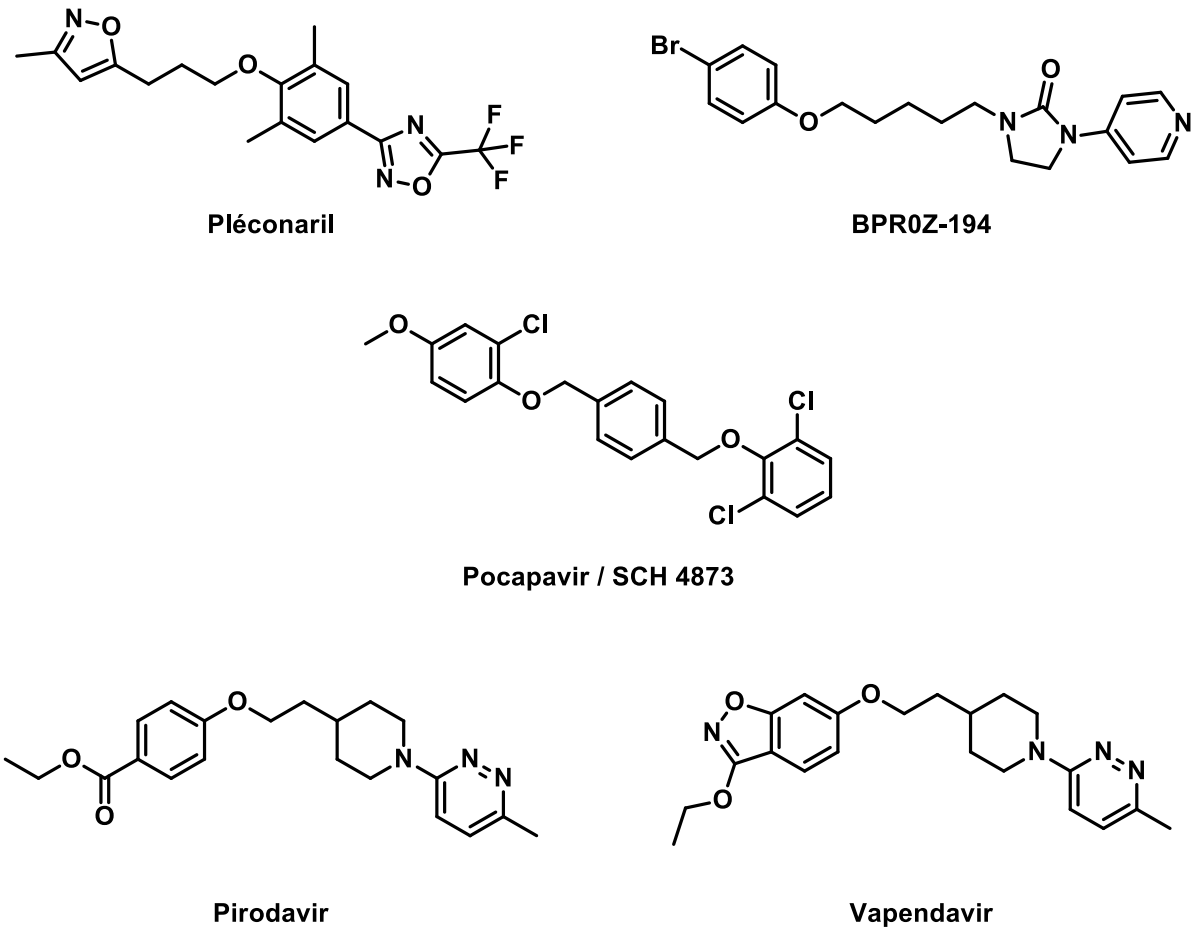


Figure 6. Structure des têtes de série ciblant les protéines structurales des Entérovirus.

---

[345] Tijsma, A.; Franco, D.; Tucker, S.; Hilgenfeld, R.; Froeyen, M.; Leyssen, P.; Neyts, J. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2014**, 58 (11), 6990-6992. DOI: 10.1128/AAC.03328-14.

[346] Thibaut, H.J.; Leyssen, P.; Puerstinger, G.; Muigg, A.; Neyts, J.; De Palma, A.M. *Antiviral. Res*. **2011**, 90 (3), 213-217. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.187.

[347] Thibaut, H.J.; De Palma, A.M.; Neyts, J. *Biochem. Pharmacol*. **2012**, 83 (2), 185-192. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.08.016.

[348] Brown, R.N.; Cameron, R.; Chalmers, D.K.; Hamilton, S.; Luttick, A.; Krippner, G.Y.; McConnell, D.B.; Nearn, R.; Stanislawski, P.C.; Tucker, S.P.; Watson, K.G. *Bioorg. Med. Chem Lett*. **2005**, *15* (8), 2051-2055. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.02.054.

[349] Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; van Eemeren, K.; Stokbroekx, R.; Janssen, P.A. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1992**, 36 (1), 100-107. DOI: 10.1128/AAC.36.1.100.

[350] Al-Nakib, W.; Tyrrell, D.A. *Antiviral. Res*. **1987**, 8 (4), 179-187. DOI: 10.1016/0166-3542(87)90072-6.

Composés ciblant les protéines non structurales.

Les autres cibles virales agissent au niveau de la réplication de l'ARN, sa traduction, l'assemblage de nouveaux virions et leur sortie. Contrairement aux protéines de la capside qui sont uniquement impliquées dans l'entrée du virus et le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme, les protéines non structurales vont agir dans plusieurs étapes du cycle de réplication en exerçant des fonctions qui peuvent être différentes, et en agissant de manière directe ou en lien avec l'environnement cellulaire. Leurs inhibiteurs sont présentés ci-dessous [**Figure 7**].

Deux LEADs ont été décrits comme des composés ciblant l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) : la **ribavirine** et **NITD008**. Le premier a été étudié en stade préclinique *in vitro* (1988), sur modèle animal (2008) et en stade clinique (2014-2018).[351,352,353] Il est efficace pour traiter les myocardites virales, notamment initiées par les CVB. Le **NITD008**, quant à lui, est un dérivé de l'adénosine inhibant EV-A71.[354] Il serait utilisé comme nucléoside lors de la synthèse de l'ARN, ce qui arrêterait sa progression le long du brin à copier.

D'autres molécules de référence ont été décrites dans la lutte contre les Entérovirus. La synthèse du **rupintrivir** a été réalisée en 1999, identifiant l'inhibition de la protéine 3C (pro-3C) comme mécanisme d'action.[355] Il semble être plus efficace que de nombreux inhibiteurs des Entérovirus, notamment le **pléconaril** et **l'enviroxime**, présenté ci-dessous.[356] Un dérivé du **rupintrivir**, l'**AG-7404** ou **V-7404**, a aussi été synthétisé comme étant un inhibiteur efficace de la pro-3C entérovirale.[357]

---

[351] Kishimoto, C.; Crumpacker, C.S.; Abelmann, W.H. *J. Am. Coll. Cardiol*. **1988**, *12* (5), 1334-1341. DOI: 10.1016/0735-1097(88)92618-6.

[352] Li, Z.H.; Li, C.M.; Ling, P.; Shen, F.H.; Chen, S.H.; Liu, C.C.; Yu, C.K.; Chen, S.H. *J. Infect. Dis*. **2008**, 197 (6), 854-857. DOI: 10.1086/527326.

[353] Effect of Xiaoer Jiebiao Oral Liquid on Hand-foot-mouth Disease. National Library of Medecine. Lien.

[354] Deng, C.L.; Yeo, H.; Ye, H.Q. Liu, S.Q.; Shang, B.D.; Gong, P.; Alonso, S.; Shi, P.Y.; Zhang, B. *J. Virol*. **2014**, *88* (20), 11915-11923. DOI: 10.1128/JVI.01207-14.

[355] Patick, A.K.; Binford, S.L.; Brothers, M.A.; Jackson, R.L.; Ford, C.E.; Diem, M.D.; Maldonado, F.; Dragovich, P.S.; Zhou, R.; Prins, T.J.; Fuhrman, S.A.; Meador, J.W.; Zalman, L.S.; Matthews, D.A.; Worland, S.T. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1999**, *43* (10), 2444-2450. DOI: 10.1128/AAC.43.10.2444.

[356] Smee, D.F.; Evans, W.J.; Nicolaou, K.C.; Tarbet, E.B.; Day, C.W. *Antiviral Res*. **2016**, *131*, 61-65. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.04.003.

[357] Costenaro, L.; Kaczmarska, Z.; Arnan, C.; Janowski, R.; Coutard, B.; Solà, M.; Gorbalenya, A.E.; Norder, H.; Canard, B.; Coll, M. *J. Virol*. **2011**, *85* (20), 10764-10773. DOI: 10.1128/JVI.05062-11.

L'**enviroxime**, aussi nommé **LY 122772**, inhibe la protéine 3A (pro-3A) des Entérovirus.[358] La première synthèse a été réalisée en 1995 pour lutter contre les conjonctivites hémorragiques.[359] Enfin, un inhibiteur de la protéine 2C (pro-2C) a été identifié en 1962, la **guanidine·HCl**.[360]
A ce jour, aucun inhibiteur de synthèse n'a été envisagé pour cibler les protéines virales 2B et 3B.

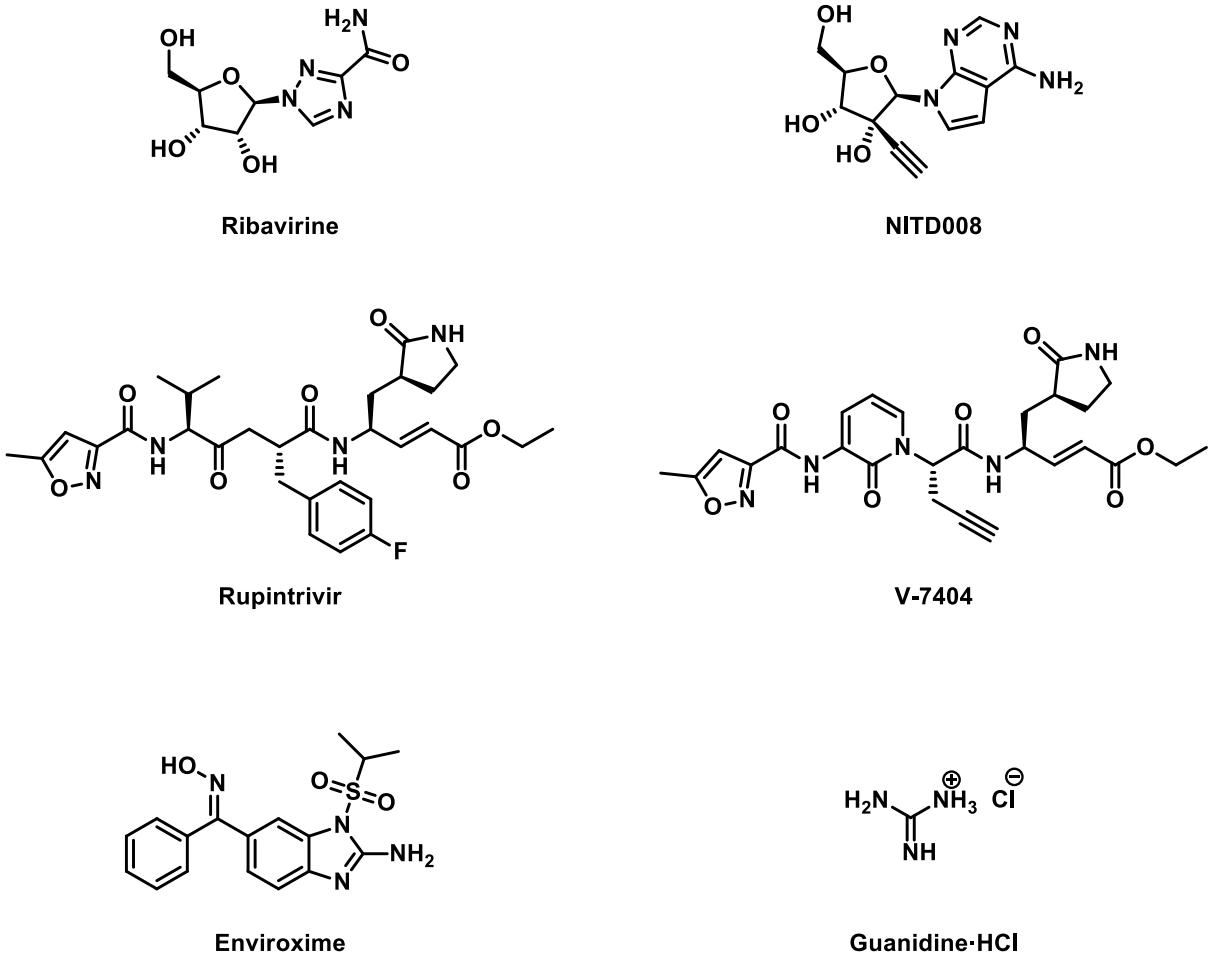


Figure 7. Structure des têtes de série ciblant les protéines non structurales des Entérovirus.

[358] Brown-Augsburger, P.; Vance, L.M.; Malcolm, S.K.; Hsiung, H.; Smith, D.P.; Heinz, B.A. *Arch. Virol*. **1999**, 144 (8), 1569-1585. DOI: 10.1007/s007050050611.

[359] Langford, M.P.; Ball, W.A.; Ganley, J.P. *Antiviral Res*. **1995**, 27 (4), 355-365. DOI: 10.1016/01663542(95)00019-i.

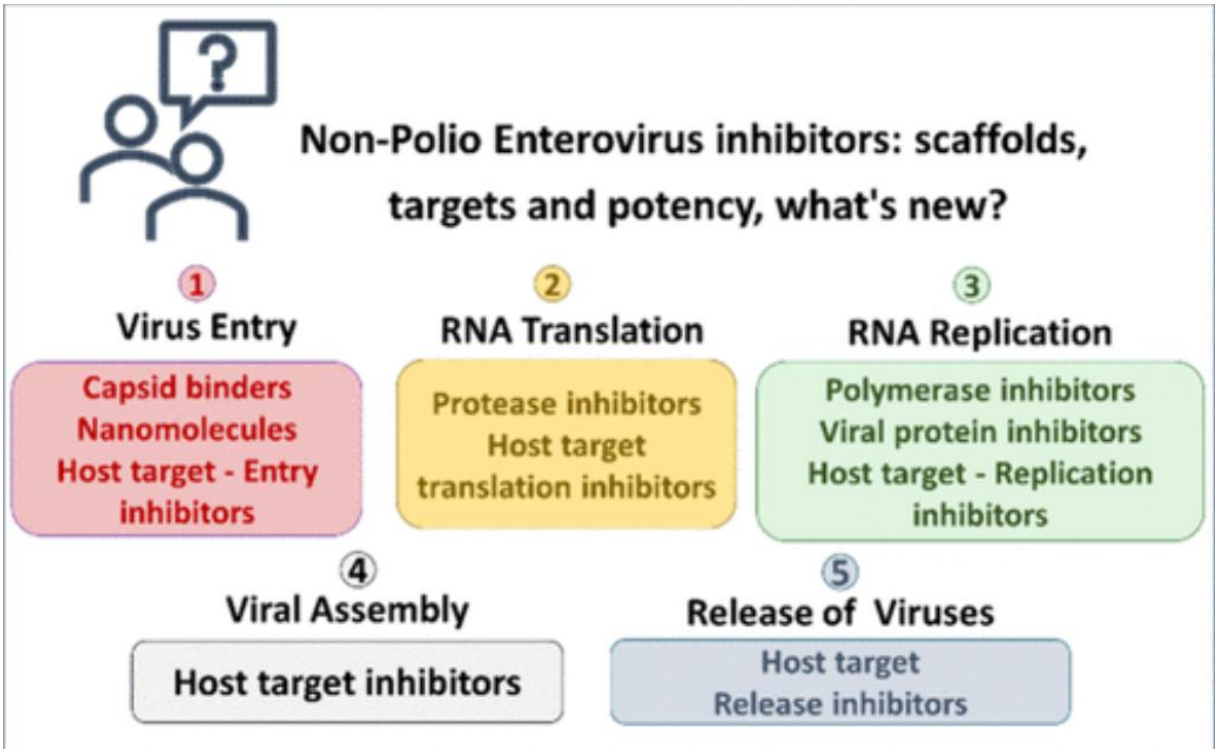
[360] Tamm, I.; Eggers, H.J. *Virology*. **1962**, *18*, 439-447. DOI: 10.1016/0042-6822(62)90034-x.

Petites molécules récemment développées.

Après avoir évoqué les différents inhibiteurs historiques des Entérovirus, cette partie présente les derniers composés synthétisés pour lutter contre ces virus. De nombreux composés sont des dérivés de molécules citées ci-dessus mais d'autres sont issus de nouvelles séries de synthèse ou proviennent de repositionnement médicamenteux. Les différentes classes de composés sont divisées selon leur mode d'action et leur cible virale.

Ce recensement a fait l'objet d'une publication dans le journal « *ACS Infectious Diseases* » en 2025 comme revue de la littérature exhaustive des derniers candidats évalués, quelles que soient les espèces d'Entérovirus (EV-A – EV-D, RV-A – RV-C). Un résumé de leurs principales interactions avec leurs cibles respectives ainsi qu'une discussion autour des dynamiques de la recherche d'inhibiteurs contre les Entérovirus sont aussi décrites.

"Non-Polio Enterovirus inhibitors: scaffold, targets, and potency, what's new?" Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Sciò, P.; Coluccia, A.; Vanelle, P.; Roche, M.
ACS Infect. Dis. **2025**, *11*, 21-46. DOI: 10.1021/acsinfecdis.4c00606.



ACS Infectious Diseases

pubs.acs.org/journal/aidcbc

Review

Non-Polio Enterovirus Inhibitors: Scaffolds, Targets, and Potency—What's New?

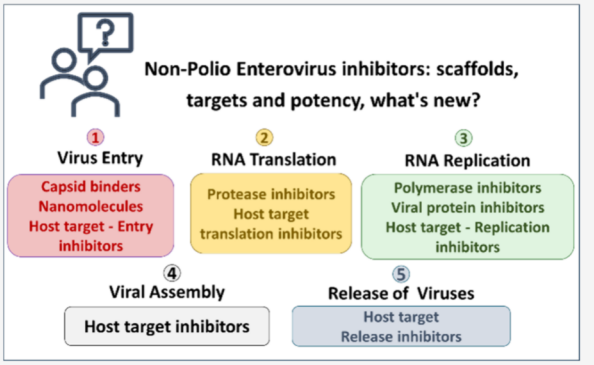
Hugo Fernando Georges Roux, Franck Touret, Pascal Rathelot, Pietro Sciò, Antonio Coluccia, Patrice Vanelle,* and Manon Roche*

Cite This: *ACS Infect. Dis.* 2025, 11, 21−46

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations

ABSTRACT: Enterovirus (EV) is a genus that includes a large diversity of viruses spread around the world. They are the main cause of numerous diseases with seasonal clusters, like hand-foot-mouth disease (HFMD). A vaccine is marketed in China for the prevention of HFMD caused by EV-A71. Despite the need, no antiviral is marketed to date. Therefore, several compounds have been currently evaluated to inhibit non-polio Enterovirus (NPEV), namely direct antiviral agents and host target inhibitor. We propose to make a review of the latest molecules evaluated as NPEV inhibitors and to summarize structure−activity relationships between these inhibitors and their target. We provide access to all recent information on Enterovirus inhibitors, regardless of the species, to facilitate the design of future broad-spectrum drugs.



KEYWORDS: *Enterovirus, Antiviral drugs, Structure−activity relationships, Broad-spectrum, Mechanism of action*

Downloaded via AIX-MARSEILLE UNIV on January 16, 2025 at 09:54:14 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

INTRODUCTION

Enterovirus is a genus that gathers two subgroups, including respectively four and three species: Enteroviruses (EV-A, EV-B, EV-C, EV-D) and Human Rhinoviruses (RV-A, RV-B, RV-C).[1] They are composed of a wide range of small, icosahedral RNA viruses [Figure 1A]. Enteroviruses are nonenveloped viruses with a single-stranded, positive-sense RNA genome of approximately 7Kb. Their coding region is divided into three parts [Figure 1B]. The first 3Kb codes for structural proteins (viral proteins VP1, VP2, VP3, VP4). The second part of 2 Kb contains 2A protease, 2B protein, and 2C protein. The last 2Kb is composed of 3A protease, 3B protein, 3C protease, and RNA-dependent RNA polymerase or 3D protein-coding regions. Viruses belonging to the Enterovirus genus share several conserved protein motifs located in the RNA-dependent RNA polymerase, capsid proteins, viral proteases, and other non-structural proteins.

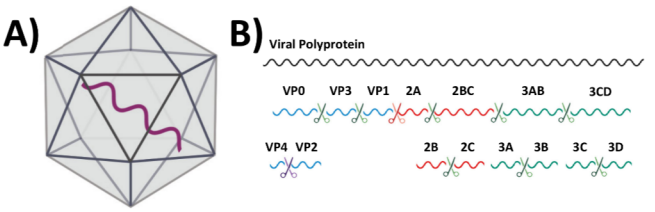
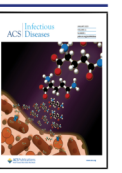


Figure 1. A) General structure of Enteroviruses. Capsid in gray, RNA in purple. B) Coding regions of enterovirus RNA. Polyprotein part 1 (VP0−4) in blue = structural proteins, polyprotein part 2 in red (2A, 2BC, 2B, 2C) and polyprotein part 3 in green (3AB, 3A, 3B, 3CD, 3C, 3D) = nonstructural proteins. Red scissors = cleavage by 2A protease. Purple scissors = cleavage by viral RNA. Sea green scissors = cleavage by 3C protease.

The viral replication cycle is composed of six steps, namely the entry into the cell, the viral uncoating, the RNA translation, the RNA replication, the assembly, and the release from the cell [Figure 2]. Plasma membrane receptors recognize specific structures in viral capsid. Then, its flexibility enables it to uncoat then release viral RNA into the cell's cytoplasm. The RNA in the cell is either translated by human ribosomes or replicated between the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. Thus, some viral proteases exacerbate these steps and reduce normal cell metabolism. At last, new capsids were assembled thanks to double-membrane vesicles help. Once they are mature, apoptosis, pyroptosis, or autophagy exit, enabling the proliferation of newly formed virions.

Diseases associated with Enterovirus infections are usually benign. Patients present most frequently nonspecific febrile

Received: July 25, 2024
Revised: December 3, 2024
Accepted: December 4, 2024
Published: December 23, 2024



ACS Publications

© 2024 The Authors. Published by American Chemical Society

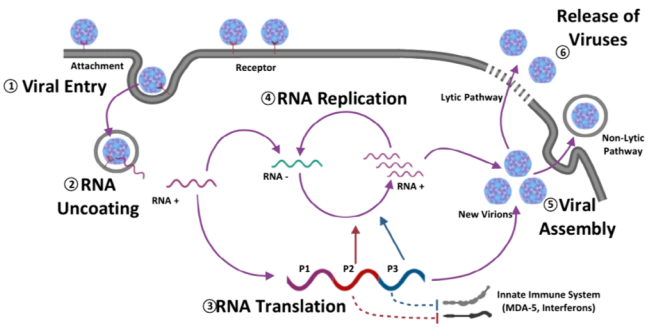


Figure 2. Main steps of enterovirus replication cycle. RNA+ = positive-sense RNA. RNA− = negative-sense RNA.

illness, exanthemas, respiratory tract infections, and ocular manifestations. However, some severe complications or comorbidities can be observed in immunocompromised patients or children.

Currently, there is no marketed directed antiviral agent against non-polio enteroviruses (NPEV). Three vaccines against EV-A71 are approved in China to reduce hand-foot-mouth disease epidemics. They provide protection against severe infections.[2] EV-A71, as EV-D68, is one of the new emergent types of enteroviruses that is now associated with more severe disease manifestations. Indeed, some neuronal infections, like acute flaccid myelitis, have been recently observed.[3,4] Enterovirus worldwide prevalence is clearly defined with a specific geographical distribution.[5] EV-D68 is mainly found in North America, while EV-A71 is very common in Southeast Asia. Elsewhere, the EV-B species is in the majority, while the EV-C species is scarcely present but scattered in Africa and South America.

To date, there is no effective antiviral treatment to prevent EV infection. Several molecules have been evaluated in phase II clinical trials, but none have been marketed. Recently, research has been divided into two main strategies. The first way is the structural modulation of hits through ligand- or structure-based drug design. It optimizes already published scaffolds, trying to overcome viral drug-related resistances or enhance their *in vivo* efficiency. Structural modulations to improve interactions in a large panel of viruses, decrease half-maximal effective concentration (EC_{50}), or optimize pharmacokinetic parameters can be performed in this way. The second option is to try to identify new antienteroviral hits. In this case de novo synthesis or repurposing, also called drug repositioning or drug reprofiling, are performed. For several years, numerous drugs have been the subject of evaluation to identify a new therapeutic indication. This was also the case in the search for molecules targeting enteroviruses. This approach is cost-effective, particularly useful where or a drug is urgently needed, such as in the search for a enterovirus treatments.[6]

The main goal of this work is to identify last year's published NPEV inhibitors and summarize data considering efficiency, structure−activity relationships, and pharmacokinetic parameters, if available. First, the optimization of original compounds is presented. Then, repurposing drugs is described. We regroup inhibitors according to their targets, human or viral proteins.

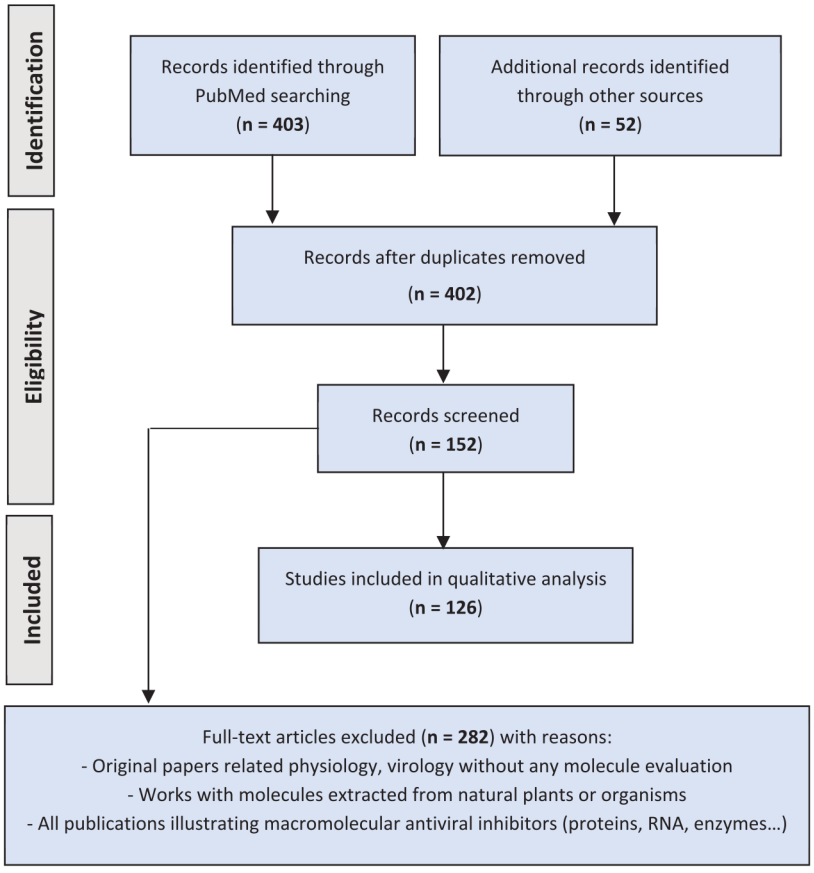


Figure 3. Results − data collection.[10]

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

LITERATURE SURVEY

The literature survey was conducted using the PubMed database. The data collection period occurred in May 2024. The search parameters included results from the past 7 years. The keywords used for study inclusion were a combination of a type of enterovirus ("Coxsackievirus (A or B)", "Enterovirus A", "Enterovirus B", "Enterovirus D", or "Rhinovirus") AND a keyword ("capsid binder" or "inhibitor"). The search parameters were confined to the title or abstract of original research articles written in English. The criteria of exclusion were original research articles related to physiology, virology without compound evaluation, natural products, and large molecule (proteins, RNA, enzymes) antiviral inhibitors.

Information was manually populated and noted if data was not available. We grouped together all articles evaluating analogs of the same hit or same chemical structure.

The type of inhibitor, chemical structure, type of EV inhibited, type of EV noninhibited (if known), potency in terms of biological activity, and modeling data were used for reporting. In this perspective, the half-efficiency concentration of inhibitors will be presented according to this notation: $EC_{50,\ cell}$ = value ± interval unity. The same notation is used for half inhibition concentration IC_{50} and half cytotoxic concentration CC_{50}. Compounds presented in this review are reported with their name used in the initial article bound with an acronym according to their target (VP1 = viral protein 1 of capsid, RdRp = RNA dependent RNA polymerase, 2C = 2C protein, 2A = 2A protease, 3C = 3C protease, HT = host target).

Docking and crystallography data figures were created to illustrate the interactions between the ligand and the receptor. All figures depicting the binding modes of the compounds examined in this review were generated using PyMOL.[7] Crystal structures were obtained from the Protein Data Bank using the respective PDB codes indicated in image descriptions. To accurately assess noncovalent interactions of the inhibitors at the binding site, all complexes were prepared using Maestro.[8] Hydrogen atoms, missing loops and amino acid side chains were added. Hydrogens were also minimized using the OPLS4 force field with all other heteroatoms held fixed.[9]

RESULTS

A total of 403 records were identified through PubMed database searching and other sources, and 126 full articles were accessed for analysis (53 duplicates removed and 282 excluded). Results are presented in the PRISMA flow diagram [Figure 3].[10]

PART 1: OPTIMIZATION OF ORIGINAL HITS BY LIGAND- OR STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN

The original Enteroviruses inhibitors mainly targeted structural proteins (involved in cellular entry and uncoating to release RNA), and nonstructural proteins (polymerase, 2C protein, or proteases, which are active during replication and translation of RNA).[11] Also, extensive hit-to-lead optimization processes were carried out.

1.1. Extracellular Viral Inhibition. Viruses can be targeted outside cells, interacting with the capsid. Indeed, several binding sites are identified on the viral capsid, and mainly on viral protein VP1. Most receptors in the plasma membrane bind with it, through its structural depression, named "canyon". VP3 protein also forms another summit at the junction of 3 VP3 proteins, "the threefold axis", which can also be targeted by cognate receptors. The VP1, VP2, and VP3 capsid proteins play a crucial part in the early stage of infection and viral replication cycle.[11] As the reference for Enterovirus taxonomy, VP1 is the most studied part of these viruses. This abundance of knowledge enables lots of inhibitor designs. They are presented below.

1.1.1. "Classical" Hydrophobic Pocket. The most studied target is the VP1 capsid protein. The "classical" hydrophobic pocket is in the capsid canyon [Figure 4]. This pocket is linear

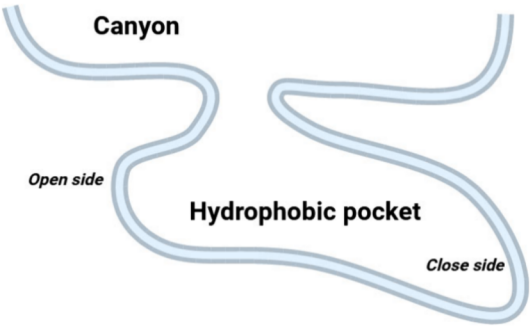


Figure 4. "Classical" hydrophobic pocket, located in a capsid canyon.

with two sides. The entry is like a pore in the capsid and the closed side looks like a toe. The stabilization of viral capsids by capsid binders prevents the binding with cognate cellular receptors, like intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) or lysosomal integral membrane protein 2 (LIMP2 or SCARB2).[12] The induced rigidity stops the release of viral RNA, as well as VP4, during uncoating. The following classical hydrophobic pocket capsid binders are presented in Figure 5 and Table 1. The most important interaction between compounds and VP1 is hydrophobic stabilization, even if the difference in the inhibitor's activity may come from opportunities to form hydrogen bonds with the target, in precise locations.

WIN-like compounds. The most famous family of viral protein VP1 hydrophobic pocket capsid binder is derived from drug candidates developed by Winthrop company (WIN compounds) and their derivatives, including **pleconaril**, **DBPR-103**, or **vapendavir**. In 2017, derivatives of **pleconaril** led to compound **VP1-14**, endowed with nanomolar potency against EV-A71.[13] The **pleconaril** isoxazole is substituted by a 2-(2-aminopyridin-4-yl)-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxide. In 2020, at Nankai University, keeping the imidazolidin-2-one moiety, a new lead compound named **NLD-4** was identified after the screening of a library of derivatives.[14] The same year, the pleconaril scaffold was modulated by Egorova et al., developing the compound **VP1-10g** with submicromolar potency against CVB3 (several strains), RV-A2, RV-B5, and RV-B14.[15] Adding a methyl amide on **pleconaril**, it was obtained **VP1-10g**, which is active against resistant CVB3. In 2023, this pleconaril derivative, **11526092**, was synthesized with nanomolar potency against EV-A71, CVB3, and EV-D68.[16] Methyl as 3-substituent in **11526092** led to hydrophobic interactions with W93, I95, I119, and V239. Moreover, this methyl provides a higher activity than fluorine or nitro functions instead. This compound was cocrystallized in EV-D68 capsid to confirm the same binding mode as **pleconaril**. Stabilizing interactions were identified with molecular modeling for these inhibitors [Figure 6].

Tetrazole derivatives. A tetrazole derivative characterized by three aromatics was identified as hydrophobic pocket capsid binders.[17] In 2019, a University of Arizona team synthesized **R856932** with micromolar potency against EV-D68. Unfortu-

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

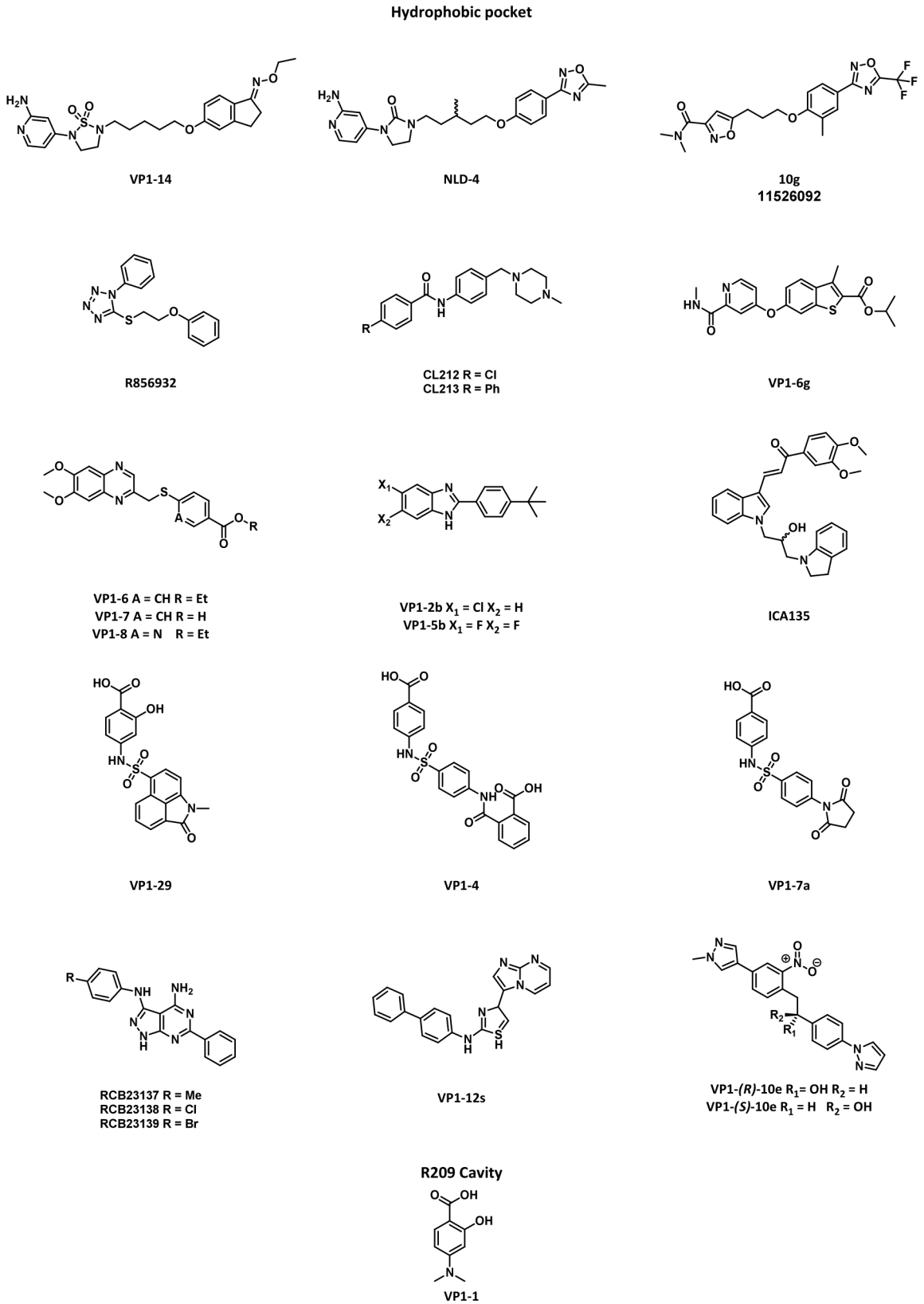


Figure 5. Inhibitors of capsid VP1.

nately, it was inactive against EV-A71 (Tainan/4643/1998 & MP4 strains). No data about binding mode or interaction were described in the associated article.

Piperazine derivatives. Another class of inhibitor was identified, mixing aromatic and saturated cycles. In 2023, Laajala et al. synthesized two piperidine derivatives, **CL212** and

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 1. Summary of Potency by Target for Original VP1 Pockets Binders

Molecule	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells[b]	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells[b]	Ref
Target: Classical Hydrophobic Pocket							
VP1-2b	EV-A71 BrCr	3.5	Vero 76	CVB5 Faulkner	10	Vero 76	22
	CVB3 Nancy	33		E9	4	LLC-MK2	
	CVB4 J.V.B.	25.5					
VP1-5b	EV-D68 Fermon	4	HeLa				
CL212	CVA9 Griggs	1.09	A549				18
CL213		5.92					
VP1-4	CVB3 Nancy	13.21 ± 1.49	Vero				25
VP1-7a	CVB3 Nancy	<9.88					
VP1-29	CVB1 Conn-5	16 ± 10	Vero A	CVB2 OH	14 ± 0	Vero A	24
	CVB3 Nancy	0.4 ± 0.1		CVB4 Edwards	21 ± 5		
	CVB5 Dekking	12 ± 2		CVB6 stamp P2183	20 ± 4		
	E7	39.8 ± 0.3		E11	4.3 ± 0.1		
ICA135	CVA10	9.11 ± 3.88	Vero	CVA16	*0.566*	Vero	23
	CVB3	*9.68*		EV-A71	3.047		
	EV-D68	*1.425*					
VP1-6g	RV-B14 ATCC VR-284	0.083 ± 0.029	H1HeLa	EV-A71 ATCC VR-1181	0.015 ± 0.001	H1HeLa	19
	RV-A21 ATCC VR-496	0.078 ± 0.003					
VP1-6	CVB5 Ohio-1	0.09 ± 0.01	Vero 76				20
		0.06 ± 0.01					
VP1-7	CVB3 Nancy	1.45	Vero 76	CVB4 J.V.B.	2	Vero 76	21
VP1-8	EV-D68 Fermon	50	HeLa	E9 Vispo	6	LLC-MK2	
RCB23138	RV-B5 WT1	*0.01 ± 0.01*	HeLa	RV-B5 Y1201H	*0.071 ± 0.010*	HeLa	26
	RV-B5 Q2131L	*1.66 ± 0.12*					
RCB23139	RV-B5 WT1	*0.01 ± 0.01*		RV-B5 Y1201H	*0.068 ± 0.16*	HeLa	
	RV-B5 Q2131L	*1.22 ± 0.10*					
RCB23137	RV-B5 WT1	*0.01 ± 0.00*		RV-B5 Y1201H	*0.041 ± 0.16*	HeLa	
	RV-B5 Q2131L	*1.20 ± 0.49*					
R856932	EV-D68 US/MO/14-18947 (clade B1)	0.46 ± 0.09	RD	EV-D68 US/IL/14-18956 (clade B2)	1.77 ± 0.05	RD	17
	EV-D68 US/MO/14-18949 (clade B1)	1.40 ± 0.04		EV-D68 US/KY/14-18953 (clade D)	3.34 ± 0.31		
	EV-D68 US/IL/14-18952 (clade B2)	4.39 ± 0.21					
VP1-12s	EV-A71 BrCr	1.541	ND	CVA16	0.747	ND	27
	EV-A71 GZ-CII	0.687	ND	EV-D68	0.190	ND	
	EV-A71/HeN09	0.732	ND	E6	0.365	ND	
	EV-A71/G082	0.272	ND	CVB2	0.364	ND	
VP1- *(S)*-10e	RV-B4	0.035 ± 0.006	HeLa Rh	RV-B70	0.017 ± 0.006		28
VP1- *(R)*-10e	RV-A89	0.190 ± 0.001					
VP1-10g or 11526092	CVB3 97927/I1207/I1092	0.02	HeLa Ohio	CVB3 Nancy	2.76	HeLa Ohio	15
	CVB3 97927/I1207K/I1092	4.79		RV-A2	0.86		
	CVB3 97927/I1207M/I1092	0.01		RV-B5	5.25		
	CVB3 97927/I1027T/I1092	0.01		RV-B14	0.09		
	CVB3 Woodruff	0.006 ± 0.000 (0.0020 ± 0.0000)[c]	HeLa	CVB3 HA 201933	0.00101	Vero 76	16
	CVB3 Nancy	0.00127	Vero 76	EV-A71 Tainan/4643/98	0.00424		
	CVB5	0.001	Vero	EV-D68 US/KY/14-18953	0.042	RD	
	EV-D8 US/MO/14-18949	0.058	RD	E11 Gregory	<0.032		
	E30 Bastianni	<0.032					

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 1. continued

Molecule	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells[b]	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells[b]	Ref
VP1-14	EV-A71/Shenzen/120F1/09	0.004	RD				13
NLD-4	EV-A71 (FY)-Luc	0.0000061	RD				14
Target: R219 Pocket							
	CVB1 Conn-5	48 ± 9		CVB4 Edwards	6.3 ± 0.4		
VP1-1	CVB2 Ohio	233 ± 32	Vero A	CVB5 Dekking	161 ± 32	Vero A	29
	CVB3 Nancy	2.6 ± 0.5		CVB6 P 2183	47 ± 3		

[a]Potency generally refers to half-maximal effective concentration (EC_{50}), except when the text is written in italics. In this case, potency refers to half the maximal targeted enzyme inhibition concentration (IC_{50}). [b]ND = not determined. [c]Result with a plaque-forming unit of 3 instead of 1.

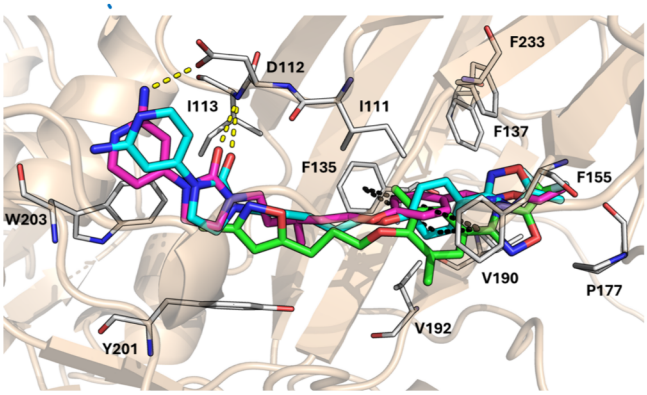


Figure 6. Interactions identified between VP1 hydrophobic pocket (PDB code: 4CEY) and **NLD** (magenta – PDB code: 4CEY), **NLD-22** (cyan – PDB code: 6LQD), and **pleconaril** (green – PDB code: 1NCQ). Hydrogen bonds in yellow, $\pi-\pi$ stacking in black and amino acids in gray stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions..

CL213, with micromolar potency against CVA9.[18] Both also reduce CVB3 proliferation without having a quantitative evaluation of the inhibition. Benzyl amide seems to be essential, compared to simple aniline, for **CL212** or **CL213**, as well as methyl-piperazine is preferred to morpholine, thiomorpholine, or imidazole. In addition to targeting classical hydrophobic pockets, docking studies predict that **CL212** and **CL213** could bind with the 3-fold axis of CV.

Fused bicycle derivatives. Another class of bicycle derivatives was identified to bind the hydrophobic pocket of VP1. In 2017, a Korean team synthesized benzothiophene derivative **VP1-6g** with submicromolar potency against several human rhinoviruses (RV-B4, RV-A21, RV-A71).[19] Some interactions were identified thanks to molecular modeling [Figure 7]. Both aromatics were predicted to have a perpendicular geometry through the oxygen linker.

In 2018, quinoxaline derivatives **VP1-6** and **VP1-7** were synthesized by Carta et al. They have submicromolar potency against CVB5.[20] Structure–activity relationships analysis presents some privileged functions. In 2022, two quinoxaline

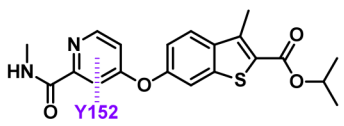
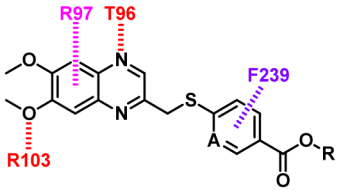


Figure 7. Interactions identified between VP1 hydrophobic pocket (PDB code: 1NCQ) and VP1-6g. $\pi-\pi$ stacking in purple and amino acids (V76, I104, L106, Y128, I130, A150, P174, F186, V188, V191, V197, M221, M224, $A24_{VP3}$, $L25_{VP3}$) stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

derivatives, **VP1-7** and **VP1-8**, had micromolar potency when tested against CVB3 and CVB4 or EV-D68 and E9, respectively.[21] In this series, phenyl better binds with CV viruses, while pyridine moiety is favorable for E9 and EV-D68. The results indicated the presence of structure–activity relationships and binding interactions were characterized



VP1-6 A = CH R = Et
VP1-7 A = CH R = H
VP1-8 A = N R = Et

Figure 8. Interactions identified between VP1 hydrophobic pocket and quinoxaline derivatives. Cation–π interaction in pink, hydrogen bond in red, $\pi-\pi$ stacking in purple, and amino acids (I94, L106, F114, L116, L118, Y191, M215) stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

[Figure 8]. However, compounds with an ethyl ester moiety can act like prodrugs, releasing the active drug after cleavage by esterases. In 2021, they synthesized benzimidazole derivatives with micromolar potency against several enteroviruses: EV-A71, CVB3, CVB4, CVB5, E9 for **VP1-2b** and EV-D68 for **VP1-5b**.[22] Surprisingly, **VP1-2b** and **VP1-5b** appear to inhibit viruses in the virion step, after cellular entry.

In 2019, Chen et al. conducted a screen and identified ICA**135** with a potency in the micromolar range against CVA10, CVA16, CVB3, EV-A71, and EV-D68. The secondary alcohol should form a hydrogen bond with isoleucine I109. Hydrophobic stabilization thanks to isoleucine I109 and I11, asparagine N226, aspartic acid D108, lysine K272, and cysteine C224 were identified.[23]

In the same year, **VP1-29**, a phthalimide with micromolar potency against CVB, E1 and E7 viruses, was synthesized. However, this compound is not effective against CVA21, EV-D68, RV-A9, RV-B14, RV-A59, and RV-A63.[24] Hydrogen on carbonic acid is essential for the activity of the compound. This chemical function has an ionic interaction with arginine R234 from VP1 protein. In 2022, two sulfonamide benzoic acid derivatives **VP1-4**, and **VP1-7a** were synthesized with a micromolar activity against CVB3.[25]

In 2024, Richter et al. synthesized three pyrazolopyrimidine, or **OBR-5-340**, derivatives, **RCB22137**, **RCB22138**, and **RCB22139**, with submicromolar potency against RV-B5.[26] More efficient *para* substitution of phenyl from this series are bromine, chlorine or methyl ones instead of fluorine, difluorine,

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21–46

and iodine. They also evaluated its efficiency against RV-B5 with **OBR-5-340** resistant Y1201H or Q2131L mutations. While Y1201H mutation does not affect activity, all the inhibitors had

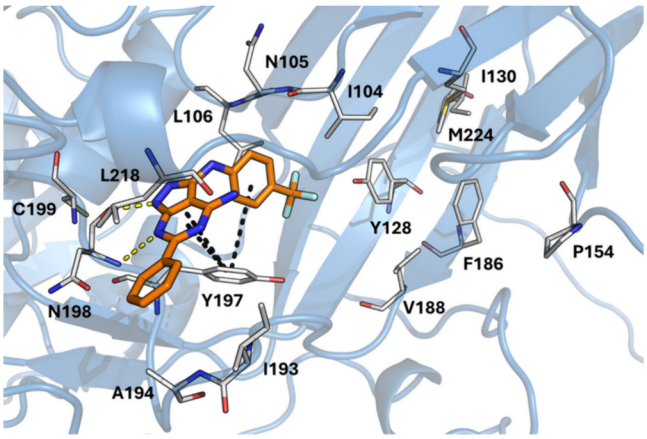


Figure 9. Reported binding mode of **OBR-5-340** in orange in VP1 "classical" hydrophobic pocket (PDB code: 6SK5). Hydrogen bonds in yellow, $\pi-\pi$ stacking in black, and amino acids in gray stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

micromolar potency against RV-B5 with Q2131L one. We performed docking studies [Figure 9].

Tetra- or more heteroaromatic compounds. Another family of molecules, with four or more heteroaromatics, was designed to bind with the hydrophobic pocket. In 2022, an aminothiazole derivative **VP1-12s** was synthesized with submicromolar potency against EV-A71, CVA16, EV-D68, E6, CVB2, and CVB6.[27] Compounds from this series containing five

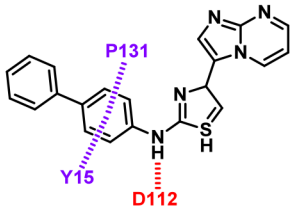


Figure 10. Interactions identified between VP1 hydrophobic pocket and **VP1-12s**. Hydrogen bond in red, $\pi-\pi$ stacking in purple, and amino acids (I111, I113, M195, W203, M230) stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

aromatics are more favorable than ones with four aromatics. The reported structural analysis is summarized in Figure 10.

In 2018, two pyrazole derivatives were designed from **LPCRW_0005**, with submicromolar potency against RV-A89 (enantiomer **VP1-*(R)*-10e**), RV-B14, and RV-B70 (enantiomer **VP1-*(S)*-10e**).[28] Molecular modeling determined several interactions stabilizing the complex hydrophobic pocket compound [Figure 11]. The lack of activity against RV-B14 is like the well-known pleconaril-like capsid binding resistance.

1.1.2. R219 Inhibitors. Another VP1 pocket was identified as a promising target for enterovirus inhibition. The cavity surrounded with R219 and Y157 is close to the above-mentioned hydrophobic pocket, binding with usual capsid-binders. Mutations deleting binding with the R219 cavity enhance the flexibility of the viral capsid. This behavior is characteristic of traditional capsid binders, which stabilize the

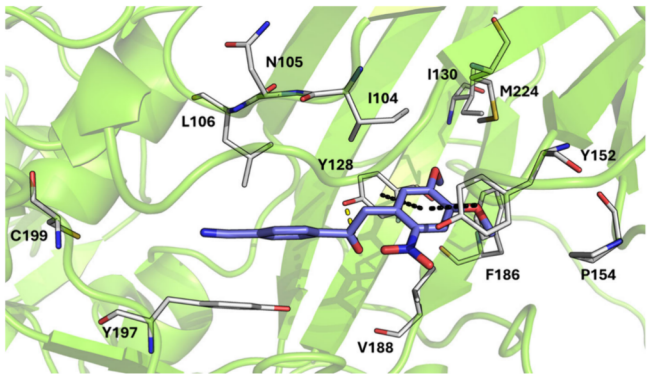


Figure 11. Interactions identified between VP1 hydrophobic pocket and **VP1-10e** in purple (PDB code: 4PDW). Hydrogen bonds in yellow, $\pi-\pi$ stacking in black, and amino acids in gray stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

viral capsid. Thus, even if the mechanism of inhibition is not well-defined, the stabilization of the capsid remains the main hypothesis to explain viral proliferation's decrease. As well as the "classical" pocket, the R219 one is hydrophobic.

In 2017, screenings were performed with 4-dimethylamino benzoic acid in Vero A cells with several EVs. The derivatives were efficient against CV but not E11, EV-A71, RV-A2, or RV-B14.[29] After optimization, compound **VP1-1** was the best candidate against CV, binding with the cavity above-mentioned. It is more active in CVB1 and CVB4 strains than others tested.

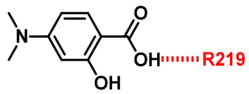


Figure 12. Interactions identified between VP1 R219 pocket and **VP1-1**. The hydrogen bond in is red and Y157 stabilizes the inhibitor by hydrophobic interactions.

Drug-binding interactions were identified and can be seen in Figure 12. **VP1-1**'s tertiary amine and benzoic acid are keys for activity inside the R219 pocket. R219 reduces steric hindrance in the cavity, which allows the virus to attach to the cell. This compound series opens a new category of capsid binders.

1.2. Intracellular Viral Inhibition. The viral capsid is the first accessible target of the viral replication cycle. However, other targets were identified during viral replication or translation after the release of viral RNA in the cell's cytoplasm. In addition to structural proteins, enteroviruses possess nonstructural proteins which are also crucial to the replication cycle.

1.2.1. RNA-Dependent RNA-Polymerase (RdRp). The best-known enzyme acting during viral replication is the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) that mediates viral RNA synthesis. Inhibition of RdRp has been used for treatments for hepatitis B (DNA virus) or human immunodeficiency virus (RNA virus) infections. It seems especially attractive for viruses with RNA genomes. Alternatively, viral RNA polymerases share sequence homology, and it is possible that an inhibitor can have broad activity. Therefore, nucleoside analogs represent a broad class of small compounds extensively studied as promising broad-spectrum antivirals. Several nucleoside analogs were synthesized to inhibit the first step of enterovirus replication [Figure 13, Table 2]. To our knowledge, no study of the

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

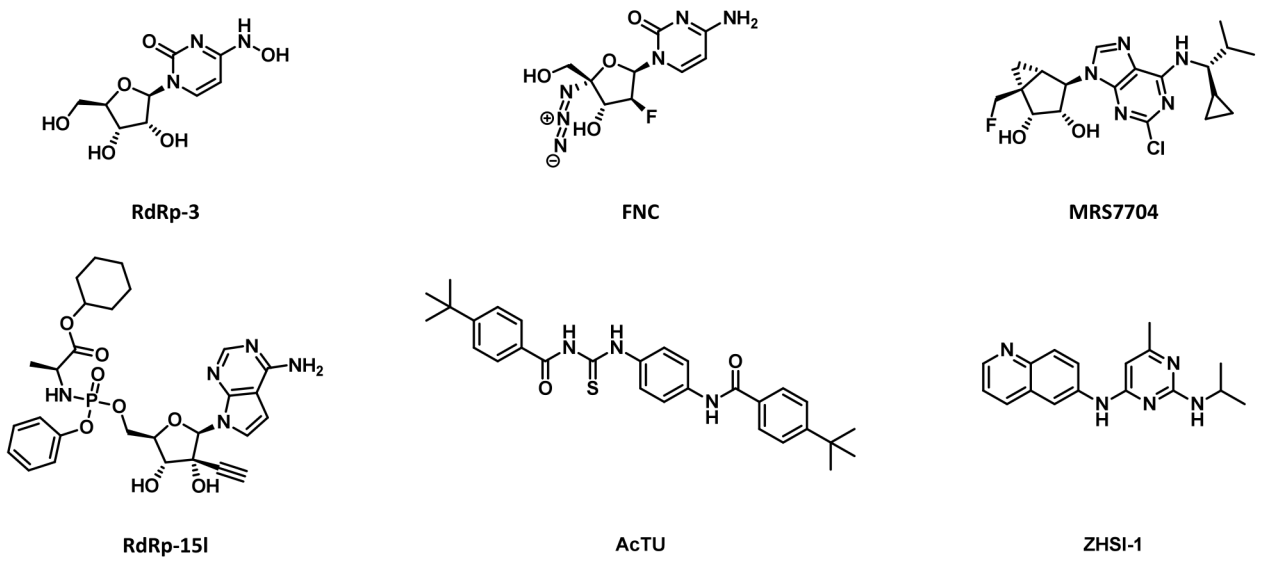


Figure 13. RNA-dependent RNA-polymerase inhibitors.

Table 2. Summary of Potency for Each Original RNA-Dependent RNA-Polymerase Inhibitors

Molecule	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells	Ref
RdRp-3	EVA71 46973 CVA9 46721 CVA16 49360	28 ± 13 18.41 5.41	RD	CVB1 48461 E6 42582 E30 47783	7.74 73.66 18.41	RD	30
ZHS-1	EV-A71 VR-78	*3.272*	RD				35
MRS7704	EV-A71 Tainan/4643/98	3.0	Vero 76	EV-D68 US/KY/14-48953	RD	16	32
RdRp-15l	EVA71	*0.19 ± 0.27*	RD	EVD68	*6*	RD	33
AcTU	EV-A71 CVB1 EV-D68	0.0010 0.00586 0.00075	RD	CVA16 CVA21	0.00496 0.01715	RD	34
FNC	EVA71 CC063 CVA6 changchun046/CHN/2013 or shzh05-1 CVA16 CC045	0.01687 0.01343 0.05212	RD	CVB3 JX312064.1 EVD68 US/KY/14-18953	0.03378 0.001548	RD	31

[a]Potency generally refers to half-maximal effective concentration (EC_{50}), except when the text is written in italics. In this case, potency refers to half the maximal targeted enzyme inhibition concentration (IC_{50}).

interactions between the ligands and its target (RNA Dependent RNA polymerase) has been carried out.

However, the main mechanism of inhibition against viral RdRp is the binding of nucleoside-like drugs in the currently synthesized RNA by the enzyme. Thus, viral RNA, including the drug, cannot be translated into viral proteins. Non-nucleoside analogs seem to bind strongly with RdRp thanks to hydrogen bonds. Even if nucleosides are hydrophilic, some hydrophobic moieties are keys to increasing the activity of compounds.

In 2018, a cytidine-like nucleoside **RdRp-3** was synthesized with a broad-spectrum and micromolar potency against EV-A71, CV (A9, A16, and B1) and echoviruses (E6 and E30).[30] Here, the cytidine is modulated and presents a hydroxylamine function at the C4 position. In 2020, another-cytidine like nucleoside (**FNC**) was synthesized with nanomolar activity against enterovirus RdRp.[31] **FNC** has broad-spectrum nanomolar activity against the following EVs: EV-A71, CVA6, CVA16, CVB3. and EV-D68. To synthesize **FNC**, the C2′-alcohol of cytidine must be substituted by fluorine by the Walden inversion. Additionally, the C4′ of cytidine will be replaced with an azido group. Also, **FNC** is efficient *in vivo* in contaminated mice brains, lungs, and muscles. Consequently, we can conclude that it is well-spread after its absorption. In 2020, Tosh et al. synthesized an adenosine derivative, **MRS7704**, with a micromolar potency against EV-A71 and EV-D68.[32] Some structure−activity relationships were identified. First, 5′-substitution can be truncated, or the alcohol can be substituted by a halogen (chlorine, fluorine) or by an azide. Bicycles have a greater activity than ribose. Purine is more effective than fused imidazopyridine. 2-chloropurine improved the efficacy of these inhibitors. Also, isobutylcyclopropane moiety leads to greater activity than benzyl substitution on purine amine. In 2021, an adenosine phosphate-like nucleotide **RdRp-15l** was synthesized with a submicromolar activity against EV-A71 and EV-D68.[33] Two main moieties were modified. First, a terminal alkyne was added to the C2′ position of ribose.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

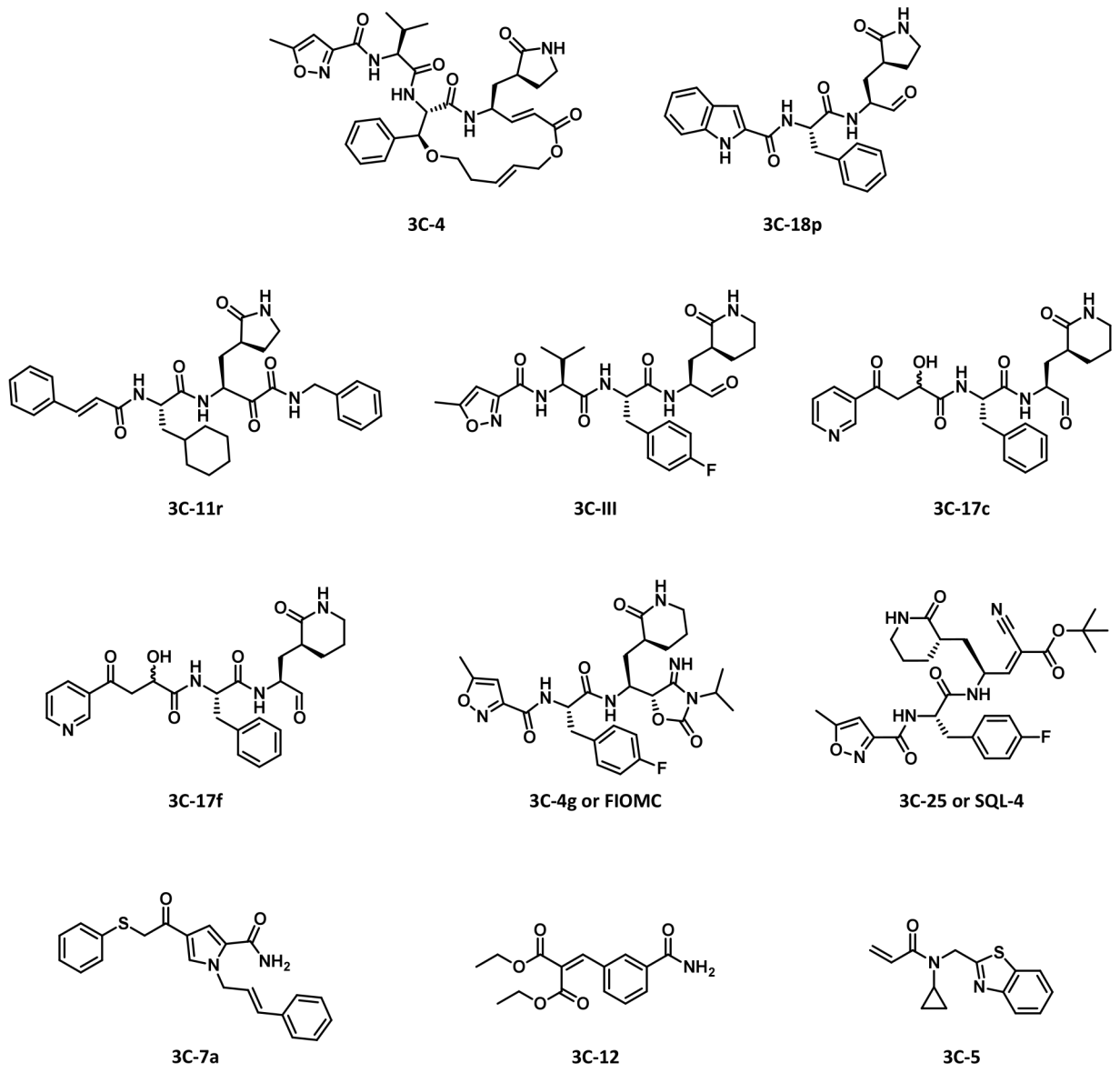


Figure 14. 3C protease inhibitors.

Moreover, respectively, the alcohol phosphate was substituted by a phosphoramide containing a phenol and an L-alanine cyclohexyl ester. Long alkyl chain in phosphoramide improves efficiency for **RdRp-15l**. The same year, an acylthiourea derivative, **AcTU**, was synthesized with a nanomolar potency against several types from all EV species.[34] EV-A71, CVA16, CVB1, CVA21, and EV-D68 were evaluated. The acylthiourea function usually has low cytotoxicity and offers a lot of opportunities to have a large structural diversity modulating potential inhibitors. Benzylamide is more active than alkylamide for acyl thiourea derivatives. Moreover, bulky hydrophobic substituents, such as *tert*-butyl moiety, in phenyl acylthiourea are necessary for activity. At last, thiourea of **AcTU** ensures efficiency, whereas urea or heterocycles are inactive Later in 2023, Wang et al. synthesized a pyrimidine derivative **ZHSI-1** with micromolar potency against EV-A71 and CVA16.[35] With biotin-marked **ZHSI-1**, coimmunoprecipitation assays measured direct interaction between the drug and RdRp. Consequently, staining cells confirm that **ZHSI-1** inhibits the complex between RdRp and Ragulator-Rag complex. CVA16 inhibition was only quantitatively evaluated.

1.2.2. 3C Protease. 3C protease ensures vital functions for viral translation, including the cleavage of eight sites of polyprotein.[36] Thus, it cleaves every site to release viral proteins except the binding of VP1 and 2A protease and VP4 and VP2. 2A protease and viral RNA, respectively, perform these cleavages. 3C protease also interacts with metabolic proteins to favor viral replication rather than the usual one and induce apoptosis by activation of caspases 3, 8, and 9.[37] 3C protease inhibitors tend to be more efficient than **enviroxime** and **pleconaril**, which in turn were more effective than **vapendavir** and **pirodavir**.[38] The historic 3C inhibitor of enterovirus is **rupintrivir**, first synthesized in 1999. However, other promising molecules have been identified since the discovery of the role of 3C protease inhibitors, which are mostly peptide analogs, such as historic **rupintrivir** or **AG-7404** (**V-7404**) [Figure 14, Table 3].

Rupintrivir and AG-7404 (V-7404) derivatives. In 2020, Li et al. synthesized a macrocyclic rupintrivir derivative **3C-4** with

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 3. Summary of Potency for Original 3C Protease Inhibitors

Molecule	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells	EV Species and Strain	Potency[a] [μM]	Cells	Ref
3C-4	EVA71/Shenzhen/120F1/09	4.5	RD	CVA16	/	/	39
3C-18p	CVB3	4.19	RD	CVA21	0.43 ± 0.11	RD	40
	HRVA2	1.62		EVD68	0.03 ± 0.01		
	HRVB14	0.81		EVA71 BrCr	0.030 ± 0.002		
3C-11r	EVA71	3.7 ± 0.2	RD	EVD68	0.48 ± 0.09	HeLa Rh	41
	CVB3 Nancy	2.77 ± 0.03	Huh7	HRVB14	0.70 ± 0.09		
3C-III	EVA71 (FY)-Luc	0.036 ± 0.007	RD				43
3C-25/SQL-4	EVA71 (FY)-Luc	0.030 ± 0.008	RD	EVA71 Fuyang	0.089 ± 0.010	RD	45, 46
	EVA71 BrCr	0.089 ± 0.010		CVA16	0.083 ± 0.008		
	EVA71 SK-EV006	0.119 ± 0.013		CVB3	0.086 ± 0.006		
3C-4g/FIOMC	EVA71 (FY)-Luc	0.033 ± 0.008	RD	EVA71-C Fuyang	0.075 ± 0.003	RD	47
	EVA71-A	0.096 ± 0.001		CVA16	0.125 ± 0.002		
	EVA71-B	0.102 ± 0.009		CVB3	0.080 ± 0.004		
3C-17f 3C-17c	EVA71	0.17 ± 0.01 0.15 ± 0.01	/				44
3C-5	EVA71	*30.1*	/				50
3C-12	EVD68	3.8	HeLa				49

[a]Potency generally refers to half-maximal effective concentration (EC_{50}), except when the text is written in italics. In this case, potency refers to half the maximal targeted enzyme inhibition concentration (IC_{50}).

micromolar potency against EV-A71.[39] **3C-4** presents 3-phenylserine instead of the rupintrivir 4-fluorophenyl. This serine is linked with the ethyl ester by a butylene linker. The His-Glu-Cys147 catalytic triad is crucial for enzymatic activity in the binding site. *In silico*, rupintrivir and the macrocyclic derivative have similar binding modes. In 2021, other rupintrivir derivative **3C-18p** was synthesized with micromolar potency against CVB3 and RV-A2 and submicromolar against EV-A71, EV-D68, CVA21, and RV-B14.[40] Interactions between **3C-18p** and the 3C protease were identified by docking studies (PDB code: 7DNC) and are represented in Figure 15. In 2020, Zhang et al. synthesized another rupintrivir derivative **3C-11r**. It had micromolar potency against EV-A71 and CVB3, and sub-micromolar against EV-D68, RV-A2, and RV-B14.[41] This derivative is characterized by a cyclohexane moiety instead of a 4-fluorophenyl group in rupintrivir. An optimization of the interaction with the target still seems necessary with this compound. In 2016, a Chinese team made assays comparing a library of rupintrivir derivatives.[42] These assays revealed that δ-lactams tend to be more efficient than γ-lactams against the enterovirus 3C protease. This resulted in several inhibitors with 6 atom-membered rings instead of 5. In 2018, an aldehyde rupintrivir derivative **3C−III** was synthesized with submicromolar activity against EV-A71.[43] Apart from the lactam elongation, an acrylate moiety was substituted by an aldehyde functional group. A quantitative structure−activity relationships model was developed to identify potent inhibitors for enterovirus A71 3C protease. Fu et al. synthesized two other aldehyde rupintrivir derivatives **3C-17c** and **3C-17f**, which displayed submicromolar potency against EV-A71.[44] Following a target-guided screening of fragments method, modulation of isoxazole by a 3 or 4-acetylpyridine was identified as the most potent fragments. The aldehyde in both compounds is a Michael acceptor required for C147 modulation. The valine side chain of rupintrivir is also substituted by an α-hydroxyglycine. Additional inhibitors were synthesized without the valine group in rupintrivir. In 2019, a 2-cyanoacrylate derivative **3C-25**, also named **SQL-4**, was synthesized with nanomolar potency against EV-A71.[45] In 2021, the same team increased the biological evaluations of this compound with submicromolar activity against other strains of EV-A71, CVA16, and CVB3.[46] In 2018, Ma et al. synthesized an oxazolidin derivative **3C-4g**, also named **FIOMC**. It displayed submicromolar potency against EV-A71, CVA16, and CVB3.[47] After 20 cycles of viral replication the presence of inhibitors resulted in no observed mutations or viral resistance. To have a better visualization, we docked most of these compounds in 3C protease.

Eventually, another peptide alog **GC376** already active againts multiple cysteine protease was evaluated in 2021 against rhinovirus 3C protein with nanomolar potency.[48] Likewise, it was evaluated against CVA6, CVA7, CVA10, and CVA16 with submicromolar activity.[49]

The experimental data showed a series of interactions that characterized this series of compounds and 3C-4 and **3C-18p** complexes. A Michael acceptor forms an irreversible (Figure 15A) or reversible (Figure 15B) covalent bond with a cysteine (C147 − PDB code: 7DNC). The C147 thiol adds to the carbon atom in the α-position of the peptide analog containing the lactone. The capacity of addition depends on the electronic environment of Michael's acceptor. Compared to ethyl acrylate moiety, aldehyde seems to be more efficient. However, the short warhead does not fill completely the bind pocket. Some nonsubstituted benzyls are bulkier to do it, better than alkyl substitution. Adding a nitrile on 2-position in the acrylate increases the inhibition thanks to the electro-withdrawing effect but decreases it due to steric hindrance. Moreover, this nitrile

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

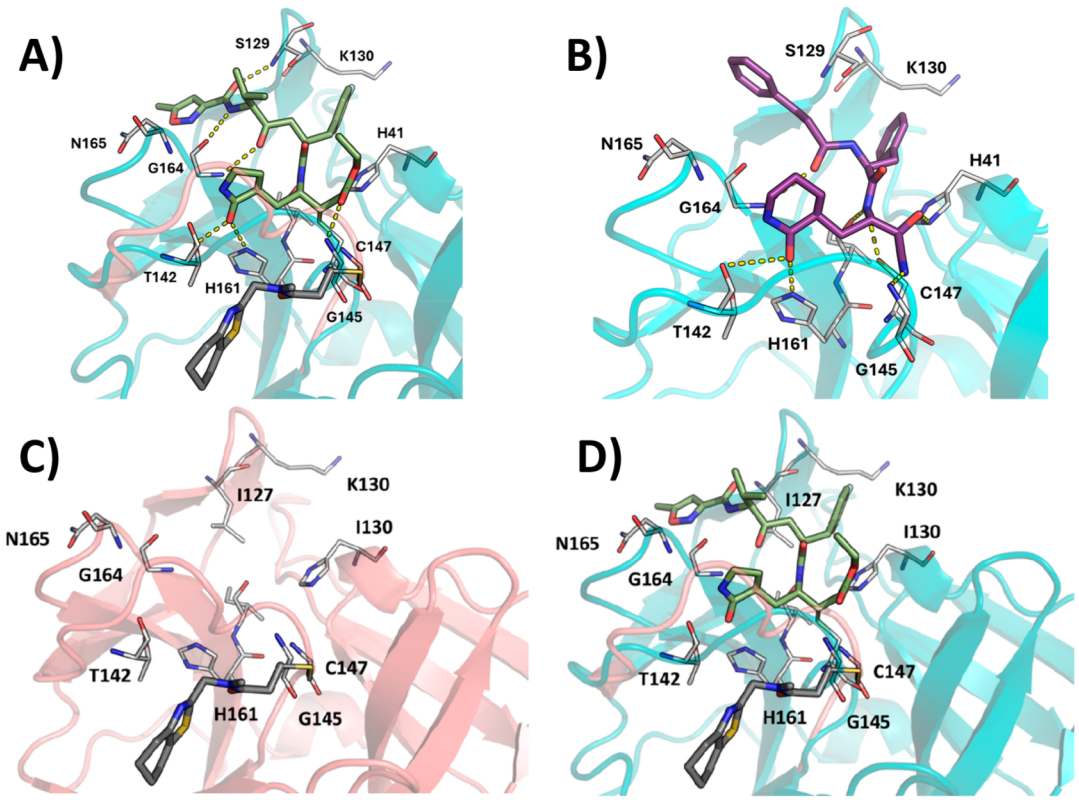


Figure 15. Interactions identified between the viral 3C protease (PDB code: 4GHT − teal) and its inhibitors: A) Irreversible covalent peptide analogs (3C-4 in magenta, PDB code: 6LKA) (AG7088 in gray, PDB code: 4GHT) (3C-18p in yellow, PDB code: 7DNC); B) Reversible covalent peptide analog 3C-11r in purple (PDB code: 5BPE); C) Irreversible covalent nonpeptide analog 3C-5 in gray with another 3C protease model (PDB code: 7WYO − dark salmon); D) Comparison of binding mode between peptide and nonpeptide analogs (AG7088 in olive in model: PDB code: 4GHT − teal; 3C-5 in gray in model: PDB code: 7WYO − dark salmon). Covalent binding with C147, and amino acids in gray stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

substitution also enables the release of cyanide during the addition of C147. Cyclization of cyanomethyl carbamate in a 4-iminooxazolidin-2-one stops the cyanide release while retaining the activity enhanced by the electro-withdrawing effect of imide. Increasing steric hindrance around lactone or warhead binding function increases the metabolic stability of the compound. Cyclization of cyanomethyl carbamate in a 4-iminooxazolidin-2-one improved its stability compared to the same compound with the open cycle. According to *in vivo* mice assays, 90% of **3C-4** were degraded after 2h. Eventually, in the same conditions, half-time of **3C-18p** was superior to the rupintrivir one.

Other molecules. Nonpeptide analogs have also been studied against the 3C protein. In 2018, a phenylthiomethyl ketone derivative **3C-7a** was synthesized with potentially irreversible inhibition of the 3C protein.[50] Inhibition values (k_{inact}/K_I) for CVB3 and EV-D68 have been calculated (54 ± 4 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$ and 160 ± 26 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$, respectively). Two mechanisms of action can be used to describe the impact of the inhibitor on the 3C protein. The first mechanism is the reversible addition of C147 on the carboxyl group to form thiohemiketal. The second mechanism is the substitution of thiophenol by C147. This irreversible reaction enables a side reaction between the free thiophenol and another C147 to form a disulfide bond. These last results, which must be validated by experimental procedures, unravel novel and previously unknown irreversible and reversible inhibition of the 3C protease. In 2021, *Tauber et al.* synthesized a 2-alkylenemalonic acid derivative **3C-12**. It has micromolar potency against EV-D68.[51] It is synthesized *in situ* by the 3C protease by an aldol reaction between 3-formylbenzamide and diethylmalonate in enol form. Ketones with CH-acidic substrates, like diethylmalonate, have faster reaction kinetics and higher affinity for the aldol reaction. **3C-12** inhibits 3C protease, even if the binding kinetics between the thiol from the 3C protein C147 is slow, the decomposition of the complex protein-drug is also slower than other compounds studied. In 2022, an acrylamide derivative **3C-5** was synthesized with micromolar potency against EV-A71.[52] The mechanism involves C147 binding to the inhibitor by a nucleophilic conjugate addition on acrylamide. This nucleophilic addition induces several conformational changes in some of the residues and an interface for dimerization. Its binding mode is modeled in Figure 15C. 3C protease Inhibitors, either peptide or nonpeptide analogs, do not bind in the same mode according to our compared docking because the 7WYO PDB model possesses a supplementary loop in comparison with the 4GHT one (Figure 15D).

■ PART 2: REPURPOSING DRUGS

Another strategy for discovering new compounds that inhibit Enteroviruses is drug repurposing. Already commercially available drugs possess an advance to select the optimized pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. However, as they are often designed for other pathogens, they also do not fit perfectly with the target but can be a new hit to be optimized. Here, in the past 7 years, repurposed drugs mainly target proteases and human proteins.[11]

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 4. Summary of Potency for Drug Repurposing Targeting Replication or Translation Viral Proteins

Molecule	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	Ref
Target: RNA-Dependent RNA-Polymerase							
Remdesivir	RV-A2	0.450	H1-HeLa	RV-B14	0.385 ± 0.318	H1-HeLa	54
	RV-A16	0.750					
Target: 2C Protein							
R523062	EV-D68 US/MO/14-18947	4.1 ± 0.8	RD	EV-D68 US/MO/14-18949	2.4 ± 0.3	RD	59
	EV-D68 US/IL/14-18952	4.9 ± 3.5		EV-D68 US/IL/14-18956	2.3 ± 0.5		
	EV-D68 US/KY/14-18953	6.4 ± 0.8		EV-A71 Tainan/4643/1998	18.0 ± 4.3		
	EV-A71 MP4	55.7 ± 7.4		EV-A71 US/CT/2016-19519	9.6 ± 2.5		
	EV-A71 US/AK/2016-19516	44.5 ± 10.2					
Fluoxetine	CVB3 Nancy	0.42 ± 0.17	HeLa R19	HRVA2	7.95 ± 0.39	HeLa R19	56
	EVD68 Fermon	0.67 ± 0.22		HRVB14	6.34 ± 1.02		
2C-12b	EVA71 BrCr	0.49 ± 0.26	HeLa R19	EVD68 Fermon	0.0860 ± 0.0071	HeLa R19	57
	CVB3 Nancy	0.0029 ± 0.0003		HRVA2	2.75 ± 0.38		
	CVA24 Joseph	1.33 ± 0.24		HRVB14	0.095 ± 0.120		
2C-2b	CVB3 Nancy	0.19 ± 0.45	HeLa R19	HRVA2	7.49 ± 1.12	HeLa R19	58
	EVD68 Fermon	0.11 ± 0.02		HRVB14	0.98 ± 1.25		
2C-6i	EVA71	1.238 ± 0.122	RD				60
2C-12a		0.02 ± 0.01	A172	EVD68 US/MO/14-18947	0.10 ± 0.01	A172	61
	EVD68 US/KY/14-18953	0.10 ± 0.05	SH-SY5Y		0.010 ± 0.008	SH-SY5Y	
		0.04 ± 0.01			0.06 ± 0.03	RD	
	EVD68 US/MO/14-18949	0.05 ± 0.03	RD	EVD68 UA/IL/14-18952	0.05 ± 0.03		
	EVD68 US/IL/14-18956	0.06 ± 0.04					
2C-6aw	CVB3	0.2 ± 0.2	Vero C1008	EV-D68 US/KY/14-18953	0.2 ± 0.1	RD	62
	EV-D68 US/MO/14-18947	0.10 ± 0.02	RD	EV-A71 Tainan	3.1 ± 1.0	RD	
	EV-A71 US/AK	3.6 ± 0.2	RD				
JX042	EVA71	0.4 ± 0.1	LLC	CVB3 H3	0.6 ± 0.1	HeLa	63
2C-7f	EVD68 US/KY/14-18953	0.020 ± 0.001	RD	CVB3	0.040 ± 0.002	Vero	64
	EVA71 Tainan/4643/1998	0.10 ± 0.02					
2C-10a	EVD68 US/KY/14-18953	0.030 ± 0.001	RD	EVD68 US/MO/14-18949	0.08 ± 0.01	RD	64
	EVA71 Tainan/4643/1998	0.10 ± 0.03			0.07 ± 0.01		
	EVA71 USA/CT/2016-19519	0.06 ± 0.01		EVD68 US/IL/14-18956	0.09 ± 0.01		
	EVA71 MP4	0.20 ± 0.04		EVD68 US/MO/14-18947	0.03 ± 0.00	SH-SY5Y	
	EVD68 US/MO/14-18947	0.07 ± 0.01		CVB3	0.04 ± 0.02	Vero	
SJW-2C-227	EV-A71 BrCr	1.7	Vero	EV-D68 Fermon	0.52	RD	65
Target: 2A Protease							
Telaprevir	EVD68 2014 strains	*0.4 ± 0.1−1.9 ± 0.2*	RD	EVD68 US/KY/14-18953	*0.6 ± 0.1*	RD	68, 70
Jun11762	EV-D68 US/MO/14-18949 B1	0.1010 ± 0.0128	RD	EV-D68 US/MO/14-18947	0.0430 ± 0.00332017	RD	71
	EV-D68 US/IL/14-18952 B2	0.2687 ± 0.0219		EV-D68 US/KY/14-18953	0.0467 ± 0.0066		
	EV-D68 US/IL/14-18956 B2	0.2460 ± 0.0348					

[a]Potency generally refers to half-maximal effective concentration (EC_{50}), except when the text is written in italics. In this case, potency refers to half the maximal targeted enzyme inhibition concentration (IC_{50}).

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

2.1. Intracellular Viral Inhibition. Some already commercialized drugs, like remdesivir or telaprevir, have been reused to inhibit the same target but in enteroviruses. However, other drugs were just screened and bound with proteases like fluoxetine or dibucaine. Then, some optimization from these repurposed drugs was performed. All of these compounds are presented below, with, in some cases, their optimization by structural modulations. Their potencies are presented in Table 4, classified by target.

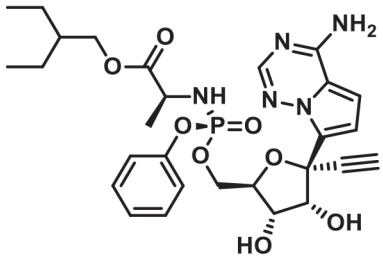


Figure 16. Structure of Remdesivir.

2.1.1. RNA-Dependent RNA-Polymerase RdRp. **Remdesivir** [Figure 16] is already designed to inhibit Zaire ebolavirus polymerase. However, monoclonal antibodies have substituted it in clinical practice due to their higher efficiency, but some derivatives bring back this nucleoside.[53] But a recent preclinical study hase shown a good efficacy of the remdesivir parent prodrug (obeldesivir) administrated orally in monkeys against Sudan ebola virus in primates, bringing back this nucleoside. In 2023, Rhadoshitzky et al. evaluated it with a submicromolar potency against EV-A71, EV-D68, RV-A2, RV-A16, and RV-B14 [Table 4].[54] During this study, it also showed a broad-antiviral activity against coronavirus OC43, flaviviruses, filoviruses, and hepaciviruses.

2.1.2. 2C Protein. In addition to RdRp, another nonstructural protein playing an important role during viral proliferation is the 2C protein. It is involved in the viral uncoating process, membrane remodeling, RNA binding, RNA replication, and RNA encapsidation.[55] Collectively, it is a prime target to inhibit viral replication. Two main families of compounds have been identified as good 2C protein inhibitors: fluoxetine derivatives and nitrogenous fused aromatics derivatives [Figure 17]. 2C protein inhibitors are also mostly small molecules having both heteroaromatic cycles for hydrophobic stabilization and polar moieties on substitutions.

Fluoxetine and derivatives. **Fluoxetine** is a commercial drug used against major depressive episodes, obsessive-compulsive disorder, and bulimia nervosa. In 2019, **fluoxetine** was tested for drug repurposing assays by a European team against CVB3 and EV-D68. **Fluoxetine** presents micromolar potency against RV-A2 and RV-B14 and submicromolar activity against CVB3 and EV-D68.[56] In 2020, a more effective fluoxetine derivative, with an aromatic amine **2C-12b**, was developed with micromolar potency against CVA24 and RV-A2 and submicromolar potency against EV-A71, EV-D68, and RV-B14, and nanomolar potency against CVB3.[57] The same year, other people from this team also modified amine by a guanidine function. This **fluoxetine** derivative **2C-2b** also displays micromolar potency against RV-B14 and submicromolar activity against CVB3 and EV-D68.[58] **R523062** is a **fluoxetine** derivative synthesized by Ma et al. in 2020. It has a micromolar potency against EV-A71 and EV-D68.[59] ***(S)*-fluoxetine**, **2C-12b**, and **2C-2b** are not efficient against 2C protein with AVIVAV mutations which imply ATPase and helicase activities inhibition. According to docking, **fluoxetine** must bind with two major pockets [Figure 18]. The main pocket is composed by A229, F190, F242, I227, L126, L178, L238, and V187.

Dibucaine derivatives. In 2020, a dibucaine derivative, **2C-6i**, was synthesized with micromolar potency against EV-A71.[60] The ethyl moiety of dibucaine's terminal tertiary amine was substituted by two methyl groups, and the butoxy moiety by a pentoxy group. These substitutions improved activity by a factor of 4.7. In this case, helicase activity inhibition was proved. **2C-6i** blocks 2C protein and VP1 expression as well as the EV-A71 replication by impeding 2C ATPase-mediated RNA remodeling. According to the docking studies realized, **2C-6i** seems to target 2C protein in a semiclosed mode.[60] Some interactions were identified during **2C-6i** binding [Figure 19]. In parallel, in 2019, an American team synthesized a dibucaine derivative **2C-12a**. It presented submicromolar potency against several strains of EV-D68.[61] As EV-D68 might replicate in neuronal cells, drugs have

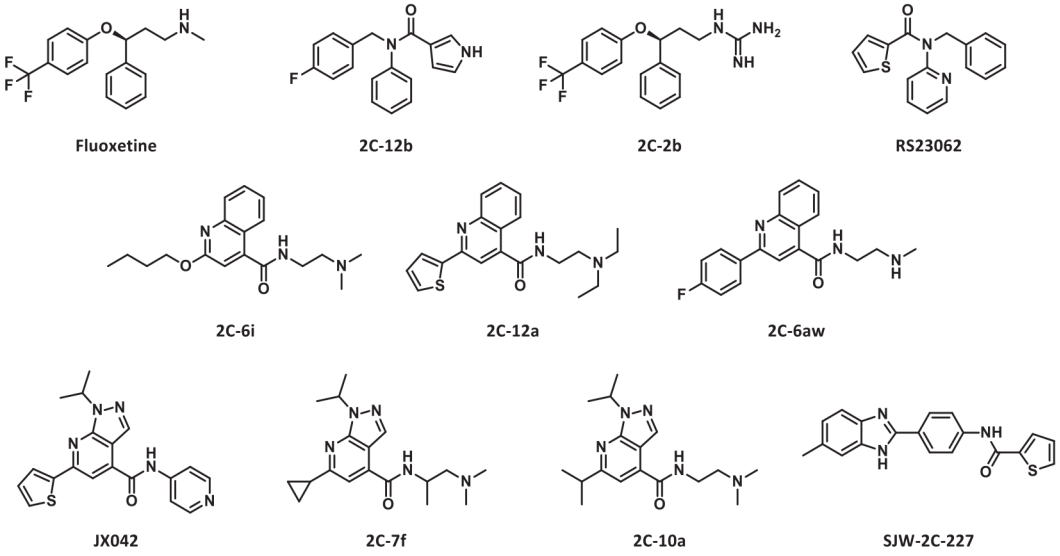


Figure 17. 2C protein inhibitors.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

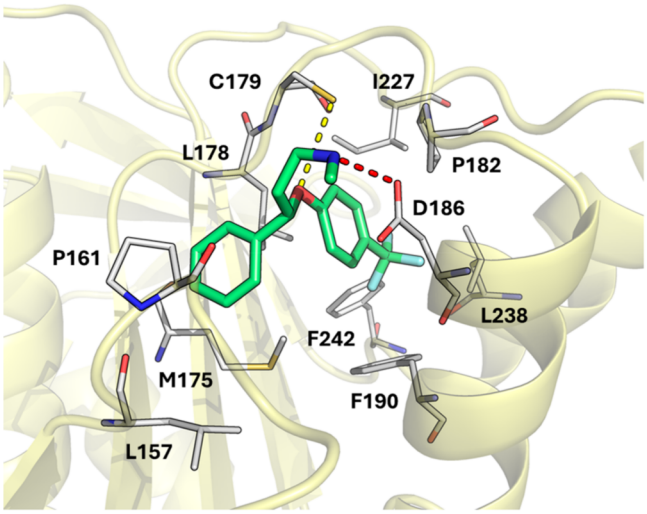


Figure 18. Interactions were identified between the viral 2C protein and fluoxetine in pale green (PDB code: 6S3A). Hydrogens bond in yellow, ionic interactions in red, and amino acids in gray stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

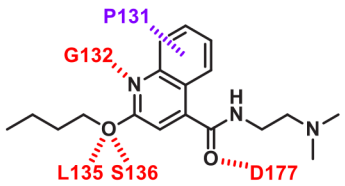


Figure 19. Interactions identified between the viral 2C protein and 2C-6i. Hydrogen bond in red, $\pi-\pi$ stacking in purple, and amino acids (P131, L137, P159, L261, A263) stabilize the inhibitor by hydrophobic interactions.

also been tested in some neuronal cells with the same activities. The EV-D68 infection has a direct link with acute flaccid myelitis. Compared with dibucaine, the only modulation is the thiophenyl moiety instead of the butoxyl one. Finally, in 2020, Musharrafieh et al. synthesized a dibucaine derivative **2C-6aw** with (sub)micromolar activity against CVB3, EV-A71, and EV-D68.[62]

Benzimidazole or pyrazolopyridine derivatives. In 2018, an American team replaced the quinoline substrate of the dibucaine with a pyrazolopyridine **JX042**, which presents submicromolar potency against EV-A71 and CVB3.[63] So far, interactions of **JX042**, or its derivatives, with the target have not been identified. In 2021, two **JX042** derivatives, **2C-7f** and **2C-10a**, were synthesized by another American team with submicromolar potency against EV-A71, EV-D68, and CVB3.[64] The pyrrazolo-pyridine and the *N*-dimethyl-2-aminoethylamide, ensure broad spectrum activity against EV to **2C-7f**. Moreover, **2C-10a** had been tested on neuronal cells in a surrogate model to simulate neuronal infections by EV-D68. X-ray crystal structures have not been resolved yet, even if it is certain that these compounds are bound with EV-A71 and CVB3 2C protein. Eventually, some EV-D68 mutations were realized. D183 V mutation has a substantial impact on resistance, whereas mutations with D323G induce moderate resistance. Finally, in 2023, Kejriwal et al. synthesized a benzimidazole derivative **SJW-2C-227** with a micromolar potency against EV-A71 and EV-D68.[65]

To resume, according to **dibucaine** and **JX042** derivatives results, dimethylamine is the most efficient moiety, even if secondary or primary amine functions have similar activity. Moreover, substitutions need to be well-positioned to fill free spaces but do not have too much steric hindrance for the walls of the binding site. For instance, *n*-butoxy is the most efficient substitution on C2 for **dibucaine** derivatives. Likewise, C6 of **JX042** must be methyl or *n*- or *i*-propyl substitutions to have the highest potency, as well as N1 should be substituted by bulky alkyl chains (*i*-propyl or *t*-butyl). On the contrary, any substitution, or a methyl one, must be localized on C3 to ensure activity.

2.1.3. 2A Protease. 2A protease is a viral protein and it cleaves the viral polyprotein between P1 and P2 segments and suppresses host cell translation by inhibition of initiation factor eIF4G.[66] One of the systems used to preserve virions from the cellular defense process is directed by 2A protease.[67] Thus, 2A protease is a target to inhibit viral replication. Several inhibitors were studied recently to form a covalent bond with C106 [Figure 20]. Optimized peptide analogs seem to be efficient against enterovirus 2A protease. The covalent bond between a Michael acceptor and C106 causes the inhibition of this protease. These peptides bind also by hydrophobic stabilization and hydrogen bonds.

Telaprevir was studied for potential enterovirus potency during a drug repurposing assay. **Telaprevir** has been a commercialized drug against HCV since 2011 in the US.[68,69] In 2019, **telaprevir** potency was identified to be submicromolar against EV-D68. Some drug-binding interactions were identified (PDB code: 4FVB) and are presented in Figure 21. In 2023,

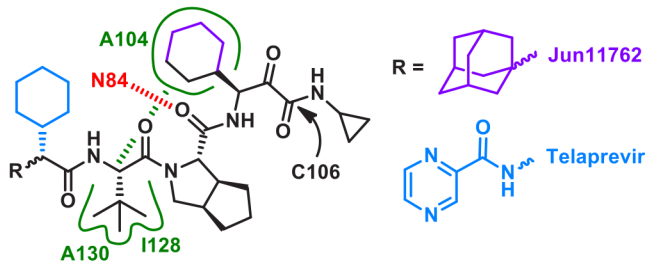


Figure 21. Interactions identified between the viral 2A protease and Telaprevir and Jun11762. Covalent binding with C106, hydrogen bond in red.

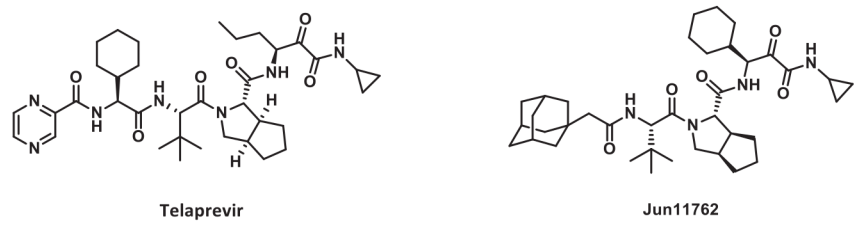


Figure 20. 2A protease inhibitors.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

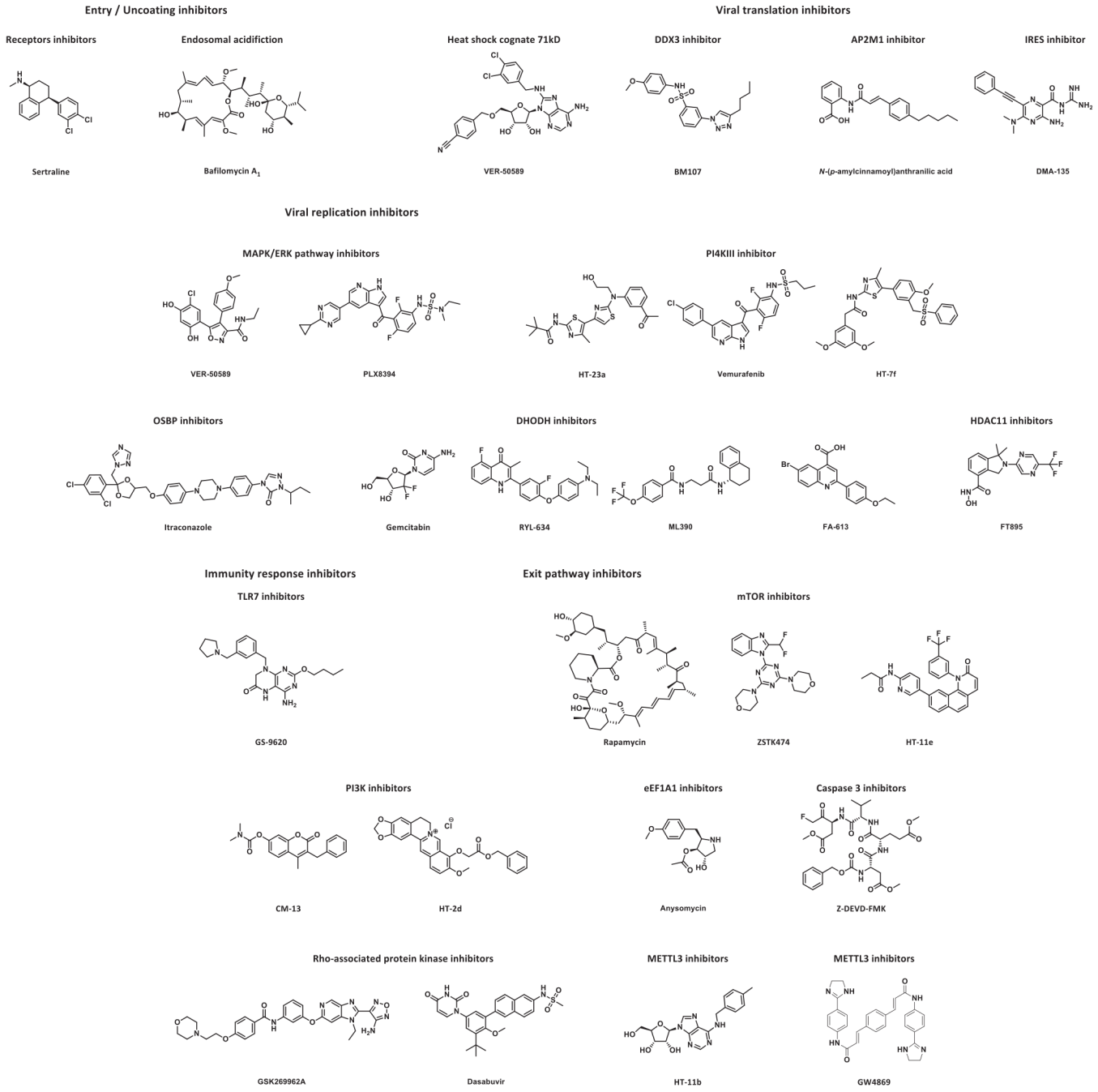


Figure 22. Host target inhibitors.

another study led to the precise efficiency of **telaprevir** on mice against acute flaccid myelitis.[70] It reduces both viral titer and apoptotic activity in mice muscles and spinal cords. However, if the treatment is delayed, the benefits are no longer observed. The same year, Tan et al. synthesized **telaprevir** derivative **Jun11762**, which has submicromolar potency on various strains of EV-D68.[71] Thanks to modulations of warhead, the part of a molecule that binds with C106, we determined that the key function is the amide of 2-oxopropanamide [Figure 22]. **Jun11762** do not inhibit CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 but had potent inhibition of CYP3A-M (IC_{50} = 0.57 μM).

Some interactions were identified between **telaprevir** derivatives and EV-D68 2A protease. To summarize them, the bulky hydrophobic substituent (adamantane or cyclohexane) must be in the P4 position for higher potency. Likewise, *tert*-butyl enhances the activity in the P3 position. The linker between them also must be not too polar, as the amide function is more efficient than the urea function. On the contrary, the warhead, which binds with C106, must be polar. Here a major parameter is the position of the Michael acceptor. Indeed, simple aldehydes, ketones, or nitriles are not long enough to bind with C106, while 2-oxopropanamide gives activity to the inhibitors. P2 moiety seems to modulate the selectivity of the compound. Indeed, cyclopentyl moiety, instead of cyclopentylproline one, is highly cytotoxic for RD cells. P1 moiety effect on activity is also governed by steric hindrance in a hydrophobic pocket. β-functionalized amino acid analogs seem to be more suitable than α- or γ- ones. Indeed, they can be too bulky or, on the contrary, not enough to completely fill the

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 5. Summary of Potency of Host Target Inhibiting Repurposed Drugs

Molecule	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	Ref
Target: SCARB2							
Sertraline	EVA71/CVA16/CVB1/CVB2/E9/E30	1.87−4.14	RD	EVA71/CVA16/CVB1/CVB2/E9/E30	1.50−4.60	HeLa	75
	EVA71	1.92	RD	EVA71	1.67	HeLa	
Target: Hsc70							
VER-155008	EVA71 SHZH98	*2.01*	RD				80
Target: DDX3							
BM107	CVB1	2.5	KB (HeLa)	CVB4	4.2	KB (HeLa)	83
	CVB2	11.5		CVB5	1.4		
	CVB3	8.7		CVB6	3.0		
Target: AP2M1							
N-(p-amylcinnamoyl) anthranilic acid	EV-A71 SZ/HK05	1.35 ± 0.25	RD	RV-B14 1059	5.38 ± 0.51	RD	84
Target: IRES							
DMA-135	EV-A71	*7.5400 ± 0.0024*	SF268				85
Target: MAPK/ERK Pathway							
VER-50589	EV-A71 Xiangyuang-Hubei-09 JN230523.1	1.137 (0.047)[b]	RD	E11 GWCMC01/GZ/CHN/2019 MN817130	0.1409	RD	86
	CVB3-Chi	4.312	HeLa	CVB4-5 SHZH05-1 SDLW1/CHN/2013	0.0572	HeLa	
	CVB7 SLW1/CHN/2013	0.0134					
PLX8394	EV-A71	*0.0755*	RD	CVB3	*0.0441*	HeLa	87
	CVB4-5	*0.0584*	HeLa	CVB4-7	*0.0429*		
	E11	*0.1261*					
Target: PI4KIIIβ							
HT-23a	EVA71	<0.43	RD	HRVA2	6.10	HeLa-Rh	89
	CVB3	6.60	Vero	HRVB14	>9.1		
Vemurafenib	E1 Farouk	0.49	A549	CVA9 Griggs	0.96	A549	90
	CVB-1	1.80		CVB2	2.03		
	CVB3	1.65		CVB4	1.63		
	CVB5	1.50		CVB6	1.16		
	RV-B14	<5	HeLa				
HT-7f	RV-B14	*0.0220 ± 0.0039*	RD	RV-A16	*0.0320 ± 0.0055*	RD	91
	RV-A21	*0.036 ± 0.012*		RV-A1B	*0.0590 ± 0.0026*		
	RV-A2	*0.034 ± 0.0024*		RV-A13	*0.0390 ± 0.0022*		
	RV-A23	*0.065 ± 0.011*		RV-A33	*0.0190 ± 0.0021*		
	RV-A45	*0.062 ± 0.013*		RV-A51	*0.040 ± 0.002*		
	RV-A53	*0.0310 ± 0.0038*		RV-A63	*0.059 ± 0.015*		
	RV-A68	*0.0590 ± 0.0083*		RV-A71	*0.0380 ± 0.0048*		
	RV-A73	*0.0380 ± 0.0082*		RV-A98	*0.0140 ± 0.0022*		
	RV-A100	*0.0240 ± 0.0092*		RV-B27	*0.0230 ± 0.0085*		
	RV-B37	*0.037 ± 0.001*		RV-B42	*0.0570 ± 0.0048*		
	RV-B86	*0.0058 ± 0.0011*		RV-B91	*0.0150 ± 0.0011*		
	RV-B93	*0.038 ± 0.002*		EV-A71 H	*0.0150 ± 0.0022*		
	CVB1	*0.036 ± 0.0020*		CVB2	*0.0380 ± 0.0022*		
	CVB3	*0.032 ± 0.0026*		CVB4	*0.0310 ± 0.0048*		
	CVB5	*0.037 ± 0.0022*		CVB6	*0.026 ± 0.015*		
	EV-D68 Fermon	*0.0110 ± 0.0005*	H1 HeLa				
Target: DHODH							
FA-613	EV-A71	8.6 ± 1.2	RD	Rhinovirus	9.7 ± 0.3	RD	96

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Table 5. continued

Molecule	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	EV Species and strain	Potency[a] [μM]	Cells	Ref
Gemcitabine	EV-A71	0.419	RD				97
RYL-634	EVA71 (FY)-Luc	0.004	RD				99
ML390	CVB3 CVB4-7 EV-A71 Xiangyang-Hubei-09 JN230523,1	0.2731 0.0430 0.0601	RD	CVB4-5 E11	0.1016 0.0472	RD	100
Target: HDAC11							
FT895	EV-A71 BrCr	*0.10*	HeLa				102
Target: mTOR1&2							
HT-11e	EVA71	*0.027 ± 0.020*	RD				108
Target: PI3KIII							
HT-2d	EVA71 H EVA71 JS-52	*12.4* *7.12*	Vero	EVA71 SHZH98 EVA71 BrCr	*14.8* *8.52*	Vero	112
HT-13	EVA-71 (GU475127)	*3.29*	HEK293	EVA-71 (GU475127)	*2.5*	RD	110
Target: eEF1A1							
Anisomycin	CVB3 Woodruff	0.156	HeLa				114
Target: METTL3							
HT-11b	EV-A71 BrCr EV-D68	0.094 ± 0.045 8.9	RD HeLa	CVA21	36.4	HeLa	123

[a]Potency generally refers to half-maximal effective concentration (EC_{50}), except when the text is written in italics. In this case, potency refers to half the maximal targeted enzyme inhibition concentration (IC_{50}). [b]Potency during postentry assays.

pocket. Likewise, *β-tert*-butyl seems to generate too much steric hindrance, while *β-i*-propyl or *β-i*-butyl seems to not completely fill the pocket. Saturated cycles are less cytotoxic than aromatic ones, even if both have the same potency. Eventually, some parts are efficient but not compulsory. For instance, the pyrazine "capping group" on **telaprevir** is not present in its derivative.

2.2. Host Target Inhibitors. Apart from viral targets, a few molecules also target human enzymes, which implies a reduction of viral charge [Figure 22, Table 5]. Most of these compounds were evaluated during pure drug repurposing or secondary assays, as not main targeted pathogen or disease. Thus, a broad-range antienteroviral drug is being considered.[72]

2.2.1. Entry or Uncoating Inhibition. Enteroviral receptors inhibition. To prevent the entry of the virus inside the cell, some receptors specific to enteroviruses have been targeted, inhibiting viral proliferation. Scavenger receptor B2 (SCRAB2), also known as lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP2), is a well-known receptor for enteroviruses, even if the proteolytic function is to transport cholesterol to the cellular cytoplasm.[73] Acid sphingomyelinase ASM is also a factor of entry, like in the COVID-19 replication cycle.[74] In 2022, **sertraline** was studied in a drug repurposing assay by Tseng et al. and had micromolar potency against EV-A71, CVA16, CVB1, CVB2, E9, and E30.[75] **Sertraline** acts differently in comparison with other selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), during the entry stage. The activity is pH-dependent. Indeed, alkalization of the endolysomal route blocks enterovirus entry. Even if the target of **sertraline** remains unknown, lysosomal-resident proteins, such as acid sphingomyelinase (ASM) or SCARB2, are targets that merit further investigations.

Acidic endosomes inhibition. Another way of entry for the virus involves endosomes and their maturation by their own acidification. Endosomes regulate the trafficking of proteins and lipids among other subcellular compartments of the secretory and endocytic pathway, specifically the plasma membrane Golgi, trans-Golgi network, and vacuoles or lysosomes.[76] Endosomes, maturing into a lysosome, create a unique acidic environment within the cell for proteolysis and recycling of unneeded cellular components into usable amino acids and other biomolecular building blocks. Thanks to the presence of ATP-dependent proton pumps in the membrane of endosomes, the endosomal lumen pH is maintained in a range of 4.5 to 6.5, which is optimal for many hydrolases and other enzymes.[77] In 2021, in a drug repurposing assay, **bafilomycin A_1** was studied by a Japanese team to analyze its effect on the proliferation of RV-C. The use of **bafilomycin A_1** increases the pH of acidic endosomes and reduces RV-C3 RNA synthesis. These findings suggest that virus entry takes place via receptor-mediated endocytosis. Previously, it was shown that uncoating of RV-A and RV-B is inhibited by **bafilomycin A_1**.[78] These findings suggest that RV-A and RV-B RNA may enter the cytoplasm via acidic endosomes.

2.2.2. Viral Translation Inhibition. The most common way to translate enterovirus RNA remains the IRES-mediated translation. IRES-mediated translation is an alternative mechanism of translation initiation, known for maintaining protein synthesis when canonical translation is impaired.[79]

Heat shock cognate 71kD inhibition. Some heat shock proteins are potential antiviral targets that enhance or inhibit IRES-mediated translation. Heat shock cognate 71kD (Hsc70/HSPA8) mainly hydrolyzes ATP into ADP helped by heat shock

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

protein 40 family. In 2018, a nucleoside derivative **VER-155008** was synthesized with a micromolar potency against EV-A71.[80] Hsc70 regulates EV-A71 IRES activity via eIF4G cleavage's promotion. Viral 2A protease is a positive regulator of IRES activity. When Hsc70 is overexpressed, 2A protease proteolytic activity is also increased. These findings suggest that Hsc70 is a positive regulator of EV-A71 infection. When **VER-155008** was used as an inhibitor of Hsc70, it suppressed EV-A71 infections.

DDX3 inhibition. Another enzyme involved in cell translation is the DDX3 protein.[81] It binds with domain VI of enterovirus IRES and unwinds its secondary structure to facilitate entry into the ribosome.[82] Thus, the translation is exacerbated by DDX3 in association with 2A and 3C proteases. In 2020, Quaranta et al. synthesized a sulfonamide derivative **BM107** with micromolar potency against CVB1-CVB6.[83] Modulating the structure, structure−activity relationships have been identified. Among tested viruses, CVB3 remains the least sensitive. Two main regions were studied with an effect on activity. Tetrazole or triazole moiety must be equivalent. A long alkyl chain on triazole and electron-donating group in *para* or *ortho* position of phenyl may enhance activity. Sulfonamide linker increases **BM107** solubility compared to urea function.

AP2M1 protein inhibition. In 2020, a Chinese team screened several AP2M1 inhibitors against EV-A71 and RV-B14. Among them, they identified *N*-(*p*-amylcinnamoyl)anthranilic acid with a micromolar potency. AP2M1 interacts with viral 2C protein and improve its binding with the endoplasmic reticulum.[84]

IRES inhibition. In 2020, a pyrazine derivative **DMA-135** was found follonwing a screen, it has demonstrated a micromolar potency against EV-A71. By HSQC NMR assays, its binding mode was identified. **DMA-135** interacts with SLII domain of viral IRES, specifically adenosines A133, A134, A136, A139, and A165.[85]

2.2.3. Viral Replication Inhibition. MAPK/ERK pathway inhibition. Heat shock protein 90 (Hsp90) possesses a large panel of functions in the host target, such as chaperone function, cell survival, cell cycle control, hormone signaling, and apoptosis. Here, Hsp90 interference reduces AKT/RAF phosphorylation, which reduces the MEK/ERK (MAPK/ERK) system and inhibits viral replication.[86] In 2023, Zhu et al. evaluated an Hsp90 inhibitor **VER-50589** with a submicromolar potency against EV-A71 and a large panel of EV-B species viruses. CVB3, CVB4 (strains 4−5 and 4−7) and E11 were evaluated in EV-B species. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF) protein is also implied in the MAPK/ERK pathway. It is activated by phosphorylation of GDP-bound RAS, obtaining GTP-bound ones. Then, interacts with mitogen-activated or extracellular protein kinase (MEK1 & 2) in the pathway. In 2023, Wu et al. evaluated an RAF inhibitor **PLX8394** with nanomolar potency against the same viruses.[87] It blocks the postentry phase of EV replication by inhibiting the MAPK/ERK pathway.

Phosphatidylinositol 4-kinases type III isoform β (PI4KIIIβ) inhibition. Another protein has been identified for its non-enzymatic functions, which are suitable for viral replication. Indeed, the isoform *β* of phosphatidylinositol 4-kinases type III (PI4KIII*β*) may be used by positive-sense RNA viruses to generate membranes providing shelter against the innate immune system of the cell.[88] Acyl-coenzyme A binding domain containing 3 ACBD3, a Golgi-residing protein, is a mediator between PI4KIII*β* and 3A protease for EV-A71, CVB3, EV-D68, RV-A2 and RV-B14. In 2019, a 4,5′-bithiazole derivative **HT-23a** was synthesized with micromolar potency against CVB3, RV-A2, and RV-B14 and submicromolar against EV-A71.[89] This compound increases steady-state levels of F508del-CFTR at the plasma membrane and anion permeability. **HT-23a** efficacy is equal to 80% and 50% of the reference (VX-809) effect, respectively. In addition, **HT-23a** acts synergically with VX-809 to increase F508del-CFTR membrane density up to 3-fold higher than VX-809 alone. Eventually, it has a promising *in vitro* absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) profile. In 2023, Laajala et al. evaluated **vemurafenib**, a BRAF inhibitor, with micromolar potency against CVB types and RV-B14, and submicromolar potency against E1 and CVA9.[90] According to this study, it reduces EV production by inhibiting PI4KIII*β*. In 2024, a 2-aminothiazole derivative **HT-7f** was synthesized with nanomolar potency against EV-A71, EV-D68, and CVB viruses and a large panel of HRV.[91] Indeed, all the CVB viruses are inhibited by **HT-7f** as well as RV-A (1B, 2, 13, 16, 21, 23, 33, 45, 51, 53, 63, 68, 71, 73, 98, and 100) and RV-B (14, 27, 37, 42, 86, 91, and 93). However, it does not reduce RV-A31 replication. Benzylamide makes it more active than modulations with pivalamide or methylamide. Dimethoxybenzene also provides a higher potency than halogen or alkyl substitutions. Moreover, the *meta* position is the most favorable compared to the *para* and *ortho* ones. Central aromatic should be non-substituted, as well as phenyl shows better activity than pyridine.

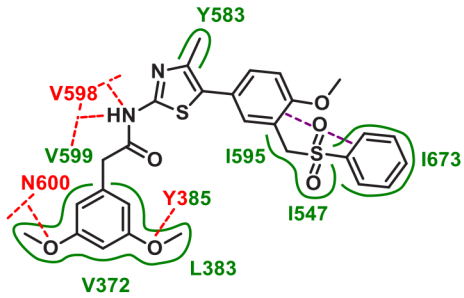


Figure 23. Interactions identified between the PI4KIII*β* and HT-7f. Hydrogen bond, hydrophobic interactions, *π*−*π* stacking.

As a consequence, some interactions were identified, presented in Figure 23.

Oxysterol-binding protein 1 (OSBP) inhibition. The other isoform of phosphatidylinositol 4-kinases type III, the *α* isoform (PI4KIII*α*), controls the activity of oxysterol-binding protein 1 (OSBP) recruitment to the membranous web.[92] Moreover, OSBP is required for HCV replication and membranous web integrity. **Itraconazole** is a known inhibitor of OSPB, with efficiency against HCV or with a potential anticancer activity.[93] In 2018, **itraconazole**, in a repurposing drug assay, was studied by Bauer et al. for its potency against EV-A71, CVA16, CVB3, EV-D68, RV-A1B, RV-B14, and RV-A15.[94] **Itraconazole** inhibits enterovirus replication by targeting the OSBP. It was identified in several drug-repurposing screens as a novel broad-spectrum antiviral agent that affects genome replication.

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibition. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) is an enzyme catalyzing the fourth universal enzymatic step in pyrimidine synthesis. It is engaged in producing pyrimidines, building blocks of DNA or RNA and molecules such as ATP and GTP providing energy for the cell.[95] Inhibition of DHODH remains a viable mechanism of defense against cancer and autoimmune diseases. In 2017, a quinolone derivative **FA-613** was identified after a screen performed against "rhinovirus" and EV-A71.[96]

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

In 2020, for repurposing drug assay, **gemcitabin** was studied by Sun et al. with submicromolar potency EV-A71.[97] In 2017, the same team had already identified the mechanism of action of **gemcitabin** against CVB3.[98] It inhibited the pyrimidine biosynthesis and the proliferation of CVB3. It is suspected it is involved in any step(s) after viral entry. **Gemcitabin** is not associated with intracellular processes, such as IRES-dependent translation, and polyprotein processing involving other proteases ($2A^{pro}$ and $3C^{pro}$) or proteins (2C and 3A). However, **gemcitabin** was also identified as a 3D polymerase inhibitor. In 2019, Yang et al. synthesized a 4-quinolinol derivative **RYL-634** with nanomolar potency against EV-A71.[99] This potential drug possesses a large spectrum activity and *in vitro* activity against other viruses (HCV, HIV, DENV, CHIKV). In 2023, a benzamide derivative **ML390** was synthesized with submicromolar potency against a large panel of EV.[100] Indeed, lots of types from EV-B specie and EV-A71 were inhibited by **ML390**.

Histone deacetylase (HDAC) 11 inhibition. Histone deacetylase 11 is a recently discovered protein, that is not well characterized.[101] In addition to deacetylation, HDAC11 also has a lysine defatty-acylation, such as HDAC1 and several sirtuins (SIRT). In fact, SIRT1, also a histone deacetylase, interferes with RdRp acetylation and inhibits the EV-A71 proliferation. It may be the same mechanism as the antienteroviral effect of HDAC11. In 2023, an HDAC11 inhibitor **FT895** was evaluated with a submicromolar potency against EV-A71.[102] Some mice assays confirm the decrease of viral production by **FT895**.

2.2.4. Immunity Response Inhibition. Toll-like receptor 7 (TLR7) inhibition. Inside endosomes, some receptors can recognize single-stranded RNA like the toll-like receptor 7 (TLR7), which recognizes ssRNA from HIV or HCV.[103] Once activated by pathogen detection, TLR7 exacerbates the synthesis of cytokines and the lysis of cells. In 2019, Zhang et al. studied the compound **GS-9620**, considering its potency against EV-A71.[104] **GS-9620** is a known agonist of TLR7. In this study, it acted against EV-A71 through the NF-κB and PI3K signaling pathways. These pathways control the transcription of DNA and the cell cycle, respectively. Analyzing the *in vivo* assay, **GS-9620** decreases various cytokines and chemokines levels in serum and EV-A71 VP1-specific RNA concentration.

2.2.5. Release Pathway Inhibition. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. Mechanistic targets of rapamycin C1&C2 (mTORC1&C2) are ones of metabolic targets which inhibit enteroviruses. It is activated by protein kinase B.[105,106] mTORC1 is rapamycin-sensitive and mediates temporal control of cell growth by regulating several processes, including translation, transcription, and autophagy. mTORC2 is rapamycin insensitive and mediates spatial control of cell growth by regulating the actin skeleton. In our case, mTOR interacts with the new virions to exit them outside the cell by autophagy pathway. In 2018, **rapamycin** and **ZSTK474** were studied by a Chinese Team regarding CVB3 replication and virus-induced autophagy.[107] Solubility of **HT-11e** must be superior to the reference (Torin2) one. Briefly, drug-induced autophagy helps the cell to clear the viral charge inside itself, resulting in a reduced production of VP1 capsid protein. However, increasing the infection time, autophagy is used by viruses to increase viral proliferation. In 2019, trying to search for a new target, Hao et al. synthesized a benzonaphthiridin-2-one derivative **HT-11e** with submicromolar potency against EV-A71.[108] The benzonaphthiridin-2-one core and pyridin-3-yl moiety increase the antiviral efficiency of the molecule. Short alkyl chains on the *para*-amide also share this effect. mTOR 1 and 2 are inhibited by this compound.

PI3K/AKT pathway inhibition. Another target that regulates autophagy is phosphoinositide 3-kinase class III (PI3KIII) via the PI3K/AKT pathway.[109] Indeed, PI3K activates protein kinase B, also named AKT.[105,106] In 2018, a coumarin derivative **HT-13** was synthesized with micromolar potency against EV-A71.[110] Viral 2A protease is inhibited by the inhibition of phosphorylation by MEK/ERK kinases. The MEK/ERK pathway, also known as MAPK/ERK pathway, is a medium to transmit extracellular signals to internal targets.[111] These kinases were required for enhancing the EV-A71 IRES activity. The mechanism between the MAPK/ERK pathway and the viral replication remains unknown. The same year, a berberine derivative **HT-2d** was synthesized with micromolar potency against EV-A71.[112] **HT-2d** inhibits the MEK/ERK signaling pathway. The fusion of dioxolan and protoberberine guarantees the activity of the compound. Therefore, it suppresses EV-A71-induced autophagy by activating protein kinase B (AKT) and inhibiting of phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and (PI3KIII) proteins. Consequently, it inhibits RNA and protein levels of EV-A71.

eEF1A1 inhibition. The rate of apoptosis is directly proportional to levels of eEF1A proteins.[113] However, two isoforms of eEF1A proteins exist: eEF1A1, which, indeed, is pro-apoptotic, and eEF1A2 which inhibits apoptosis. While the first is ubiquitous, the second is only expressed in the heart, brain, and muscles. eEF1A1 interacts with 70 kDa heat shock protein (Hsp70) during the chaperone-mediated autophagy pathway as an agonist.[114] The same year, Shao et al. evaluated **anisomycin**, which is an antibiotic and translation inhibitor, with a submicromolar potency against CVB3. It inhibits viral proliferation during the early stage of viral infection.

Caspase 3 inhibition. Another exit pathway for Enteroviruses is cell lysis. Caspase 3 is a potential target. Indeed, the most recognized proteolytic activity of caspase-3 is the trigger of apoptosis in cells responding to specific extrinsic or intrinsic inducers of this mode of cell death.[115] In 2018, **Z-DEV-D-FMK** was studied by a Chinese team for caspase 3 inhibition.[116] Caspase 3 may be activated by activity of caspase 8 or caspase 9. In some neural cells, cell death is caused by caspase 9 only, while caspase 8 is not activated. The transient expression of EV-A71, the 3C protein, induces cell apoptosis by activation of caspase 3, while the 3C mutant without proteolytic activity does not induce apoptosis.[117] EV-A71 induces the synthesis phase (S phase) arrests during the cell cycle to facilitate its own replication. Caspase 3 inhibitors such as **Z-DEV-D-FMK** reduce these arrests and corresponding viral replication. In 2020, the same team studied the same caspase 3 inhibitor against EV-D68 infections.[118] It was revealed that contrary to EV-A71 and CVA16, EV-D68 and CVA6, there was induction of cell cycle arrest during the G0/G1 phase. Caspase 3 inhibitor prevents these arrests and viral production as well, unlike CVA6 production.

Rho-associated protein kinase (Rock) 1 and 2 inhibition. Rho-associated protein kinases (Rock) 1 or 2 control the actin-cytoskeleton, which enhances cell contractility, improving cell substrate and cell−cell adhesion. Activated by caspase-3, ROCK 1 also induces apoptosis by membrane blebbing.[119] In 2022, an imidazopyridine derivative **GSK269962A** was synthesized with approximatively micromolar potency against EV-A71.[120] In 2023, Qiao et al. evaluated **dasabuvir**, an antihepatitis C, with antiviral effect against EV-A71 and CVA10.[121] During this study,

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

it was proved that only Rock1 inhibition decrease EV-A71 proliferation while Rock2 as no effect against EVA-71 proliferation. This activity is observed on RD cells for EV-A71, and on Huh-7, Caco-2, HT-28, and HEK-293T for both viruses. However, there was no activity on HepG2 and Vero-E6 cells against EV-A71. Moreover, **dasabuvir** shows no activity against CVB1. During this study, its mechanism of action, inhibiting Rock1, was determined against EV, as well as its interactions with the kinase [Figure 24].

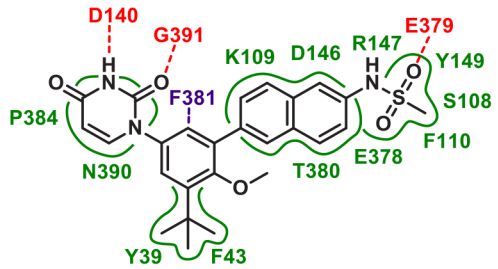


Figure 24. Interactions identified between Rock1 and dasabuvir. Hydrogen bond, hydrophobic interactions, $\pi-\pi$ stacking.

METTL3 methyl transferase inhibition. METTL3 methyl transferase is a protein that methylates the primary amino function of adenosine. It is a common RNA modification.[122] Thus, by this reaction, METTL3 can inhibit enterovirus replication. However, some studies observed that it also decreases cell death by apoptosis, and therefore viral proliferation. In 2023, a nucleoside analog **HT-11b** was synthesized with micromolar potency against CVA21 and EV-D68 and submicromolar one against EV-A71.[123] However, it does not inhibit CVB3 on Vero A cells, RV-A2, or RV-B14 on HeLa cells. Consequently, it seems to be efficient against EV-A, EV-C and EV-D species but not against EV-B, RV-A, and RV-B ones. The *meta*-benzyl substituent binds with a favorable hydrophobic region. This is why, hydrophobic and electron-withdrawing functions, like OCF_3, CN, or SO_2NH_2, are considered in the future. Moreover, methylation in the nonaromatic part of benzyl leads to a loss of activity, surely caused by steric hindrance. On the contrary, the C5-ribose substituent is situated in an unfavorable hydrophobic region. Consequently, polar groups are favored there.

Neutral sphingomyelinase/sphingomyelin phosphodiesterase inhibition. Neutral sphingomyelinase is implied in the apoptosis mechanism.[124] It cleaves ceramide and phosphocholine. The sphingomyelin cycle is involved in apoptosis, as is ceramide, that is cleaved by the action of tumor necrosis factor. In 2024, a pyrrolidine derivative **GW4869**, a neutral sphingomyelinase inhibitor, was evaluated against EV-A71.[125] It inhibits EV biogenesis in an ESCRT-independent way.

■ DISCUSSION

The fight against non-polio enteroviruses is worrying because of their high pathogenicity in children and the lack of funding devoted to them.[126] Surveillance activities, pharmaceutical development, and prevention efforts are needed to better anticipate epidemics. 114 *in vitro* studies were identified here, although there is currently no marketed treatment. In fact, there is a need for (broad-acting) antivirals against non-polio enteroviruses. The number of preclinical studies and the number of molecules marketed (and pharmacological classes) is higher for the viruses mentioned above, such as HCV or HIV, even if the severity of the pathologies associated with the latter forces us to qualify this analysis a little.

Several enterovirus inhibitors were already designed, with docking or cocrystallization in viral targets. Among viral structural proteins, viral protein 1 (VP1) is the most studied as it is the reference for Enteroviruses' taxonomy.[1] Capsid binders were developed along with the discovery of these viruses. The rise of molecular biology should also optimize research around the new targets identified, while we have observed gaps in the available data. Considering our results optimization of original compounds was performed through ligand- or structure-based drug design. Other *de novo* drug development strategies could be considered depending on the targets. In fact, a fragment-based approach to drug design seems incompatible with the capsid targets, given the technical limitations of the method. It is not possible to express in solution the isolated VP1 from any picornavirus. VP1, like VP2-VP3-VP4, needs to be expressed in the context of the full polyprotein for correct folding. The success of fragment screening is not possible in this condition. To identify fragments with confidence, we need high resolution (>2A), and virus crystals rarely diffract better than 3A.

The same would apply to cryo-EM; the resolution will not be enough to identify the fragments with confidence.

Likewise, some viral nonstructural proteins also need specific conformations to have a protease, polymerase, or other activities.

Enteroviruses are RNA nonenveloped viruses with a high rate of natural mutations; few broad-spectrum targets have been identified, namely "classical" hydrophobic pockets. Here, several capsid binders (**disoxaril**, **pleconaril**, **pirodavir**, **vapendavir**, etc.)[127] were evaluated during clinical trials, and none of them were commercialized. The main reason was drug-induced adverse effects and their lack of efficiency. Surprisingly, even if new EV targets emerged in the past decade, capsid binders are still a major part of antienterovirus inhibitors synthesis. They represent more than 40% of original hits and more than 20% of the total above-mentioned compounds. Therefore, optimization of them is still possible, as well as the study of other hydrophobic identified hits such as the above-mentioned tetrazole, piperazine, fused bicycles and multiheteroaromatic derivatives. Moreover, another near hydrophobic pocket was identified around the R219 amino acid.

Nonstructural proteins are also targeted for Enterovirus inhibition. Here again, several cocrystallized models are available, specifically the 3D protein or also RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the 3C protein. Respectively, nucleoside and peptide analogs seem to be the most efficient inhibitors. Both whether it is the sugar or warhead structure or the side chains of amino acid analogs, all these compounds can be optimized. RdRp is characterized by its activity during Enterovirus replication. However, it also decreases the cell RNA to favor viral RNA translation. Likewise, knowing for eight cleavages of viral polyprotein, 3C protease also regulates viral translation, destabilizing the intracellular stability of RdRp. Finally, 3C protease takes part in viral assembly and cell lysis.

The second strategy of repurposing still involves structural optimization. There have been many examples in recent years. **Remdesivir** is a nucleoside analog that was functionalized with a hydrophobic long alkyl chain on its phosphoramidate. At last, **fluoxetine**, **dibucaine**, and **telaprevir** derivatives were optimized to increase the binding. Thus, the efficiency of these commercially available drugs retains their other parameters,

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

such as pharmacokinetics. This strategy offers an attractive alternative to de novo design, as pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological profiles are known, allowing a bypass of expensive (pre)clinical studies.[72]

Likewise, lots of host target inhibitors were evaluated to measure their antienterovirus potency. They represent more than 30% of the above-mentioned evaluated compounds. Each step of the viral replication cycle can be implied, namely entry in the cell, viral RNA uncoating, then its translation or its replication, and the exit of the virus outside the cell without being recognized as a pathogen. Several compounds interfere with signaling pathways (MAPK/ERK, PI3K/AKT) while others focus on specific individual or cluster proteins. Contrary to other inhibitors, host-targeting compounds do not have an identified mechanism of action. As host proteins are often multifunctional, it is difficult to observe which specific interaction with EV is inhibited. At the same time, host-targeting inhibitors raise hope for the development of (broad-range) antienteroviral drugs, eliminating any inhibitor selectivity problem.[128] But this strength can also be a weakness, because by targeting host pathways, these compounds may be more toxic and therefore more difficult to develop. As most enterovirus infections are not fatal, we need to consider the risk-benefit ratio, which may not be favorable for these compounds.

Globally, even if a lot of compounds were evaluated in anti-EV assays, few of them led to clinical evaluations. The more targets are recently studied, the less active are their identified inhibitors. Indeed, while R219 hydrophobic pocket or recently host target inhibiting EV proliferation inhibitors have micromolar potency, VP1 protein ones effectively inhibit EV proliferation with nanomolar concentrations. Except for their own potencies, another criterion to discuss is the spectrum of each inhibitor. Unfortunately, some data are lacking for some inhibitor categories. For instance, PI3KIII inhibitors were only evaluated on EV-A71, **telaprevir** and its derivative on EV-D68, and DDX3 or R219 pocket inhibitors on CVB. Moreover, only 45 of the studies presented here contain cocrystallization assays. It is explained by the similarities between an already cocrystallized reference, a lack of data for the target, or a high cost in time or money.

At last, we also summarized interaction trends by targets. Capsid binders and 2C protein inhibitors are mainly small molecules with mostly hydrophobic interactions. To counter RdRp action, some nucleoside analogs mixing hydrophobic and hydrophilic moieties were synthesized. Peptide analogs were also designed to inhibit 2A and 3C proteases. Indeed, they form covalent binds with a cysteine (C106 for 2A protease, C147 for 3C protease) thanks to Michael acceptors. However, each opportunity to form hydrogen bonds is a key to enhancing the activity of compounds. Eventually, most inhibitors of host targets are composed of large hydrophobic moieties.

For the capsid inhibitors, it is important to note that there are no broad-spectrum capsid inhibitors: the main reason for this is the diversity of the VP1 sequence targeted by the inhibitors. At the same time, Liu et al. showed that the capsid proteins from EV-D68 share many conserved sites with another enterovirus, such as EV-A71, RV, and poliovirus; but despite these similarities not all previously discovered enterovirus capsid inhibitors are active against EV-D68.[129] In addition, Vapendavir showed broad-spectrum activities *in vitro* but this activity must be evaluated systematically on all EV circulating strains.

In contrast, RdRp and 3CLpro inhibitors tend to display broad-spectrum antiviral activity because of their higher degree of conservation. The synthesis of broad-spectrum compounds) is indeed a relatively ambitious goal, but in view of the progress in molecular/structural virology, this challenge no longer seems out of reach.

It is important to note that compounds will present different resistance barriers depending on their mode of action which is classically elucidated *in vitro*, but these considerations are not necessarily applicable for the treatment of patients in real-life conditions, as it all depends on the pharmacology and the potency of the compound.

To date, there are no approved antiviral drugs targeting these viruses. Some of the reasons for these failures include viral resistance, single-targeted approaches, and lack of clinical efficacy, which pose significant obstacles in drug development. The importance of combination therapies involving different therapeutic mechanisms to control a disease is well-known in clinical practice with other viruses (e.g., Hepatitis C virus, (HCV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV)).

Two, three, or four classes of drugs are currently used daily according to the patient's individual needs, the resistance profile of the virus, adverse effects, interactions with other drugs, and previous treatment failures.

This strategy has been explored for the treatment of enteroviruses with evaluations of combining two or even three compounds in cell cultures, to improve the efficacy of compound combinations and avoid viral resistance. These tests have been described in our previous work. A total of 44 combinations of enterovirus inhibitors were identified in cell culture.

The results of this work suggested that certain associations could allow a synergy of action in vitro and open the possibility of considering this strategy in preclinical studies.[130] To date, no combinations of drugs have been evaluated in clinical trials.

■ CONCLUSION

To conclude, enteroviruses can be considered as a potential risk as new emergent viruses, due to their high rate of mutations and the acceleration in the frequency of clusters associated with enterovirus infections.

Targeting VP1 capsid, **pleconaril/vapendavir** derivative **11526092** possesses submicromolar or nanomolar potency against a large panel of EV, as well as **VP1-12s**. Another VP1 inhibitor can be interesting. Indeed, **VFFA-23**, also named **AL-534**, has nanomolar potency against EV-A71 or EV-D68 but is inactive against CV. **FNC**, as well as **fluoxetine** derivative **2C-12b** or **2C-10a**, have submicromolar or nanomolar potency against EV from the four species. Likewise, from **rupintrivir/AG-7404**, also named **V-7404**, **SQL-4** inhibits submicromolar potency several viruses. Last, **HT-23a** and **HT-7f** have respectively broad-spectrum enterovirus micromolar and submicromolar potency.

Even if some mechanisms of the enterovirus cycle are still unknown, several inhibitors and their derivatives are designed through rational strategies or from drug repurposing. Some of them are currently under clinical phase II or III against specific EV or for a broad-spectrum action. To multiply their activity, their bioavailability or reduce adverse effects, galenic formulation, multiple drug cocktails, and molecules' link, fusion, or merge can be considered.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Patrice Vanelle − *Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, Marseille 13385, France;* orcid.org/0000-0002-9946-829X; Email: patrice.vanelle@univ-amu.fr

Manon Roche − *Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, Marseille 13385, France;* orcid.org/0000-0001-9892-9173; Email: manon.roche@univ-amu.fr

Authors

Hugo Fernando Georges Roux − *Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, Marseille 13385, France;* orcid.org/0000-0002-6101-2211

Franck Touret − *Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Université, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), Marseille 13284, France*

Pascal Rathelot − *Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, Marseille 13385, France*

Pietro Sciò − *Laboratory Affiliated with the Institute Pasteur Italy—Cenci Bolognetti Foundation, Department of Drug Chemistry and Technologies, Sapienza University of Rome, Roma 00185, Italy*

Antonio Coluccia − *Laboratory Affiliated with the Institute Pasteur Italy—Cenci Bolognetti Foundation, Department of Drug Chemistry and Technologies, Sapienza University of Rome, Roma 00185, Italy;* orcid.org/0000-0002-7940-8206

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Aix-Marseille Université (AMU) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche is gratefully acknowledged for his Ph.D. Grant.

REFERENCES

(1) Enterovirus page in International Committee on Taxonomy of Viruses webite, https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/enterovirus (accessed 2024-07-24).

(2) Yee, P. T. I.; Laa Poh, C. Impact of Genetic Changes, Pathogenicity and Antigenicity on Enterovirus-A71 Vaccine Development. *Virology* **2017**, *506*, 121−129.

(3) Pons-Salort, M.; Parker, E. P.; Grassly, N. C. The Epidemiology of Non-Polio Enteroviruses: Recent Advances and Outstanding Questions. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2015**, *28* (5), 479−487.

(4) Morens, D. M.; Folkers, G. K.; Fauci, A. S. Acute Flaccid Myelitis: Something Old and Something New. *mBio.* **2019**, *10* (2), e00521−19.

(5) Brown, D. M.; Zhang, Y.; Scheuermann, R. H. Epidemiology and Sequence-Based Evolutionary Analysis of Circulating Non-Polio Enteroviruses. *Microorganisms.* **2020**, *8* (12), 1856.

(6) Roessler, H. I.; Knoers, N. V. A. M.; van Haelst, M. M.; van Haaften, G. Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42* (4), 255−267.

(7) *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 3.0; Schrödinger, LLC.

(8) *Schrödinger Release 2024-3: Maestro*; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024.

(9) Lu, C.; Wu, C.; Ghoreishi, D.; Chen, W.; Wang, L.; Damm, W.; Ross, G. A.; Dahlgren, M. K.; Russell, E.; Von Bargen, C. D.; Abel, R.; Friesner, R. A.; Harder, E. D. OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17* (7), 4291−4300.

(10) Page, M. J.; McKenzie, J. E.; Bossuyt, P. M.; Boutron, I.; Hoffmann, T. C.; Mulrow, C. D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J. M.; Akl, E. A.; Brennan, S. E.; Chou, R.; Glanville, J.; Grimshaw, J. M.; Hróbjartsson, A.; Lalu, M. M.; Li, T.; Loder, E. W.; Mayo-Wilson, E.; McDonald, S.; McGuinness, L. A.; Stewart, L. A.; Thomas, J.; Tricco, A. C.; Welch, V. A.; Whiting, P.; Moher, D. The PRISMA 2020 Statement: an Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71.

(11) Baggen, J.; Thibaut, H. J.; Strating, J. R. P. M.; van Kuppeveld, F. J. M. The Life Cycle of Non-Polio Enteroviruses and How To Target It. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 368−381.

(12) Anasir, M. I.; Zarif, F.; Poh, C. L. Antivirals Blocking Entry of Enteroviruses and Therapeutic Potential. *J. Biomed. Sci.* **2021**, *28*, 10.

(13) Li, P.; Yu, J.; Hao, F.; He, H.; Shi, X.; Hu, J.; Wang, L.; Du, C.; Zhang, X.; Sun, Y.; Lin, F.; Gu, Z.; Xu, D.; Chen, X.; Shen, L.; Hu, G.; Li, J.; Chen, S.; Xiao, W.; Wang, Z.; Guo, Q.; Chang, X.; Tian, X.; Lin, T. Discovery of Potent EV71 Capsid Inhibitors for Treatment of HFMD. *ACS. Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (8), 841−846.

(14) Zhang, M.; Wang, Y.; He, W.; Sun, Y.; Guo, Y.; Zhong, W.; Gao, Q.; Liao, M.; Wang, X.; Cai, Y.; Guo, Y.; Rao, Z. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Enterovirus 71 Inhibitors as Therapeutic Drug Leads for the Treatment of Human Hand, Foot, and Mouth Disease. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (3), 1233−1244.

(15) Egorova, A.; Kazakova, E.; Jahn, B.; Ekins, S.; Makarov, V.; Schmidtke, M. Novel Pleconaril Derivatives: Influence of Substituents in the Isoxazole and Phenyl Rings on the Antiviral Activity against Enteroviruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *188*, No. 112007.

(16) Lane, T. R.; Fu, J.; Sherry, B.; Tarbet, B.; Hurst, B. L.; Riabova, O.; Kazakova, E.; Egorova, A.; Clarke, P.; Leser, J. S.; Frost, J.; Rudy, M.; Tyler, K. L.; Klose, T.; Volobueva, A. S.; Belyaevskaya, S. V.; Zarubaev, V. V.; Kuhn, R. J.; Makarov, V.; Ekins, S. Efficacy of an Isoxazole-3-Carboxamide Analog of Pleconaril in Mouse Models of Enterovirus-D68 and Coxsackie B5. *Antiviral Res.* **2023**, *216*, No. 105654.

(17) Ma, C.; Hu, Y.; Zhang, J.; Musharrafieh, R.; Wang, J. A Novel Capsid Binding Inhibitor Displays Potent Antiviral Activity against Enterovirus D68. *ACS. Infect. Dis.* **2019**, *5* (11), 1952−1962.

(18) Laajala, M.; Kalander, K.; Consalvi, S.; Amamuddy, O. S.; Bishop, Ö.T.; Biava, M.; Poce, G.; Marjomäki, V. Antiviral Mechanisms of *N*-Phenyl Benzamides on Coxsackie Virus A9. *Pharmaceutics.* **2023**, *15* (3), 1028.

(19) Kim, J.; Jung, Y. K.; Kim, C.; Shin, J. S.; Scheers, E.; Lee, J. Y.; Han, S. B.; Lee, C. K.; Neyts, J.; Ha, J. D.; Jung, Y. S. A Novel Series of Highly Potent Small Molecule Inhibitors of Rhinovirus Replication. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5472−5492.

(20) Carta, A.; Sanna, G.; Briguglio, I.; Madeddu, S.; Vitale, G.; Piras, S.; Corona, P.; Peana, A. T.; Laurini, E.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Serra, A.; Carta, E.; Loddo, R.; Giliberti, G. Quinoxaline Derivatives as New Inhibitors of Coxsackievirus B5. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 559−569.

(21) Madeddu, S.; Ibba, R.; Sanna, G.; Piras, S.; Riu, F.; Marongiu, A.; Ambrosino, A.; Caria, P.; Onnis, V.; Franci, G.; Manzin, A.; Carta, A. Human Enterovirus B: Selective Inhibition by Quinoxaline Derivatives and Bioinformatic RNA-Motif Identification as New Targets. *Pharmaceuticals (Basel).* **2022**, *15* (2), 181.

(22) Ibba, R.; Carta, A.; Madeddu, S.; Caria, P.; Serreli, G.; Piras, S.; Sestito, S.; Loddo, R.; Sanna, G. Inhibition of Enterovirus A71 by a Novel 2-Phenyl-Benzimidazole Derivative. *Viruses.* **2021**, *13* (1), 58.

(23) Chen, J.; Ye, X.; Zhang, X. Y.; Zhu, Z.; Zhang, X.; Xu, Z.; Ding, Z.; Zou, G.; Liu, Q.; Kong, L.; Jiang, W.; Zhu, W.; Cong, Y.; Huang, Z. Coxsackievirus A10 atomic structure facilitating the discovery of a broad-spectrum inhibitor against human enteroviruses. *Cell Discovery* **2019**, *5*, 4.

(24) Abdelnabi, R.; Geraets, J. A.; Ma, Y.; Mirabelli, C.; Flatt, J. W.; Domanska, A.; Delang, L.; Jochmans, D.; Kumar, T. A.; Jayaprakash, V.; Sinha, B. N.; Leyssen, P.; Butcher, S. J.; Neyts, J. A novel druggable interprotomer pocket in the capsid of rhino- and enteroviruses. *PLoS Biol.* **2019**, *17* (6), No. e3000281.

(25) Shetnev, A. A.; Volobueva, A. S.; Panova, V. A.; Zarubaev, V. V.; Baykov, S. V. Design of 4-Substituted Sulfonamidobenzoic Acid Derivatives Targeting Coxsackievirus B3. *Life (Basel).* **2022**, *12* (11), 1832.
(26) Richter, M.; Döring, K.; Blaas, D.; Riabova, O.; Khrenova, M.; Kazakova, E.; Egorova, A.; Makarov, V.; Schmidtke, M. Molecular Mechanism of Rhinovirus Escape from the Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Capsid-Binding Inhibitor OBR-5−340 via Mutations Distant from the Binding Pocket: Derivatives that Brake Resistance. *Antiviral Res.* **2024**, *222*, No. 105810.
(27) Xu, Z.; Tang, Q.; Xu, T.; Cai, Y.; Lei, P.; Chen, Y.; Zou, W.; Dong, C.; Lan, K.; Wu, S.; Zhou, H. B. Discovery of Aminothiazole Derivatives as Novel Human Enterovirus A71 Capsid Protein Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2022**, *122*, No. 105683.
(28) Da Costa, L.; Scheers, E.; Coluccia, A.; Casulli, A.; Roche, M.; Di Giorgio, C.; Neyts, J.; Terme, T.; Cirilli, R.; La Regina, G.; Silvestri, R.; Mirabelli, C.; Vanelle, P. Structure-Based Drug Design of Potent Pyrazole Derivatives against Rhinovirus Replication. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (18), 8402−8416.
(29) Ma, Y.; Abdelnabi, R.; Delang, L.; Froeyen, M.; Luyten, W.; Neyts, J.; Mirabelli, C. New Class of Early-Stage Enterovirus Inhibitors with a Novel Mechanism of Action. *Antiviral Res.* **2017**, *147*, 67−74.
(30) Kozlovskaya, L. I.; Golinets, A. D.; Eletskaya, A. A.; Orlov, A. A.; Palyulin, V. A.; Kochetkov, S. N.; Alexandrova, L. A.; Osolodkin, D. I. Selective Inhibition of Enterovirus A Species Members' Reproduction by Furano[2, 3-d]Pyrimidine Nucleosides Revealed by Antiviral Activity Profiling against (+)ssRNA Viruses. *ChemistrySelect.* **2018**, *3* (8), 2321−2325.
(31) Xu, N.; Yang, J.; Zheng, B.; Zhang, Y.; Cao, Y.; Huan, C.; Wang, S.; Chang, J.; Zhang, W. The Pyrimidine Analog FNC Potently Inhibits the Replication of Multiple Enteroviruses. *J. Virol.* **2020**, *94* (9), e00204−20.
(32) Tosh, D. K.; Toti, K. S.; Hurst, B. L.; Julander, J. G.; Jacobson, K. A. Structure activity relationship of novel antiviral nucleosides against Enterovirus A71. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (23), No. 127599.
(33) Yan, L.; Cao, R.; Zhang, H.; Li, Y.; Li, W.; Li, X.; Fan, S.; Li, S.; Zhong, W. Design, Synthesis and Evaluation of 2'-Acetylene-7-Deaza-Adenosine Phosphoamidate Derivatives as Anti-EV71 and Anti-EV-D68 Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, No. 113852.
(34) Liu, X.; Xu, Z.; Liang, J.; Yu, L.; Ren, P.; Zhou, H. B.; Wu, S.; Lan, K. Identification of a Novel Acylthiourea-Based Potent Broad-Spectrum Inhibitor for Enterovirus 3D Polymerase *In Vitro* and *In Vivo*. *Antiviral Res.* **2023**, *213*, No. 105583.
(35) Wang, X.; Hu, Z.; Zhang, W.; Wu, S.; Hao, Y.; Xiao, X.; Li, J.; Yu, X.; Yang, C.; Wang, J.; Zhang, H.; Ma, F.; Shi, W.; Wang, J.; Lei, X.; Zhang, X.; He, S. Inhibition of Lysosome-Tethered Ragulator-Rag-3D Complex Restricts the Replication of Enterovirus 71 and Coxsackie A16. *J. Cell. Biol.* **2023**, *222* (12), No. e202303108.
(36) Lu, G.; Qi, J.; Chen, Z.; Xu, X.; Gao, F.; Lin, D.; Qian, W.; Liu, H.; Jiang, H.; Yan, J.; Gao, G. F. Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 3C Proteases: Binding to Rupintrivir and Their Substrates and Anti-Hand, Foot, and Mouth Disease Virus Drug Design. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10319−10331.
(37) Chau, D. H.; Yuan, J.; Zhang, H.; Cheung, P.; Lim, T.; Liu, Z.; Sall, A.; Yang, D. Coxsackievirus B3 Proteases 2A and 3C Induce Apoptotic Cell Death Through Mitochondrial Injury and Cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis.* **2007**, *12* (3), 513−524.
(38) Sun, L.; Meijer, A.; Froeyen, M.; Zhang, L.; Thibaut, H. J.; Baggen, J.; George, S.; Vernachio, J.; van Kuppeveld, F. J.; Leyssen, P.; Hilgenfeld, R.; Neyts, J.; Delang, L. Antiviral Activity of Broad-Spectrum and Enterovirus-Specific Inhibitors against Clinical Isolates of Enterovirus D68. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (12), 7782−7785.
(39) Li, P.; Wu, S.; Xiao, T.; Li, Y.; Su, Z.; Wei, W.; Hao, F.; Hu, G.; Lin, F.; Chen, X.; Gu, Z.; Lin, T.; He, H.; Li, J.; Chen, S. Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Macrocyclic Anti-EV71 Agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (12), No. 115551.
(40) Dai, W.; Jochmans, D.; Xie, H.; Yang, H.; Li, J.; Su, H.; Chang, D.; Wang, J.; Peng, J.; Zhu, L.; Nian, Y.; Hilgenfeld, R.; Jiang, H.; Chen, K.; Zhang, L.; Xu, Y.; Neyts, J.; Liu, H. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Peptidomimetic Aldehydes as Broad-Spectrum Inhibitors against Enterovirus and SARS-CoV-2. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (4), 2794−2808.
(41) Zhang, L.; Lin, D.; Kusov, Y.; Nian, Y.; Ma, Q.; Wang, J.; von Brunn, A.; Leyssen, P.; Lanko, K.; Neyts, J.; de Wilde, A.; Snijder, E. J.; Liu, H.; Hilgenfeld, R. α-Ketoamides as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4562−4578.
(42) Zeng, D.; Ma, Y.; Zhang, R.; Nie, Q.; Cui, Z.; Wang, Y.; Shang, L.; Yin, Z. Synthesis and Structure-Activity Relationship of C-Keto Amides as Enterovirus 71 3C Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (7), 1762−1766.
(43) Nie, Q.; Xu, X.; Zhang, Q.; Ma, Y.; Yin, Z.; Shang, L. 3D-Quantitative Structure-Activity Relationship Study for the Design of Novel Enterovirus A71 3C Protease Inhibitors. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2018**, *92* (4), 1750−1762.
(44) Fu, S.; Nie, Q.; Ma, Y.; Song, P.; Ren, X.; Luo, C.; Shang, L.; Yin, Z. Target-Guided Screening of Fragments (TGSOF) in the Discovery of Inhibitors against EV-A71 3C Protease. *Chem. Commun. (Camb).* **2018**, *54* (23), 2890−2893.
(45) Ma, Y.; Li, L.; He, S.; Shang, C.; Sun, Y.; Liu, N.; Meek, T. D.; Wang, Y.; Shang, L. Application of Dually Activated Michael Acceptor to the Rational Design of Reversible Covalent Inhibitor for Enterovirus 71 3C Protease. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (13), 6146−6162.
(46) Liu, M.; Xu, B.; Ma, Y.; Shang, L.; Ye, S.; Wang, Y. Reversible Covalent Inhibitors Suppress Enterovirus 71 Infection by Targeting the 3C Protease. *Antiviral Res.* **2021**, *192*, No. 105102.
(47) Ma, Y.; Shang, C.; Yang, P.; Li, L.; Zhai, Y.; Yin, Z.; Wang, B.; Shang, L. 4-Iminooxazolidin-2-one as a Bioisostere of the Cyanohydrin Moiety: Inhibitors of Enterovirus 71 3C Protease. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 10333−10339.
(48) Liu, C.; Boland, S.; Scholle, M. D.; Bardiot, D.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Blatt, L. M.; Beigelman, L.; Symons, J. A.; Raboisson, P.; Gurard-Levin, Z. A.; Vandyck, K.; Deval, J. Dual inhibition of SARS-CoV-2 and human rhinovirus with protease inhibitors in clinical development. *Antiviral Res.* **2021**, *187*, No. 105020.
(49) Chen, Y.; Li, X.; Wang, M.; Li, Y.; Fan, J.; Yan, J.; Zhang, S.; Lu, L.; Zou, P. A cysteine protease inhibitor GC376 displays potent antiviral activity against coxsackievirus infection. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2023**, *5*, No. 100203.
(50) Schulz, R.; Atef, A.; Becker, D.; Gottschalk, F.; Tauber, C.; Wagner, S.; Arkona, C.; Abdel-Hafez, A. A.; Farag, H. H.; Rademann, J.; Wolber, G. Phenylthiomethyl Ketone-Based Fragments Show Selective and Irreversible Inhibition of Enteroviral 3C Proteases. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (3), 1218−1230.
(51) Tauber, C.; Wamser, R.; Arkona, C.; Tügend, M.; Abdul Aziz, U. B.; Pach, S.; Schulz, R.; Jochmans, D.; Wolber, G.; Neyts, J.; Rademann, J. Chemical Evolution of Antivirals against Enterovirus D68 through Protein-Templated Knoevenagel Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2021**, *60b* (24), 13294−13301.
(52) Qin, B.; Craven, G. B.; Hou, P.; Chesti, J.; Lu, X.; Child, E. S.; Morgan, R. M. L.; Niu, W.; Zhao, L.; Armstrong, A.; Mann, D. J.; Cui, S. Acrylamide Fragment Inhibitors that Induce Unprecedented Conformational Distortions in Enterovirus 71 3C and SARS-CoV-2 Main Protease. *Acta. Pharm. Sin. B* **2022**, *12* (10), 3924−3933.
(53) Cross, R. W.; Woolsey, C.; Chu, V. C.; Babusis, D.; Bannister, R.; Vermillion, M. S.; Geleziunas, R.; Barrett, K. T.; Bunyan, E.; Nguyen, A. Q.; Cihlar, T.; Porter, D. P.; Prasad, A. N.; Deer, D. J.; Borisevich, V.; Agans, K. N.; Martinez, J.; Harrison, M. B.; Dobias, N. S.; Fenton, K. A.; Bilello, J. P.; Geisbert, T. W. Oral Administration of Obeldesivir Protects Nonhuman Primates Against Sudan Ebolavirus. *Science.* **2024**, *383* (6688), No. eadk6176.
(54) Radoshitzky, S. R.; Iversen, P.; Lu, X.; Zou, J.; Kaptein, S. J. F.; Stuthman, K. S.; Van Tongeren, S. A.; Steffens, J.; Gong, R.; Truong, H.; Sapre, A. A.; Yang, H.; Xie, X.; Chia, J. J.; Song, Z. J.; Leventhal, S. M.; Chan, J.; Shornikov, A.; Zhang, X.; Cowfer, D.; Yu, H.; Warren, T.; Cihlar, T.; Porter, D. P.; Neyts, J.; Shi, P. Y.; Wells, J.; Bilello, J. P.; Feng,

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

J. Y. Expanded Profiling of Remdesivir as a Broad-Spectrum Antiviral and Low Potential for Interaction with Other Medications *In Vitro*. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 3131.
(55) Wang, S. H.; Wang, K.; Zhao, K.; Hua, S. C.; Du, J. The Structure, Function, and Mechanisms of Action of Enterovirus Non-structural Protein 2C. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, No. 615965.
(56) Bauer, L.; Manganaro, R.; Zonsics, B.; Strating, J. R. P. M.; El Kazzi, P.; Lorenzo Lopez, M.; Ulferts, R.; van Hoey, C.; Maté, M. J.; Langer, T.; Coutard, B.; Brancale, A.; van Kuppeveld, F. J. M. Fluoxetine Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Viral 2C Protein in a Stereospecific Manner. *ACS. Infect. Dis.* **2019**, *5* (9), 1609−1623.
(57) Bauer, L.; Manganaro, R.; Zonsics, B.; Hurdiss, D. L.; Zwaagstra, M.; Donselaar, T.; Welter, N. G. E.; van Kleef, R. G. D. M.; Lopez, M. L.; Bevilacqua, F.; Raman, T.; Ferla, S.; Bassetto, M.; Neyts, J.; Strating, J. R. P. M.; Westerink, R. H. S.; Brancale, A.; van Kuppeveld, F. J. M. Rational Design of Highly Potent Broad-Spectrum Enterovirus Inhibitors Targeting the Nonstructural Protein 2C. *PLoS Biol.* **2020**, *18* (11), No. e3000904.
(58) Manganaro, R.; Zonsics, B.; Bauer, L.; Lorenzo Lopez, M.; Donselaar, T.; Zwaagstra, M.; Saporito, F.; Ferla, S.; Strating, J. R. P. M.; Coutard, B.; Hurdiss, D. L.; van Kuppeveld, F. J. M.; Brancale, A. Synthesis and Antiviral Effect of Novel Fluoxetine Analogues as Enterovirus 2C Inhibitors. *Antiviral Res.* **2020**, *178*, No. 104781.
(59) Ma, C.; Hu, Y.; Zhang, J.; Wang, J. Pharmacological Characterization of the Mechanism of Action of R523062, a Promising Antiviral for Enterovirus D68. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (8), 2260−2270.
(60) Tang, Q.; Xu, Z.; Jin, M.; Shu, T.; Chen, Y.; Feng, L.; Zhang, Q.; Lan, K.; Wu, S.; Zhou, H. B. Identification of Dibucaine Derivatives as Novel Potent Enterovirus 2C Helicase Inhibitors: *In Vitro*, *In Vivo*, and Combination Therapy Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *202*, No. 112310.
(61) Musharrafieh, R.; Zhang, J.; Tuohy, P.; Kitamura, N.; Bellampalli, S. S.; Hu, Y.; Khanna, R.; Wang, J. Discovery of Quinoline Analogues as Potent Antivirals against Enterovirus D68 (EV-D68). *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (8), 4074−4090.
(62) Musharrafieh, R.; Kitamura, N.; Hu, Y.; Wang, J. Development of broad-spectrum enterovirus antivirals based on quinoline scaffold. *Bioorg. Chem.* **2020**, *101*, No. 103981.
(63) Xing, Y.; Zuo, J.; Krogstad, P.; Jung, M. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship (SAR) Studies of Novel Pyrazolopyridine Derivatives as Inhibitors of Enterovirus Replication. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1688−1703.
(64) Hu, Y.; Kitamura, N.; Musharrafieh, R.; Wang, J. Discovery of Potent and Broad-Spectrum Pyrazolopyridine-Containing Antivirals against Enteroviruses D68, A71, and Coxsackievirus B3 by Targeting the Viral 2C Protein. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (12), 8755−8774.
(65) Kejriwal, R.; Evans, T.; Calabrese, J.; Swistak, L.; Alexandrescu, L.; Cohen, M.; Rahman, N.; Henriksen, N.; Charan Dash, R.; Hadden, M. K.; Stonehouse, N. J.; Rowlands, D. J.; Kingston, N. J.; Hartnoll, M.; Dobson, S. J.; White, S. J. Development of Enterovirus Antiviral Agents That Target the Viral 2C Protein. *ChemMedChem.* **2023**, *18* (10), No. e202200541.
(66) Kuo, R. L.; Kung, S. H.; Hsu, Y. Y.; Liu, W. T. Infection with Enterovirus 71 or Expression of its 2A Protease Induces Apoptotic Cell Death. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 1367−1376.
(67) Visser, L. J.; Langereis, M. A.; Rabouw, H. H.; Wahedi, M.; Muntjewerff, E. M.; de Groot, R. J.; van Kuppeveld, F. J. M. Essential Role of Enterovirus 2A Protease in Counteracting Stress Granule Formation and the Induction of Type I Interferon. *J. Virol.* **2019**, *93* (20), e00222−19.
(68) Food and Drug Administration, Notice for INCIVEK® (Tealprevir). INCIVEK® (Tealprevir). Food and Drug Administration, 2011, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/201917lbl.pdf (accessed 2024-07-24).
(69) Musharrafieh, R.; Ma, C.; Zhang, J.; Hu, Y.; Diesing, J. M.; Marty, M. T.; Wang, J. Validating Enterovirus D68−2A Pro as an Antiviral Drug Target and the Discovery of Telaprevir as a Potent D68−2A Pro Inhibitor. *J. Virol.* **2019**, *93* (7), e02221−18.
(70) Frost, J.; Rudy, M. J.; Leser, J. S.; Tan, H.; Hu, Y.; Wang, J.; Clarke, P.; Tyler, K. L. Telaprevir Treatment Reduces Paralysis in a Mouse Model of Enterovirus D68 Acute Flaccid Myelitis. *J. Virol.* **2023**, *97* (5), No. e0015623.
(71) Tan, B.; Liu, C.; Li, K.; Jadhav, P.; Lambrinidis, G.; Zhu, L.; Olson, L.; Tan, H.; Wen, Y.; Kolocouris, A.; Liu, W.; Wang, J. Structure-Based Lead Optimization of Enterovirus D68 2A Protease Inhibitors. *J. Med. C2hem.* **2023**, *66* (21), 14544−14563.
(72) Bauer, L.; Lyoo, H.; van der Schaar, H. M.; Strating, J. R.; van Kuppeveld, F. J. Direct-Acting Antivirals and Host-Targeting Strategies to Combat Enterovirus Infections. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *24*, 1−8.
(73) Yamayoshi, S.; Yamashita, Y.; Li, J.; Hanagata, N.; Minowa, T.; Takemura, T.; Koike, S. Scavenger Receptor B2 Is a Cellular Receptor for Enterovirus 71. *Nat. Med.* **2009**, *15* (7), 798−801.
(74) Kornhuber, J.; Hoertel, N.; Gulbins, E. The Acid Sphingomyelinase/Ceramide System in COVID-19. *Mol. Psychiatry.* **2022**, *27* (1), 307−314.
(75) Tseng, K. C.; Hsu, B. Y.; Ling, P.; Lu, W. W.; Lin, C. W.; Kung, S. H. Antidepressant Sertraline Is a Broad-Spectrum Inhibitor of Enteroviruses Targeting Viral Entry through Neutralization of Endolysosomal Acidification. *Viruses.* **2022**, *14* (1), 109.
(76) Otegui, M.; Reyes, F. C. Endosomes in Plants. *Nature Education* **2010**, *3* (9), 23.
(77) Yamaya, M.; Deng, X.; Kikuchi, A.; Sugawara, M.; Saito, N.; Kubo, T.; Momma, H.; Kawase, T.; Nakagome, K.; Shimotai, Y.; Nishimura, H. The Proton ATPase Inhibitor Bafilomycin A_1 Reduces the Release of Rhinovirus C and Cytokines from Primary Cultures of Human Nasal Epithelial Cells. *Virus Res.* **2021**, *304*, No. 198548.
(78) Bayer, N.; Prchla, E.; Schwab, M.; Blaas, D.; Fuchs, R. Human Rhinovirus HRV14 Uncoats from Early Endosomes in the Presence of Bacilomycin. *F.E.B.S. Lett.* **1999**, *463* (1−2), 175−178.
(79) Marques, R.; Lacerda, R.; Romão, L. Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Mediated Translation and its Potential for Novel mRNA-Based Therapy Development. *Biomedecines.* **2022**, *10* (8), 1865.
(80) Dong, Q.; Men, R.; Dan, X.; Chen, Y.; Li, H.; Chen, G.; Zee, B.; Wang, M. H. T.; He, M. L. Hsc70 Regulates the IRES Activity and Serves as an Antiviral Target of Enterovirus A71 Infection. *Antiviral Res.* **2018**, *150*, 39−46.
(81) Lai, M. C.; Lee, Y. H.; Tarn, W. Y. The DEAD-box RNA Helicase DDX3 Associates with Export Messenger Ribonucleoproteins as well as Tip-Associated Protein and Participates in Translational Control. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19* (9), 3847−3858.
(82) Su, Y. S.; Tsai, A. H.; Ho, Y. F.; Huang, S. Y.; Liu, Y. C.; Hwang, L. H. Stimulation of the Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Dependent Translation of Enterovirus 71 by DDX3X RNA Helicase and Viral 2A and 3C Proteases. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1324.
(83) Quaranta, P.; Lottini, G.; Chesi, G.; Contrafatto, F.; Russotto, R.; Macera, L.; Lai, M.; Spezia, P. G.; Brai, A.; Botta, M.; Freer, G.; Pistello, M. DDX3 Inhibitors Show Antiviral Activity against Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses but not against Negative-Sense Single-Stranded RNA viruses: The Coxsackie B Model. *Antiviral Res.* **2020**, *178*, No. 104750.
(84) Yuan, S.; Chu, H.; Huang, J.; Zhao, X.; Ye, Z. W.; Lai, P. M.; Wen, L.; Cai, J. P.; Mo, Y.; Cao, J.; Liang, R.; Poon, V. K.; Sze, K. H.; Zhou, J.; To, K. K.; Chen, Z.; Chen, H.; Jin, D. Y.; Chan, J. F.; Yuen, K. Y. Viruses harness YxxØ motif to interact with host AP2M1 for replication: A vulnerable broad-spectrum antiviral target. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (35), No. eaba7910.
(85) Davila-Calderon, J.; Patwardhan, N. N.; Chiu, L. Y.; Sugarman, A.; Cai, Z.; Penutmutchu, S. R.; Li, M. L.; Brewer, G.; Hargrove, A. E.; Tolbert, B. S. IRES-targeting small molecule inhibits enterovirus 71 replication via allosteric stabilization of a ternary complex. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4775.
(86) Zhu, G.; Wu, C.; Wang, Q.; Deng, D.; Lin, B.; Hu, X.; Qiu, F.; Li, Z.; Huang, C.; Yang, Q.; Zhang, D. Antiviral Activity of the HSP90 Inhibitor VER-50589 Against Enterovirus 71. *Antiviral Res.* **2023**, *211*, No. 105553.
(87) Wu, C.; Zhu, G.; Qiu, F.; Ren, F.; Lin, B.; Zhang, D.; Yang, Q.; Huang, C. PLX8394, a RAF Inhibitor, Inhibits Enterovirus 71

Replication by Blocking RAF/MEK/ERK Signaling. *Virol. Sin.* **2023**, *38* (2), 276−284.
(88) Lyoo, H.; van der Schaar, H. M.; Dorobantu, C. M.; Rabouw, H. H.; Strating, J. R. P. M.; van Kuppeveld, F. J. M. ACBD3 Is an Essential Pan-Enterovirus Host Factor that Mediates the Interaction Between Viral 3A Protein and Cellular Protein PI4KB. *MBio.* **2019**, *10*, e02742−18.
(89) Tassini, S.; Langron, E.; Delang, L.; Mirabelli, C.; Lanko, K.; Crespan, E.; Kissova, M.; Tagliavini, G.; Fontò, G.; Bertoni, S.; Palese, S.; Giorgio, C.; Ravanetti, F.; Ragionieri, L.; Zamperini, C.; Mancini, A.; Dreassi, E.; Maga, G.; Vergani, P.; Neyts, J.; Radi, M. Multitarget CFTR Modulators Endowed with Multiple Beneficial Side Effects for Cystic Fibrosis Patients: Toward a Simplified Therapeutic Approach. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10833−11084.
(90) Laajala, M.; Zwaagstra, M.; Martikainen, M.; Nekoua, M. P.; Benkahla, M.; Sane, F.; Gervais, E.; Campagnola, G.; Honkimaa, A.; Sioofy-Khojine, A. B.; Hyöty, H.; Ojha, R.; Bailliot, M.; Balistreri, G.; Peersen, O.; Hober, D.; Van Kuppeveld, F.; Marjomäki, V. Vemurafenib Inhibits Acute and Chronic Enterovirus Infection by Affecting Cellular Kinase Phosphatidylinositol 4-Kinase Type IIIβ. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11* (4), No. e0055223.
(91) Vishakantegowda, A. G.; Hwang, D.; Chakrasali, P.; Jung, E.; Lee, J. Y.; Shin, J. S.; Jung, Y. S. Highly Potent and Selective Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIβ Inhibitors as Broad-Spectrum Anti-Rhinoviral Agents. *RSC Med. Chem.* **2024**, *15* (2), 704−719.
(92) Wang, H.; Tai, A. W. Nir2 is an Effector of BVAPs Necessary for Efficient Hepatitis C Virus Replication and Phosphatidylinositol 4-Phosphate Enrichment at the Viral Replication Organelle. *J. Virol.* **2019**, *93* (22), e00742−19.
(93) Tsubamoto, H.; Ueda, T.; Inoue, K.; Sakata, K.; Shibahara, H.; Sonoda, T. Repurposing Itraconazole as an Anticancer Agent. *Oncol. Lett.* **2017**, *14* (2), 1240−1246.
(94) Bauer, L.; Ferla, S.; Head, S. A.; Bhat, S.; Pasunooti, K. K.; Shi, W. Q.; Albulescu, L.; Liu, J. O.; Brancale, A.; van Kuppeveld, F. J. M.; Strating, J. R. P. M. Structure-Activity Relationship Study of Itraconazole, a Broad-Range Inhibitor of Picornavirus Replication That Targets Oxysterol-Binding Protein (OSBP). *Antiviral Res.* **2018**, *156*, 55−63.
(95) MedlinePlus. DHODH gene dihydroorotate dehydrogenase (quinone). https://medlineplus.gov/genetics/gene/dhodh/ (accessed 2024-07-24).
(96) Cheung, N. N.; Lai, K. K.; Dai, J.; Kok, K. H.; Chen, H.; Chan, K. H.; Yuen, K. Y.; Kao, R. Y. T. Broad-spectrum inhibition of common respiratory RNA viruses by a pyrimidine synthesis inhibitor with involvement of the host antiviral response. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98* (5), 946−954.
(97) Sun, J.; Yogarajah, T.; Lee, R. C. H.; Kaur, P.; Inoue, M.; Tan, Y. W.; Chu, J. J. H. Drug repurposing of pyrimidine analogs as potent antiviral compounds against human enterovirus A71 infection with potential clinical applications. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 8159.
(98) Lee, K.; Kim, D. E.; Jang, K. S.; Kim, S. J.; Cho, S.; Kim, C. Gemcitabine, a Broad-Spectrum Antiviral Drug, Suppresses Enterovirus Infections Through Innate Immunity Induced by the Inhibition of Pyrimidine Biosynthesis and Nucleotide Depletion. *Oncotarget.* **2017**, *8* (70), 115315−115325.
(99) Yang, Y.; Cao, L.; Gao, H.; Wu, Y.; Wang, Y.; Fang, F.; Lan, T.; Lou, Z.; Rao, Y. Discovery, Optimization, and Target Identification of Novel Potent Broad-Spectrum Antiviral Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (8), 4056−4073.
(100) Yang, Q.; Wu, C.; Zhu, G.; Ren, F.; Lin, B.; Huang, R.; Hu, X.; Zhao, D.; Peng, K.; Wu, Y.; Wang, Q.; Huang, C.; Zhang, D. ML390 Inhibits Enterovirus 71 Replication by Targeting *De Novo* Pyrimidine Biosynthesis Pathway. *Antiviral Res.* **2023**, *209*, No. 105498.
(101) Gao, L.; Cueto, M. A.; Asselbergs, F.; Atadja, P. Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (28), 25748−25755.
(102) Xie, H.; Yang, E.; Wang, C.; Peng, C.; Ji, L. Targeting HDAC11 Activity by FT895 Restricts EV71 Replication. *Virus Res.* **2023**, *330*, No. 199108.
(103) Zhang, Y.; El-Far, M.; Dupuy, F. P.; Abdel-Hakeem, M. S.; He, Z.; Procopio, F. A.; Shi, Y.; Haddad, E. K.; Ancuta, P.; Sekaly, R. P.; Said, E. A. HCV RNA Activates APCs Via TLR7/TLR8 While Virus Selectivity Stimulates Macrophages Without Inducing Antiviral Responses. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29447.
(104) Zhang, Q.; Zhao, B.; Chen, X.; Song, N.; Wu, J.; Li, G.; Yu, P.; Han, Y.; Liu, J.; Qin, C. GS-9620 Inhibits Enterovirus 71 Replication Mainly Through the NF-κB and PI3K-AKT Signaling Pathways. *Antiviral Res.* **2018**, *153*, 39−48.
(105) Maharati, A.; Moghbeli, M. PI3K/AKT Signaling Pathway as a Critical Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Tumor Cells. *Cell. Commun. Signal.* **2023**, *21* (1), 201.
(106) Hall, M. N. mTOR-what does it do? *Transplant. Proc.* **2008**, *40* (10), S5−S8.
(107) Chang, H.; Tian, L.; Chen, J.; Tang, A.; Li, C.; Li, Z.; Yang, Z. Rapamycin and ZSTK474 Can Have Differential Effects at Different Post-Infection Time-Points Regarding CV-B3 Replication and CV-B3-Induced Autophagy. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18* (1), 1088−1094.
(108) Hao, T.; Li, Y.; Fan, S.; Li, W.; Wang, S.; Li, S.; Cao, R.; Zhong, W. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of a Novel mTOR-Targeted Anti-EV71 Agent. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *175*, 172−186.
(109) Paul, J.; Soujon, M.; Wengner, A. M.; Zitzmann-Kolbe, S.; Sturz, A.; Haike, K.; Keng Magdalene, K. H.; Tan, S. H.; Lange, M.; Tan, S. Y.; Mumberg, D.; Lim, S. T.; Ziegelbauer, K.; Liu, N. Simultaneous Inhibition of PI3Kδ and PI3Kα Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF-κB and AKT. *Cancer Cell.* **2017**, *31* (1), 64−78.
(110) Zhang, H.; Wang, X.; Wang, Y.; Pei, X.; Wang, C.; Niu, Y.; Xu, P.; Peng, Y. Substituted 3-Benzylcoumarins 13 and 14 Suppress Enterovirus A71 Replication by Impairing Viral 2A Dependent IRES-Driven Translation. *Antiviral Res.* **2018**, *160*, 10−16.
(111) Duan, H.; Zhu, M.; Xiong, Q.; Wang, Y.; Xu, C.; Sun, J.; Wang, C.; Zhang, H.; Xu, P.; Peng, Y. Regulation of Enterovirus 2A Protease-Associated Viral IRES Activities by the Cell's ERK Signalling Cascade: Implicating ERK as an Efficiently Antiviral Target. *Antiviral Res.* **2017**, *143*, 13−21.
(112) Wang, Y. X.; Yang, L.; Wang, H. Q.; Zhao, X. Q.; Liu, T.; Li, Y. H.; Zeng, Q. X.; Li, Y. H.; Song, D. Q. Synthesis and Evolution of Berberine Derivatives as a New Class of Antiviral Agents against Enterovirus 71 through the MEK/ERK Pathway and Autophagy. *Molecules.* **2018**, *23* (8), 2084.
(113) Ruest, L. B.; Marcotte, R.; Wang, E. Peptide Elongation Factor eEF1A-2/S1 Expression in Cultured Differentiated Myotubes and Its Protective Effect Against Caspase-3-Mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 5418−5425.
(114) Shao, E.; Zhao, S.; Dong, Y.; Wang, Y.; Fei, Y.; Li, S.; Wang, L.; Bashir, T.; Luan, T.; Lin, L.; Wang, Y.; Zhao, W.; Zhong, Z. Anisomycin Inhibits Coxsackievirus B Replication by Promoting the Lysosomal Degradation of eEF1A1. *Antiviral Res.* **2023**, *215*, No. 105621.
(115) Eskandari, E.; Eaves, C. J. Paradoxical Roles of Caspase-3 in Regulating Cell Survival, Proliferation, and Tumorigenesis. *J. Cell. Biol.* **2022**, *221* (6), No. e202201159.
(116) Huo, W.; Yu, J.; Liu, C.; Wu, T.; Wang, Y.; Meng, X.; Song, F.; Zhang, S.; Su, Y.; Liu, Y.; Liu, J.; Yu, X.; Hua, S. Caspase-3 Inhibitor Inhibits Enterovirus D68 Production. *J. Microbiol.* **2020**, *58* (9), 812−820.
(117) Li, M. L.; Hsu, T. A.; Chen, T. C.; Chang, S. C.; Lee, J. C.; Chen, C. C.; Stollar, V.; Shih, S. R. The 3C Protease Activity of Enterovirus 71 Induces Human Neural Cell Apoptosis. *Virology.* **2002**, *293* (2), 386−395.
(118) Wang, Z. Y.; Zhong, T.; Wang, Y.; Song, F. M.; Yu, X. F.; Xing, L. P.; Zhang, W. Y.; Yu, J. H.; Hua, S. C.; Yu, X. F. Human Enterovirus 68 Interferes with the Host Cell Cycle to Facilitate Viral Production. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 29.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

(119) Sebbagh, M.; Renvoizé, C.; Hamelin, J.; Riché, N.; Bertoglio, J.; Bréard, J. Caspase-3-Mediated Cleavage of ROCK I Induces MLC Phosphorylation and Apoptotic Membrane Blebbing. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3* (4), 346−352.
(120) Zhao, X.; Li, C.; Chiu, M. C.; Qiao, R.; Jiang, S.; Wang, P.; Zhou, J. Rock1 is a Novel Host Dependency Factor of Human Enterovirus A71: Implication As a Drug Target. *J. Med. Virol.* **2022**, *94* (11), 5415−5424.
(121) Qiao, R.; Tang, W.; Li, J.; Li, C.; Zhao, C.; Wang, X.; Li, M.; Cui, Y.; Chen, Y.; Cai, G.; Wu, Q.; Zhao, X.; Wang, P. Structure-Based Virtual Screening of ROCK1 Inhibitors for the Discovery of Enterovirus-A71 Antivirals. *Virology.* **2023**, *585*, 205−214.
(122) Xiao, Y.; Yang, Y.; Hu, D. Knockdown of METTL3 Inhibits Enterovirus 71-Induced Apoptosis of Mouse Schwann Cell Through Regulation of Autophagy. *Pathog. Dis.* **2021**, *79* (6), ftab036.
(123) Salerno, M.; Varricchio, C.; Bevilacqua, F.; Jochmans, D.; Neyts, J.; Brancale, A.; Ferla, S.; Bassetto, M. Rational Design of Novel Nucleoside Analogues Reveals Potent Antiviral Agents for EV71. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *246*, No. 114942.
(124) Chatterjee, S. Neutral Sphingomyelinase: Past, Present and Future. *Chem. Phys. Lipids.* **1999**, *102* (1−2), 79−96.
(125) Liang, Y.; Kong, Y.; Rao, M.; Zhou, X.; Li, C.; Meng, Y.; Chen, Y.; Li, H.; Luo, Z. Inhibition of ESCRT-Independent Extracellular Vesicles Biogenesis Suppresses Enterovirus 71 Replication and Pathogenesis in Mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *267*, No. 131453.
(126) Glaser, C.; Wilson, M. R. Enteroviruses: the elephants in the room. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20* (2), 153−155.
(127) Rotbart, H. A. Antiviral Therapy for Enteroviruses and Rhinoviruses. *Antivir. Chem. Chemother.* **2000**, *11* (4), 261−271.
(128) Bauer, L.; Lyoo, H.; van der Schaar, H. M.; Strating, J. R.; van Kuppeveld, F. J. Direct acting Antivirals and Host Targeting to Combat Enterovirus Infections. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *24*, 18.
(129) Liu, Y.; Sheng, J.; Fokine, A.; Meng, G.; Shin, W. H.; Long, F.; Kuhn, R. J.; Kihara, D.; Rossmann, M. G. Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science.* **2015**, *347* (6217), 71−74.
(130) Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Vanelle, P.; Roche, M. From the "One-Molecule, One-Target, One-Disease" Concept towards Looking for Multi-Target Therapeutics for Treating Non-Polio Enterovirus (NPEV) Infections. *Pharmaceuticals (Basel).* **2024**, *17* (9), 1218.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00606
ACS Infect. Dis. 2025, 11, 21−46

Molécules macromolaires inhibant les Entérovirus.

Si la plupart des recherches s'intéressent à la synthèse de petites molécules ciblant les différentes protéines virales, des macromolécules ont été envisagées pour cibler la capside, et en particulier le sommet de l'axe quintuple de la capside. Il est situé au centre de cinq protomères constitués de protéines structurales. Il permet la reconnaissance de certains récepteurs, qui ne sont ni des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, ni des récepteurs des intégrines. D'après le modèle RCBS PDB 3ZFF, le rayon du site de liaison est estimé à environ 1,3 nanomètre.[*] Cela explique le développement de nanoparticules, comme les dendrimères, les fullerènes ou les conjugués, pour inhiber cette partie de la capside. Les liaisons hydrogène et les interactions ioniques permettent aux composés de se lier à leur cible. Les résultats des évaluations de ces composés sont synthétisés dans le **Tableau 7**.

Dendrimères

Un dendrimère est une nanoparticule. Il est composé de dendrons monodispersés, qui peuvent rapidement atteindre une dizaine de nanomètres. La structure du dendrimère peut être divisée en trois parties : le noyau, les branches intérieures (dendrons) et la surface fonctionnalisée avec des sites réactifs/passifs. Selon leurs propriétés, les dendrimères peuvent se comporter comme des micelles classiques ou inversées. La fonctionnalisation de la surface permet la synthèse de conjugués dendrimère-médicament ; il existe une possibilité de vectorisation ou de marquage des composés pour améliorer la sélectivité ou le suivi des médicaments *in vivo*.[361,362,363]

Plusieurs dérivés de dendrimères ont été développés pour se lier aux sulfates d'héparane (SH) ou récepteur ligand de la glycoprotéine *p*-sélectine 1 (PSGL-1) [**Figure 8**]. Dans les exemples suivants, si la nature du noyau n'est pas précisée, alors il s'agit d'un pentaérythritol.

---

[*] Capside de l'EV-A71 complexée avec l'inhibiteur WIN51711. RCSB PDB. Lien.

[361] Price, C.F.; Tyssen, D.; Sonza, S.; Davie, A.; Evans, S.; Lewis, G.R.; Xia, S.; Spelman, T.; Hodsman, P.; Moench, T.R.; Humberstone, A.; Paull, J.R.; Tachedjian, G. *PLoS One*. **2011**, *6* (9), e24095. DOI: 10.1371/journal.pone.0024095.

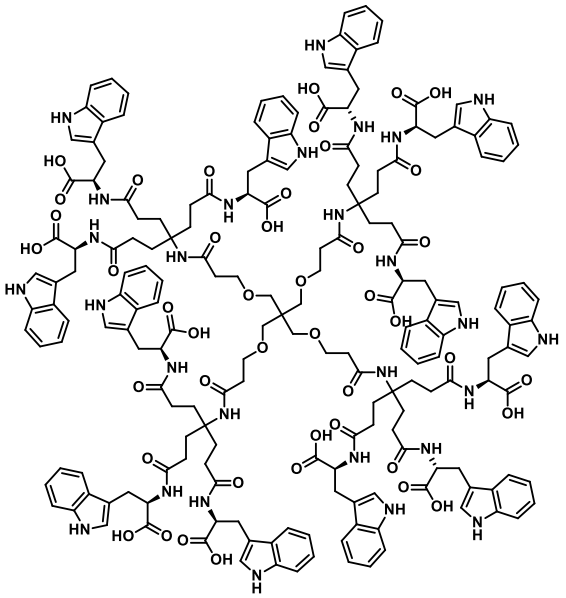
[362] Castellarnau, A.; Heery, G.P.; Seta, A.; Luscombe, C.A.; Kinghorn, G.R.; Button, P.; McCloud, P.; Paull, J.R.A. *Sci. Rep*. **2022**, *12* (1), 10210. DOI: 10.1038/s41598-022-14601-3.

[363] 361 Khaitov, M.; Nikonova, A.; Kofiadi, I.; Shilovskiy, I.; Smirnov, V.; Elisytina, O.; Maerle, A.; Shatilov, A.; Shatilova, A.; Andreev, S.; Sergeev, I.; Trofimov, D.; Latysheva, T.; Ilyna, N.; Martynov, A.; Rabdano, S.; Ruzanova, E.; Savelev, N.; Pletiukhina, I.; Safi, A.; Ratnikov, V.; Gorelov, V.; Kaschenko, V.; Kucherenko, N.; Umarova, I.; Moskaleva, S.; Fabrichnikov, S.; Zuev, O.; Pavlov, N.; Kruchko, D.; Berzin, I.; Goryachev, D.; Merkulov, V.; Shipulin, G.; Udin, S.; Trukhin, V.; Valenta, R.; Skvortsova, V. *Allergy*. **2023**, *78* (6), 1639-1653. DOI: 10.1111/all.15663.

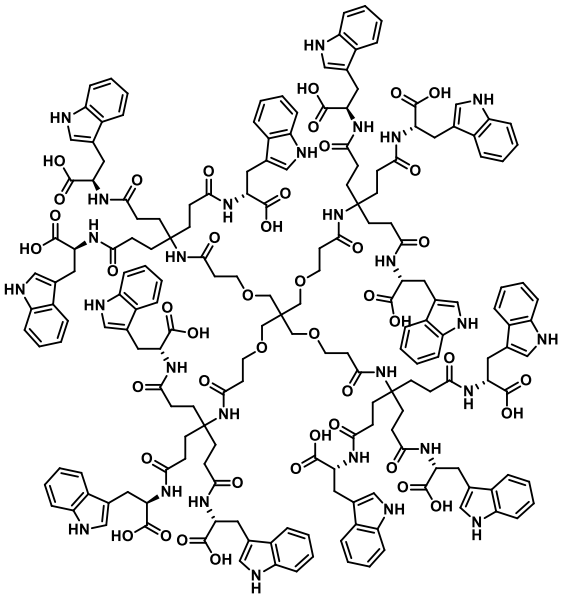
Tableau 7. Résumé des activités antivirales des macromolécules.

Molécule	Espèce & souche virale	Activité* [µM]	Cellule	Espèce & souche virale	Activité* [µM]	Cellule	Réf.
28	CVA24v	248	HCE				371
27		159					372
12	EV-A71 BrCr	0,29 ± 0,07	RD	E11 Gregrory	1,3 ± 0,2	BGM	364
	EV-D68 CU70	6,0 ± 2,1	HeLa Rh				
MADAL-385	EV-A71 BrCr	0,28 ± 0,01	RD	EV-A71 11316	0,21 ± 0,03	RD	365
33 / AL-518	EV-A71 BrCr	0,04 ± 0,01	RD				366
26 / AL-525	EV-A71 BrCr	0,042 ± 0,007	RD	EV-A71 A71 11316	0,0750 ± 0,0009	RD	367
	EV-A71 TW/70902/08	0,002 ± 0,001		EV-A71 H08300 461#812	0,091 ± 0,009		
	EV-A71 TW/1956/05	0,006 ± 0,001					
IIa	EV-A71 BrCr	0,012 ± 0,002	RD				368
IId	EV-A71 BrCr	0,52 ± 0,03	RD				
30	EV-A71 BrCr	0,109 ± 0,034	RD	EV-A71 A71 11316	0,0190 ± 0,0006	RD	369
	EV-A71 TW/70902/08	0,0059 ± 0,0007		EV-A71 H08300 461#812	0,0026 ± 0,0006		
	EV-A71 TW/1956/05	0,0044 ± 0,0007		EV-A71 BrCr VP1_S184T	0,90 ± 0,05		
	EV-A71 BrCr VP1_P246S	0,20 ± 0,09		EV-A71 BrCr VP1_S184T_P246S	0,30 ± 0,04		
23 / AL-534	EV-A71 BrCr	0,0180 ± 0,0003	RD	EV-A71 A71 11316	0,0020 ± 0,0007	RD	370
	EV-A71 TW/70902/08	0,00020 ± 0,00007		EV-A71 H08300 461#812	0,0020 ± 0,0003		
	EV-A71 TW/1956/05	0,00040 ± 0,00003		EV-A71 BrCr VP1_S184T	2,0 ± 0,1		
	EV-A71 BrCr VP1_P246S	4,7 ± 0,2		EV-A71 BrCr VP1_S184T_P246S	8,9 ± 0,5		
	EV-D68 CU70	26,0 ± 0,2	HeLa Rh				
10	EV-A71 BrCr	0,33 ± 0,07	RD	EV-A71 BrCr VP1_S184T	0,40 ± 0,03	RD	375
	EV-A71 BrCr VP1_P246S	0,36 ± 0,02		EV-A71 BrCr VP1_S184T_P246S	0,35 ± 0,05		

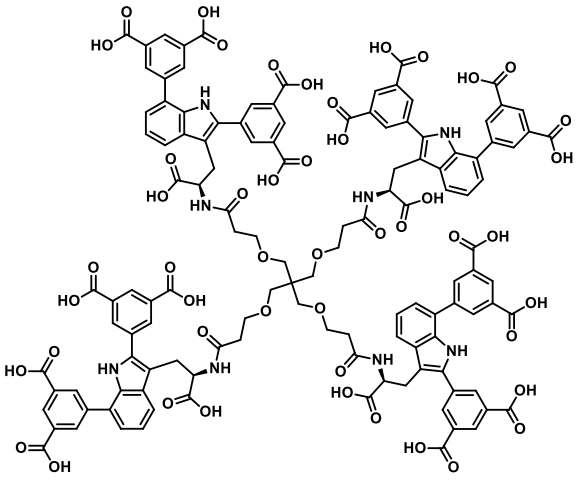
* L'activité antivirale se réfère à la concentration efficace 50 (EC_{50}).



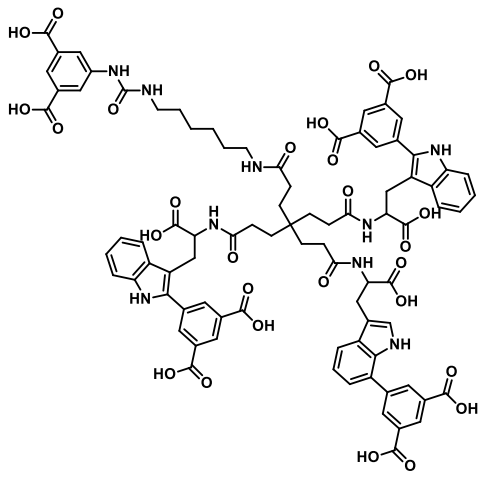
12



MADAL-385

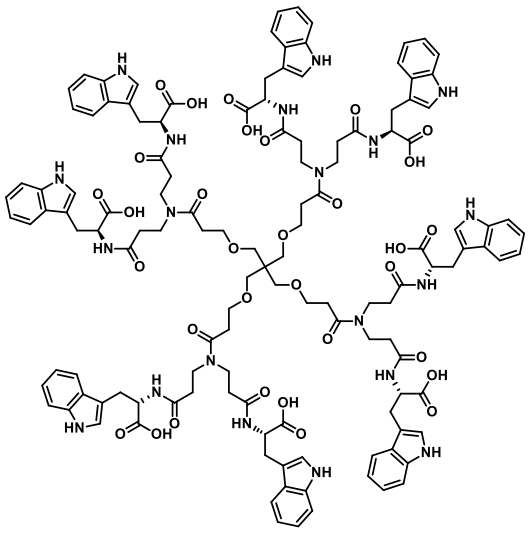


23 / AL-518

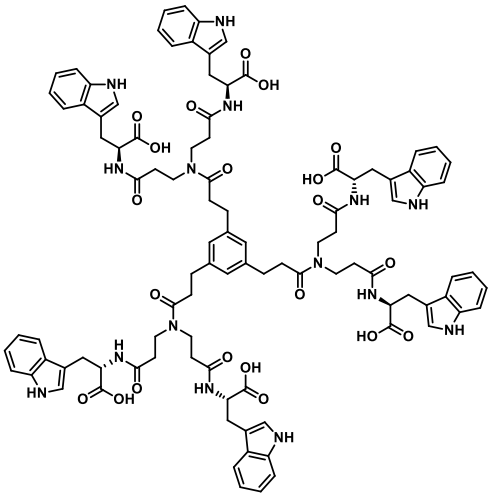


26 / AL-525

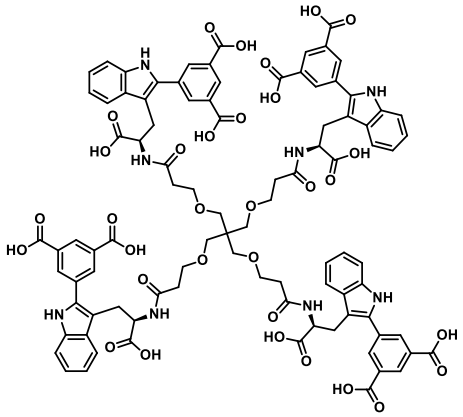
Figure 8. Structure des dendrimères développés par l'Instituto de Química Médica (Madrid).



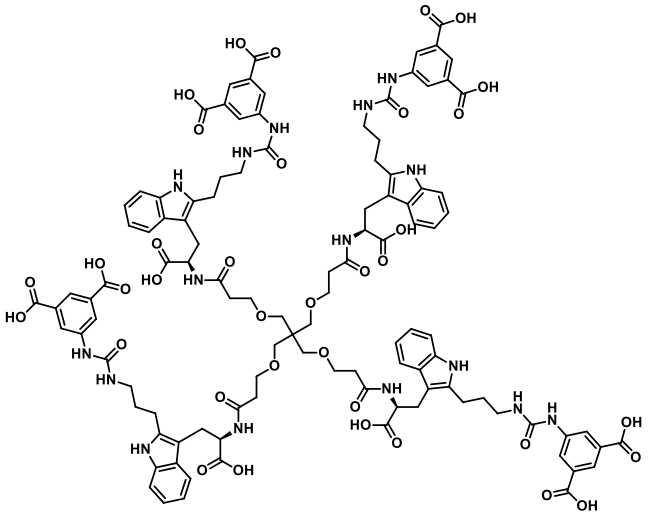
IIa



IId



30



23 / AL-534

Figure 8. Structure des dendrimères développés par l'Instituto de Química Médica (Madrid) (suite).

Le premier dendrimère (composé **12**) a été découvert en 2016 par le groupe de San Félix.[364] Il est un dendrimère de génération G-2. Le composé **12** possède douze sites réactifs fonctionnalisés avec un tryptophane. Il possède une activité antivirale submicromolaire contre EV-A71 et micromolaire contre E11 et EV-D68. Cependant, certains dérivés pourraient potentiellement atteindre un niveau d'activité de l'ordre du nanomolaire ou du picomolaire. Aucune activité n'a été observée contre CV-B3, RV-A2 et RV-B14. Un second hit (**MADAL-385**) a été découvert en 2019, sous la direction de la même équipe, avec un niveau d'activité similaire.[365] Ce composé est un diastéréo-isomère du composé **12**.

Dans la continuité, plusieurs dérivés de dendrimères ont été synthétisés. La concentration efficace semi-maximale (EC_{50}) d'**AL-518** et d'**AL-525** est de l'ordre du submicromolaire.[366,367] Ils sont tous deux des dendrimères de génération G-1, comprenant quatre sites réactifs. Le premier est fonctionnalisé avec des tryptophanes et le second avec trois acides isophtaliques tryptophaniques 2-substitués et un acide 5-uréidoisophtalique. Le dendrimère **AL-525** n'inhibe pas non plus la réplication des CV-B3, RV-A2 et RV-B14.

---

[364] Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donckers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. *Antimicrob. Agents Chemother.***2016**, 60 (8); 5064-5067. DOI: 10.1128/AAC.00626-16.

[365] Sun, L.; Lee, H.; Thibaut, H.J.; Lanko, K.; Rivero-Buceta, E.; Bator, C.; Martinez-Gualda, B.; Dallmeier, K.; Delang, L.; Leyssen, P.; Gago, F.; San-Félix, A.; Hafenstein, S.; Mirabelli, C.; Neyts, J. *PLoS Pathog*. **2019**; *15* (5), 1007760. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007760.

[366] Martí-Marí, O.; Martínez-Gualda, B.; de la Puente-Secades, S.; Mills, A.; Quesada, E.; Abdelnabi, R.; Sun, L.; Boonen, A.; Noppen, S.; Neyts, J.; Schols, D.; Camarasa, M..J; Gago, F.; San-Félix A. *J. Med. Chem*. **2021**; *64* (14), 10027-10046. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00315.

[367] Martí-Marí, O.; Martínez-Gualda, B.; Fernández-Barahona, I.; Mills, A.; Abdelnabi, R.; Noppen, S.; Neyts, J.; Schols, D.; Camarasa, M.J.; Herranz, F.; Gago, F.; San-Félix, A. *Eur. J. Med. Chem*. **2022**; *237*, 114414. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114414.

Trois dendrimères ont été synthétisés avec une activité de l'ordre du nanomolaire en 2019 et 2020. Le premier est un dendrimère de génération G-2 avec seize sites réactifs fonctionnalisés avec des tryptophanes (**IIa**).[368] Le deuxième est un dendrimère de génération G-0 avec quatre sites réactifs fonctionnalisés avec des acides 5-(tryptophane-2-yl)isophtaliques (**30**).[369] Le dernier composé est un dendrimère de génération G-1 possèdant douze sites réactifs fonctionnalisés par des tryptophanes et des noyaux acide trimérique (**IId**).[368]

Enfin, la dernière série de dendrimères se distingue par une fonction urée reliant les tryptophanes et les acides isophtaliques (**23**, également appelé **AL-534**).[370] Il inhibe un large panel de génotypes d'EV-A71 et certains mutants. Certaines interactions ont été identifiées avec le sommet de l'axe quintuple et **30** ou **23 [Schéma 21**].

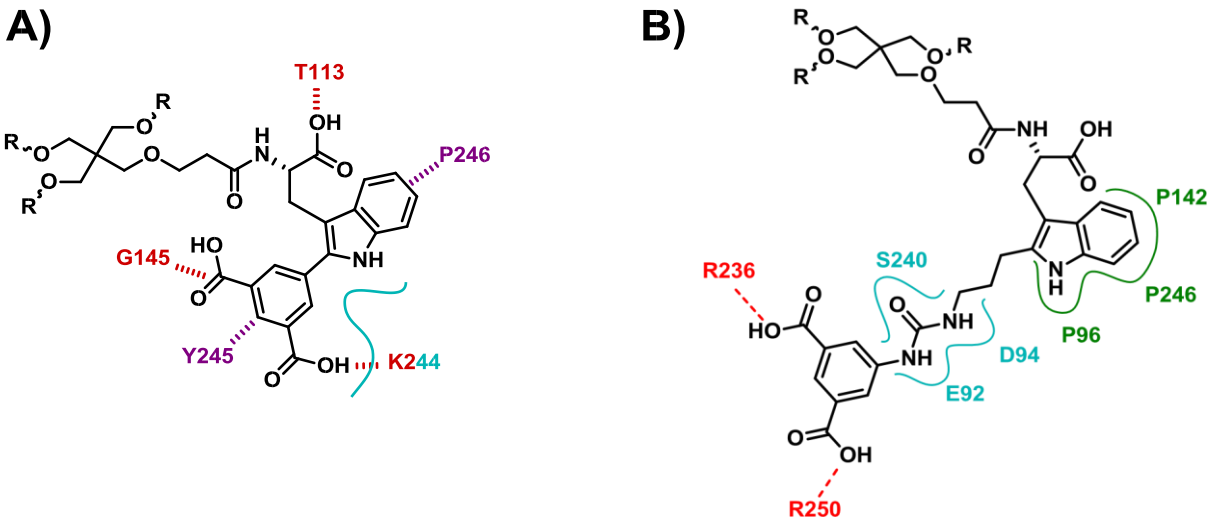


Schéma 21. Interactions identifiées entre le sommet de l'axe quintuple de la capside et les dendrimères : A) 30 ; B) 23. Liaison hydrogène, stabilization hydrophobe, interactions ioniques, $\pi - \pi$ stacking.

[368] Martínez-Gualda, B.; Sun, L.; Martí-Marí, O.; Mirabelli, C.; Delang, L.; Neyts, J.; Schols, D.; Camarasa, M.J.; San-Félix, A. *Antiviral Res.* **2019**, *168*, 210-214. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.06.006.

[369] Martínez-Gualda, B.; Sun, L.; Martí-Marí, O.; Noppen, S.; Abdelnabi, R.; Bator, C.M.; Quesada, E.; Delang, L.; Mirabelli, C.; Lee, H.; Schols, D.; Neyts, J.; Hafenstein, S.; Camarasa, M.J.; Gago, F.; San-Félix, A. *J. Med. Chem*. **2020**; *63* (1); 349-368. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01737.

[370] Martí-Marí, O.; Abdelnabi, R.; Schols, D.; Neyts, J.; Camarasa, M.J.; Gago, F.; San-Félix A. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (4), 3539. DOI: 10.3390/ijms24043539.

En 2020, une équipe suédoise a synthétisé des dendrimères dérivés de l'acide sialique pentavalent ciblant le sommet de l'axe quintuple de CV-A24v, avec une activité submillimolaire (composés **28** et **44**) [**Figures 9**].[371] En 2021, la même équipe a remplacé le noyau du dendrimère à base de glucose par un échafaudage de dibenzofluoranthène (**27**).[372] Aucun effet bénéfique sur l'inhibition de la transduction de CV-A24v n'a été identifié par rapport à la série précédente. En fin de compte, les hydrates de carbone ne présentent pas de propriétés physicochimiques efficaces, propices à la drugabilité (polarité élevée et vulnérabilité métabolique).

Certaines interactions ont été identifiées pour le dendrimère **28** [**Schéma 22**]. La fonction hydroxy du carbone C9 forme une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carboxylate, ce qui entraîne un verrouillage favorable d'une conformation. Si les extrémités des "nanomolécules" sont polaires, les noyaux sont principalement hydrophobes. D'après les résultats des études biologiques évaluant les dendrimères, la nature du noyau n'est pas importante, si ce n'est pour contrôler le nombre de bras. Leur rigidité ne semble pas affecter la liaison et l'activité.

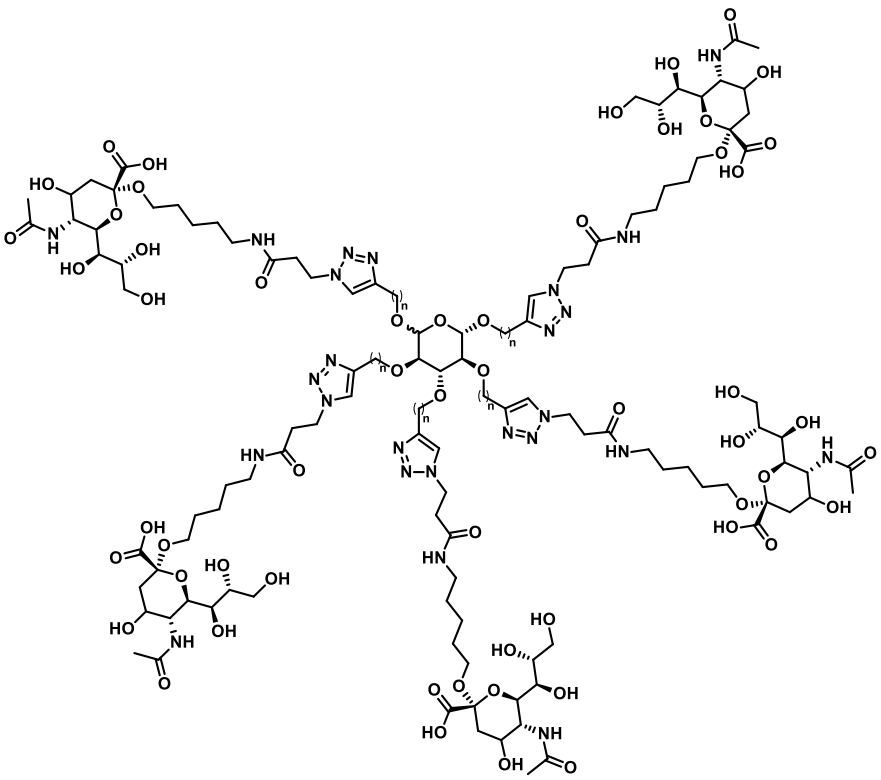
Les dérivés de dendrimères sont des médicaments prometteurs. Leur toxicité est potentiellement faible. En effet, les dendrimères poly(amidoamine) fonctionnalisés par des anions carboxylés se sont révélés moins toxiques que les cationiques, en raison de l'absence d'ammoniums quaternaires.[373] Ici, les acides carboxyliques réagissent et deviennent des carboxylates à un pH physiologique. Une grande partie de ces dendrimères a une CC_{50} supérieure à 100 µM.

---

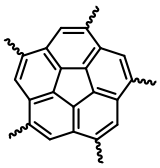
[371] Johansson, E.; Caraballo, R.; Mistry, N.; Zocher, G.; Qian, W.; Andersson, C.D.; Hurdiss, D.L.; Chandra, N.; Thompson, R.; Frängsmyr, L.; Stehle, T.; Arnberg, N.; Elofsson, M. *ACS Chem. Biol*. **2020**, *15* (10), 2683-2691. DOI: 10.1021/acschembio.0c00446.

[372] Johansson, E.; Caraballo, R.; Hurdiss, D.L.; Mistry, N.; Andersson, C.D.; Thompson, R.F.; Ranson, N.A.; Zocher, G.; Stehle, T.; Arnberg, N.; Elofsson, M. *Int. J. Mol. Sci*. **2021**, *22* (16), 8418. DOI: 10.3390/ijms22168418.

[373] Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N.B.; D'Emmanuele, A. *Int. J. Pharm*. **2003**, *252*, 263-266. DOI: 10.1016/s0378-5173(02)00623-3.



28 noyau β n = 1
44 noyau α n = 2



27 Noyau dibenzofuorenthène

Figure 9. Constituants des dendrimères 28, 44 et 27.

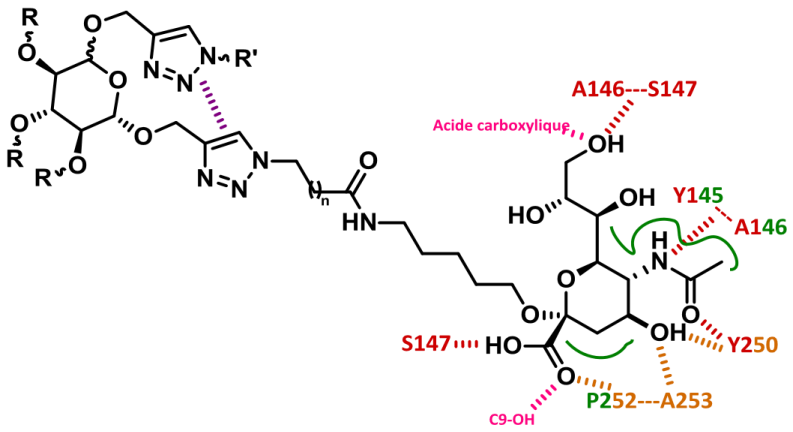


Schéma 22. Interactions identifiées entre le sommet de l'axe quintuple de la capside et le dendrimère 28. Liaison hydrogène, Stabilisation hydrophobique, Liaison hydrogène intramoléculaire, π – π stacking intramoléculaire, Liaison hydrogène bond médiée par des molécules d'eau.

Fullerène

Une autre classe de macromolécules a été testée pour inhiber les SH, en ciblant le sommet de l'axe quintuple des capsides, les fullerènes substitués [**Figure 10**]. Les fullerènes ont déjà prouvé leur efficacité contre le virus de l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine.[374] En 2021, le groupe de Saint Félix a synthétisé le fullerène **10**.[375] Il contient 12 dendrons de 1pentamide fonctionnalisés par des tyrosines et se liant des acides maloniques. Le composé **10** présente le même niveau activité que le dendrimère **12** : submicromolaire contre EV-A71 et micromolaire contre EV-D68. Ils restent inefficaces contre les rhinovirus testés (RV-A2 et RVB14) et CV-B3. Aucune interaction n'est clairement décrite dans l'article associé. Enfin, le composé **10** est plus cytotoxique (CC_{50} (RD) = 49,00 ± 0,02 µM) que les dendrimères.

Conjugués

D'autres molécules ont été identifiés comme des inhibiteurs du sommet de l'axe quintuple, comme la **suramine** (IC_{50} (RD) = 40 µM contre la souche SK-EV006 de EV-A71 avec GFP EV-A71-GFP).[376]

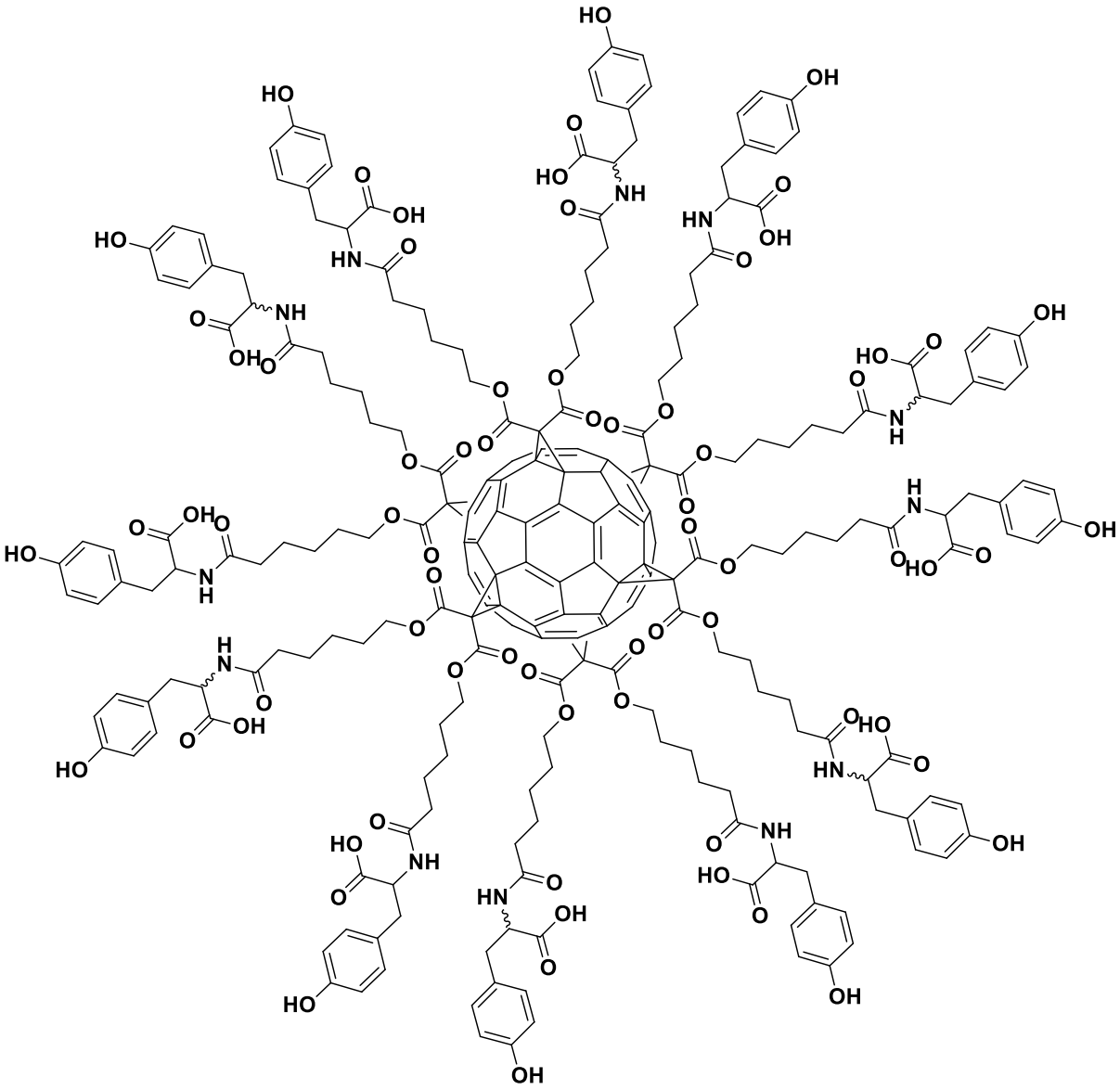
Parmi les dendrimères synthétisés en Espagne, la présence de résidus tryptophane à l'extrémité des bras est nécessaire pour qu'ils soient actifs. Entre 6 et 12 résidus tryptophane non substitués sont nécessaires pour conserver l'activité. Substituer l'indole avec un acide isophtalique sur le carbone C2 semble plus efficace que de le faire avec un acide benzoïque. De même, les carboxylates sont essentiels à l'activité du fullerène et autres dendrimères co-cristallisés, possédant des fonctions alcool et amide. Ils peuvent se lier à des acides aminés cationiques. Au contraire, la substitution de l'azote de l'indole rend les dendrimères inactifs. Avec une liaison urée entre l'indole et l'acide isophtalique, les liaisons alkyle-urée sont plus actives lorsqu'elles sont courtes, comme dans le cas de l'**AL-534**.

---

[374] Ruiz-Santaquiteria, M.; Illescas, B.M.; Abdelnabi, R.; Boonen, A.; Mills, A.; Martí-Marí, O.; Noppen, S.; Neyts, J.; Schols, D.; Gago, F.; San-Félix, A.; Camarasa, M.J.; Martín, N. *Chemistry*. **2021**; *27* (41); 10700-10710. DOI: 10.1002/chem.202101098.

[375] Ruiz-Santaquiteria, M.; Illescas, B.M.; Abdelnabi, R.; Boonen, A.; Mills, A.; Martí-Marí, O.; Noppen, S.; Neyts, J. Schols, D.; Gago, F.; San-Félix, A.; Camarasa, M.J.; Martín, N. *Chemistry*. **2021**, *27* (41), 10700-10710. DOI: 10.1002/chem.202101098.

[376] Wang, Y.; Qing, J.; Sun, Y.; Rao, Z. *Antiviral Res.* **2014**, *103*, 1-6. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.12.008.



10

Figure 10. Structure du fullerène 10.

2) Composés biosourcés inhibant les Entérovirus.

Parmi les molécules inhibant les Entérovirus, beaucoup de composés organiques ont été décrits comme efficaces. Ils peuvent être synthétisés ou bien extraits. Dans la section suivante, nous présenterons les études des molécules provenant d'organismes vivants [**Figure 11**]. Plusieurs extraits d'algues, de champignons et de plantes ont été identifiés comme possédant des propriétés antivirales, le plus souvent *in vitro*.

Herbes médicinales provenant de la tradition chinoise.

La majorité de ces composés s'inspire de la médecine traditionnelle, généralement chinoise. Un extrait d'*Houttuynia cordata Thunberg* (herbe à poivre, poivre de Chine) a montré une activité contre EV-A16 et CVA16 mais pas E9 [**Figure 11A**].[377] Le **Gan-Lu-Siao-Du-Yin** (GLSDY) est un mélange d'herbes médicinales contenant 11 ingrédients [**Figure 11B**].[378] Après extraction à l'eau chaude, une inhibition de la réplication virale a été observée. Des acides, respectivement l'**acide salvianolique A**, extrait de la racine de *Salvia miltiorrhiza* (Sauge rouge), et l'**acide ptérodontique**, provenant de *Laggera pterodonta*, inhibent l'EV-A71 par exacerbation de la signalisation AkT/PKB, et la voie de signalisation des facteurs nucléaires kappa B (NF-κB) ainsi que l'export des protéines virales depuis le noyau cellulaire [**Figure 11C-11D**]. [379,380]

Extraits de plantes non utilisées dans la médecine traditionnelle.

D'autres plantes, en dehors des remèdes traditionnels, inhibent aussi les Entérovirus. Extraite au méthanol, la *Melissa officinalis* (mélisse officinale) riche en **acide rosmarinique** réduit l'entrée et la traduction virale [**Figure 11E**].[381] L'**acide rosmarinique**, identifié au sein de *Salvia miltiorrhiza* (Sauge rouge), interagit avec le sommet de l'axe quintuple de la capside, ce

---

[377] Lin, T.Y.; Liu, Y.C.; Jheng, J.R.; Tsai, H.P.; Jan, J.T.; Wong, W.R.; Horng, J.T. *Am. J. Chin. Med*. **2009**, *37* (1), 143-158. DOI: 10.1142/S0192415X09006734.

[378] Hsieh, Y.J.; Yen, M.H.; Chiang, Y.W.; Yeh, C.F.; Chiang, L.C.; Shieh, D.E.; Yeh, I.; Chang, J.S. *J. Ethnopharmacol*. **2016**, *185*, 132-139. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.034.

[379] Kim, S.H.; Lee, J.; Jung, Y.L.; Hong, A.; Nam, S.J.; Lim, B.K. *J. Microbiol. Biotechnol*. **2020**, *30* (1), 38-43. DOI: 10.4014/jmb.1907.07079.

[380] Guan, W.; Li, J.; Chen, Q.; Jiang, Z.; Zhang, R.; Wang, X.; Yang, Z.; Pan, X. *Molecules*. **2017**, *22* (10), 1738. DOI: 10.3390/molecules22101738.

[381] Chen, S.G.; Leu, Y.L.; Cheng, M.L.; Ting, S.C.; Liu, C.C.; Wang, S.D.; Yang, C.H.; Hung, C.Y.; Sakurai, H.; Chen, K.H.; Ho, H.Y. *Sci. Rep*. **2017**, *7* (1), 12264. DOI: 10.1038/s41598-017-12388-2.

qui empêche la reconnaissance des récepteurs de la cellule (PSGL-1, sulfate d'héparane).[382] Un autre acide, l'**acide isochlorogénique C**, isolé de *Crassocephalum crepidioides* (crassocéphale fausse crépide), régule la protéine ACOX1 grâce à son activité antioxydante et empêche la sortie du virus par apoptose ou autophagie [**Figure 11F**].[383] D'autres extraits de plantes ont aussi été évalués en vue d'envisager un traitement. L'essai clinique d'extrait d'*Echinacea angustifolia* (Echinacée à feuilles étroites) a été conclu comme n'ayant aucun effet thérapeutique par rapport au placebo [**Figure 11G**].[384]

De même, des polysaccharides ont été décrits comme inhibant les Entérovirus comme l'extrait de *Grifola frondosa* (Polypore en touffe) ayant une structure principale composée de **β–1,6–D–glucose** avec une chaine secondaire unique de **α–1,3–fructose** [**Figure 11H**].[385] Un autre polysaccharide composé d'**α–L–mannose**, extrait de *Monostroma latissimum*, ciblant la capside inhibe l'entrée virale [**Figure 11I**].[386] Le polysaccharide riche en soufre, extrait de *Monostroma nitidum*, comportant un squelette majoritairement d'**α–L–mannose** et d'un cinquième de **β–1,4–D–glucose,** inhibe la voie de signalisation phosphoinositide-3kinase/protéine kinase B (PI3K/AKT) [**Figure 11J**].[387] Le polysaccharide extrait de *Picochlorum sp. 122* inhibe, quant à lui, la prolifération entérovirale en régulant les voies de signalisation AKT/PKB et ATM/ATK.[388] Un autre polysaccharide riche en soufre, **κ –**

---

[382] Hsieh, C.F.; Jheng, J.R.; Lin, G.H.; Chen, Y.L.; Ho, J.Y.; Liu, C.J.; Hsu, K.Y.; Chen, Y.S.; Chan, Y.F.; Yu, H.M.; Hsieh, P.W.; Chern, J.H.; Horng, J.T. *Emerg. Microbes Infect*. **2020**, 9 (1), 1194-1205. DOI: 10.1080/22221751.2020.1767512.

[383] Cao, Z.; Ding, Y.; Cao, L.; Ding, G.; Wang, Z.; Xiao, W. *Sci. Rep*. **2017**, *7* (1), 16278. DOI: 10.1038/s41598017-16446-7.

[384] Turner, R.B.; Bauer, R.; Woelkart, K.; Hulsey, T.C.; Gangemi, J.D. *N. Engl. J. Med*. **2005**, *353* (4), 341-348. DOI: 10.1056/NEJMoa044441.

[385] Zhao, C.; Gao, L.; Wang, C.; Liu, B.; Jin, Y.; Xing, Z. Carbohydr. Polym. **2016**, 144, 382-389. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.12.005.

[386] Wang, S.; Wang, W.; Hao, C.; Yunjia, Y.; Qin, L.; He, M.; Mao, W. *Carbohydr. Polym*. **2018**, *200*, 43-53. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.067.

[387] Wang, S.; Wang, W.; Hou, L.; Qin, L.; He, M.; Li, W.; Mao, W. *Carbohydr. Polym*. **2020**, *227*, 115280. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115280.

[388] Guo, M.; Zheng, R.; Wu, H.L.; Chen, D.; Su, J.; Xu, T.; Wu, H.; Xiang, W.; Li, Y.; Zhu, B. *Arch. Virol*. **2021**, *166* (12), 3269-3274. DOI: 10.1007/s00705-021-05229-1.

carraghénane, est très présent chez les algues *Chondus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, *Hypnea*… [**Figure 11K**]. Il inhibe l'entrée virale au sein de la cellule en ciblant la capside.[389] Enfin, *Durvillaea antarctica* possède un polysaccharide qui inhibe l'infection à EV-A71 par un effet antagoniste de la voie de signalisation KEGG p53 [**Figure 11L**].[390]

Composés de la famille des flavonoïdes.

Outre les extraits et décoctions de sources dites naturelles, une classe de molécule nous a paru intéressante du fait de son utilisation fréquente dans l'alimentation : les flavonoïdes. Leurs effets pharmaceutiques sont multiples mais le plus connu est leur pouvoir antioxydant, malgré une très faible biodisponibilité.[391] Celui-ci est corrélé positivement à leur acylation.[392] Cela permet de protéger et agir en cas de risque de stress oxydatif ou en présence de lipopolysaccharides.[393] Ils ont aussi des activités hépatoprotectives, cadioprotectives, néphroprotective, et neuroprotectives.[394,395,396,397] Enfin, ils réduisent les taux de cholestérol dans le sang et les possibilités de développer une obésité.[378,398,399,400]

---

[389] Chiu, Y.H.; Chan, Y.L.; Tsai, L.W.; Li, T.L.; Wu, C.J. *Antiviral Res*. **2012**, 95 (2), 128-134. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.05.009.

[390] Xu, T.; Li, Y.; Wu, H.L.; Chen, H.; Wu, H.; Guo, M.; Zhao, M.; Wang, C.; Lin, T.; Lin, Z.; Chen, D.; Xiang, W.; Zhu, B. *J. Med. Virol*. **2021**, *93* (6), 3532-3538. DOI: 10.1002/jmv.26693.

[391] Zhang, N.; Jing, P. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. **2022**, *62* (8), 2205-2220. DOI: 10.1080/10408398.2020.1852170.

[392] Wiczkowski, W.; Szawara-Nowak, D.; Romaszko, J. *Food Chem*. **2016**, *190*, 730-740. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.021.

[393] Saluk, J.; Bijak, M.; Posmyk, M.M.; Zbikowska, H.M. *Int. J. Biol. Macromol*. **2015**, 80, 702-709. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.039.

[394] Liang, T.; Sun, G.; Cao, L; Li, J.; Wang, L. *Food Hydrocolloids*. **2019**, *87*, 858–868. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.08.028.

[395] Strauch, R.C.; Mengist, M.F.; Pan, K.; Yousef, G.G.; Iorizzo, M.; Brown, A.F.; Lila, M.A. *Food Chem.* **2019**, 301, 125289. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125289.

[396] Sharef, M.A.; Aljamali, D.S.M.J. *Int. J. Pharm. Res*. **2019**. *11* (1), 1636–1647. ISSN : 0975-2366.

[397] Zhang, J.; Wu, J.; Liu, F.; Tong, L.; Chen, Z.; Chen, J.; He, H.; Xu, R.; Ma, Y.; Huang, C. *Eur. J. Pharmacol*. **2019**, *858*, 172500. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172500.

[398] Duchnowicz, P.; Bors, M.; Podsędek, A.; Koter-Michalak, M.; Broncel, M. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. **2012**, *34* (3), 783-790. DOI: 10.1016/j.etap.2012.09.008.

[399] Xie, L.; Su, H.; Sun, C.; Zheng, X.; Chen, W. *Trends in Food Science & Technology*. **2018**, *72*, 13–24. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.12.002.

[400] Daud, M.A.; Sanjana, R.; Shahnaz, R.; Ishtiaq, A.; Mohammed, R. *World J. Pharm. Pharmaceutical Sci*. **2015**, *4* (9), 1642–1651. ISSN: 2278-4357.

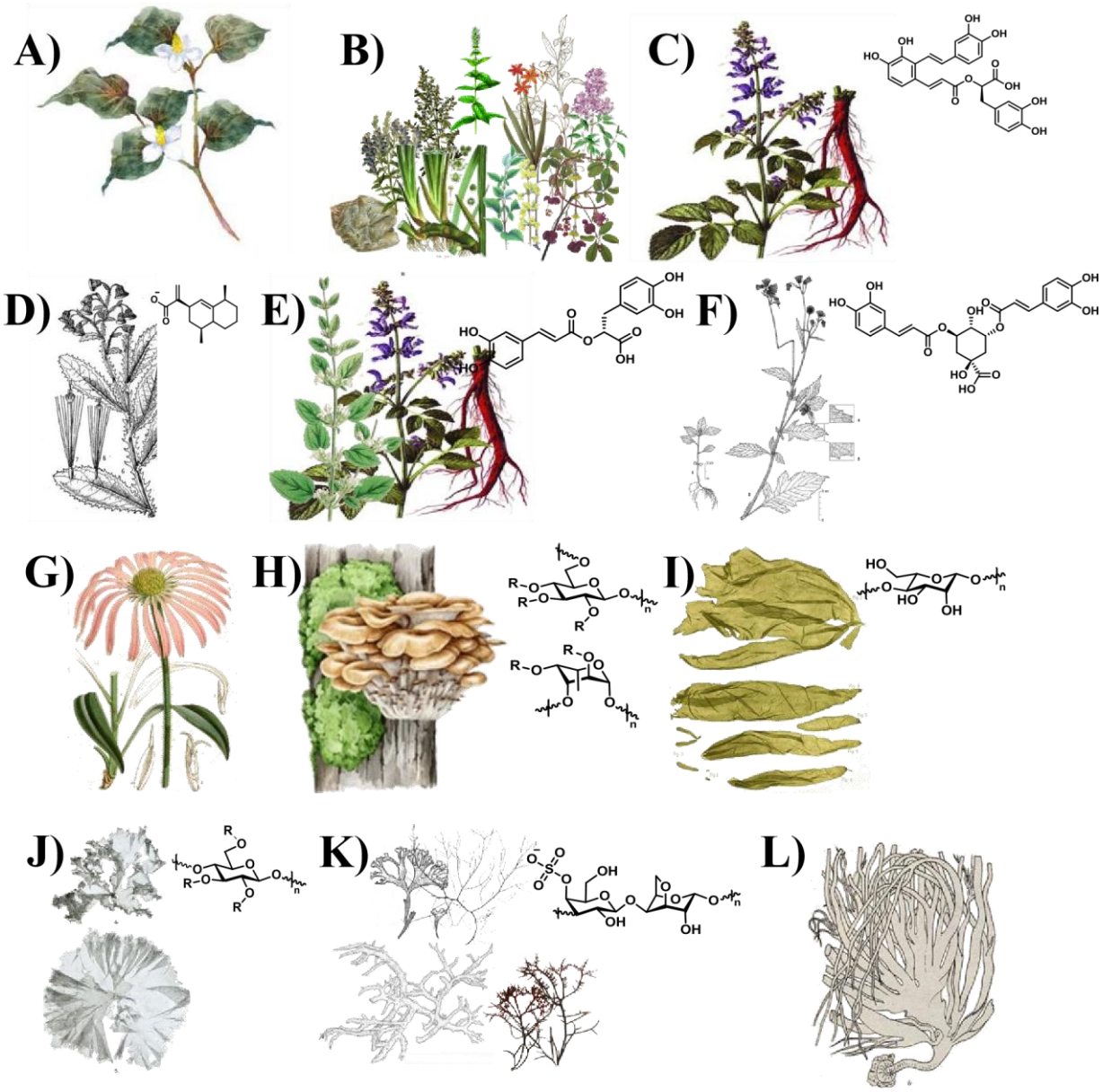


Figure 11. Plantes, champignons procurant des composés antiviraux, et leur principal composé actif.[†] **A)** ***Houttuynia cordata*****. B) Gan Lu Xiao Du Dan.**[‡] **C)** ***Salvia miltiorrhiza*** **(acide salvianolique A). D)** ***Laggera pterodonta*** **(acide ptérodontique). E)** ***Melissa officinalis*** **(acide rosmarique). F)** ***Crassocephalum crepidioides*** **(acide isochlorogénique C). G)** ***Echinacea angustifolia*****. H)** ***Grifola frondosa*** **(β–1,6–D –glucose, α–1,3–fucose). I)** ***Monostroma latissimum*** **(α–L–mannose). J)** ***Monostroma nitidum*** **(β–1,4–D –glucose). K)** ***Chondus*****,** ***Eucheuma*****,** ***Gigartina*****,** ***Hypnea*** **(K-Carraghénane). L)** ***Durvillae Algae*****.**

[†] Pour ne pas surcharger la page, les références des images sont mises en Annexe.

[‡] 15g de Fei Hua Shi, 9g de Huang Qin, de Yin Chen, de Shi Chang Pu, 6g de Lian Qiao, de Bo He, de Sje Gan, de Bei Mu, de Mu Tong, de Huo Xiang, de Bai Dou Kou. Lien.

Parmi les flavonoïdes, plusieurs classes de composés existent. Nous aborderons ici trois flavones, quatre flavonols, deux flavanones et une isoflavone, dont deux molécules mono ou biglycosylée [**Figure 12**]. Toutes sont présentent dans de multiples plantes. Les flavonoïdes inhibant les Entérovirus présentent trois mécanismes d'action identifiés.

L'**apigénine** et le **kampférol** régulent respectivement la liaison aux ribonucléoprotéines et l'activité de l'IRES de l'EV-A71. [401,402] L'**apigénine** n'inhibe pas le CVA16.[403]

La **quercétine** protège aussi les cellules contre l'infection à Entérovirus en empêchant l'activité de clivage de la protéine 3C (pro-3C).[404] Des dérivés d'hémisynthèse de la quercétine ont été synthétisés par le laboratoire Roche (**Ro 09-0179** et **Ro 09-0298**).[405] Le **lutéoloside** (7–β–glucosyllutéoline) inhibe aussi la pro-3C d'EV-A71. [406]

La **formononétine** inhibe l'EV-A71, la CVB2, la CVB3 et la CVB6, en ciblant la voie de signalisation PI3K/AKT, pour inhiber le déclenchement de l'apoptose.[407]

Enfin, l'**hespérétine**, l'**hespérédine** et la **lutéoline** inhibent la prolifération d'EV-A71 sans que leur mécanisme d'action soit clairement identifié.[388,408]

---

[401] Zhang, W.; Qiao, H.; Lv, Y.; Wang, K.; Chen, X.; Hou, Y.; Tan, R.; Li, E. *PLoS One*. **2014**, *9* (10), e110429. DOI: 10.1371/journal.pone.0110429.

[402] Tsai, F.J.; Lin, C.W.; Lai, C.C.; Lan, Y.C.; Lai, C.H.; Hung, C.H.; Hsueh, K.C.; Lin, T.H.; Chang, H.C.; Wan, L.; Sheu, J.J.; Lin, Y.J. *Food Chem*. **2011**, 128 (2), 312-322. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.022.

[403] Ji, P.; Chen, C.; Hu, Y.; Zhan, Z.; Pan, W.; Li, R.; Li, E.; Ge, H.M.; Yang, G. *Biol. Pharm. Bull*. **2015**, 38 (1), 1-6. DOI: 10.1248/bpb.b14-00357.

[404] Yao, C.; Xi, C.; Hu, K.; Gao, W.; Cai, X.; Qin, J.; Lv, S.; Du, C.; Wei, Y. *Virol. J*. **2018**, *15* (1), 116. DOI: 10.1186/s12985-018-1023-6.

[405] Ishitsuka, H.; Ohsawa, C.; Ohiwa, T.; Umeda, I.; Suhara, Y. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1982**, *22* (4), 611616. DOI: 10.1128/AAC.22.4.611.

[406] Cao, Z.; Ding, Y.; Ke, Z.; Cao, L.; Li, N.; Ding, G.; Wang, Z.; Xiao, W. *PLoS One*. **2016**, *11* (2), e0148693. DOI: 10.1371/journal.pone.0148693.

[407] Wang, H.; Zhang, D.; Ge, M.; Li, Z.; Jiang, J.; Li, Y. *Virol. J*. **2015**, *12*, 35. DOI: 10.1186/s12985-015-0264x.

[408] Lv, X.; Qiu, M.; Chen, D.; Zheng, N.; Jin, Y.; Wu, Z. *Antiviral Res*. **2014**, 109, 30-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.06.004.

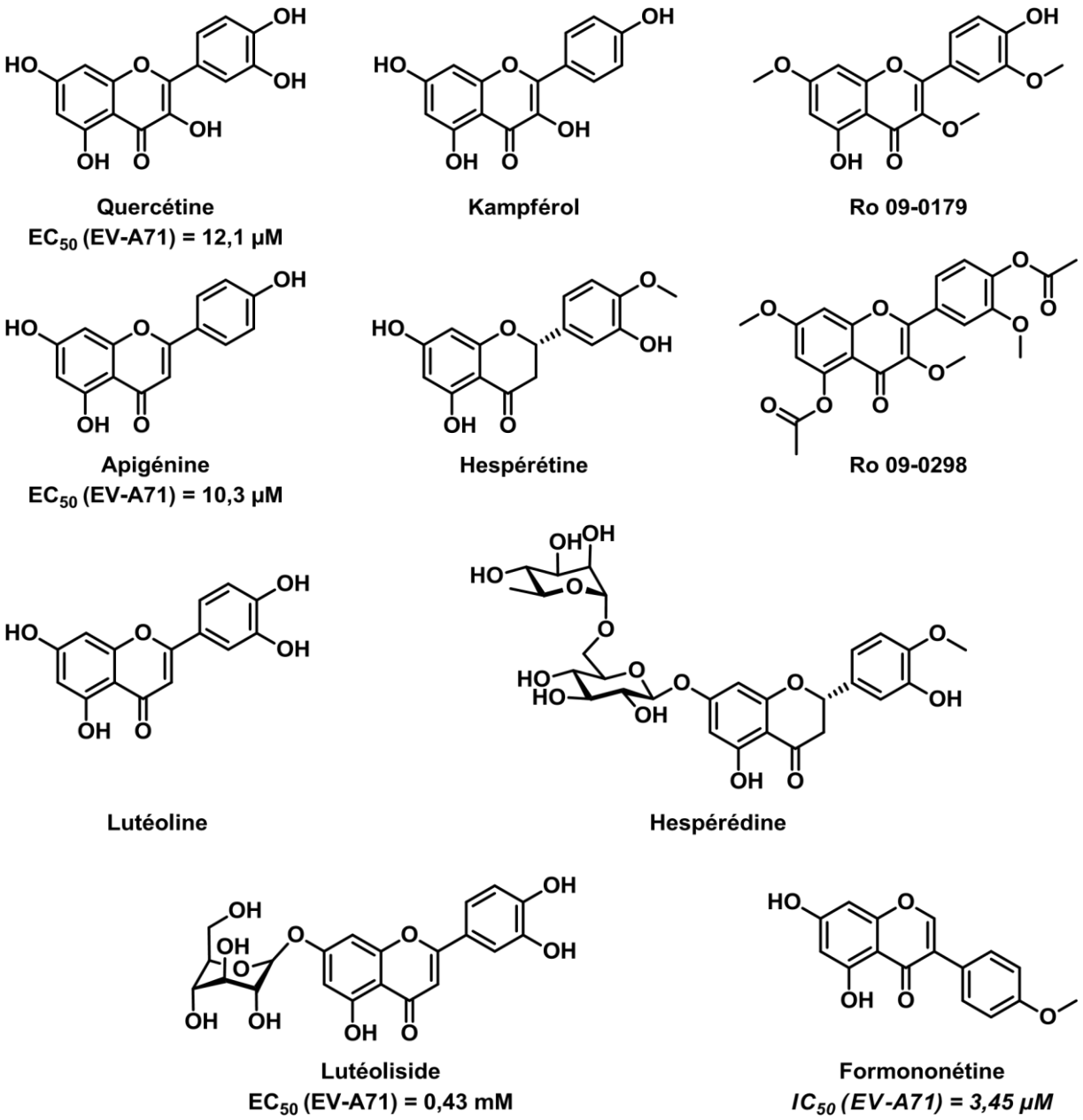


Figure 12. Flavonoïdes présentant une activité antivirale.

3) Composés inorganiques inhibant les Entérovirus.

Certains agents non organiques ont aussi été utilisés, tels que des dérivés du zinc sous forme de solution pour des sprays antiviraux [**Figure 13**]. La quantité de zinc dans le corps est inversement corrélée au risque d'infections du tractus respiratoire.[409] Il a fortement été utilisé comme traitement curatif réduisant la durée des symptômes malgré son usage plus rare désormais.[410] L'**acétate de zinc** semblait avoir une activité anti-rhinovirale de l'ordre du micromolaire.[411] Il permettait notamment de réduire la durée d'observation des symptômes, sans interférer avec la réponse inflammatoire de l'hôte.[412] Des effets de liaison avec l'ARN ou la polyprotéine virale ont été longtemps supposés. Cependant, lors de plusieurs études, ce métal sous forme de complexe **gluconate : glycine de zinc**, de **gluconate de zinc** ou d'**acétate de zinc** n'a pas montré d'efficacité par rapport au placebo donné.[413,414]

Outre le zinc, le sélénium a été utilisé comme agent antiviral [**Figure 13**].[415] Au sein de nanoparticules, et relié à des polyéthylimines ainsi qu'à des petits ARN interférants (pARNi) ciblant la protéine virale de la capside VP1, le sélénium issu de **sélénite de sodium** (Na_2SeO_3) a eu un effet de prévention de l'infection entérovirale [**Figure 13**].
D'autres métaux, doublement chargés positivement, ont été complexés avec du chitosane et testés [**Figure 13**].[416] En comparaison avec le cuivre, le fer et le zinc, le nickel a procuré le meilleur effet antiviral *in vitro* par complexation d'acides aminés de la capside avec le métal. La synthèse de ces complexes métalliques ont été préparés avec du sulfate.

---

[409] Zinc supplementation to improve treatment outcomes among children diagnosed with respiratory infections. World Health Organization. Lien.

[410] Singh, M.; Das, R.R. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **2013**, *6*, CD001364. DOI: 10.1002/14651858.CD001364.pub4.

[411] Korant, B.D.; Kauer, J.C.; Butterworth, B.E. *Nature*. **1974**, *248* (449), 588-590. DOI: 10.1038/248588a0.

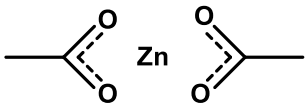
[412] Prasad, A.S.; Fitzgerald, J.T.; Bao, B.; Beck, F.W.; Chandrasekar, P.H. *Ann. Intern. Med*. **2000**, *133* (4), 245252. DOI: 10.7326/0003-4819-133-4-200008150-00006.

[413] Macknin, M.L.; Piedmonte, M.; Calendine, C.; Janosky, J.; Wald, E. *JAMA*. **1998**, *279* (24), 1962-1967. DOI: 10.1001/jama.279.24.1962.

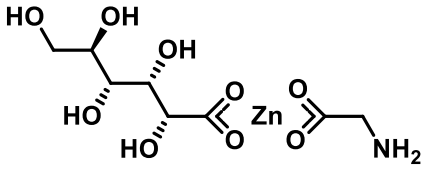
[414] Turner, R.B.; Cetnarowski, W.E. *Clin. Infect. Dis*. **2000**, *31* (5), 1202-1208. DOI: 10.1086/317437.

[415] Lin, Z.; Li, Y.; Xu, T.; Guo, M.; Wang, C.; Zhao, M.; Chen, H.; Kuang, J.; Li, W.; Zhang, Y.; Lin, T.; Chen, Y.; Chen, H.; Zhu, B. *ACS Omega*. **2020**, *5* (21), 12495-12500. DOI: 10.1021/acsomega.0c01382.

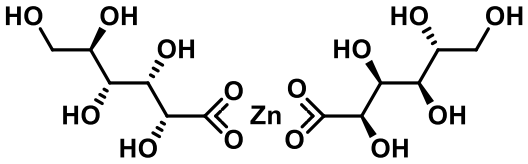
[416] Lin, Y.C.; Lin, S.T.; Chen, C.Y.; Wu, S.C. *Biotechnol. Prog*. **2012**, *28* (3), 892. DOI: 10.1002/btpr.699.



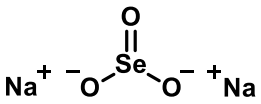
Acétate de Zinc



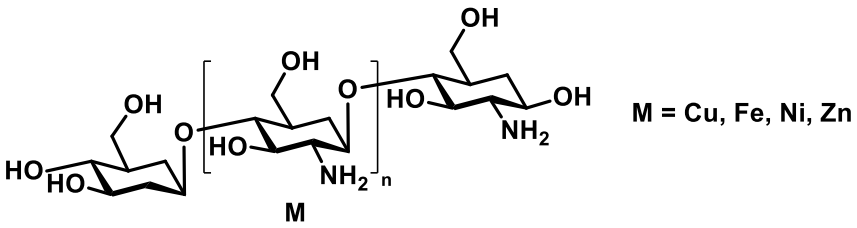
(1:1) Gluconate : Glycine de Zinc



Gluconate de Zinc



Sélénite de Sodium



Chitosane de [métal]

Figure 13. Structure des antiviraux inorganiques évalués (*in vitro* ou *in vivo*) contre les RV à ce jour.

4) Biomédicaments et autres inhibiteurs des Entérovirus.

Outre les composés organiques ou inorganiques à base de métal, des agents antiviraux d'origine biologique ont été évalués.

Biomédicaments.

Evaluation d'anticorps, d'immunoglobulines et d'interférons.

Les immunoglobulines font partie du système immunitaire adaptatif. Elles sont produites par les individus infectés par le virus à inhiber. Les anticorps monoclonaux sont des immunoglobulines spécialement produites sur cellules sans aucune infection réelle *in vivo*. Enfin les interférons sont, quant à eux, des éléments importants du système immunitaire inné, exacerbant la production des agents associés, souvent des macrophages et lymphocytes NK.

Dans un premier temps, plusieurs essais *in vitro* de thérapie spécifique contre l'EV-A71 sur modèle animal par anticorps monoclonaux ont été effectués.[417,418] Tous ciblaient la boucle GH de la protéine VP1 ou le récepteur LIMP2, ainsi que l'ensemble des mécanismes des premières étapes, à savoir l'attachement, l'entrée, l'internalisation des virus ainsi que le relargage et la dispersion de l'ARN au sein du cytoplasme. L'inhibition se fait en comblant les sites de reconnaissance des récepteurs membranaires.[400] De même, évaluées sur modèle animal, des immunoglobulines ont été considérées comme traitement potentiel des infections à Entérovirus.[419] Elles pourraient donc être utilisées comme à la fois moyen de diagnostic (par reconnaissance de sérotype) mais aussi de traitement. Enfin, les interférons sont produits par le système immunitaire.[420] Utilisés en pré-traitement sur modèle animal, certains interférons sélectionnés ont permis une protection face aux infections à Entérovirus.[421] Des essais cliniques ont aussi démontré leur efficacité, notamment sur la charge virale.[422]

---

[417] Zhang, X.; Yang, P.; Wang, N.; Zhang, J.; Li, J.; Guo, H.; Yin, X.; Rao, Z.; Wang, X.; Zhang, L. Protein *Cell*. **2017**, *8* (8), 590-600. DOI: 10.1007/s13238-017-0405-7.

[418] 418 Zhu, L.; Xu, K.; Wang, N.; Cao, L.; Wu, J.; Gao, Q.; Fry, E.E.; Stuart, D.I.; Rao, Z.; Wang, J.; Wang, X. *mBio*. **2018**, *9* (4), e01013-18. DOI: 10.1128/mBio.01013-18.

[419] Lim, X.F.; Jia, Q.; Khong, W.X.; Yan, B.; Premanand, B.; Alonso, S.; Chow, V.T.; Kwang, J. *PLoS One*. **2012**, *7* (1), e29751. DOI: 10.1371/journal.pone.0029751.

[420] Reizis, B. *Immunity*. **2019**, *50* (1), 37-50. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.12.027.

[421] Liu, M.L.; Lee, Y.P.; Wang, Y.F.; Lei, H.Y.; Liu, C.C.; Wang, S.M.; Su, I.J.; Wang, J.R.; Yeh, T.M.; Chen, S.H.; Yu, C.K. *J. Gen. Virol*. **2005**, *86* (Pt 12), 3263-3269. DOI: 10.1099/vir.0.81195-0.

[422] Huang, X.; Zhang, X.; Wang, F.; Wei, H.; Ma, H.; Sui, M.; Lu, J.; Wang, H.; Dumler, J.S.; Sheng, G.; Xu, B. *PLoS One*. **2016**, *11* (2), e0148907. DOI: 10.1371/journal.pone.0148907.

Limites de l'utilisation d'anticorps, d'immunoglobulines ou d'interférons.

Malgré une grande efficacité contre EV-A71, les problématiques de reconnaissance des sérotypes des Entérovirus, abordés dans la partie A du **Chapitre I**, se retrouvent dans ce type de traitement. En effet, ces thérapeutiques sont des thérapies ciblées, spécifiques d'une protéine ou d'un fragment, qui peuvent être très variables selon le type de virus. Certains agents pathogènes ne sont pas obligatoirement reconnus par les immunoglobulines de référence associées, d'autant plus que des virus chimériques ont été identifiés.[176] Ces traitements substitutifs sont, néanmoins, en pleine expansion.

Récepteurs solubles des Entérovirus et analogues.

Outre l'immunothérapie, d'autres biomédicaments ont été étudiés comme les récepteurs permettant l'entrée des virus et le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme. En augmentant leur concentration, une concurrence entre ceux naturels des cellules et ceux libres inoculés se crée et devrait réduire la réplication virale.

Ainsi, des molécules d'adhésion cellulaire 1 (ICAM1) solubles ont été évaluées *in vitro* pour stopper les infections rhinovirales.[423] Ces récepteurs ont inhibé une dizaine de types de RV.

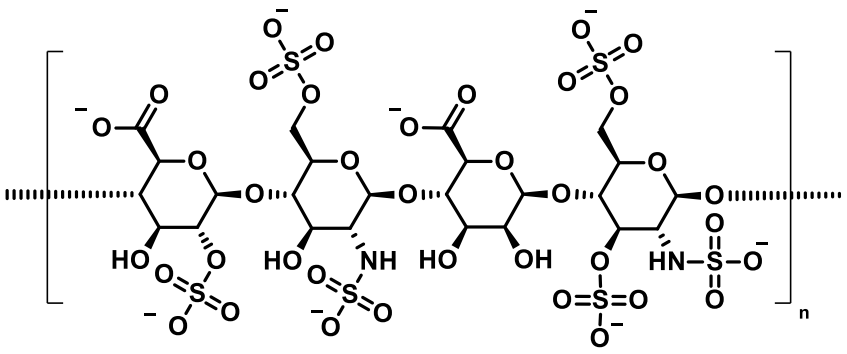
Plusieurs initiateurs à l'extrémité 3' modifiés ont permis le design d'analogues plus efficaces que la souche sauvage (initiateurs de molécule d'adhésion cellulaire modifiés : GGAATTCCTGCAGTCACTCATACCGGGGGGAGAGCACATT 3' ou TTCTAGAGGATCCTCAAAAGGTCTGGAGCTGGTAGG 3').

De même, certains analogues aux récepteurs de **sulfate d'héparane** ont été synthétisés pour évaluer leur efficacité contre les EV [**Figure 14**].[424] Tous ont montré une activité *in vitro* antivirale contre l'EV-A71. Cependant, **l'héparine** est le substrat ayant l'effet antiviral le plus puissant comparé au **sulfate d'héparane** ainsi qu'au **polysulfate de pentosane**. De même, d'autres analogues ont été conçus de telle sorte qu'ils soient enrichis en soufre, paramètre clef dans la réplication entérovirale.[10,11,12]

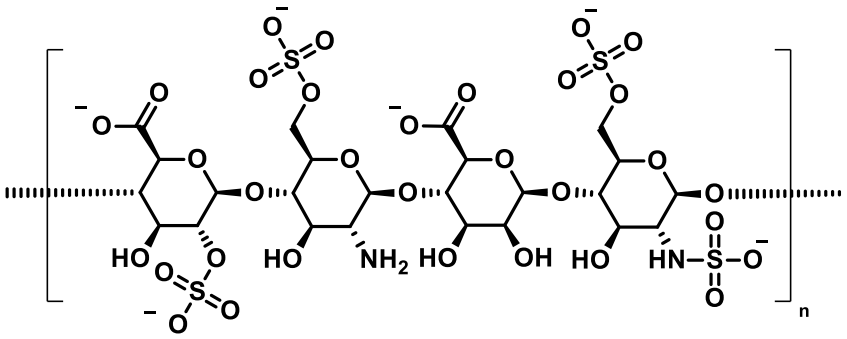
---

[423] Arruda, E.; Crump, C.E.; Marlin, S.D.; Merluzzi, V.J.; Hayden, F.G. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1992**, 36 (6), 1186-1191. DOI: 10.1128/AAC.36.6.1186.

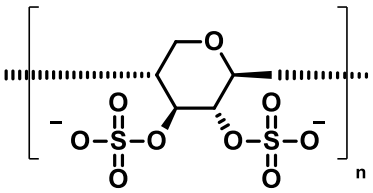
[424] Pourianfar, H.R.; Poh, C.L.; Fecondo, J.; Grollo, L. *Virus Res*. **2012**, *169* (1), 22-29. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.06.025.



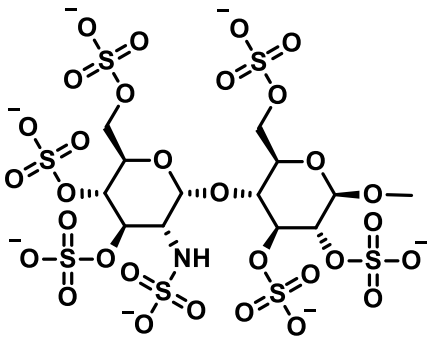
Sulfate d'héparane



Héparine



Polysulfate de pentosane



Sulfate d'héparane dissacharide enrichi au soufre

Figure 14. Structure du sulfate d'héparane et de ses analogues efficaces contre les EV.

Séquences nucléotidiques et peptidiques et leurs analogues.

De nombreux fragments d'ARN ou de protéines ont été synthétisés afin d'inhiber la prolifération des Entérovirus. Les avantages des inhibiteurs peptidiques sont multiples : une facilité de synthèse, un moindre risque d'apparition de résistance virale ainsi qu'une moindre toxicité. Cependant, ils restent généralement moins efficaces que les petites molécules organiques inhibitrices.[425] De plus, les peptides sont généralement caractérisés par une faible biodisponibilité et une demi-vie courte.[426] En effet, ils sont facilement métabolisés par différentes enzymes une fois absorbés. Enfin, bien que la méthode soit facile, les coûts associés peuvent être importants, que ce soit pour la synthèse ou la purification.[410,427] En effet, les réactifs sont souvent coûteux, les produits faiblement purs avec des opérations énergivores, comme pour introduire des ponts disulfures.

L'extraction de petit ARN interférent (pARNi) s'est récemment développée, provenant notamment du chèvrefeuille, pour cibler le gène de la protéine virale VP1 (VP1) ou du récepteur cellulaire LIMP2 et inhiber *in vitro* leur expression.[428,429]

---

[425] Anasir, M.I.; Ramanathan, B.; Poh, C.L. *Viruses*. **2020**, 12 (4), 367. DOI: 10.3390/v12040367.

[426] Vilas Boas, L.C.P.; Campos, M.L.; Berlanda, R.L.A.; de Carvalho Neves, N.; Franco, O.L. *Cell Mol. Life Sci*. **2019**, *76* (18), 3525-3542. DOI: 10.1007/s00018-019-03138-w.

[427] Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; Nilsson, B.; Verlander, M. L. *Biopolymers*. **2000**, *55* (3), 227-250. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7.

[428] Li, X.; Huang, Y.; Sun, M.; Ji, H.; Dou, H.; Hu, J.; Yan, Y.; Wang, X.; Chen, L. *Antiviral Res*. **2018**, *152*, 117123. DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.02.015.

[429] Feng, C.; Fu, Y.; Chen, D.; Wang, H.; Su, A.; Zhang, L.; Chang, L.; Zheng, N.; Wu, Z. *FEBS Open Bio*. **2017**, *7* (6), 747-758. DOI: 10.1002/2211-5463.12197.

De plus, des analogues d'une partie de la VP1 ont été synthétisés pour saturer les potentiels récepteurs membranaires reconnaissant les Entérovirus. Le plus documenté est le **SP40**, et sa version énantiopure **L-SP40** [**Figure 15**].[430,431] Ils ciblent principalement le récepteur LIMP2/SCARB2, mais aussi les nucléolines et l'annexine A2.[414] Le peptide **SP40** possède une activité sur plusieurs lignées cellulaires contre EV-A71, et est aussi efficace contre d'autres génotypes (CVA16, PV-1).[432] D'autres séquences ont été envisagées tels que le **SP45**, le **SP55** et le **SP81,** avec cependant moins d'activité que **SP40** [**Figure 15**].

Ciblant d'autres protéines virales, le peptide **LVLQTM** inhibe la protéine 2A (pro-2A) dans son activité de clivage d'eF14A, déclenchant l'apoptose de la cellule.[433] De même, le peptide **VAD** vient inhiber cette fonction de la pro-2A, tout comme le peptide **AAPV**.[434,435]

Les **lactoferrines**, d'origine bovine ou humaine, ont été identifiées comme de potentiels antiviraux avec un effet inhibiteur contre l'EV-A71.[436] Le mécanisme d'action identifié est l'empêchement de l'entrée au sein de la cellule par liaison avec la VP1.[437]

---

[430] Masomian, M.; Lalani, S.; Poh, C.L. *Molecules*. **2021**, *26* (21), 6576. DOI: 10.3390/molecules26216576.

[431] Lalani, S.; Tan, S.H.; Tan, K.O.; Lim, H.X.; Ong, K.C.; Wong, K.T.; Poh, C.L. *Life Sci*. **2021**, 287, 120097. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120097.

[432] Tan, C.W.; Chan, Y.F.; Sim, K.M.; Tan, E.L.; Poh, C.L. *PLoS One*. **2012**, *7* (5), e34589. DOI: 10.1371/journal.pone.0034589.

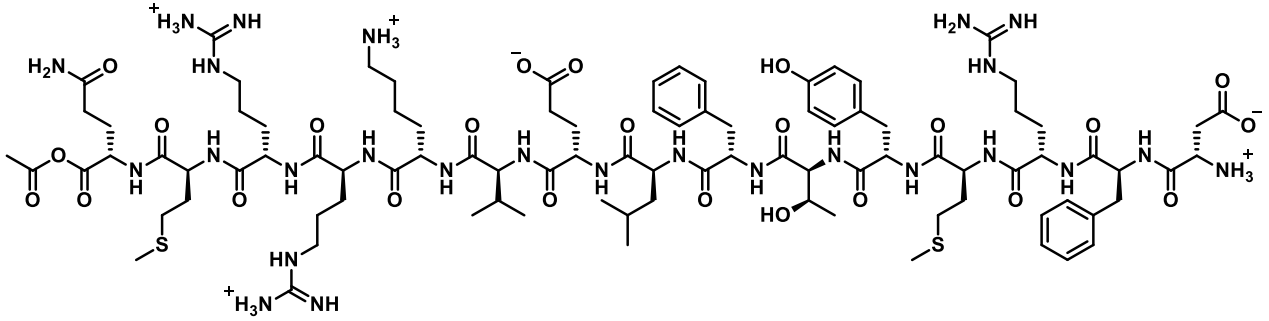
[433] Falah, N.; Montserret, R.; Lelogeais, V.; Schuffenecker, I.; Lina, B.; Cortay, J.C.; Violot, S. *J. Antimicrob. Chemother*. **2012**, *67* (12), 2865-2869. DOI: 10.1093/jac/dks304.

[434] Deszcz, L.; Seipelt, J.; Vassilieva, E.; Roetzer, A.; Kuechler, E. *FEBS Lett*. **2004**, *560* (1-3), 51-55. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00069-9.

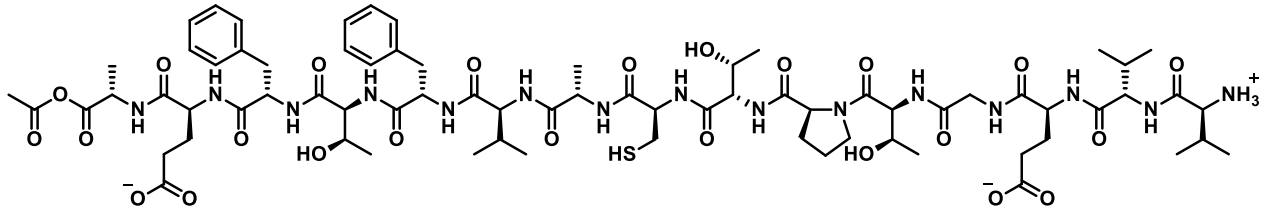
[435] Molla, A.; Hellen, C.U.; Wimmer, E. *J. Virol*. **1993**, *67* (8), 4688-4695. DOI: 10.1128/JVI.67.8.46884695.1993.

[436] Lin, T.Y.; Chu, C.; Chiu, C.H. *J. Infect. Dis*. **2002**, *186* (8), 1161-1164. DOI: 10.1086/343809.

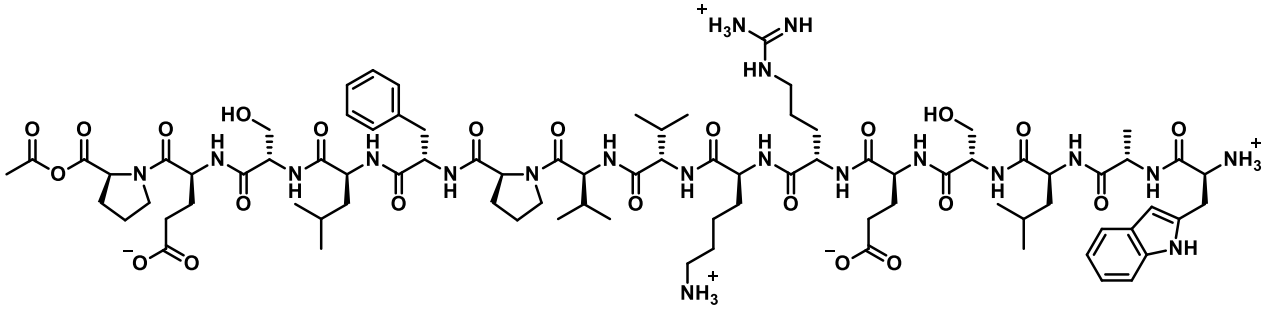
[437] Weng, T.Y.; Chen, L.C.; Shyu, H.W.; Chen, S.H.; Wang, J.R.; Yu, C.K.; Lei, H.Y.; Yeh, T.M. *Antiviral Res*. **2005**, *67* (1), 31-37. DOI: 10.1016/j.antiviral.2005.03.005.



SP40

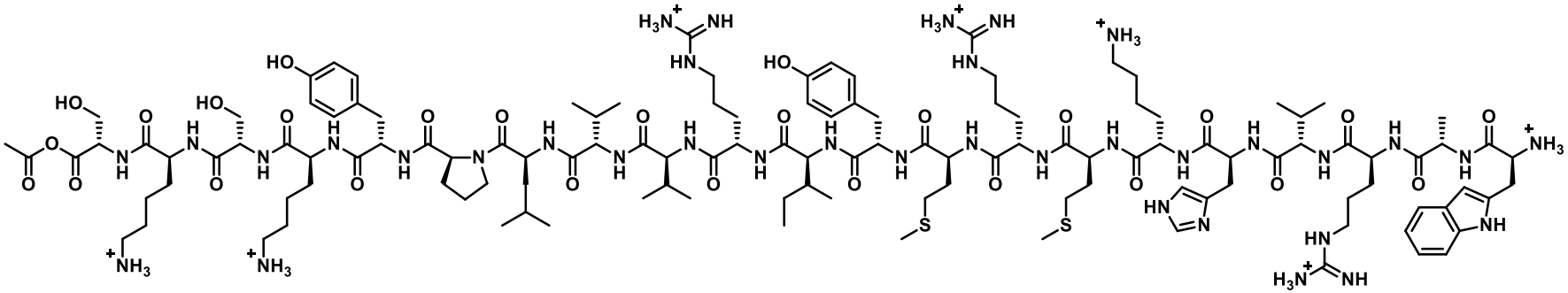


SP45

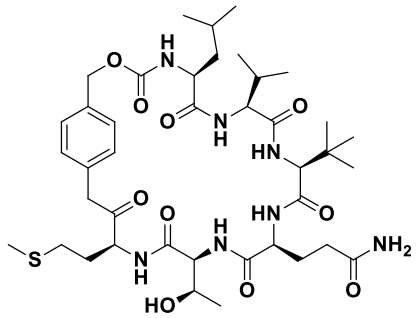


SP55

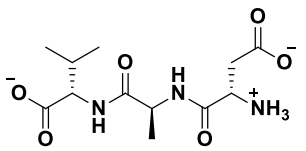
Figure 15. Structure des séquences peptidiques synthétisées pour cibler les Entérovirus.



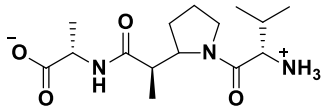
SP55



LVLQTM



VAD



AAPV

Figure 15. Structure des séquences peptidiques synthétisées pour cibler les Entérovirus (suite).

Carbohydrates efficaces contre les Entérovirus.

Enfin, des carbohydrates ont été aussi étudiés pour leurs effets contre différents Entérovirus [**Figure 16**]. L'**acarbose** rentre en compétition avec le récepteur LIMP2/SCARB2 pour se lier à EV-A71.[438] Cela permet d'inhiber la prolifération virale en bloquant l'étape d'entrée au sein de la cellule. Pour conclure ce paragraphe, le **méthyl-β-cyclodextrine** interfère avec les couches lipidiques par inhibition de la production de cholestérol membranaire.[439] Avec cette baisse, une diminution de la prolifération d'EV-A71 a été observée.

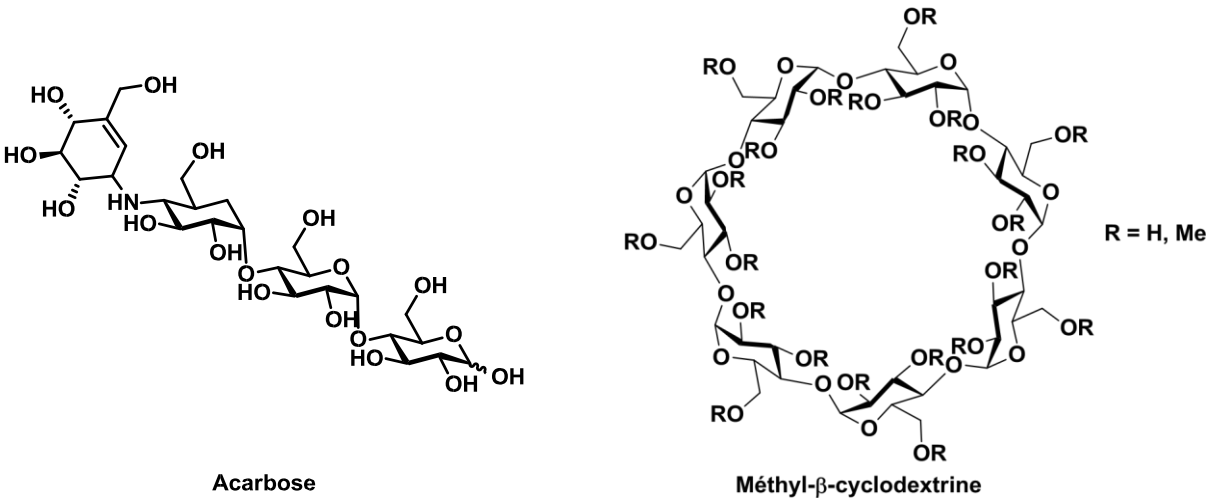


Figure 16. Structure des autres molécules d'origine biologique inhibant respectivement l'entrée et la réplication virale des Entérovirus.

[438] Feng, Q.; Zhou, H.; Zhang, X.; Liu, X.; Wang, J.; Zhang, C.; Ma, X.; Quan, C.; Zheng, Z. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *81*, 104210. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104210.

[439] Zhu, Y.Z.; Wu, D.G.; Ren, H.; Xu, Q.Q.; Zheng, K.C.; Chen, W.; Chen, S.L.; Qian, X.J.; Tao, Q.Y.; Wang, Y.; Zhao, P.; Qi, Z.T. *Cell. Physiol. Biochem*. **2015**, *35* (4), 1347-1359. DOI: 10.1159/000373956.

B. Validation de la cible pour ce projet de thèse.

Dans la section précédente, l'ensemble des composés présentés ont été étudiés pour leur efficacité antivirale en culture cellulaire. Ces travaux ont permis l'identification de molécules avec des propriétés antivirales ciblant différentes protéines virales ou humaines. Cependant, afin de déterminer la protéine à cibler dans ce projet de thèse, il nous faut évaluer l'intérêt des différentes voies d'inhibition par rapport aux travaux existants.

C'est pourquoi, dans cette partie, nous justifierons notre choix de synthétiser des « *capsid binders* ». Tout d'abord, l'accès aux différentes cibles virales selon l'étape visée du cycle de réplication virale sera discuté afin d'évaluer la difficulté de les atteindre. Une seconde section détaillera la sélectivité des composés de la partie A. Avec un manque de sélectivité, plusieurs effets secondaires peuvent apparaitre. Dans le cas contraire, une sursélectivité ne permettant pas une inhibition d'un large spectre d'Entérovirus peut être observée. Enfin, des résistances, qu'elles soient d'origine ou liées à l'adaptation face à la réponse médicamenteuse, ont été décrites pour un grand ensemble de cibles virales.

Ainsi, dans cette section, nous présenterons les avantages et contraintes de notre choix de synthèse d'un « *capsid binder* » en le comparant avec les autres solutions médicamenteuses envisagées.

1) Accès aux cibles visées par les antiviraux selon l'étape de réplication inhibée.

Les Entérovirus, comme tous les virus, ont besoin d'une cellule hôte pour pouvoir se multiplier avant d'être expulsés et contaminer d'autres cellules. L'ensemble de ces virus ont un cycle de réplication semblable. De plus, lors de chaque étape, des moyens sont appliqués afin de rendre furtif les différentes protéines virales. Ces protéines promouvant la prolifération des infections à Entérovirus vont avoir un intérêt à différentes étapes du cycle viral.

Inhibiteurs de l'entrée du virus au sein des cellules et du relargage de l'ARN viral.

L'inhibition d'une protéine de la capside en amont de son internalisation ou d'un récepteur, empêchant la liaison à la cellule hôte, permet de faciliter l'interaction entre le ligand et la cible, en limitant le nombre de barrières à franchir. En effet, atteindre une protéine avant l'entrée du virus dans la cellule permet de ne pas avoir à assurer le passage de la membrane plasmique. Les seules protéines accessibles sont les protéines VP1, VP2 et VP3. Leur inhibition bloque l'entrée

du virus dans la cellule et le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme. A ce jour, seules des structures propres aux protéines VP1 et VP3 ont été ciblées : à savoir le sommet de l'axe quintuple de la capside (VP1) et des poches hydrophobes (dans le canyon, et associée à l'arginine R219 – PDB code : 1COV).

Parmi ces cibles, la poche hydrophobe associée à R219 et le sommet de l'axe quintuple semblent être accessibles sans autre barrière à franchir. De même, les inhibiteurs interagissant sur les récepteurs de la membrane ont une action directe en étant reconnus par la cellule. Au contraire, la poche hydrophobe, dite classique, située dans le canyon de la capside, est souvent liée à un analogue d'acide gras, comme les **acides myristoléique**, **palmitique** ou **stéarique**, ou des sucres (**saccharose**…) [**Figure 17**].[440,441] Ce co-facteur au sein de la poche permet de la maintenir ouverte dans la majorité des Entérovirus. Cette conformation « ouverte » permet la reconnaissance par la membrane mais aussi la liaison avec les « *capsid binders* ». Néanmoins, la nécessité, la plupart du temps, de substituer le co-facteur par l'inhibiteur ne semble pas être limitant dans l'accès à la poche hydrophobe située dans le canyon puisque la grande majorité des co-cristallisations, en présence de ces inhibiteurs, ne présente plus de cofacteur.[442]

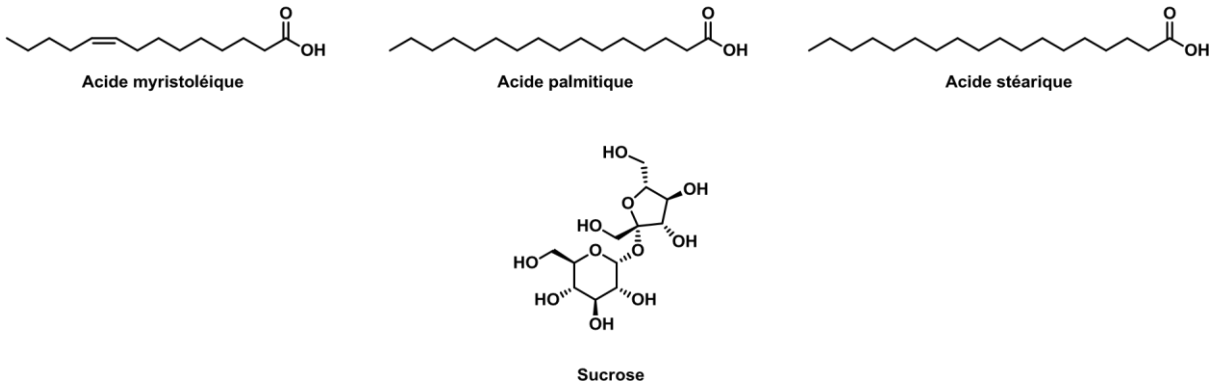


Figure 17. Structure des co-facteurs identifiés de la poche hydrophobe dite 'classique'.

[440] Bergelson, J.M.; Coyne, C.B. *Adv. Exp. Med. Biol*. **2013**, 790, 24-41. DOI: 10.1007/978-1-4614-7651-1_2.

[441] Büttner, C.R.; Spurný, R.; Füzik, T.; Plevka, P. *Commun. Biol*. **2022**, *5* (1), 898. DOI: 10.1038/s42003-022-03863-2.

[442] Grant, R.A.; Hiremath, C.N.; Filman, D.J.; Syed, R.; Andries, K.; Hogle, J.M. *Curr. Biol*. **1994**, 4 (9), 784-797. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00176-7.

Inhibiteurs de la réplication, de la traduction de l'ARN viral et de l'assemblage des nouveaux virus.

Les inhibiteurs des protéines agissant pour la réplication, la traduction ou l'assemblage des Entérovirus doivent pouvoir passer au travers de la membrane plasmique pour interagir avec leurs cibles. Plusieurs voies d'entrée sont possibles, comme les transports actifs ou passifs, l'endocytose ou l'attachement à des enzymes métabolisant les composés, facilitant l'entrée des pro-médicaments.[443]

Outre ce paramètre plus longuement développé dans la partie consacré à la pharmacocinétique, des vésicules à double membrane (VDM) ont été identifiées lors de la réplication de l'ARN ou l'assemblage de nouveaux virions. Comme détaillé dans la partie décrivant ces étapes, ces vésicules permettent la furtivité du matériel viral au sein de la cellule, réduisant sa détection par le système immunitaire. Cependant, cela permet aussi de mettre un obstacle entre les organes de réplication ou les nouvelles protéines traduites et les inhibiteurs ciblant ces étapes.

Par conséquent, il semble plus compliqué d'avoir accès aux protéines virales ou humaines présentes dans le cytoplasme par rapport à celles de la capside (VP1, VP2, VP3). De plus, les cibles agissant lors de la réplication de l'ARN ou l'assemblage des nouveaux virions ont souvent le besoin d'agir au sein des VDM et donc de traverser leur membrane double. Le choix de synthétiser des « *capsid binders* » permet donc de réduire les obstacles et barrières à devoir traverser afin d'inhiber les Entérovirus.

[443] van Breemen, R.B.; Li, Y. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2005, 1 (2), 175 85. DOI: 10.1517/17425255.1.2.175.

2) Sélectivité des inhibiteurs.

Les inhibiteurs sont structurés afin de cibler des protéines spécifiques. Cependant, deux limites sont à éviter, à savoir une sélectivité trop accrue restreignant le spectre des Entérovirus inhibés ou au contraire un manque de spécificité déclenchant des effets secondaires. Nous présenterons ces différents aspects dans cette section.

Sélectivité trop importante – Spectre de virus inhibés restreints.

Une première contrainte est l'obtention d'un composé trop sélectif d'une cible. Ce travail de thèse se portant sur le développement d'un inhibiteur à large spectre, ce dernier ne doit pas avoir une trop grande affinité avec une cible provenant d'un type de virus, afin de pouvoir être efficace sur l'ensemble des virus appartenant au genre Entérovirus.

Les entérovirus (EV) sont monophylétiques en analysant toutes les parties du génome, hormis celle non-codante à l'extrémité 5'.[444] Cependant, la variabilité génétique dépend de la nature du génome. Pour l'ensemble des types d'EV-A étudiés, les parties P2 et P3 de la polyprotéine ont un pourcentage de partie commune entre 92 et 96%. Bien que la ressemblance nucléotidique soit inférieure (60 à 80%), les acides aminés correspondants sont semblables. De même, pour EV-B, nous avons un taux de similarité de 92,9 à 99,0% pour ces mêmes parties.[445] Pour la partie codante pour la capside, la ressemblance est bien moindre (de 55,4 à 83,3% pour EV-A, de 68,5 à 87,0% pour EV-B).[428,429] Cela peut s'expliquer par le fait que les mutations des protéines de la surface accessible soient plus fréquentes. En effet, plus ces protéines sont spécifiques et moins elles ne peuvent être reconnues par le système immunitaire spécifique. Cependant, les variations observées chez les RV permettent de déduire que les mutations, dites « naturelles », ne concernent pas la poche hydrophobe ciblée par la grande majorité des « *capsid binders* ».[446] Une autre étude a permis de généraliser à toutes les espèces d'Entérovirus cette

---

[444] Oberste, M.S.; Peñaranda, S.; Maher, K.; Pallansch, M.A. *J. Gen. Virol*. **2004**, *85* (Pt 6), 1597-1607. DOI: 10.1099/vir.0.79789-0.

[445] Oberste, M.S.; Maher, K.; Pallansch, M.A. *J. Virol*. **2004**, 78 (2), 855-867. DOI: 10.1128/jvi.78.2.855867.2004.

[446] Ledford, R.M.; Patel, N.R.; Demenczuk, T.M.; Watanyar, A.; Herbertz, T.; Collett, M.S.; Pevear, D.C. *J. Virol*. **2004**, *78* (7), 3663-3674. DOI: 10.1128/jvi.78.7.3663-3674.2004.

conservation de la poche hydrophobe.[447] Parmi les vingt-six acides aminés d'EV-A71 interagissant avec les « *capsid binders* », vingt-deux ont une forte conservation à travers les autres génotypes. De plus, une étude a aussi mis en évidence des zones proches des sommets de l'axe quintuple et de l'axe triple suffisamment conservées pour être potentiellement des cibles universelles contre les Entérovirus.[448]

Dans ce cas-là, les protéines de la surface de la capside semblent être défavorisées. En effet, celles agissant après l'internalisation de la cellule sont davantage conservées d'un virus à l'autre. Elles ont alors plus de chance d'inhiber un large spectre malgré une haute sélectivité envers un type de virus.

Au contraire, comme présenté dans la section précédente, les immunoglobulines ou anticorps peuvent être reconnus par certains types de virus mais pas d'autres, voire être spécifiques de certaines souches, comme cela est précisé dans le **Chapitre I**, lors de la description des limites de la classification selon leur génotype. De même, au sein même de notre laboratoire, des composés ciblant les rhinovirus (RV) ont été développés.[449] Leur spécificité, limitant leur action uniquement aux RV et non à tous les Entérovirus, sera détaillée dans le **Chapitre III**. Cependant, les « *capsid binders* » peuvent toutefois être considérés comme potentiellement avoir un large spectre contre les Entérovirus. Certains composés évalués en essais cliniques l'ont confirmé. Nous les présenterons dans le **Chapitre VI**. C'est pourquoi, notre choix de synthétiser un « *capsid binder* » ne nous empêche pas d'atteindre l'objectif de ce projet de thèse. Au contraire, la connaissance des différentes interactions sur un grand ensemble de virus nous permet de développer, avec un grand appui de la littérature, des composés efficaces contre les Entérovirus.

---

[447] Huang, Y.L.; Lin, T.M.; Wang, S.Y.; Wang, J.R. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. **2022**, *55* (4), 590 597. DOI: 10.1016/j.jmii.2022.01.004.

[448] Wang, L.; Zhu, M.; Fang, Y.; Rong, H.; Gao, L.; Liao, Q.; Zhang, L.; Dong, C. *Sci. Rep*. **2021**, *11* (1), 5701. DOI: 10.1038/s41598-021-84891-6.

[449] Da Costa, L. *Pharmacochimie de nouveaux inhibiteurs contre les infections à rhinovirus*. Aix Marseille Université. Thèse soutenue le 19 octobre 2017. Lien.

Manque de sélectivité et effets secondaires.

La principale manifestation de manque de sélectivité d'un principe actif est l'apparition d'effets secondaires. En effet, les petites molécules peuvent avoir de multiples cibles. L'inhibition ou l'exacerbation de l'activité de protéines non ciblées induisent ainsi des effets indésirables pouvant s'exprimer à l'échelle de l'organisme. Par exemple, la **fluoxétine** cible les neurones présynaptiques dans sa fonction d'antidépresseur mais se lie à la protéine 2C des Entérovirus dans sa fonction antivirale.[450,451] Le **saquinavir**, quant à lui, est un inhibiteur de protéases dont la commercialisation a été stoppée le 15 novembre 2017 à cause de risques de troubles du rythme cardiaque.[452] De même, certains composés agissant contre les Entérovirus, évalués dans des essais cliniques, ont aussi été abandonnées à cause d'un manque de sélectivité. Nous les présenterons dans le **Chapitre VI**.

[450] Sohel, A.J.; Shutter, M.C.; Patel, P.; Molla, M. *Fluoxetine*. ***StatPearls [Internet]***. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida, U.S.A. 2024. PMID: 29083803.

[451] Bauer, L.; Manganaro, R.; Zonsics, B.; Strating, J.R.P.M.; El Kazzi, P.; Lorenzo Lopez, M.; Ulferts, R.; van Hoey, C.; Maté, M.J.; Langer, T.; Coutard, B.; Brancale, A.; van Kuppeveld, F.J.M. *ACS. Infect. Dis*. **2019**, *5* (9), 1609-1623. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00179.

[452] INVIRASE (saquinavir) : arrêt de commercialisation le 15 novembre 2017. VIDAL. Lien.

3) Résistances virales.

Un autre paramètre à prendre en compte dans le choix de cible est la stabilité de la région à viser. En effet, l'ARN viral peut être facilement modifié, ce qui, si ces mutations sont viables, forme de nouvelles souches voire des nouveaux types de virus.[453] Les mutations peuvent être provoquées soit avec la recombinaison propre aux Entérovirus, soit par sélection des virus face à une pression environnementale.

Caractère hautement recombinant des Entérovirus.

Les Entérovirus, en tant que virus à ARN, ont une possibilité plus importante de mutation. La protéine 3D (pro-3D) / ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) n'a pas de propriété de « relecture » corrigeant ses erreurs lors de la réplication de l'ARN viral.[437] Cela explique le nombre important de mutations au cours de la réplication du génome viral. Le taux d'erreur a été évalué entre 10^{-4} et 10^{-3} erreurs/nucléotide/cycle de réplication.[454] Les mutations spontanées viables du génome peuvent impliquer des changements de conformation des protéines finales, et donc potentiellement empêcher les interactions entre antiviraux et leur cible.

Résistances acquises et sélection d'un virus résistant.

Les recombinaisons hautement probables du génome viral permettent aussi la résistance de virus face à des pressions de sélections environnementales, comme celles occasionnées par un antiviral ou une caractéristique de l'hôte infecté. Il existe différentes fréquences d'apparition de résistances selon les cibles et les types de virus.

Par exemple, lors de prélèvements, certains virus ont paru s'adapter au milieu de culture.[455] Lors de culture sur les lignées cellulaires RD-A ou Vero, il a été démontré que les EV-A71 possédant des mutations du phénotype de liaison au sulfate d'héparane sont préférentiellement sélectionnés. Cette omniprésence est caractérisée par une exacerbation de ce moyen de reconnaissance par les cellules.

---

[453] Falah, N. *Identification et caractérisation de nouveaux inhibiteurs peptidiques de la protéase 2A du rhinovirus humain*. Thèse soutenue le 01/02/2013. Lien.

[454] Harvala, H.; Simmonds, P. *J. Clin. Virol*. **2009**, 45 (1), 1-9. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.03.009.

[455] Kobayashi, K.; Mizuta, K.; Koike, S. *PLoS Pathog*. **2020**, 16 (3), e1008428. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008428.

D'autre part, la majorité des évaluations préliminaires d'efficacité antivirale sont effectuées par une unique mise en contact entre le composé étudié et les cellules infectées.[456] Cependant, l'hostilité du milieu causée par les antiviraux peut aussi être la raison principale d'apparition de résistances. De manière non exhaustive, nous reportons ici quelques exemples de mutations reportées sur différentes cibles pour lutter contre les Entérovirus.

Les protéases des Entérovirus ont pu être évaluées de la sorte. La protéase 3C (pro-3C) a été donc placée plusieurs fois dans un milieu comportant du **rupintrivir**.[457] Au bout de huit passages, l'activité de ce composé à chuté. Ainsi, plusieurs mutations de la pro-3C comme les mutations T1556I (sur E1) ou V104I (sur EV-D68) ont été décrites comme favorisant des résistances en présence de ces inhibiteurs.[458]

Des mutations ont aussi été décrites pour la protéase 2A après vingt passages dans des milieux contenant de la **fluoxétine** telles que les mutations C179F, I227V, le triple-mutant A224V-I227V-A229V, et F190L.[459,460]

Pour ce qui est des protéines de la capside, elles sont réputées pour être plus sensibles aux mutations. Des tests similaires ont cependant été réalisés pour les « *capsid binders* » ciblant la poche hydrophobe de la protéine VP1 (VP1). L'exposition à huit passages de milieux comportant du **pléconaril** induit plusieurs mutations de la VP1, comme les mutations V69A, R667G et F809L (sur E1). [441,442,461] De même, les mutants résistants I113, V123 (sur EV-A71)

---

[456] Laajala, M.; Reshamwala, D.; Marjomäki, V. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2020**, 24 (8), 745-757. DOI: 10.1080/14728222.2020.1784141.

[457] Ianevski, A.; Frøysa, I.T.; Lysvand, H.; Calitz, C.; Smura, T.; Schjelderup Nilsen, H.J.; Høyer, E.; Afset, J.E.; Sridhar, A.; Wolthers, K.C.; Zusinaite, E.; Tenson, T.; Kurg, R.; Oksenych, V.; Galabov, A.S.; Stoyanova, A.; Bjørås, M.; Kainov, D.E. *Antiviral Res*. **2024**, *224*, 105842. DOI: 10.1016/j.antiviral.2024.105842.

[458] Sun, L.; Meijer, A.; Froeyen, M.; Zhang, L.; Thibaut, H.J.; Baggen, J.; George, S.; Vernachio, J.; van Kuppeveld, F.J.; Leyssen, P.; Hilgenfeld, R.; Neyts, J.; Delang, L. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2015**, *59* (12), 7782-7785. DOI: 10.1128/AAC.01375-15.

[459] Zuo, J.; Kye, S.; Quinn, K.K.; Cooper, P.; Damoiseaux, R.; Krogstad, P. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2015**, *60* (3), 1615-1626. DOI: 10.1128/AAC.02646-15.

[460] Bauer, L.; Manganaro, R.; Zonsics, B.; Strating, J.R.P.M.; El Kazzi, P.; Lorenzo Lopez, M.; Ulferts, R.; van Hoey, C.; Maté, M.J.; Langer, T.; Coutard, B.; Brancale, A.; van Kuppeveld, F.J.M. *ACS Infect. Dis*. **2019**, *5*, (9), 1609-1623. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00179.

[461] Groarke, J.M.; Pevear, D.C. *J. Infect. Dis*. **1999**, *179* (6), 1538-1541. DOI: 10.1086/314758.

et L113 (sur CVA16) ont été observés après exposition à des dérivés des séries **ALD** et **NLD**.[462] Enfin, d'autres résistances par des mutations induites par la présence du **pirodavir**, de son dérivé le **vapendavir** ou du composé **V-073** ont été décrites.[463,464,465]

Le fait de n'avoir pas identifié de mutations avec les inhibiteurs des autres protéines virales, telles que la protéine 3D, ne signifie pas que cela ne se produit pas. En effet, aucune étude de ce type n'a été réalisée.

Outre la recherche de nouveaux antiviraux ou la régulation de leur utilisation, la combinaison d'antiviraux afin de toucher plusieurs cibles à la fois peut être un levier pour éviter l'émergence de résistances aux inhibiteurs. Que ce soit la formulation d'associations de médicaments ou la conception d'un agent unique touchant plusieurs cibles à la fois, ces options seront décrites dans le **Chapitre VI**. Toutes les combinaisons ne sont pas équivalentes. La poche hydrophobe du canyon de la capside est, dans la plupart des cas, combinée à d'autres cibles provoquant des effets synergiques, démultipliant l'efficacité des « *capsid binders* ».

De plus, il faut également se méfier de ces mutations, qui, dans de nombreux cas, peuvent conduire à une perte de l'effet pathogène du virus ou au retour à une prévalence des virus non résistants lors de l'absence prolongée de traitement.[441,466]

---

[462] Kelly, J.T.; De Colibus, L.; Elliott, L.; Fry, E.E.; Stuart, D.I.; Rowlands, D.J.; Stonehouse, N.J. *Antiviral Res*. **2015**, *124*, 77-82. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.10.006.

[463] Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; van Eemeren, K.; Stokbroekx, R.; Janssen, P.A. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1992**, 36 (1), 100-107. DOI: 10.1128/AAC.36.1.100.

[464] Feil, S.C.; Hamilton, S.; Krippner, G.Y.; Lin, B.; Luttick, A.; McConnell, D.B.; Nearn, R.; Parker, M.W.; Ryan, J.; Stanislawski, P.C.; Tucker, S.P.; Watson, K.G.; Morton, C.J. *ACS Med. Chem. Lett*. **2012**, 3 (4), 303-307. DOI: 10.1021/ml2002955.

[465] Liu, H.M.; Roberts, J.A.; Moore, D.; Anderson, B.; Pallansch, M.A.; Pevear, D.C.; Collett, M.S.; Oberste, M.S. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2012**, 56 (11), 5568-5574. DOI: 10.1128/AAC.00539-12.

[466] Pevear, D.C.; Hayden, F.G.; Demenczuk, T.M.; Barone, L.R.; McKinlay, M.A.; Collett, M.S. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2005**, 49 (11), 4492-4499. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4492-4499.2005.

Chapitre III : Contexte et méthodes utilisées dans ce projet

A. Présentation des travaux précédents à ce projet de thèse.

1) Contexte d'initiation du projet.

Lors d'un screening haut débit réalisé au Rega Institute for Medical Research, à Louvain (Belgique), des composés de la chimiothèque de l'équipe Pharmaco-Chimie Radicalaire de l'Institut de Chimie Radicalaire, des activités virales ont été observées.[467] Parmi les virus testés (cytomégalovirus, virus de l'immunodéficience humaine…), les Entérovirus, et plus particulièrement les rhinovirus humains A et B (RV-A et -B), ont été inhibés avec une activité antivirale de l'ordre du micromolaire et un index de sélectivité de l'ordre de la centaine.

L'activité des composés est évaluée selon leur concentration efficace médiane (CE_{50}), à savoir la concentration pour laquelle 50% des virus ont été inhibés. Dans la même mesure, la cytotoxicité est évaluée par la concentration cytotoxique médiane (CC_{50}), à savoir la concentration pour laquelle 50% des cellules sont mortes à l'issue du test. L'index de sélectivité (IS) est le rapport entre la CC_{50} et la CE_{50}.

Après synthèse de molécules di-benzyliques, offrant une plus grande possibilité de modulations, le composé **LPCRW_0005** a été évalué avec un potentiel micromolaire contre RV-B14.[468] Des relations structure-activité ont été identifiées [**Figure 18**].[469] La fonction nitrile du composé assure son activité contre les RV-B14. Contrairement aux substitutions trifluorométhyle et phényle, elle n'a pas induit de cytotoxicité. Sa position *para* est aussi importante. En effet, les autres positions de substitution réduisent l'efficacité du composé. De même, le cycle aromatique substitué 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzène assure l'activité du composé. Enfin, la flexibilité ainsi que la présence d'un alcool en α du cyanophényle est aussi important pour obtenir une activité anti-rhinovirale.

L'efficacité à large spectre du composé **LPCRW_0005** a aussi été évaluée. Il est actif de l'ordre du micromolaire sur RV-A9, RV-B14, RV-A59, RV-A63, RV-B70, RV-B72 et RV-B86.

---

[467] Roche, M. *Pharmacochimie radicalaire à visée antirhinovirale*. Aix-Marseille Université. Thèse soutenue le 18 décembre 2013. Lien.

[468] Roche, M.; Lacroix, C.; Khoumeri, O.; Franco, D.; Neyts, J.; Terme, T.; Leyssen, P.; Vanelle, P. *Eur. J. Med. Chem*. **2014**, *76*, 445-459. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.01.034.

[469] Lacroix, C.; Querol-Audí, J.; Roche, M.; Franco, D.; Froeyen, M.; Guerra, P.; Terme, T.; Vanelle, P.; Verdaguer, N.; Neyts, J.; Leysse, P. *J. Antimicrob. Chemother*. **2014**, *69* (10), 2723-2732. DOI: 10.1093/jac/dku200.

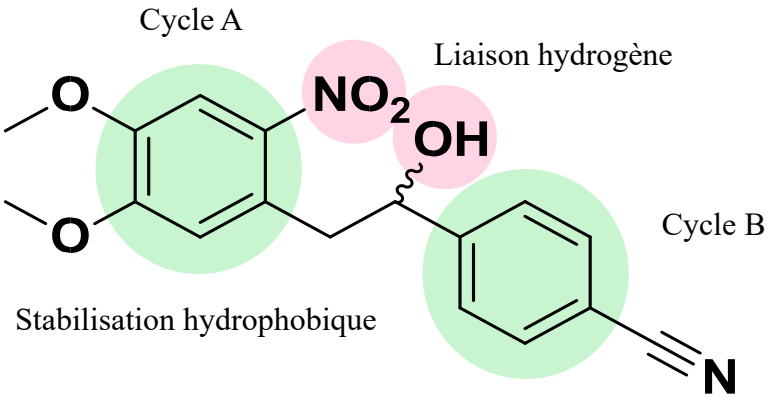


Figure 18. Structure du composé LPCRW_0005 et ses relations structure-activité associées.

2) Mécanisme d'action du LPCRW_0005.

Pour étudier le mécanisme d'inhibition du **LPCRW_0005** et de ses dérivés, des études cinétiques du mécanisme d'action (tests dit de « *Time-of-drug addition* ToDA ») ont été réalisés par l'équipe du Pr. J. Neyts du Rega Institute for Medicinal Research de Louvain.[453] Ils confirment que le **LPCRW_0005** agit durant la phase précoce de la réplication.

Pour poursuivre cette analyse, une co-cristallisation a été réalisée entre le composé **LPCRW_0005** et la capside d'un RV-B14.[453] La structure, longue de 14 ± 3 Å, a bien été identifiée au sein de la poche hydrophobique de la protéine VP1 de la capside, caractéristique des « *capsid binders* ». L'étude des données cristallographiques a permis de mettre en évidence des interactions [**Figure 19**]. Le cycle diméthoxylé forme des interactions hydrophobes (stabilisation hydrophobe et π – π stacking) avec la phénylalanine F186 et les tyrosines Y128 et Y152. De même, le cyanophényle possède le même type d'interactions avec l'isoleucine I104, la leucine L106, la méthionine M221 et la tyrosine Y197. Enfin, l'alcool secondaire, sur le carbone asymétrique en conformation *(S)*, forme une liaison hydrogène (2,9 Å) avec le phénol de la tyrosine Y128.

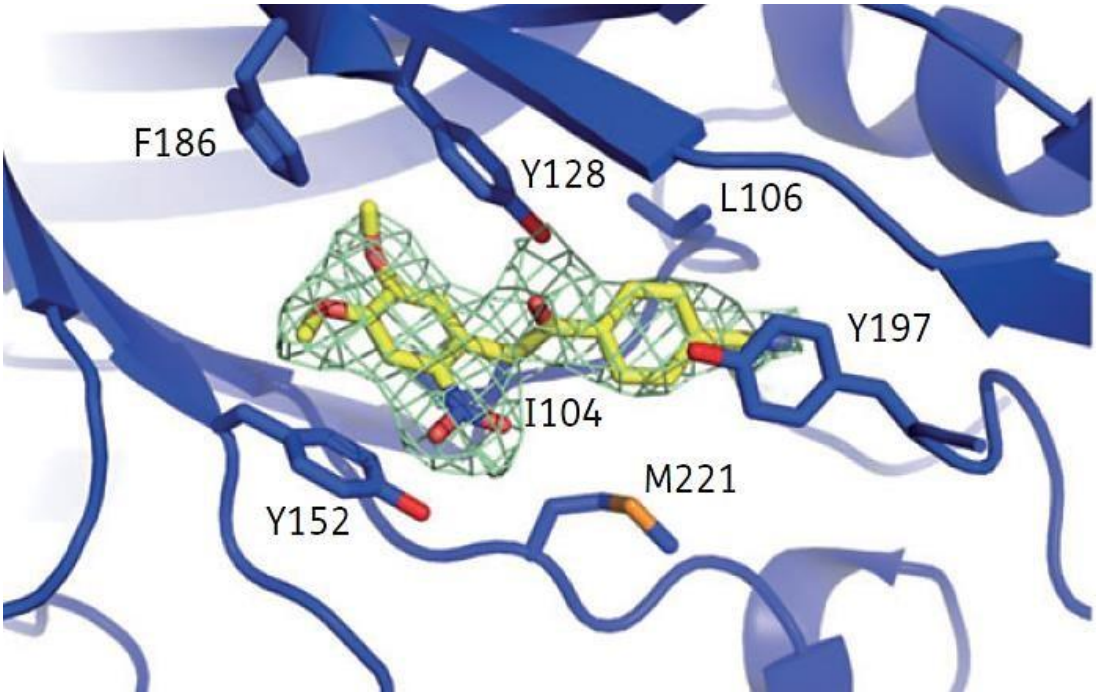


Figure 19. Représentation du mode de liaison du composé LPCRW_0005 dans la capside d'un RV-B14 à partir de la co-cristallisation réalisée (PDB code : 4PDW).

Cependant, lors de la co-cristallisation, des molécules de glycérol, aidant la réalisation de cette expérience, ont été aussi détectées de part et d'autre de la molécule. Cette observation signifie que le **LPCRW_0005** ne remplit que partiellement la poche hydrophobe. De plus, force est de constater que les autres « *capsid binders* » présentés ci-dessus possèdent un volume stérique plus important que le **LPCRW_0005**.

3) Pharmacomodulations réalisées pour augmenter l'affinité du LPCRW_0005 avec la poche hydrophobe de la capside.

Modulations des extrémités du LPCRW_0005.

Afin d'augmenter l'activité antirhinovirale, plusieurs modulations des extrémités du hit **LPCRW_0005** ont été envisagées pour allonger sa structure et ainsi remplir les vides identifiés ci-dessus [**Figure 19**]. La fonction cyanure sur le cycle B forme le côté *pore* de la molécule tandis que le diméthoxyphényle (cycle A) est nommé côté *toe-end* [**Figure 20**].

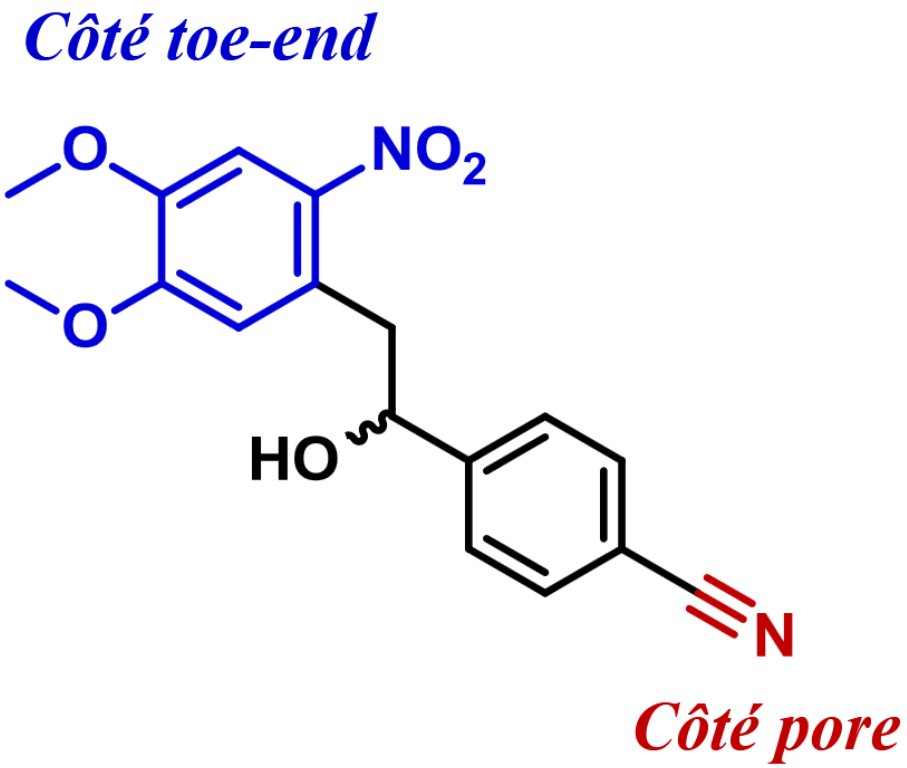
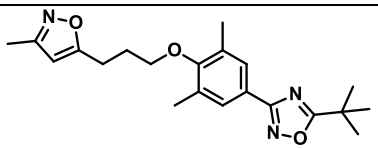
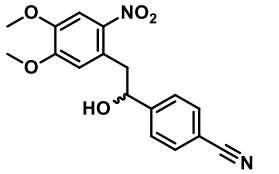
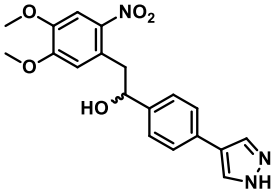
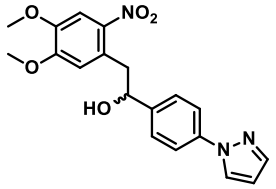
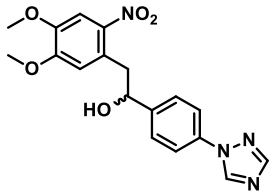
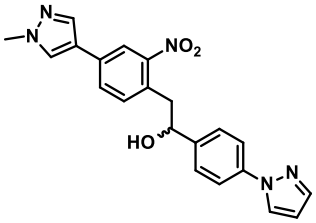
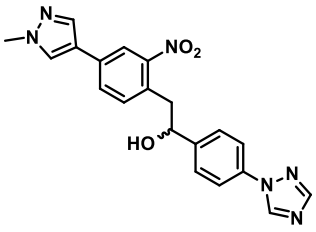


Figure 20. Représentation des côtés *toe-end* (fermé – en bleu foncé) et *pore* (ouvert – en rouge sombre) de la capside. Le code couleur utilisé ici sera maintenu dans l'ensemble de ce manuscrit.

Tout d'abord, le côté *pore* a été modulé avec des cycles aromatiques, portant eux même des substitutions ou un hétéroatome aux trois positions *ortho*, *méta* et *para*. Obtenant une meilleure affinité avec la poche hydrophobe que le **LPCRW_0005**, une seconde série de molécules a été synthétisée avec des hétérocycles aromatiques sur le cycle B, ainsi que leurs analogues saturés. Les substitutions 1,2,4-triazole (composé **57**), 1,2- et 3,4-pyrazole (composés **56** et **55**) ont eu de meilleurs résultats [**Tableau 8**].

Tableau 8. Comparaison des activités et des cytotoxicités des différents composés les plus efficaces issus de la modulation de la fonction cyanure avec celles du LPCRW_0005.

Composé	Structure	$CE_{50,HeLa}$ (RV-B14)	$CC_{50,HeLa}$	IS*
Pléconaril		0,3 ± 0,1 µM	> 131 µM	> 437
LPCRW_0005		2,0 ± 0,6 µM	184 ± 30 µM	92
55		0,76 ± 0,09 µM	> 271 µM	> 356
56		0,6 ± 0,2 µM	> 271 µM	> 467
57		0,9 ± 0,2 µM	> 271 µM	> 295
78		0,042 ± 0,010 µM	> 247 µM	> 5881
81		0,028 ± 0,013 µM	> 256 µM	> 9143

* Index de sélectivité.

Une interaction π – π stacking entre ces hétérocycles aromatiques et la tyrosine Y197 a été supposée par docking pour expliquer la meilleure affinité avec la poche hydrophobe. De même, l'addition d'un hétérocycle sur le cycle A conduit à une meilleure activité. Ainsi les molécules, avec un 1-méthylpyrazole combiné à un 1,2-pyrazole ou un 1,2,4-triazole à l'autre extrémité (composés **78** et **81**), possèdent une meilleure activité [**Tableau 8**]. Le méthyle permet d'occuper le reste de la poche hydrophobe, interagissant par stabilisation hydrophobe avec l'alanine A160, l'isoleucine I130 et la valine V176. Ces derniers composés ont permis aussi d'élargir le spectre des virus inhibés par comparaison avec le **LPCRW_0005**.

Etudes des différents énantiomères des nouvelles molécules antirhinovirales.

Outre l'allongement du **LPCRW_0005** pour former de nouvelles interactions avec la capside, le rôle du carbone asymétrique du linker a aussi été étudié.

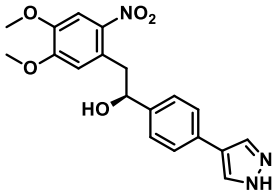
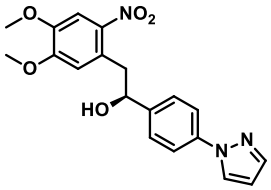
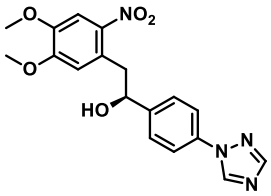
L'énantiomère (*S*) reste celui le plus actif dans les molécules présentées ci-dessus [**Tableau 9**].[470] En effet, dans cette configuration l'alcool secondaire du linker forme une liaison hydrogène avec la tyrosine Y128. Au contraire, dans sa conformation (*R*), l'alcool vient interagir de la même manière avec le solvant ce qui déstabilise la liaison non covalente composé – capside [**Schéma 23**].

4) Elargissement du spectre des rhinovirus aux Entérovirus.

La plupart des composés de référence utilisés pour le projet ont des activités sur l'ensemble des Entérovirus, et non uniquement contre les rhinovirus (RV). La capside des entérovirus (EV) possède le même système d'ouverture de la poche hydrophobe associée aux « *capsid binders* », permettant l'inhibition de l'entrée ou du relargage de l'ARN viral au sein du cytoplasme de l'hôte.

[470] Da Costa, L.; Scheers, E. ; Coluccia, A.; Casulli, A.; Roche, M.; Di Giorgio, C.; Neyts, J.; Terme, T.; Cirilli, R.; La Regina, G.; Silvestri, R.; Mirabelli, C.; Vanelle, P. *J. Med. Chem*. **2018**, *61* (18), 8402-8416. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00931.

Tableau 9. Comparaison des activités et des cytotoxicités des énantiomères (*S*) des molécules du tableau 8.

Composé (*S*)	Structure	$CE_{50,HeLa}$ (RV-B14)	$CC_{50,HeLa}$	IS*
55		0,2 ± 0,1 µM	> 271 µM	> 1084
56		0,3 ± 0,1 µM	> 271 µM	> 774
57		0,3 ± 0,1 µM	> 271 µM	> 797

* Index de sélectivité.

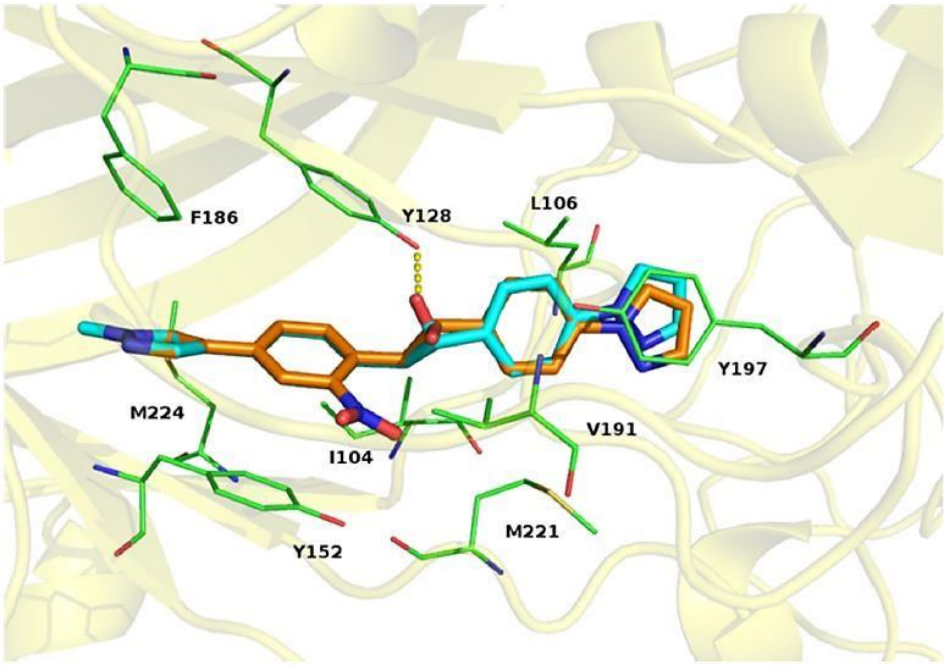


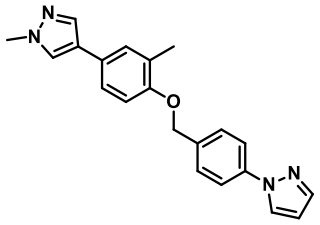
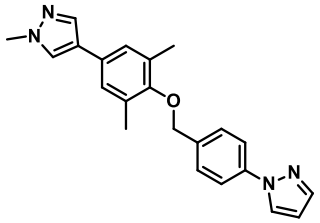
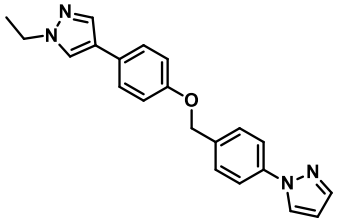
Schéma 23. Différentes conformations de l'alcool secondaire et ses interactions avec la capside (en cyan, l'énantiomère (*S*), et en orange, l'énantiomère (*R*)). Schéma provenant de la référence 454.

Comme précisé ci-dessus, une interaction spécifique entre la tyrosine Y128 et l'alcool secondaire du linker a été décrite. Cependant, cette tyrosine est spécifique aux RV et est substituée la plupart du temps par une phénylalanine chez les EV. Entre autres, le linker, une fois au sein de la capside de RV-B14, a un environnement hydrophobe constitué des acides aminés I130 et V176. Ces derniers sont conservés dans la majorité des RV, et ont des analogues hydrophobes chez les EV. C'est pourquoi, des études préliminaires ont été menées en modulant la partie centrale de la molécule (différents substituants outre le groupe nitro, avec un éther à la place du linker éthanol). Ainsi le composé **134** a démontré une activité contre RV-B14 alors que les dérivés **131** et **132** ont été actifs contre RV-A2 [**Tableau 10**].

Une étude des relations structure-activité sur les composés WIN a montré que le linker éther interagissait avec respectivement un couple valine – tyrosine et leucine – isoleucine pour les RV-B14 et RV-A2. Afin de se démarquer des molécules dérivées des composés WIN, de garder des propriétés analogues à la fonction éther mais surtout de réduire la polarité du linker, nous avons donc orienté notre choix de stratégie de synthèse vers des molécules portant un linker thioéther.

Ainsi nous détaillerons dans la section suivante les différentes méthodes utilisées dans chacun des chapitres à venir. Elles détailleront les différentes stratégies appliquées à la pharmacomodulation de nos composés, aux différentes études *in silico* et *in vitro* pour la prédiction et la détermination de leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques ainsi qu'à la réflexion et les perspectives afin d'augmenter l'activité des composés inhibant les Entérovirus, en visant plusieurs cibles à la fois. Enfin, dans la dernière section, nous nous concentrerons sur les différentes réactions utilisées lors des différentes synthèses, afin de comprendre leurs mécanismes réactionnels et les choix des réactifs utilisés dans ce projet.

Tableau 10. Comparaison des activités et des cytotoxicités des composés possédant un linker éther.

Composé	Structure	$CE_{50,HeLa}$	$CC_{50,HeLa}$	IS*
131		< 1,7 µM (RV-B14)	> 100 µM	> 58
132		< 1,7 µM (RV-B14)	> 100 µM	> 58
134		< 2,4 µM (RV-B14)	> 100 µM	> 41

* Index de sélectivité.

B. Méthodes utilisées.

Dans cette partie, nous détaillerons les différentes méthodes utilisées dans les chapitres suivants. Ces derniers seront consacrés aux principaux résultats obtenus et travaux de recherche menés lors de ce projet de thèse. Une première partie présentera les différentes pharmacomodulations réalisées sur l'analogue thioéthéré du composé **134**. Ici, nous aborderons la stratégie de rationalisation choisie pour mener à bien notre objectif d'optimisation de l'activité antivirale de nos composés. Une seconde partie décrira les études et optimisations envisagées des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés synthétisés. Dans cette section, nous nous concentrerons sur les méthodes de prédictions *in silico*, de vérification par des expériences *in vitro* et par l'optimisation grâce à l'intelligence artificielle de ces paramètres. Enfin, une dernière partie étudiera les possibilités d'augmentation du pouvoir antiviral de nos composés en ciblant plusieurs protéines virales ou de l'hôte promouvant la réplication virale.

1) Pharmacomodulation de nos composés en vue de l'obtention d'un inhibiteur à large spectre.

Afin de moduler de manière rationnelle nos composés, nous modifierons de manière séquentielle les pharmacophores aromatiques de nos composés. En effet, les interactions les plus fortes (liaisons hydrogène et π – π stacking) proviennent de ces structures chimiques. Ainsi le linker thioether restera dans chacune de nos modifications structurelles.

Dans la conception de nos molécules, nous utiliserons une stratégie de *structure-based drug design* avec un retour sur les prédictions afin de boucler et améliorer chaque étape du cycle [**Figure 21**].

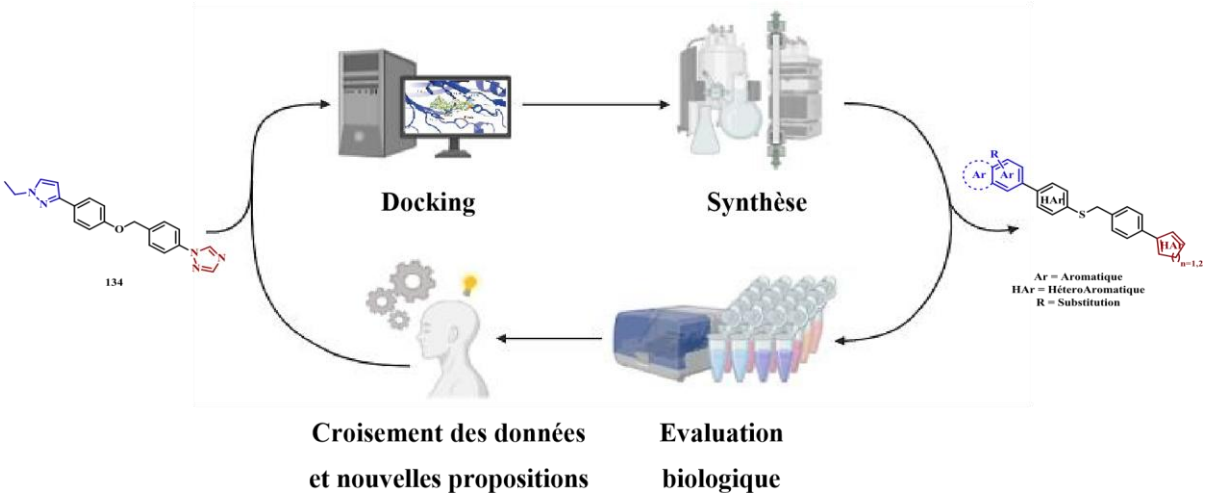


Figure 21. Présentation du cycle d'optimisation de notre stratégie de pharmacomodulation de nos composés à visée antivirale.

Dans un premier temps, les modulations envisagées sont modélisées dans la poche hydrophobe de la capside de l'EV-A71 (code PDB = 3ZFG) par l'équipe du D^{r}. Antonio Coluccia. Cette approche permet de prédire le mode de liaison des différents composés envisagés et d'anticiper les possibles types d'interactions avec la capside. Cette modélisation utilise la conformation de l'EV-A71 adaptée de celle de la capside du RV-B14 liée avec le **LPCRW_0005**. Une fois la conformation obtenue, les différentes molécules sont « placées » en son sein. Les molécules sont considérées comme des objets mobiles pouvant s'adapter à la conformation fixe de la capside.

En fonction de ces résultats, les composés ayant une interaction maximale avec la poche hydrophobe sont ensuite synthétisés. Pour cela, nous utilisons des réactions simples et ayant de bons rendements afin de facilité la potentielle industrialisation du processus. De même, plusieurs stratégies de synthèses ont été développées afin de réduire le nombre d'étapes et de réactions effectuées pour atteindre ces modulations.

Les composés, une fois synthétisés, sont évalués pour déterminer différents paramètres biologiques (activité antivirale, cytotoxicité, mutégénicité). Cette partie est réalisée en partenariat avec l'équipe du D^{r}. Franck Touret, et de la D^{re}. Carole di Giorgio. Les tests sont effectués sur différentes lignées cellulaires, à savoir les *Chinese Hamster Ovary* (CHO), les *Medical Research Council cell strain 5* (MRC-5) et les rhabdomyosarcomes (RD) selon les tests à effectuer.

Enfin, puisque nous avons choisi de réaliser une optimisation séquentielle, après avoir déterminé le meilleur pharmacophore parmi les différentes modulations, nous envisageons l'optimisation des autres parties jusqu'à l'obtention d'un composé avec les meilleurs paramètres biologiques. Cela se fait en regardant la disponibilité et le coût des réactifs à utiliser, toujours dans une démarche de faciliter la production des composés, mais aussi en fonction des interactions prédites des composés les plus efficaces lors des tests *in vitro*.

Ces tests sont effectués dans un premier temps sur l'EV-A71, entérovirus représentatif de l'espèce EV-A ayant une grande prévalence. Cependant, afin de poursuivre notre objectif d'obtenir un inhibiteur à large spectre, des évaluations sur l'E30 (membre des EV-B) et sur le CVA24 (membre des EV-C) sont aussi effectués pour les composés les plus intéressants.

2) Etude *in silico* et *in vitro* des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de potentiels « *capsid binders* ».

Outre l'activité de nos composés, nous avons aussi voulu déterminer leurs paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques. Ils sont cruciaux pour une administration par voie orale. Nous avons choisi ce moyen d'administration car il possède l'avantage d'être facile à administrer. Cela est un critère de choix sachant que la plupart des symptômes associés aux infections aux Entérovirus sont bénins, associés à une prise en charge en ville. De plus, les premières heures de la contamination sont déterminantes pour la sévérité de l'infection ainsi que l'efficacité des « *capsid binders* ». Enfin, la voie orale reste une des voies d'administration les plus simples sans discrimination d'accès aux soins.

Dans nos critères de sélection des modulations à réaliser, nous avons pris en compte l'effet de la modification structurelle sur les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés. Ces derniers ont été évalués grâce au logiciel GatroPlus™ avec l'aide de la D^re^. Florence Gattacceca. Dans une optique de comparaison de nos composés, nous avons gardé les mêmes paramètres de dosage et de modèle associé.

De plus, nous avons développé en partenariat avec les équipes de la P^re^. Raphaëlle Fanciullino, celle de la P^re^. Caroline Solas et du D^r^. Edouard Lamy, une méthode d'évaluation de la perméabilité *in vitro* de nos composés afin de valider le modèle *in silico*. La lignée cellulaire utilisée pour ces tests est les *Cancer coli 2* (Caco-2). De même, une évaluation de la solubilité de ces composés a été initiée avec la participation du P^r^. David Berger-Lefranc, du D^r^. Pascal Prinderre et de F. Chaspoul. Ces méthodes utilisent un dosage de nos composés par détection UV-visible, au sein d'un spectrophotomètre ou d'un appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPCL).

Enfin, une dernière partie sera dédiée à l'optimisation et la proposition de composés *de novo* par l'utilisation de l'intelligence artificielle à partir des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques évoqués ci-dessus ainsi que les activités antivirales des composés évaluées [**Figure 22**]. Cette étape est effectuée en coopération avec la D^re^. Florence Gattacceca et du P^r^. Laurent Bourguignon du Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de Lyon.

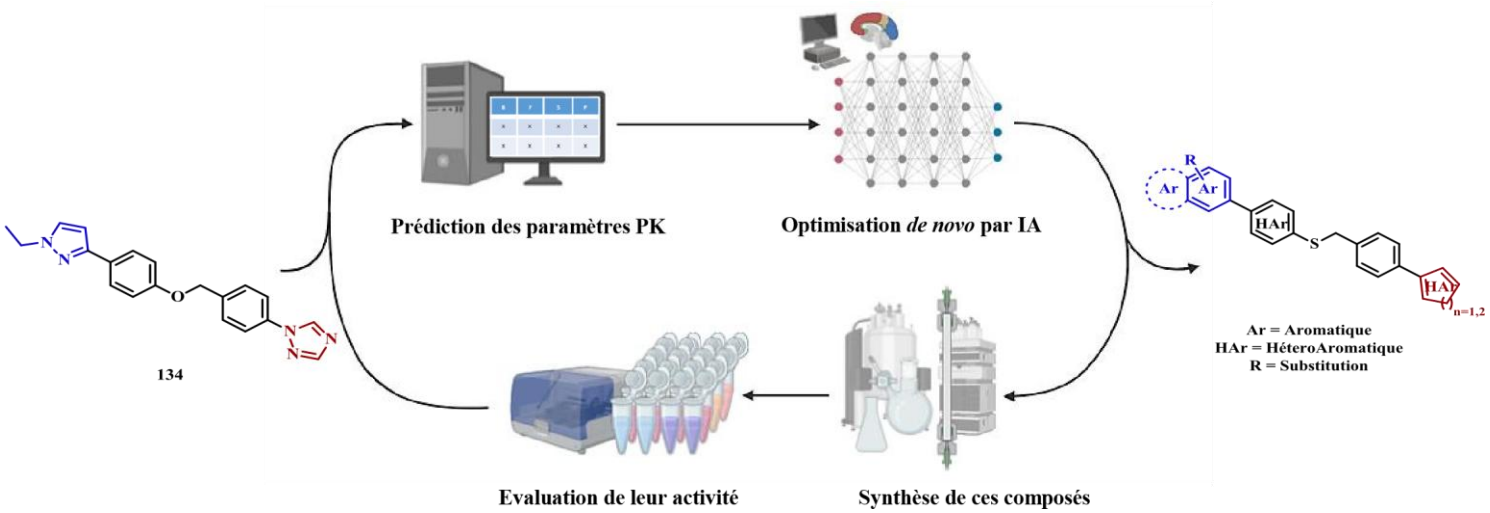


Figure 22. Présentation du cycle d'optimisation de notre stratégie d'optimisations des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés à visée antivirale.

Chap.	Coopérations	Affiliation
IV	A. Coluccia, P. Sciò	Sapienza Università di Roma
	F. Touret, H.S. Bouzidi	Unité des Virus Emergents
	C. Di Giorgio	Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale
V	F. Gattacceca R. Fanciullino, S. Giacometti	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
	C. Solas, M. Giocanti	Biogénopole (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille)
	E. Lamy	Institut des Sciences du Mouvement
	L. Bourguignon	Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de Lyon

3) Ciblage de plusieurs protéines virales à partir de plusieurs inhibiteurs.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous nous intéresserons à la conception de composés visant plusieurs cibles à la fois. Cela permet d'augmenter leur activité antivirale, de diminuer le risque de développer des résistances induites par la pression antivirale tout en évitant les interactions qu'il peut y avoir entre plusieurs principes actifs. Pour cela, nous nous concentrerons sur la littérature déjà publiée. De nombreux composés, précédemment synthétisés, n'ont pas dépassé le stade des essais cliniques. Nous tenterons d'expliquer les échecs de ces essais cliniques et détaillerons les tests *in vitro* de combinaisons, associant deux ou trois inhibiteurs. Enfin, nous envisagerons la synthèse de composés uniques inhibant plusieurs cibles virales, selon différentes approches.

C. Etude mécanistique et optimisation des conditions des réactions utilisées dans ce projet de thèse.

La chimie étant au cœur de ce projet de thèse, nous allons décrire les principales réactions des stratégies de synthèse utilisées, en détaillant également leurs mécanismes réactionnels ainsi que les différentes conditions de réaction.

1) Couplage de Suzuki-Miyaura.

Principe général.

Le couplage de Suzuki-Miyaura fait partie des couplages métallo-catalysés menant à la formation de liaison carbone – carbone [**Figure 23**]. De plus, il s'agit de l'un des couplages les plus utilisés du fait de ses conditions de réactions douces, de sa grande diversité et du prix faible des réactifs nécessaires, qui sont souvent non-toxiques.[471,472,473,474] De plus, puisque cette réaction est facilement transposable sur de grandes quantités, elle est beaucoup utilisée dans le domaine de la chimie pharmaceutique.[475] Le seul inconvénient identifié semble être l'utilisation systématique d'un minimum de deux équivalents de base.[476] La réaction qui nous intéresse ici s'effectue par réaction d'un composé électrophile (alkyle, vinyle ou aryle) avec un dérivé portant un acide ou un ester boronique [**Figure 23A**].

[471] Arora, A.; Kumar Rao, G.; Kumar, A. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2022**, *19* (5), 549-551. DOI: 10.2174/1570193X18666211215145005.

[472] Lennox, J.J.; Lloyd-Jones, G.C. *Chem. Soc. Rev*. **2014**, *43*, 412–443. DOI: 10.1039/C3CS60197H.

[473] Martínez, P.; Solà, M.; Poater, A. *ChemistryOpen*. **2015**, *4* (6), 774–778. DOI: 10.1002/open.201500093.

[474] Lei, P. Mu, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Ma, Z.; Feng, J.; Liu, X.; Szostak, M. *ACS Sustainable Chem. Eng*. **2021**, *9* (1), 552–559. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c08044.

[475] Magano, J.; Dunetz, J.R. *Chem. Rev*. **2011**, *111* (3), 2177-2250. DOI: 10.1021/cr100346g.

[476] D'Alterio, M.C.; Casals-Cruañas, E.; Tzouras, N.V.; Talarico, G.; Nolan, S.P.; Poater, A. *Chem. Eur. J*. **2021**, *27*, 13481-13493. DOI: 10.1002/chem.202101880.

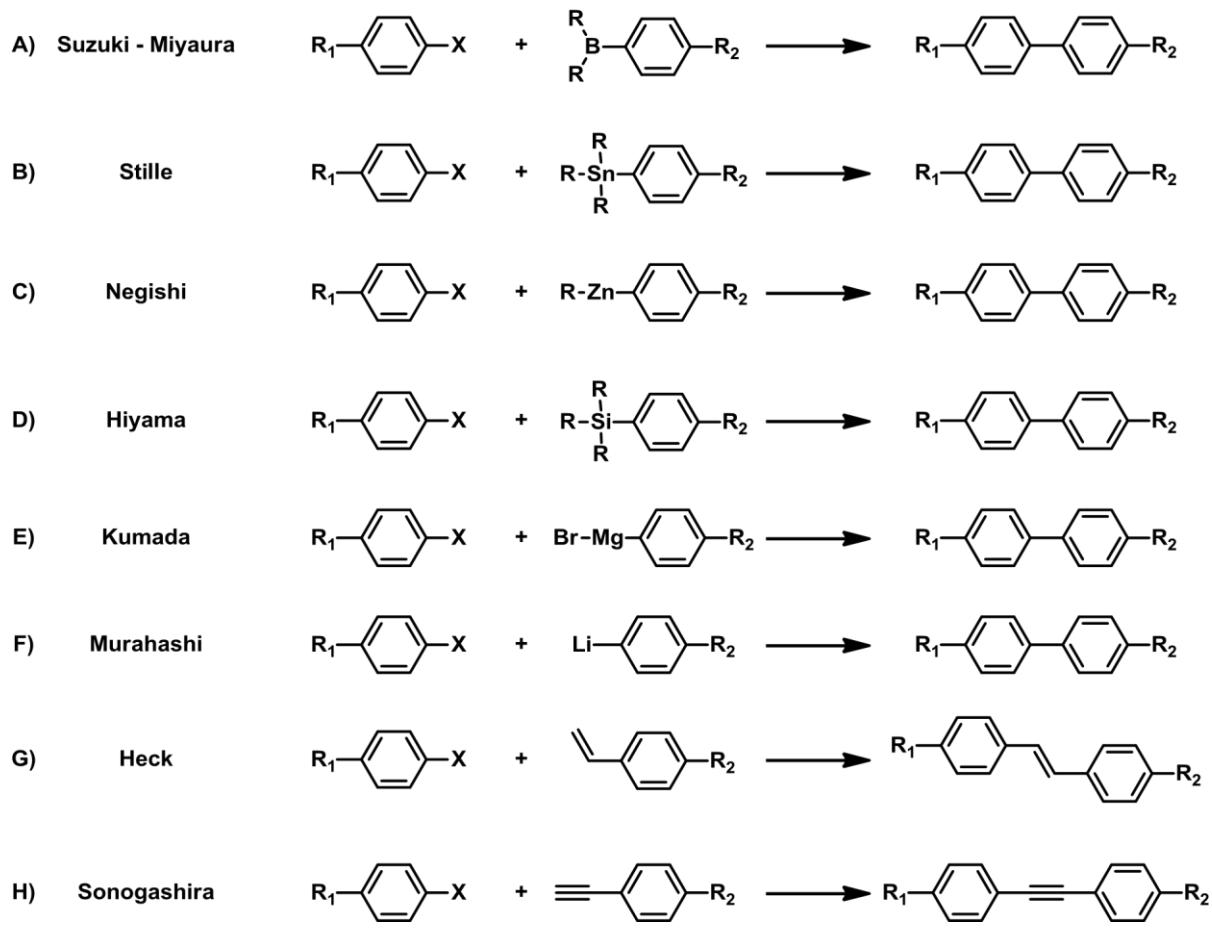


Figure 23. Différents couplages pallado-catalysés menant à la formation de liaison carbone – carbone. Certaines réactions associent un composé carboné électrophile à un dérivé substitué par un métal : A) Suzuki-Miyaura (Bore). B) Stille (Etain). C) Negishi (Zinc). D) Hiyama (Silicium). E) Kumada (Magnésium). F) Murahashi (Lithium). D'autres utilisent des réactifs insaturés : G) Heck (double liaison carbone – carbone). H) Sonogashira (triple liaison carbone – carbone).

Mécanisme réactionnel.

Le mécanisme réactionnel du couplage de Suzuki-Miyaura est le suivant, et est similaire à celui des autres couplages métallo-catalysés [**Figure 24**].

Dans un premier temps, une étape d'activation du catalyseur est effectuée. Cela permet au complexe au palladium de degré d'oxydation II (L_nPd^{II}) de passer à sa forme active de degré d'oxydation 0 (L_nPd^0).

Le dérivé, souvent halogéné, (R_1-X) vient alors s'additionner sur ce complexe réactif (L_nPd^0), ce qui l'oxyde de nouveau au degré d'oxydation II ($L_nPd^{II}(X)R_1$) [étape *(i)*].

A ce stade, une autre réaction parallèle est décrite, à savoir l'addition de la base nécessaire à la réaction sur le dérivé portant l'acide boronique (R_2-$B(R)_2$/ R_2-$B^-(R)_2$Base).

L'acide boronique (R_2-B(R)$_2$/ R_2-B$^-$(R)$_2$Base) dans sa forme activée vient effectuer une transmétallation avec le palladium (L_nPd^{II}(X)R_1) pour former le complexe (L_nPd^{II}(R_2)R_1) [étape *(ii)*].

Enfin une élimination réductrice est effectuée afin de former le produit attendu (R_1-R_2) et le catalyseur sous sa forme active (L_n Pd^0) [étape *(iii)*].

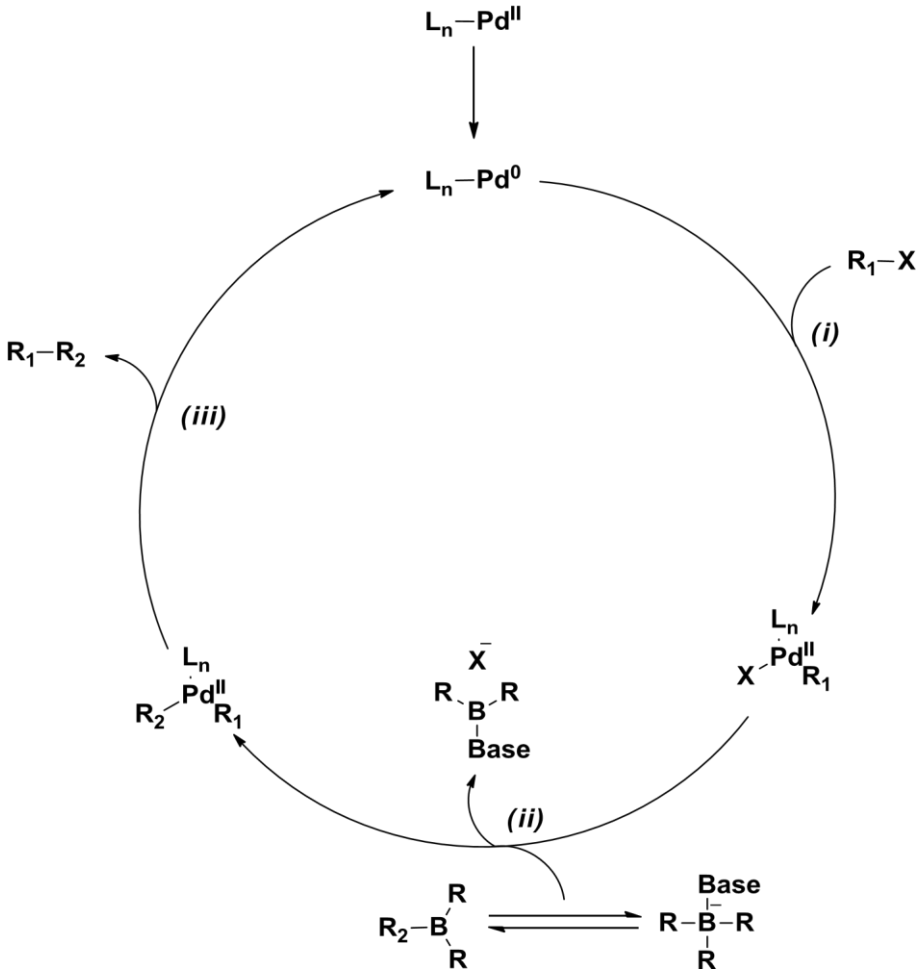


Figure 24. Mécanisme réactionnel global du couplage de Suzuki-Miyaura. (*i*) Addition oxydative. (*ii*) Transmétalation. (*iii*) Elimination réductrice.

Activation du catalyseur.

Afin de pouvoir stocker les catalyseurs au palladium qui peuvent être sensibles à l'air, l'humidité, la moisissure, des pré-catalyseurs sont souvent utilisés pour une activation *in situ* de leur pouvoir oxydant. Plusieurs mécanismes sont envisagés, comme pour le catalyseur π – aryle de Nolan [**Figure 25**]. [477] Cette étape, en dehors du cycle catalytique propre est parfois la plus demandeuse en énergie.

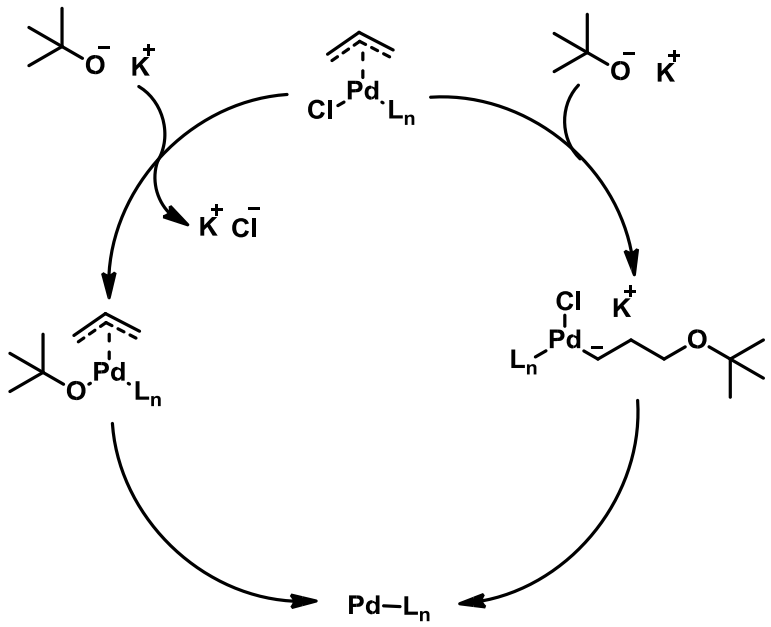


Figure 25. Deux mécanismes envisagés pour l'activation du pré-catalyseur π – aryle de Nolan.[461]

Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura.

Si l'on veut détailler les trois étapes caractérisant le cycle catalytique, deux mécanismes sont possibles pour l'addition oxydative, la transmétalation et l'élimination réductrice [**Figure 26**].[478,479] L'addition oxydative peut ainsi se faire *via* un mécanisme coordonné du catalyseur avec le réactif portant le carbone électrophile, ou un mécanisme de substitution nucléophile bimoléculaire S_N2 décrit ci-dessous.

---

[477] Meconi, G.M.; Vummaleti, S.V.C; Luque-Urrutia, J.A.; Belanzoni, P.; Nolan, S.P.; Jacobsen, H.; Cavallo, L.; Solà, M.; Poater, A. *Organometallics*. **2017**, *36* (11), 2088–2095. DOI: 10.1021/acs.organomet.7b00114.

[478] Smith, G.B.; Dezeny, G.C.; Hughes, D.L.; King, A.O.; Verhoeven, T.R. **1994**, *59* (26), 8151-8156. DOI: 10.1021/jo00105a036.

[479] Amatore, C.; Jutand, A.; Le Duc, G. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2012**, *51* (6), 1379-1382. DOI: 10.1002/anie.201107202.

La transmétalation peut se faire avec deux espèces coexistantes, l'acide boronique sous sa forme commerciale ou après addition d'une base lui permettant d'augmenter sa réactivité.

Enfin, l'élimination réductrice se fait soit spontanément soit après assistance de l'addition de la base susnommée, qui sera éliminée en même temps que le produit souhaité.

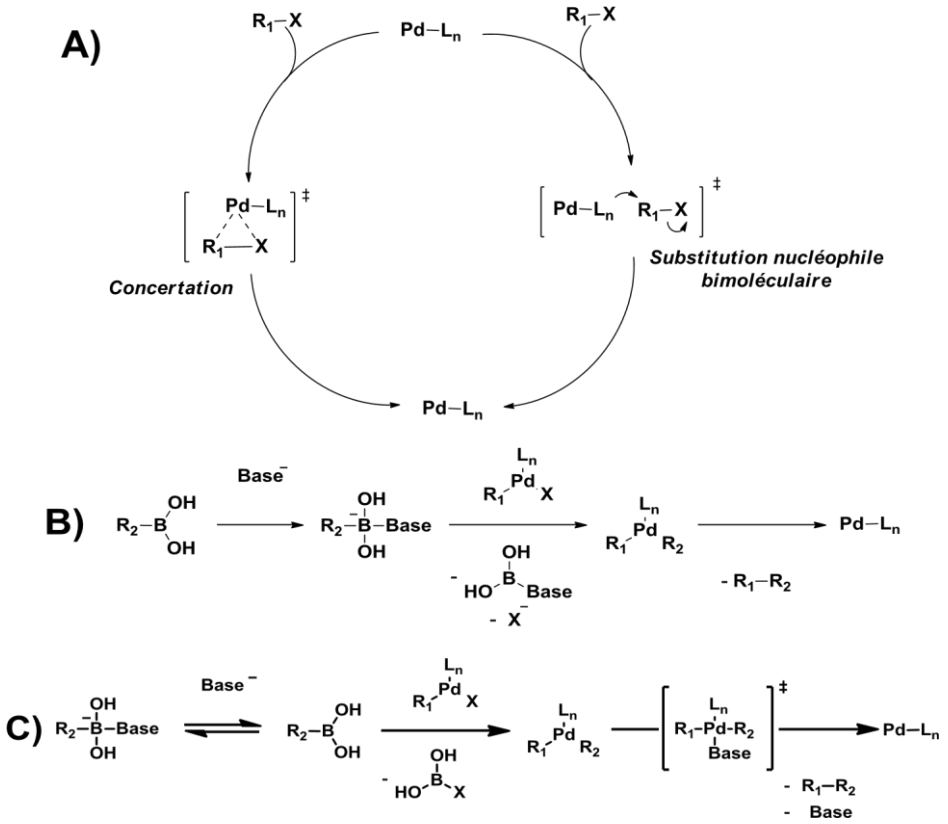


Figure 26. Détail de chaque étape du cycle réactionnel selon les différents mécanismes décrits dans la littérature. A) Mécanismes d'addition oxydative. B) Mécanisme traditionnel de transmétalation et élimination réductrice avec l'addition par un boronate. C) Mécanisme alternatif de transmétalation et élimination réductrice avec l'addition par un dérivé boronique.

Paramètres de réaction.

Dans le paragraphe ci-dessous, nous décrirons à la fois les différents types d'espèces réactives utilisées mais aussi, lorsqu'il est possible de le faire, nous comparerons leurs différentes réactivités.

Solvant.

Le choix du solvant est très important dans les réactions de couplage. Les solvants utilisés le plus couramment sont listés dans le **Tableau 11**. Même s'il n'existe pas de préférences clairement identifiées de solvant, plusieurs études rapportent que les solvants protiques semblent favoriser la réaction de couplage.[480,481]

Base utilisée.

De même, le choix de la base est important pour obtenir de bons rendements et parfois pour que la réaction se produise [**Tableau 11**]. Parmi les bases les plus utilisées, les carbonates et les hydroxydes sont les plus courants. Chaque base est spécifique pour chaque combinaison de réactifs utilisés. Par exemple, pour le couplage entre l'acide phénylboronique et le 4bromoanisole, le carbonate de potassium est la base la plus favorable.[482] Le 4-bromoanisole donne uniquement de bons rendements en présence de diisopropylamine lorsqu'il réagit avec le phényltrifluoroborate de potassium.[483]

Catalyseurs métalliques.

Ligands utilisés avec le palladium.

Initialement, le tétrakis (triphénylphosphine)palladium (0) était le seul catalyseur utilisé avec des dérivés bromés, puis iodés.[484] Cependant, comme les réactions utilisant des dérivés chlorés nécessitent un potentiel d'oxydoréduction plus faible, de nouveaux ligands sont fréquemment synthétisés pour pouvoir augmenter le panel de substrats pouvant être utilisés [**Tableau 11**].[485]

---

[480] Xia, J.; Fu, Y.; He, G.; Sun, X.; Wang, X. *Appl. Catal. B*. **2017**, *200*, 39-46. DOI: 10.1016/j.apcatb.2016.06.066.

[481] Mohammadi, E.; Movassagh, B. *J. Organomet. Chem*. **2016**, *822*, 62-66. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2016.08.017.

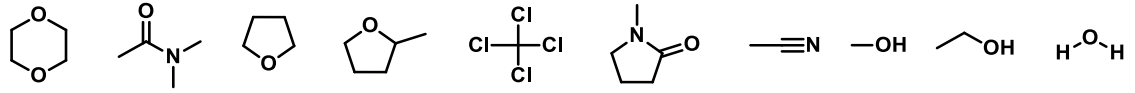
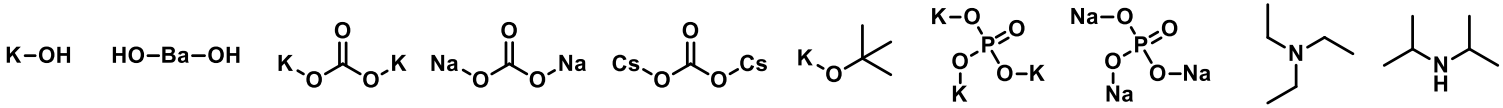
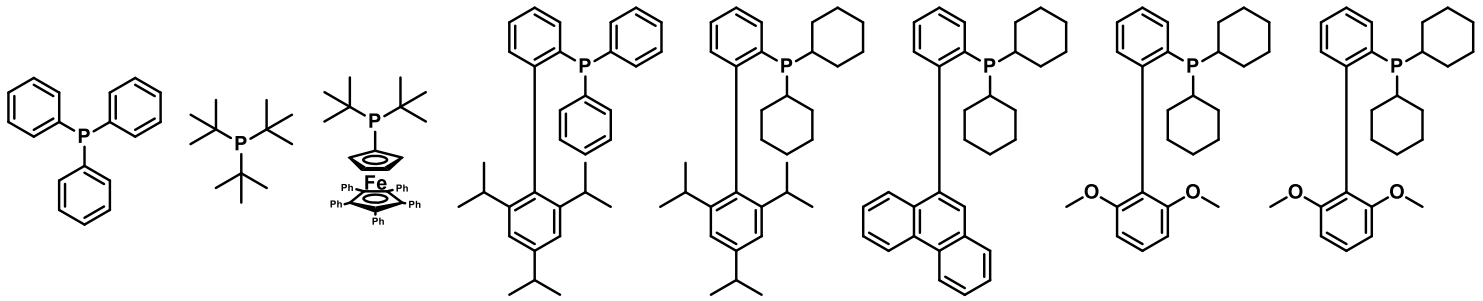
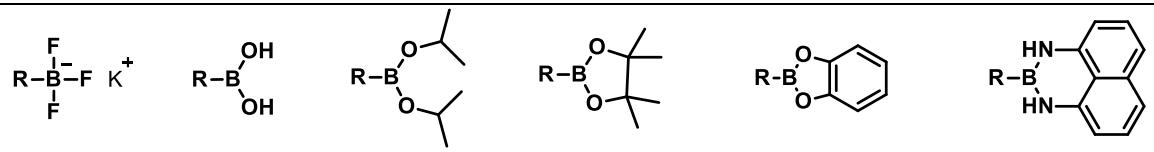
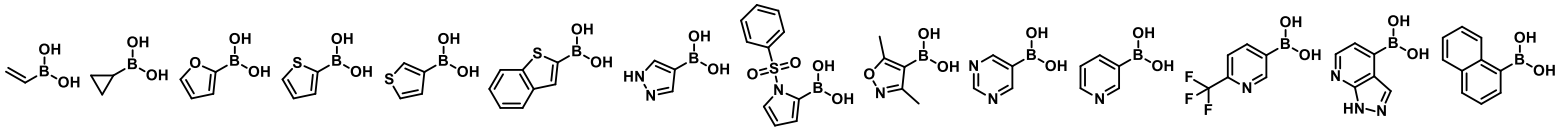
[482] Kaboudin, B.; Salemi, H.; Mostafalu, R.; Kazemi, F.; Yokomatsu, T. *J. Organomet. Chem*. **2016**, *818*, 195199. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2016.06.007.

[483] Liu, C.; Li, X.; Wang, X.; Jin, Z. *Catal. Commun*. **2015**, *69*, 81-85. DOI: 10.1016/j.catcom.2015.05.025.

[484] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett*. **1979**, *20* (36), 3437-3440. DOI: 10.1016/S00404039(01)95429-2.

[485] Akkoç, S. *J. Chin. Chem. Soc*. **2021**, *68* (6), 942-951. DOI: 10.1002/jccs.202000351.

Tableau 11. Liste non exhaustive des solvants, des bases, des métaux, des fonctions contenant du bore et des substrats fonctionnalisés avec du bore généralement utilisés dans les couplages de Suzuki-Miyaura.[469]

Solvants	
Bases	
Métaux	Pd Ni Co (*rare*) Ro (*rare*) Ru (*rare*)
Ligands	
Fonctions contenant du bore	
Substrats portant un atome de bore	

Ainsi outre le phosphore, des ligands avec d'autres groupes donneurs (azote, oxygène, soufre, sélénium, carbène…) sont désormais commercialisés. Les catalyseurs possédant des ligands volumineux et très électrodonneurs facilitent le cycle catalytique en favorisant l'addition oxydative et l'élimination réductrice.[486] Cela permet aussi d'éviter une β-élimination présente pour certains substrats. D'autres catalyseurs hétérogènes ont été développés afin d'augmenter la capacité à réutiliser le palladium en le fixant sur un support inorganique.[487]

Conditions de réaction selon les différents ligands.

Une récente étude affirme que les catalyseurs à ligand unique [LPd^0] semblent aussi être plus réactifs que ceux en possédant deux [L_2Pd^0], [L_2Pd^{II}] ou quatre [L_4Pd^{II}].[488,489] Les premiers n'auraient pas à être réduits ou à perdre un ligand par un procédé dissociatif.

Utilisation d'autres métaux.

En dehors du palladium, d'autres métaux peuvent aussi catalyser le couplage de Suzuki-Miyaura [**Tableau 11**]. Le nickel peut être intéressant du fait de son coût faible et sa disponibilité.[459,490] Il est aussi plus nucléophile que le palladium.[491] De même, que pour le palladium, le nickel a aussi été utilisé dans des réactions hétérogènes.[492]

---

[486] Galushko, A.S.; Prima, D.O.; Burykina, J.V.; Ananikov, V.P. *Inorg. Chem. Front*. **2021**, *8*, 620–635. DOI: 10.1039/D0QI01133A.

[487] Polshattiwar, V.; Len, C.; Fihri, A. *Coord. Chem. Rev*. **2009**, *253* (21-22), 2599-2626. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.001.

[488] Neshat, A.; Gholinejad, M.; Özcan, H.; Khosravi, F.; Mobarakeh, A.M; Zaim, Ö. *J. Mol. Catal*. **2021**, *505*, 111528. DOI: 10.1016/j.mcat.2021.111528.

[489] Shi, S.C.; Nolan, S.P.; Szostak, M. *Acc. Chem. Res*. **2018**, *51*, 2589–2599. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00410.

[490] Biajoli, A.F.P.; Schwalm, C.S.; Limberger, J.; Claudino, T.S.; Monteiro, A.L. *J. Braz. Chem. Soc*. **2014**, *25* (12), 2186-2214. DOI: 10.5935/0103-5053.20140255.

[491] Rosen, B.; Quasdorf, K.; Wilson, D.; Zhang, N.; Resmierita, A.; Garg, N.; Percec, V. *Chem. Rev*. **2011**, *111*, 1346-1416. DOI: 10.1021/cr100259t.

[492] Martin, L.; Molins, E.; Vallribera, A. *Tetrahedron*. **2012**, *68* (32), 6517-6520. DOI: 10.1016/j.tet.2012.05.099.

D'autres couplages plus spécifiques ont aussi été effectués grâce à du cobalt, du fer, du rhodium et du ruthénium.[493,494,495,496] Dans notre travail, nous choisirons le palladium très largement cité.

Substrats.

Compte-tenu de la facilité de synthèse et la diversité des réactifs, le couplage de Suzuki-Miyaura est peu sensible à la gêne stérique ce qui permet d'augmenter le panel de substrats pouvant être utilisés.[497]

Groupes électrophiles.

Les principaux groupes électrophiles utilisés sont pour la plupart halogénés. L'iode est le plus réactif suivi du brome, tout comme le triflate. Les dérivés chlorés sont assez difficiles à utiliser dans le couplage de Suzuki-Miyaura. Cela s'explique du fait de la liaison entre le carbone et l'halogène dont la force est proportionnelle à l'électronégativité de ce dernier. Avec la synthèse de nouveaux catalyseurs, les amides peuvent être choisis comme substrats en affaiblissant une liaison carbone aryle – carbone carbonyle.[498] En utilisant le nickel comme base pour le catalyseur, les aldéhydes, les fluorures d'acyle ou les esters peuvent aussi réagir avec des composés portant un acide ou un ester boronique.[499,500,501]

L'environnement électronique autour du carbone se complexant avec le métal est aussi important. Des essais tendent à prouver que les groupements électroattracteurs permettent de favoriser la réaction contrairement à ceux électrodonneurs.[502]

---

[493] Duong, H.; Teow, Z.; Tiong, Y.; Kamal, N.; Wu, W. *J. Org. Chem*. **2019**, *84* (19), 12686-12691. DOI: 10.1021/acs.joc.9b02105.

[494] O'Brien, H.; Manzotti, M.; Abrams, R.; Elorriaga, D.; Sparkes, H.; David, S.; Bedford, R. *Nat. Catal*. **2018**, *1*, 429-437. DOI: 10.1038/s41929-018-0081-x.

[495] Pareek, M.; Sunoj, R. *ACS Catal*. **2020**, *10* (7), 4349-4360. DOI: 10.1021/acscatal.9b05526.

[496] Schafer, P.; Palacin, T.; Sidera, M.; Fletcher, S. *Nat. Commun*. **2017**, *8*, 15762. DOI: 10.1038/ncomms15762.

[497] Falivene, L.; Credendino, R.; Poater, A.; Petta, A.; Serra, L.;Oliva, R.; Scarano, V.;Cavallo, L. *Organometallics*. **2016**, *35*, 2286–2293. DOI: 10.1021/acs.organomet.6b00371.

[498] Zhou, T.; Ji, C.; Hong, X.; Szostak, M. *Chem. Sci*. **2019**, *10*, 9865-9871. DOI: 10.1039/C9SC03169C.

[499] Guo, L.; Rueping, M. *Acc. Chem, Res*. **2018**, *51* (5), 1185-1195. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00023.

[500] Guo, L .; Srimontree, W.; Zhu, C.; Maity, B.; Liu, X.; Cavallo, L.; Rueping, M. *Nat. Commun*. **2019**, *10*, 1957. DOI: 10.1038/s41467-019-09766-x.

[501] Ariki, Z.; Mae,kawa, Y.; Nambo, M.; Crudden, C. *J. Am. Chem. Soc*. **2018**, *140* (1), 78-81. DOI: 10.1021/jacs.7b10855.

[502] Lee, J.Y.; Tzeng, R.J.; Wang, M.C.; Lee, H.M. *Inorg. Chim. Acta*. **2017**, *464*, 74-80. DOI: 10.1016/j.ica.2017.04.046.

Acides boroniques.

Les acides boroniques et dérivés sont nombreux à pouvoir être utilisés dans les couplages de Suzuki-Miyaura [**Tableau 11**]. Il semble ne pas y avoir de préférences entre les différentes fonctions portant un atome de bore. En effet, chaque fonction possède des conditions douces mais avec des réactifs différents (comme précisé dans le paragraphe « Base utilisée »).

Cependant, les substitutions fortement électrodonneuses des substrats portant l'atome de bore semblent réduire l'efficacité de la réaction.[503]

Conditions physiques.

Modification de la température.

En théorie, les rendements augmentent avec la température, en apportant plus d'énergie pour passer la barrière d'activation de la réaction. Cependant, dans le cas des couplages de Suzuki-Miyaura, certains intermédiaires sont aussi instables dans ces conditions. C'est pourquoi, ces couplages sont décrits comme ayant des conditions douces. Des sources alternatives ont été recherchées pour donner assez d'énergie sans chauffer en utilisant les micro-ondes, les ultrasons, une énergie mécanique ou la lumière.[504,505]

Modification du pH.

Comme présenté ci-dessus, le couplage de Suzuki-Miyaura nécessite une base pour qu'il puisse s'effectuer. Des tests à différents pH acide, neutre ou basique ont été décrits pour vérifier cette hypothèse, et évaluer les variations de rendements de la réaction. Prenant toujours comme exemple la réaction entre l'acide phénylboronique et le 4-bromoanisole, une baisse des rendements a été observée pour des pH de départ ou de fin de réaction inférieurs ou égaux à 9.[506] Dans tous les cas, une variation d'une unité au maximum a été observée entre le pH de début et celui de fin de réaction.

---

[503] Akkoç, M.; Buğday, N.; Altin, S.; Kiraz, N.; Yaşar, S.; Özdemir, İ. *J. Organomet. Chem*. **2021**, *943*, 121823. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2021.121823.

[504] Li, X.H.; Baar, M.; Blechert, S.; Antonietti, M. *Sci. Rep*. **2013**, *3*, 1743. DOI: 10.1038/srep01743.

[505] Martina, K.; Manzoli, M.; Calcio Gaudino, E.; Cravotto, G. *Catalysts*. **2017**, *7* (4), 98. DOI: 10.3390/catal7040098.

[506] Li, Z.; Gelbaum, C.; Heaner, W.L.; Fisk, J.; Jaganathan, A.; Holden, B.; Pollet, P.; Liotta, C.L. *Org. Process Res. Dev*. **2016**, *20* (8), 1489. DOI: 10.1021/acs.oprd.6b00180.

2) Substitutions nucléophiles.

Les substitutions nucléophiles font partie des réactions les plus utilisées, en chimie ou en biologie, du fait de leur simplicité, notamment la substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2).[507,508,509,510,511,512] Elle fait partie des premières réactions à être enseignée. Cependant, d'autres variantes telles que la substitution nucléophile mononucléaire (S_N1), celle aromatique (S_NAr), celle d'acyle (S_NAcyl), celle vinylique (S_NV) et celle intramoléculaire (S_Ni) sont aussi importantes. Nous présenterons ici, uniquement celles utilisées par la suite : la S_N2 et la S_NAr.

Substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2).

Principe général.

La substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) se caractérise par l'addition d'un nucléophile sur un site électrophile menant au départ coordonné d'un groupe partant [**Figure 27A**]. Toutes les molécules suffisamment électrophiles ou nucléophiles, selon leur rôle, qu'elles soient positivement ou négativement chargées, neutres mais aussi radicalaires, peuvent être utilisées comme substrats [**Figure 27B**]. Les seules conditions sont l'action d'un groupe nucléophile (**Nu**) initiant le mécanisme d'addition, coordonnée à l'élimination d'un groupe partant (**GP**), sur un groupe électrophile (**E**) qui recevra le nucléophile.

---

[507] Walden P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges*. **1893**, *26* (1), 210-215. DOI: 10.1002/cber.18930260146.

[508] Carey, F.A.; Sundberg, R.J. *Nuclephilic Substitution*. **Advance *Organic Chemistry***. Plenum Press. New York, New York, U.S.A. **1984**.235-322. DOI: 10.1007/978-1-4757-1143-1_5.

[509] Smith, M.B, March, J. ***March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure***. Seventh edition. Wiley. New York, New York, U.S.A. **2013**. ISBN : 9781118472217, 1118472217.

[510] Shaik, S.; Schlegel, H.B.; Wolfe, S. ***Theoretical Aspects of Physical Organic Chemistry: The S_N2 Reaction***, Wiley. New York, New York, U.S.A. **1992**. ISBN: 0471840416, 9780471840411.

[511] Riveros, J.M.; José, S.M.; Takashima, K. *Adv. Phys. Org. Chem*. **1985**, *21*, 197-240. DOI: 10.1016/S00653160(08)60100-8.

[512] de Cózar, A.; Larrañaga, O.; Bickelhaupt, F.M.; San Sebastián, E.; Ortega-Carrasco, E.; Maréchal, J.D.; Lledós, A.; Cossío, F.P. *Chemphyschem*. **2016**, *17* (23), 3932-3947. DOI: 10.1002/cphc.201600982.

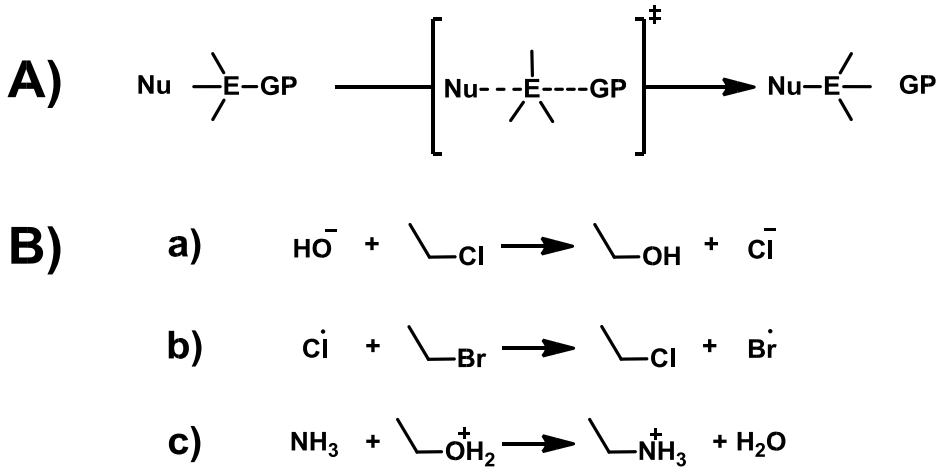


Figure 27. Réactions de Substitution Nucléophile Bimoléculaire 2 (S_N2). A) Principe général d'une substitution nucléophile bimoléculaire. B) Exemples de S_N2 avec une charge générale : a) négative, b) neutre ou c) positive.

En 1953, Swain et Scott ont introduit une définition quantitative de la nucléophilie n avec l'équation suivante :

$$log\frac{k}{k_0} = sn$$

avec k_0, la constante de vitesse de la réaction avec H_2O comme nucléophile, et s, une constante propre au substrat.

Dans le cas où il aurait un hydrogène vicinal à l'atome électrophile, la S_N2 est toujours en compétition avec une élimination bimoléculaire.[513] A ce jour, il n'est pas possible de prédire si l'un, l'autre ou la S_N1 est privilégiée.[514] La nucléophilie est confrontée à la basicité des couples acide-base entre les deux réactifs. Alors que la première est régulée par un effet cinétique, la

[513] Gronert, S. Gas phase studies of the competition between substitution and elimination reactions. *Acc. Chem. Res*. **2003**, *36* (11), 848-857. DOI: 10.1021/ar020042n.

[514] Phan, T.B.; Nolte, C.; Kobayashi, S.; Ofial, A.R.; Mayr, H. Can one predict changes from S(N)1 to S(N)2 mechanisms? *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131* (32), 11392-11401. DOI: 10.1021/ja903207b.

seconde est question d'équilibre.[515] En effet, la nucléophilie est liée par la capacité à donner des électrons, à travers l'énergie et la forme des orbitales atomiques *np* du nucléophile.[516,517,518] Bien que les S_N2 peuvent s'effectuer sur des hétéroatomes (soufre, phosphore, silicium…), nous nous intéresserons ici uniquement sur la substitution de carbones fonctionnalisés.

Inversion de Walden et autres mécanismes.

Le mécanisme le plus connu pour les S_N2 provoque une inversion possible de polarité entre le carbone électrophile par addition du nucléophile du côté opposé au groupe partant. Cette inversion s'appelle l'inversion de Walden. Elle se produit lorsque le nucléophile s'additionne en passant par l'axe formé par la liaison entre l'atome électrophile et le groupe partant. Ainsi, dans le cas d'un carbone asymétrique, sa conformation est inversée selon la nomenclature en usage [**Figure 28**]. Cependant d'autres voies ont été découvertes, à savoir l'addition frontale et la double inversion.[519] La première, même si elle est couramment défavorisée par une gêne stérique entre nucléophile et groupe partant, a déjà été observée dans certains cas explicités cidessous. Enfin, parfois, un nucléophile ayant déjà effectué une substitution peut lui-même jouer le rôle de groupe partant. C'est ce qu'on appelle la double inversion. Ainsi si un ion chlorure s'additionne sur un électrophile, un autre ion chlorure peut ensuite substituer le premier ion menant à un mélange racémique.[503]

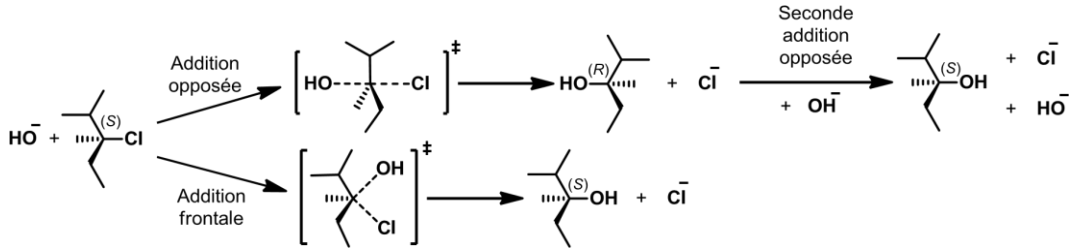


Figure 28. Différents mécanismes possibles pour les substitutions nucléophiles bimoléculaires.

[515] Uggerud, E. Steric and electronic effects in S_N2 reactions. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81* (4), 709-717. DOI: 10.1351/PAC-CON-08-10-03.

[516] Xie, J.; Sun, R.; Siebert, M.R.; Otto, R.; Wester, R.; Hase, W.L. *J. Phys. Chem. A*. **2013**, *117* (32), 7162-7178. DOI: 10.1021/jp4008027.

[517] Szabó, I.; Czakó, G. *Nat. Commun*. **2015**, *6*, 5972. DOI: 10.1038/ncomms6972.

[518] Ma, Y.T.; Ma, X.; Li, A.; Guo, H.; Yang, L.; Zhang, J.; Hase, W.L. *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2017**, *19* (30), 20127-20136. DOI: 10.1039/c7cp02998e.

[519] Bento, A.P.; Bickelhaupt, F.M. *J. Org. Chem*. **2008**, *73* (18), 7290-7299. DOI: 10.1021/jo801215z.

Paramètres de réaction.

Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter les différents paramètres et réactivités observés pour les S_N2.

Effet de solvant.

Le solvant joue un rôle important dans la réactivité des molécules présentes. Ainsi, lorsque la réaction est réalisée dans un solvant, contrairement aux réactions en phase gazeuse, la substitution est favorisée lorsque c'est le nucléophile qui porte la charge négative.[520] De même, en solvant polaire, les groupes électrophiles portant une charge positive plus concentrée sur l'atome central sont les plus réactifs.[521] Dans ces conditions, la nucléophilie de la molécule effectuant l'addition coordonnée dépend de sa capacité à former des liaisons hydrogène, dans les solvants protiques, ou à se lier à des contre-ions dans des complexes à 2 ou 3 membres. Les interactions d'ions avec des dipôles permanents ou induits n'affectent pas le caractère nucléophile d'une molécule.[522]

Nucléophile et groupe partant.

Plusieurs paramètres entrent dans l'efficacité d'un nucléophile à s'additionner sur le substrat ou le groupe partant à être substitué. La force de liaison à l'atome électrophile est le critère influençant le pouvoir d'un groupe partant alors que la nucléophilie caractérise le pouvoir d'addition des molécules dans cette réaction.

Dans le cas de substitutions impliquant des halogènes, leur nucléophilie décroit du plus petit au plus grand ($F^- > Cl^- > Br^- > I^-$). Au contraire, plus les halogènes sont gros et plus leur rôle de groupe partant est favorisé ($CH_3F < CH_3Cl < CH_3Br < CH_3I$). La fonction tosylate semble être légèrement meilleure comme groupe partant que l'ion chlorure, mais inférieure à l'ion bromure.[523]

---

[520] Garver, J.M.; Fang, Y.R.; Eyet, N.; Villano, S.M.; Bierbaum, V.M.; Westaway, K.C. *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, *132* (11), 3808-3814. DOI: 10.1021/ja909399u.

[521] Hamlin, T.A.; van Beek, B.; Wolters, L.P.; Bickelhaupt, F.M.; *Chem. Eur. J*. **2018**, *24*, DOI: 10.1002/chem.201706075.

[522] Chen, X.; Brauman, J.I. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, *130* (45), 15038-15046. DOI: 10.1021/ja802814a.

[523] Westaway, K.C.; Fang, Y.R.; MacMillar, S.; Matsson, O.; Poirier, R.A.; Islam, S.M. *J. Phys. Chem. A*. **2008**, *112* (41), 10264-10273. DOI: 10.1021/jp804237g.

Pour les autres fonctions, seul un thiol semble, par prédiction thermodynamique, favorable à être substitué par un ion fluorure. Les alcools, amines ou phosphines primaires devraient engendrer des réactions endothermiques.[524,525] On peut aussi observer une préférence théorique des atomes lourds comme groupe partant en condition anionique (nucléophile anionique – stabilité : $AsH_2^- < PH_2^- < NH_2^-$ / $SeH^- < SH^- < OH^-$ / $Br^- < Cl^- < F^-$).[526] Cette tendance s'inverse en théorie en conditions acides. En phase gazeuse, il a été observé des tendances par période ($F^- \approx HO^- < NH_2^- < H^-$) et par nature des substituants de la fonction nucléophile (*t*-$ButO^- <$ *i*$ProO^- < EtO^- < MeO^- < HO^-$).[527,528,529,530,531,532,533] De même, expérimentalement, les thiols semblent être plus nucléophiles que les alcools correspondants.[534] Ces hiérarchies sont en accord avec leur basicité. Cependant, ce n'est pas un élément unique à prendre en compte car pour les ions cyanure CN^- et acétylure C_2H^-, cette corrélation n'est pas vérifiée. De même, il y a une inversion pour les carbanions substitués par un phényle fixe et un/des méthyle(s) ou un/des hydrogènes $(Ph)C^-R_2$.[535]

---

[524] Gonzales, J.M.; Cox, R.S.; Brown, S.T.; Allen, W.D.; Schaefer, H.F. *J. Phys. Chem. A*. **2001**, *105*, 11327. DOI: 10.1021/jp012892a.

[525] Gonzales, J.M.; Pak, C.; Cox, R.S.; Allen, W.D.; Schaefer, H.F.; Császár, A.G.; Tarczay, G. *Chemistry*. **2003**, *9* (10), 2173-2192. DOI: 10.1002/chem.200204408.

[526] Uggerud, E. *Chemistry*. **2006**, *12* (4), 1127-1136. DOI: 10.1002/chem.200500639.

[527] Bohme, D.K.; Young, L.B. *J. Am. Chem. Soc*. **1970**, *92* (25), 7354-7358. DOI: 10.1021/ja00728a019.

[528] Young, L.B.; Lee-Ruff, E.;Bohme, D.K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1973**, *23* (2), 35-36. DOI: 10.1039/C3973000035B.

[529] Bohme, D.K.; Mackay, G.I.; Payzant, J.D. *J. Am. Chem. Soc*. **1974**, *96* (12), 4027-4028. DOI: 10.1021/ja00819a057.

[530] Tanaka, K.; MacKay, G.I.; Payzant, D.; Bohme, D.K. *Can. J. Chem*. **1976**, *54* (10), 1643-1659. DOI: 10.1139/v76-234.

[531] Olmstead, W.N.; Brauman, J.I. *J. Am. Chem. Soc*. **1977**, *99* (13), 4219-4228. DOI: 10.1021/ja00455a002.

[532] Lieder, C.A.; Brauman, J.I. *J. Am. Chem. Soc*. **1974**, *96* (12), 4028-4030. DOI: 10.1021/ja00819a058.

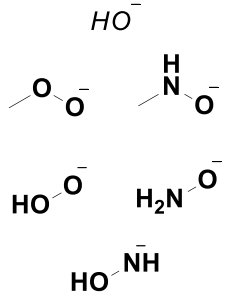
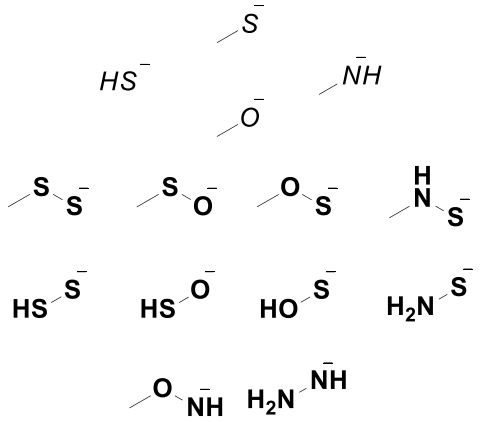
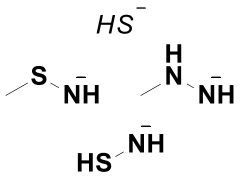
[533] Lieder, C.A.; Brauman, J.I. *Int. J. Mass. Spectrum Ion Phys*. **1975**, *16* (3), 307-319. DOI: 10.1016/00207381(75)87028-8.

[534] Bordwell, F.G.; Hughes, D.L. *J. Org. Chem*. **1981**, *46* (17), 3570. DOI: 10.1021/jo00330a047.

[535] Bartmess, J.E.; Scott, J.A.; McIvert, R.T. *J. Am. Chem. Soc*. **1979**, *101* (20), 6046-6056. DOI: 10.1021/ja00514a030.

La nucléophilie de l'atome s'additionnant peut aussi être exacerbée si l'atome voisin possède des doublets non-liants (RXY – R alkyl. X et Y – hétéroatomes : O, S, NH, Cl, Br…). On appelle cela l'effet α [**Tableau 12**].

Tableau 12. Classement selon la présence d'effet α, neutre ou inverse.

Fonctions nucléophiles avec effet α	Fonctions nucléophiles sans effet α	Fonctions nucléophiles avec effet α inverse
		

En italique, les nucléophiles dits « normaux » ; **en gras les α-nucléophiles**.

Dans le cas de substitutions en milieu basique, l'atome s'additionnant est souvent accompagné par un contre-ion. Ce dernier semble changer drastiquement les dynamiques de la substitution.[536,537,538,539,540,541,542,543] Ainsi, il augmente la barrière énergétique de formation de l'intermédiaire réactionnel. Cependant, la présence d'un cation permettrait de favoriser le mécanisme d'addition frontale. Dans le cas d'une substitution de fluorure de lithium Li^+F^- sur du méthylfluor CH_3F, le chemin de réaction théorique possède un intermédiaire plus stable qu'avec le mécanisme classique, malgré le fait qu'il soit moins stable par rapport à une substitution par un ion fluorure F^- seul. Cela semble être particulièrement vrai pour les contreions volumineux (Na^+, Mg^+Cl).[524]

Substrats électrophiles.

Un autre paramètre important dans les S_N2 est l'atome électrophile sur lequel s'effectue la substitution. La cinétique de ces réactions est corrélée au nombre de substitutions de cet atome central. En général, la réaction est facilitée pour un substrat méthyle plutôt que tertiaire (Me > Et > *i*-Pro > *t*-But).[499] Cependant, l'encombrement stérique, concept qui peut être vague et imprécis, ne serait pas le critère clef mais plutôt les effets électroniques induits par les substituants sur l'atome électrophile. En effet, en théorie, lors d'une substitution d'un alcool protoné par une molécule d'eau, la hiérarchie détaillée ci-dessus n'est plus vraie (Me > Et < *i*Pro < *t*-But).[544] Les signes semblent s'inverser lorsqu'on passe d'une prédiction dans un gaz

---

[536] Marie, J.C.; Courillon, C.; Malacria, M. *Eur. J. Org. Chem*. 2006, *2*, 463. DOI: 10.1002/ejoc.200500666.

[537] Gai, D.G.; Ren, Y. *Int. J. Quantum Chem*. 2007, *107*, 1487. DOI: 10.1002/qua.21284.

[538] Ebrahimi, A.; Habibi, M.; Amirmijani, A. *J. Mol. Struct*. 2007, *809* (1-3), 115. DOI: 10.1016/j.theochem.2007.01.037.

[539] Ren, Y.; Wang, X.; Chu, S.Y.; Wong, N.B. *Theor. Chem. Acc*. 2008, *119*, 407. DOI: 10.1007/s00214-0070386-3.

[540] Ren, Y.; Gai, J.G.; Xiong, Y.; Lee, K.H.; Chu, S.Y. *J. Phys. Chem. A*. 2007, *111* (29), 6615-6621. DOI: 10.1021/jp067495k.

[541] Li, Q.G.; Xu, K.; Ren, Y. *J. Phys. Chem. A*. 2015, *119* (17), 3878-3886. DOI: 10.1021/acs.jpca.5b01045.

[542] Laloo, J.Z.; Rhyman, L.; Ramasami, P.; Bickelhaupt, F.M.; de Cózar, A. *Chemistry*. 2016, *22* (13), 4431-4439. DOI: 10.1002/chem.201504456.

[543] Laloo, J.Z.A.; Rhyman, L.; Larrañaga, O.; Ramasami, P.; Bickelhaupt, F.M.; de Cózar, A. *Chem. Asian J*. 2018, *13* (9), 1138-1147. DOI: 10.1002/asia.201800082.

[544] Bache Andreassen, L.; Uggerud, E. *Chem. – Eur. J*. 1999, *5* (6), 1917-1930. DOI: 10.1002/(SICI)15213765(19990604)5:6<1917::AID-CHEM1917>3.0.CO;2-R.

neutre à celle en solution aqueuse. Pour les substitutions d'amines par une molécule d'ammonium, théoriquement, la règle générale est vérifiée, alors, qu'en milieu acide, il n'y a pas d'effet pour des nucléophiles et groupes partants fluorés.[545,546] De plus, les modélisations affirment qu'une inversion d'effet électronique (électroattracteur – électrodonneur) d'un substituant en γ a plus d'impact sur la réactivité que la méthylation d'un carbone en α.[499] De plus, il a été observé que la différence d'affinité de la structure alkylée avec le nucléophile et celle avec le groupe partant est égale à l'énergie dégagée par la SN2. Or, plus le carbone central est substitué, plus la différence d'énergie relative sera moindre ce qui pourrait expliquer que cette logique enthalpique ne fonctionne que pour les réactions les plus exothermiques. Outre les substrats alkyles linéaires, plusieurs études ont porté sur des structures cycliques saturées ou aromatiques. Ici, seuls les cyclopropyles et cyclobutyles ont une réactivité moindre que leurs dérivés non cycliques.[547] Au contraire, les substrats allyliques et benzyliques réagissent plus facilement.[548] Dans ce cas aussi, l'effet électronique de l'environnement a été justifié comme critère de réactivité en modulant les substitutions en position *para* de substrats benzyliques.[549,550,551] Les groupes électroattracteurs tendent à réduire la barrière d'activation de la réaction. Enfin, la présence de certaines fonctions (CN, Cl, OH) en position *ω* permet de stabiliser l'état de transition.[552] Cet effet peut être assimilé à une micro-solvatation augmentant la réactivité.

---

[545] Laerdahl, J.K.; Bache-Andreassen, L.; Uggerud, E. *Org. Biomol. Chem*. **2003**, *1*, 2943-2950. DOI: 10.1039/B302270F.

[546] Laerdahl, J.K.; Civcir, P.U.; Bache-Andreassen, L.; Uggerud, E. *Org. Biomol. Chem*. **2006**, *4*, 135-141. DOI: 10.1039/B513315G.

[547] Isaacs, N. ***Physical Organic Chemistry***. Second Edition. Longman Scientific & Technical. Burnt Mill, Harlow, Essex, UK. **1995**. ISBN: 0582218632, 9780582218635.

[548] Streitwieser, A. *Chem. Rev*. **1956**, *56* (4), 571-752. DOI: 10.1021/cr50010a001.

[549] Swain, C.G.; Langsdorf, W.P. *J. Am. Chem. Soc*. **1951**, *73* (6), 2813-2819. DOI: 10.1021/ja01150a113.

[550] Jaffé, H.H. *Chem. Rev*. **1953**, *53* (2), 191-261. DOI: 10.1021/cr60165a003.

[551] Stein, A.R.; Tencer, M.; Moffat, E.A.; Dawe, R.; Sweet, J. *J. Org. Chem*. **1980**, *45* (17), 3539-3540. DOI: 10.1021/jo01305a045.

[552] Craig, S.L.; Brauman, S.L. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121* (28), 6690-6699. DOI: 10.1021/ja983010x.

Substitution nucléophile aromatique (S_NAr).

Principe général.

Contrairement à la S_N2, la substitution nucléophile aromatique S_NAr est contrainte par certaines conditions. En effet, au sein d'un cycle aromatique, des substituants (en position *ortho* ou *para*) ou hétéroatomes (en α ou en γ) électroattracteurs sont nécessaires à la réactivité [**Figure 29A**]. Le mécanisme d'action se rapproche plus d'une addition – élimination [**Figure 29B**]. De même, par analogie à la S_N2, le mécanisme majoritaire est ici une addition frontale, celle opposée n'étant pas possible.

La liaison entre le cycle aromatique et un hétéroatome peut être catalysée par du cuivre. Dans ce cas-là, le mécanisme réactionnel n'est plus celui d'une simple substitution nucléophile mais bien celui d'un couplage catalysé par un métal (Ullmann, Buchwald-Hartwig…).

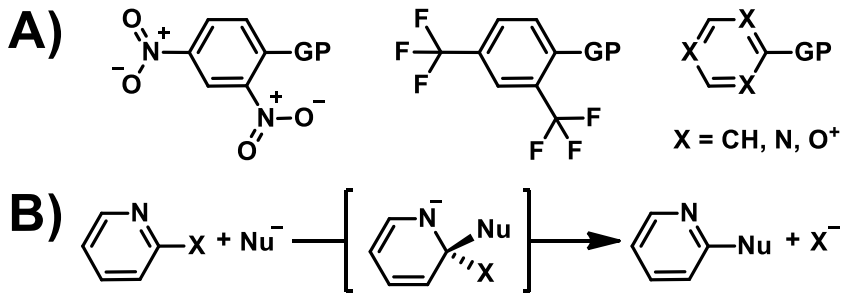


Figure 29. Réactions de Substitution Nucléophile Aromatique (S_NAr). A) Liste non exhaustive des fonctions ou atomes électroattracteurs rendant possible la substitution nucléophile aromatique. B) Mécanisme de réaction pour des pyridines substituées en α.

Paramètres de réaction.

De même que pour la S_N2, les éléments qui suivent décrivent les différents paramètres et réactivités observés pour les S_NAr. Comme pour la S_N2, la réactivité des espèces en présence dépend de la force de liaison entre le groupe partant et l'atome de carbone central dans la substitution, la répartition de la charge positive sur ce même carbone et la nucléophilie du composé venant s'additionner sur le cycle aromatique. Nous ne répèterons donc pas les paramètres qui sont communs, mais nous nous attacherons uniquement à des détails nouveaux ou différents. Cependant, la définition de la nucléophilie pour les S_NAr semble différente de celle pour les S_N2.[553] Ainsi, il n'y aurait pas d'universalité pour ce concept pour les substitutions nucléophiles.

[553] Fernández, I.; Frenking, K.; Uggerud, E. *J. Org. Chem*. **2010**, *75* (9), 2971-2980. DOI: 10.1021/jo100195w.

Effet de solvant.

Ainsi, par exemple, en comparant différents solvants, seule leur polarité a été évaluée. Les milieux les plus polaires tendent à augmenter la cinétique des S_NAr quand les alcanes utilisés comme solvants la diminuent.[554,555,556]

Nucléophile et groupe partant.

Dans le cas d'une S_NAr, les affinités entre le carbone électrophile et les différents halogènes sont inversées.[557,558] Ainsi, le fluor est un meilleur groupe partant que l'iode ($I < Br < Cl < NO_2 < F$).

Tous les alcools et les amines primaires ou secondaires ont été identifiés comme étant des nucléophiles potentiellement efficaces.[542] Il a été observé qu'une préférence existe pour remplacer un groupe partant avec un nucléophile ayant les mêmes propriétés. En effet, par exemple, le nitrite (NO_3^-) substitue le 2,4-dinitro-1-fluorobenzène par un de ses oxygènes et par son azote pour le 2,4-dinitro-1-iodobenzène.[559] L'électronégativité est le paramètre clef pour ces réactions. Dans le cas des cycles aromatiques substitués en *ortho*, les groupes partants les plus réactifs ne sont pas favorables à l'obtention des produits attendus. En effet, le 1-fluoro2,4-dinitrobenzène mène à la décomposition du produit alors que les substitutions par un groupe nitro ou un atome de chlore s'arrêtent au produit attendu.[560,561] Alors que les ions amidures sont très nucléophiles comme les alcoolates, les amines non-déprotonées peuvent agir comme nucléophile ou comme base. Selon les activations électrophiles des substrats, l'étape significative lors de la S_NAr peut varier entre l'étape d'addition nucléophile ou acido-basique.

---

[554] Suhr, H. *Chem. Ber*. **1964**, *97* (12), 3268-3276. DOI: 10.1002/cber.19640971203.

[555] Suhr, H. *Chem. Ber*. **1964**, *97* (12), 3277-3283. DOI: 10.1002/cber.19640971204.

[556] Doddi, G.; Illuminati, G.; Mencarelli, P.; Stegel, F. *J. Org. Chem*. **1976**, *41* (17), 2824. DOI: 10.1021/jo00879a008.

[557] Caron, S.; Ghosh, A. *Nucleophilic Aromatic Substitution*. ***Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles and Techniques***. First Edition. John Wiley & Sons. Inc. **2011**. DOI: 10.1002/9781118093559.ch4.

[558] Gorvin, J.H. *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans*. **1988**, *1* (6), 1331-1335. DOI: 10.1039/P19880001331.

[559] Rosenblatt, D.H.; Dennis, W.H.; Goodwin, R.D. *J. Am. Chem. Soc*. **1973**, *95* (7), 2133-2136. DOI: 10.1021/ja00788a009.

[560] Broxton, T.J.; Muir, D.M.; Parker, A.J. *J. Org. Chem*. **1975**, *40* (14), 2037. DOI: 10.1021/jo00902a005.

[561] Broxton, T.J.; Muir, D.M.; Parker, A.J. *J. Org. Chem*. **1975**, *40* (22), 3230. DOI: 10.1021/jo00910a015.

D'autre part, les thiols ont tendance à être plus nucléophiles que les alcools correspondants comme pour les S_N2.[542,562,563] C'est pourquoi il est possible de réaliser des S_NAr entre un thiolate et un substrat électrophile en présence d'un alcool, utilisé comme solvant.[564] De plus, alors que les alcools tendent à réagir selon la charge du groupe partant, les thiols s'additionnent selon la polarisation de sa liaison avec le carbone électrophile.[565] De ce fait, l'affinité des premiers serait celle-ci ($Cl < NO_2 << F$), comparativement à celle des nucléophiles soufrés ($Cl < F < NO_2$). Enfin, un effet des bases carbonates dans le DMF sur les nucléophiles est à noter par la formation d'un complexe à 3 corps pour activer ces réactifs [**Figure 30**].

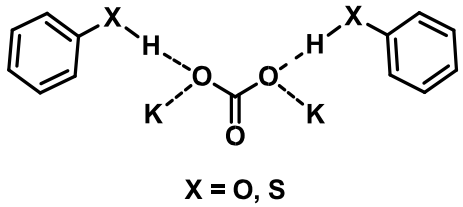


Figure 30. Complexe d'activation de la nucléophilie et réactivité acido-basique des alcools et thiols par une base carbonate.

[562] Bartoli, G.; Todesco, P.E. *Acc. Chem. Res*. **1977**, *10* (4), 125-132. DOI: 10.1021/ar50112a004.

[563] Bordwell, F.G.; Hughes, D.L. *J. Am. Chem. Soc*. **1986**, *108* (19), 5991. DOI: 10.1021/ja00279a054.

[564] Dillard, R.D.; Yen, T.T.; Strark, P.; Pavey, D.E. *J. Med. Chem*. **1980**, *23* (7), 717-722. DOI: 10.1021/jm00181a003.

[565] Vlasov, V.M. *Russ. Chem. Rev*. **2003**, *72* (8), 681-703. DOI: 10.1070/RC2003v072n08ABEH000809.

Substitution nucléophiles intramoléculaires activant l'électrophilie du substrat.

Certains substrats portent aussi des fonctions pouvant être elles-mêmes des nucléophiles. Ainsi, les acides carboxyliques ou sulfoniques placés en γ du groupe partant peuvent d'abord le substituer pour former des β-lactones ou ses équivalents avec un soufre oxydé [**Figure 31**].[566] Dans un second temps, le nucléophile envisagé vient réagir pour ouvrir le cycle à quatre membres et obtenir le produit désiré.

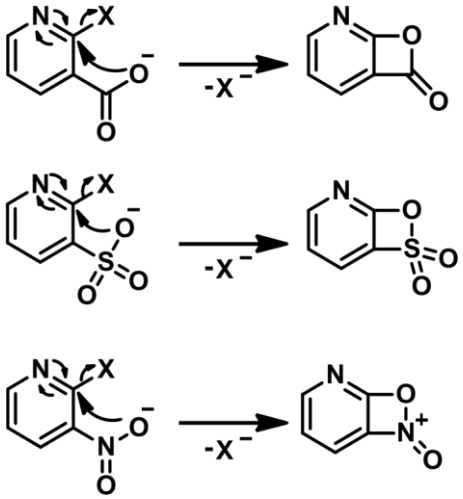


Figure 31. Produits de substitution nucléophile aromatique (SNAr) intramoléculaire facilitant une seconde SNAr.

Dans notre travail, nous utiliserons ces différentes réactions afin de synthétiser des composés dont les côtés *pore* et *toe-end* seront modifiés selon le cycle d'optimisation expliqué dans la partie B de ce chapitre.

L'objectif principal de ces modulations est la préservation des interactions déjà identifiées pour les rhinovirus, ainsi que la découverte de nouvelles interactions liées aux entérovirus afin d'élargir le spectre d'activité de nos composés.

[566] Litvak, V.; Shein, S.M. *Chem*. **1972**, *77*, 113397. DOI: 10.1002/chin.197241100.

Chapitre IV : Pharmacomodulation et optimisation des composés antiviraux

Ce chapitre, divisé en deux parties, sera dédié à la présentation des différents résultats obtenus de pharmacomodulation des extrémités des composés éthérés présentés dans la section A du **Chapitre III**. Comme précisé ci-dessus, l'objectif de ce projet de thèse est la synthèse d'inhibiteurs à large spectre des Entérovirus, afin d'élargir l'activité anti-rhinovirale déjà évaluée à l'ensemble des types de virus du même genre, tout en gardant l'activité submicromolaire observée.

Pour effectuer ces modifications structurales, nous avons utilisé des stratégies de synthèse adaptées aux modulations des hits dont les réactions (couplage de Suzuki-Miyaura, substitution nucléophile bimoléculaire ou aromatique) présentés dans la section C du **Chapitre III**.

Une première partie présentera les travaux liés à l'identification de pharmacophores par modulation des composés synthétisés dans un modèle biologique utilisant les EV-A71. Une seconde partie sera consacrée à une nouvelle modulation, connaissant les différentes interactions mises en jeu, afin d'avoir une inhibition sur différentes espèces d'entérovirus, à savoir l'EV-A71 pour les EV-A, l'E30 pour les EV-B et le CV-A24 pour les EV-C.

A. Étude pilote sur EV-A71 pour la synthèse d'inhibiteurs des Entérovirus.

1) Introduction.

Cette première partie a été menée suite aux résultats des composés éthérés possédant une activité anti-rhinovirale présentés dans le Chapitre III, partie A [**Tableau 13**]. Ainsi, après l'identification de composés actifs sur un large panel de rhinovirus, la modification du linker, substituant l'alcool secondaire par un éther, a permis de maintenir leur activité. Dans ce projet de thèse, comme pour les travaux préliminaires, rappelons que nous nommerons l'extrémité portant initialement le 1,2,4-triazole ou 1,2-pyrrazole, le côté *pore*, et celle avec le *N*-méthyl ou -éthylpyrrazole, le côté *toe-end* [**Figure 32**].

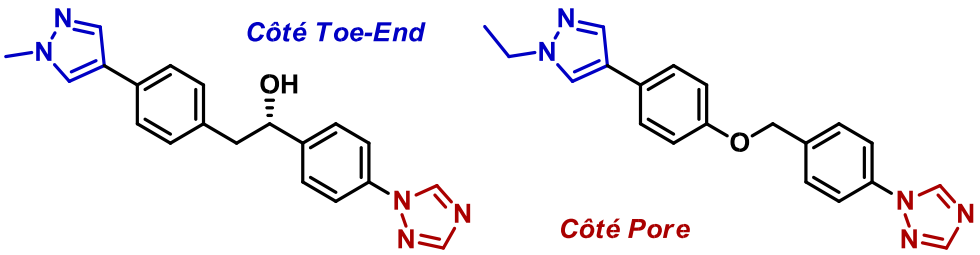


Figure 32. Nomenclature et charte graphique des composés présentés pour ce projet de thèse.

Tableau 13. Différentes activités contre HRV-B14 des inhibiteurs les plus actifs précédemment synthétisés.

Composé	$CE_{50,HeLa}$ (RV-B14)	$CC_{50,HeLa}$	Index de Sélectivité
LPCRW_0005	2,0 0,6 µM	184 30 µM	92
78	0,042 0,100 µM	> 247 µM	> 5881
81	0,028 0,013 µM	> 256 µM	> 9143
134	< 2,4 µM	> 100 µM	> 41

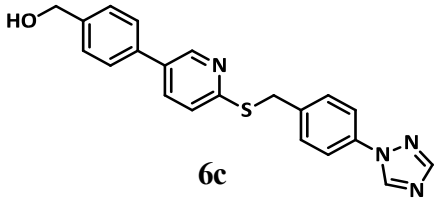
Le linker, portant une fonction éther, est très étudié depuis la synthèse des séries WIN, inhibiteurs à large spectre des Entérovirus. Afin de concevoir un autre type d'inhibiteur et augmenter l'hydrophobie de nos composés, nous avons décidé de substituer l'atome d'oxygène de ce linker par un atome de soufre pour former des thioéthers.

Le modèle choisi pour évaluer nos composés de synthèse est l'EV-A71. Il sert de référence comme Entérovirus facile à cultiver par nos partenaires de l'Unité des Virus Emergents, mais aussi comme pathogène significatif, compte tenu de la clinique des pathologies qu'induise son infection. Dans un second temps, une étude à plus large spectre sera effectuée.

Afin d'effectuer ces modifications structurales, notamment au niveau du linker, nous avons dû repenser les stratégies de synthèse exploitées précédemment. Ainsi, afin d'optimiser les travaux de pharmacomodulation des deux extrémités, nous avons développé deux stratégies, chacune construite autour de deux couplages de Suzuki-Miyaura et une substitution nucléophile soit bimoléculaire soit aromatique.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *European Journal of Medicinal Chemistry* » en 2024.

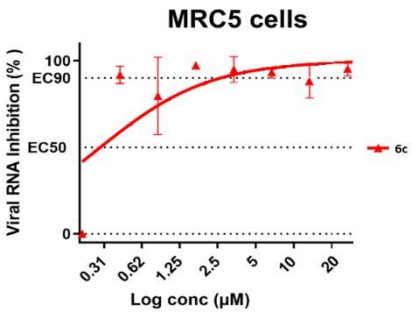
"New Potent EV-A71 Antivirals Targeting Capsid." Roux, H.; Touret, F.; Coluccia, A.; Khoumeri, O.; Di Giorgio, C.; Majdi, C.; Sciò, P.; Silvestri, R.; Vanelle, P.; Roche, M. *Eur. J. Med. Chem*. **2024**, *276*, 116658. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116658.

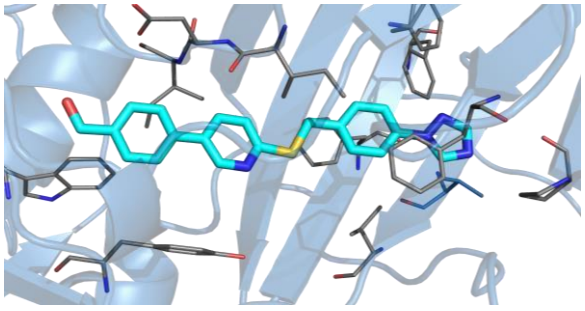


6c

$EC_{50,MRC-5}$ = 0.29 µM $EC_{50,RD}$ = 1.66 µM

$CC_{50,MRC-5}$ > 20 µM $EC_{50,RD}$ > 20 µM





European Journal of Medicinal Chemistry 276 (2024) 116658



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech



Research paper



New potent EV-A71 antivirals targeting capsid

Hugo Roux [a], Franck Touret [b], Antonio Coluccia [c], Omar Khoumeri [a], Carole Di Giorgio [d], Chaimae Majdi [a], Pietro Sciò [c], Romano Silvestri [c], Patrice Vanelle [a,**], Manon Roche [a,*]

[a] Aix-Marseille Université, CNRS, ICR UMR 7273, PCR, Faculté de Pharmacie, 13005 Marseille, France
[b] Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), France
[c] Laboratory affiliated with the Institute Pasteur Italy - Cenci Bolognetti Foundation, Department of Drug Chemistry and Technologies (M.B., A.C., R.S.), Sapienza University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, Roma 00185, Italy
[d] Aix-Marseille Université, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Faculty of Pharmacy, Service of Environmental Mutagenesis, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:
EV-A71
Capsid binder
Structure-based drug design
Structure-activity relationships
Heterocyclic compounds

ABSTRACT

The enterovirus is a genus of single-stranded, highly diverse positive-sense RNA viruses, including Human Enterovirus A-D and Human Rhinovirus A-C species. They are responsible for numerous diseases and some infections can progress to life-threatening complications, particularly in children or immunocompromised patients. To date, there is no treatment against enteroviruses on the market, except for polioviruses (vaccine) and EV-A71 (vaccine in China). Following a decrease in enterovirus infections during and shortly after the (SARS-Cov2) lockdown, enterovirus outbreaks were once again detected, notably in young children. This reemergence highlights on the need to develop broad-spectrum treatment against enteroviruses. Over the last year, our research team has identified a new class of small-molecule inhibitors showing *anti*-EV activity. Targeting the well-known hydrophobic pocket in the viral capsid, these compounds show micromolar activity against EV-A71 and a high selectivity index (SI) (**5h**: $EC_{50,\ MRC\text{-}5} = 0.57$ μM, $CC_{50,\ MRC\text{-}5} > 20$ μM, SI > 35; $EC_{50,\ RD} = 4.38$ μM, $CC_{50,\ RD} > 40$ μM, SI > 9; **6c**: $EC_{50,\ MRC\text{-}5} = 0.29$ μM, $CC_{50,\ MRC\text{-}5} > 20$ μM, SI > 69; $EC_{50,\ RD} = 1.66$ μM, $CC_{50,\ RD} > 40$ μM, SI > 24; Reference: Vapendavir $EC_{50,\ MRC\text{-}5} = 0.36$ μM, $CC_{50,\ MRC\text{-}5} > 20$ μM, $EC_{50,\ RD} = 0.53$ μM, $CC_{50,\ RD} > 40$ μM, SI > 63). The binding mode of these compounds in complex with enterovirus capsids was analyzed and showed a series of conserved interactions. Consequently, **6c** and its derivatives are promising candidates for the treatment of enterovirus infections.

1. Introduction

The enterovirus is a genus of highly diverse RNA viruses that includes Enterovirus A-D (EVs, Coxsackieviruses (CV), Echoviruses (E), Polioviruses) and Human Rhinovirus A-C species. Most spread via aerosol or fecal-oral routes [1]. They cause many acute infections, although the majority are associated with mild, flu-like, symptoms. EV-A is known to cause hand-foot-mouth disease (HFMD) outbreaks. EV-A71 is among those receiving the most attention due to its severe consequences, like neurological sequelae, including meningoencephalitis, lung difficulties, and mortality. In addition, in recent decades, new viral variants have emerged causing outbreaks associated with more severe disease manifestations than previously reported [2,3]. EV-A71 is composed of 3 main genotypes (A, B, C) but new genotypes (D,E and F) were recently described [4].

Vaccination is the sole preventive treatment available against enteroviruses, but vaccines have only been developed for polioviruses and EV-A71 (only on the market in China) [5]. To date, no antiviral molecules have been approved for enterovirus infections, although compounds such as pleconaril have already reached phase 2 of clinical trials [6].

Enterovirus particles are composed of single-strand RNA genomes encapsulated by an icosahedral capsid of ~30 nm in diameter. Viruses in the genus share several conserved protein motifs located in the RNA-dependent RNA polymerase, capsid proteins, and viral proteases [7]. In particular, VP1 is a structural protein involved in capsid formation and the major protein exposed at the virion surface. Moreover, the VP1 sequence seems to have a low recombination rate for the enteroviruses' amino acid [7,8].

Our research team's strong involvement in exploring capsid binders

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: patrice.vanelle@univ-amu.fr (P. Vanelle), manon.roche@univ-amu.fr (M. Roche).

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116658
Received 16 April 2024; Received in revised form 2 July 2024; Accepted 4 July 2024
Available online 7 July 2024
0223-5234/© 2024 Published by Elsevier Masson SAS.

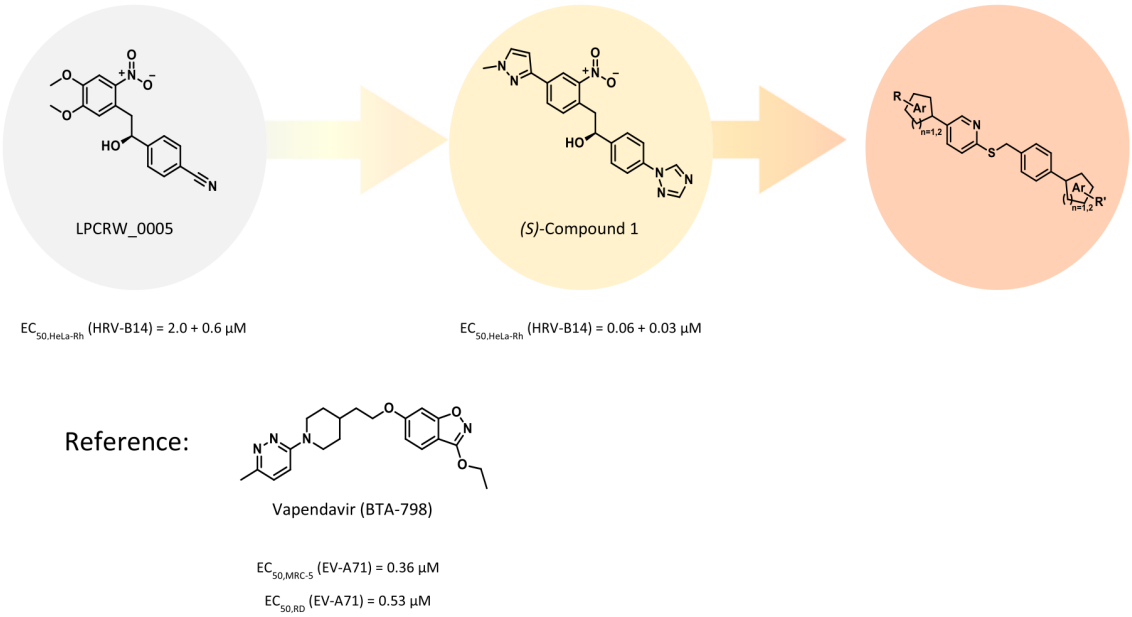


Fig. 1. Evolution of our project aimed at identifying broad-spectrum enterovirus inhibitors: main hits and reference. Compounds' activity is described by their half-maximal effective concentration (EC_{50}) against HRV-B14 on HeLa–Rh cells or EV-A71 on MRC-5/RD cells.

targeting Non-Polio Enteroviruses (NPEV) led to the development of numerous inhibitors, including a hit compound LPCRW_0005 with micromolar activity against HRV-B14 [9] (see Fig. 1). The crystal structure of the HRV-B14/LPCRW_0005 complex confirmed the proposed mechanism of action through binding with the above-mentioned hydrophobic pocket [10]. The compound blocks the capsid into a specific conformation which inhibits the recognition by human cell membrane receptors and the uncoating of viral RNA in the host cell. Our focus on VP1 crystal structure-guided exploration led us to optimize inhibitors.

Over 250 molecules were synthesized and evaluated *in vitro* [11]. Systematic hit-to-lead optimization produced *(S)*-compound 1 with excellent inhibitory activity ($EC_{50,\ HeLa\ Rh}$ (HRV-B14) = 0.06 µM) [12] (see Fig. 1).

Based on these results, we modified the linker to broaden the spectrum of activity and target EV-A as well, given the attention it was receiving from the international scientific community. First, the ethanol linker was modified by removing the alcohol group. Indeed, the latter was involved in an H-bond interaction with tyrosine residue in HRV-B14 that switched to isoleucine in EV-A71. Furthermore, the ethyl chain was exchanged for a thioether chain to improve hydrophobic interactions. Thus, a series of 31 new compounds were synthesized and assayed in two cell lines (see Fig. 1). Two derivatives showed promise, with inhibitory concentrations in the submicromolar range. Binding mode, cytotoxicity and mutagenicity were also explored.

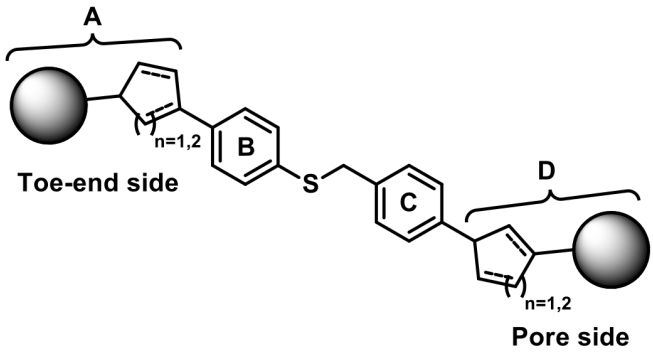


Fig. 2. Nomenclature of scaffold cycles and hydrophobic pocket sides.

2. Results and discussion

2.1. Design strategy

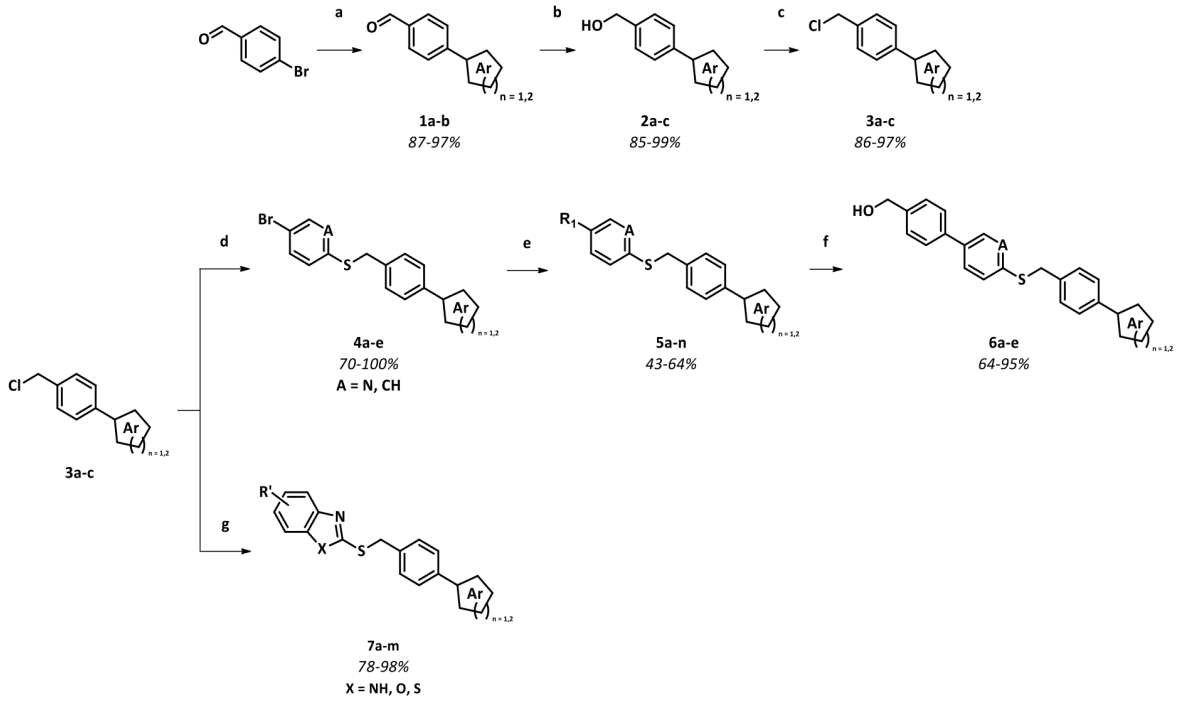
Preliminary docking studies of LPCRW_0005 at the capsid pocket of EV-A71 suggested that the inhibitor did not entirely fill the targeted hydrophobic pocket, in accordance with the literature [10,12]. Thus, the scaffold was modified by using a new linker and bulkier substituents to better fill the pocket. The hydrophobic pocket can be divided into two sides: a pore side, the solvent-exposed entrance of the cleft, and a toe-end side, the closed end of the pocket. Hence, new substituents were introduced at the pore (cycle D) and the toe-end (cycle A). See Fig. 2 for a full description.

2.2. Chemistry

A total of thirty-one new compounds were synthesized via two strategies, respectively detailed in Scheme 1 and Scheme 2, using 4-bromobenzaldheyde as the starting material. The choice of these 2 strategies was driven by the desire to limit the number of steps and concern for atom economy while allowing a wide range of modulations from a single starting compound. Several modulations were considered, such as electron-donating groups (methyl, chlorine) or -withdrawing groups (trifluoromethyl, fluorine) as well as whether to include hydrogen acceptor (aldehyde, dimethyl amino, ethoxy and methoxy, methyl indole, phenyl-morpholine, phenyl-methyl piperidine, pyrazole) or donor (alcohol, methyl alcohol) moieties. Likewise, we synthesized series of compounds by introducing heteroatoms into the **B** cycle (phenyl, pyridine, imidazole, oxazole, thiazole, triazine). In some cases, the length of the molecule was modified by adding a non-aromatic heterocycle at the extremities of the molecules or fusing the two aromatics **A** and **B**. All the ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra, HRMS-ESI, and chemical purity data of target compounds can be found in Supplementary Materials.

2.2.1. Procedure A

This synthesis strategy favors toe-end modulation. Indeed, from compound **3c**, we synthesized 11 bicycle compounds and, from

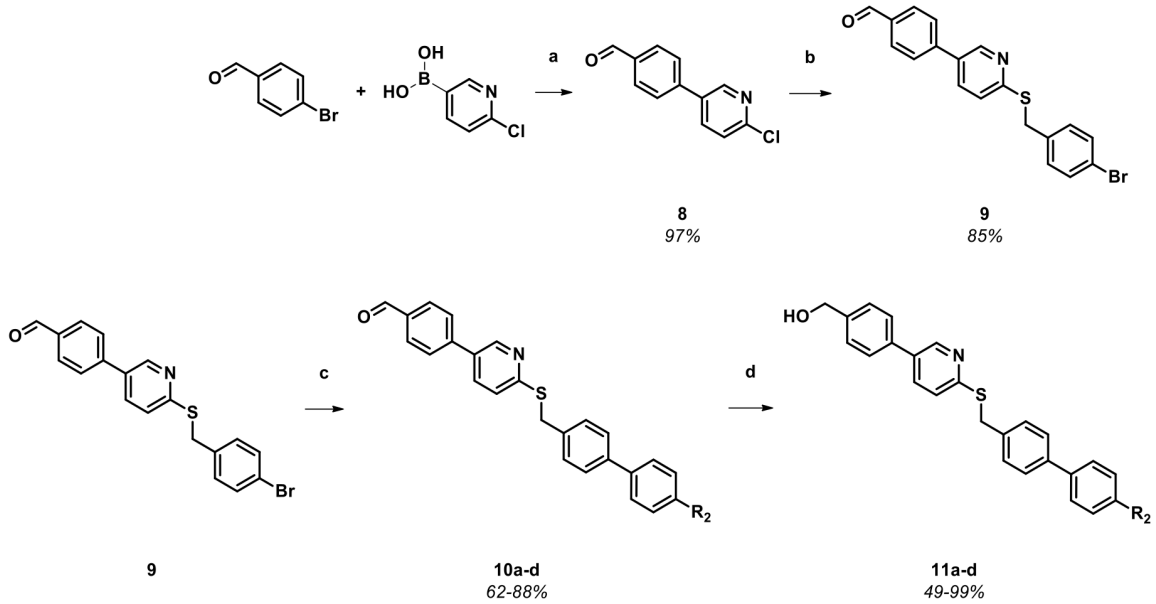


Scheme 1. Procedure A. Reagents and conditions: (**a**) $ArB(OH)_2$, $Pd(Dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxane:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (**b**) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), 0 °C to rt, 2h, N_2, p; (**c**) $SOCl_2$, DCM or DMF, 0 °C to rt, 3h, N_2; (**d**) BrPhSh or BrPySH, K_2CO_3, ACN, 80 °C, N_2, p; (**e**) $ArB(OH)_2$, $Pd(Dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxane:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (**f**) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), 0 °C to rt, 2h, N_2, p; (**g**) Fused bicycle (FB-SH), K_2CO_3, ACN, 80 °C, N_2, p.

compound **4e**, 10 compounds. All were toe-end functionalized in only 1 step.

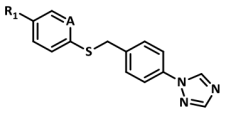
Moreover, preliminary docking assays predicted that dimethylaniline or *para*-ethoxyphenyl at the pore side enhances the binding of bicycle derivatives (compounds **7a** and **7b**). Thus, to easily obtain these derivatives, either with benzyl alcohol (**6a**, **6b**, **6d**) or methoxybenzoxazole (**7a**, **7b**) at the toe-end side, we used Procedure A.

As shown in Scheme 1, the first strategies are based on the synthesis of chloromethylbenzene derivatives **3a-c** to obtain compounds **5a-n**, **6a-e**, and **7a-m**, toe-end modulated. 4-bromobenzaldehyde was coupled by Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with functionalized boronic acid to prepare pore-functionalized benzaldehyde **1a-b**, with yields of 87–97 %. To obtain functionalized compounds **3a-c** in yields of between 87 % and 96 %, the previously synthesized or commercially available aldehyde reduction was followed by chlorination via the appropriate procedure from previously reported synthesis [11]. Then, derivatives **3a-c** were coupled with 3-bromo-6-mercaptopyridine (BrPySH), 4-bromothiophenol (BrPhSH) or fused bicyclic (FB) thiols in the presence of K_2CO_3 in acetonitrile (ACN) to yield **4a-e** (70–100 %) or **7a-m** (78–98 %) derivatives, respectively. To prepare compounds **5a-n**,

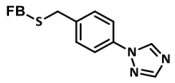


Scheme 2. Procedure B. Reagents and conditions: (**a**) 6-ClPyB$(OH)_2$, $Pd(Dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxan:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (**b**) $BrPhCH_2SH$, Cs_2CO_3, DMF, rt; (**c**) $ArB(OH)_2$, $Pd(Dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxan:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (**d**) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), 0 °C to rt, 2h, N_2, p.

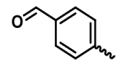
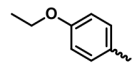
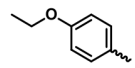
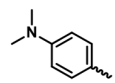
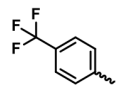
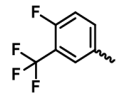
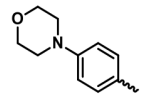
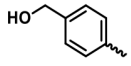
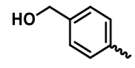
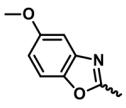
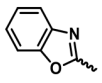
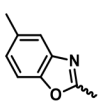
Table 1
In vitro toe-end modulated antiviral activity of against EV-A71.



5c-e / 5g-n / 6a-e

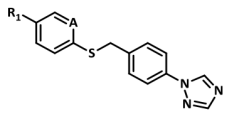


7c-m

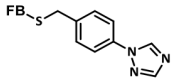
				MRC-5		RD	
Compounds	A	R_1	FB	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
5c	N		/	>20	/	/	/
5d	N		/	>20	/	/	/
5e	N		/	>20	/	/	/
5h	CH		/	0.57 ± 2.50	>20	4.38 ± 2.16	>40
5i	CH		/	>20	/	/	/
5j	CH		/	>20	/	/	/
5k	CH		/	>20	/	/	/
5l	CH		/	>20	/	/	/
5 m	CH		/	>20	/	/	/
5n	CH		/	>20	/	/	/
6c	N		/	0.29 ± 2.35	>20	1.66 ± 2.18	>40
6e	CH		/	>20	/	/	/
7c	/	/		1.67 ± 2.23	>20	28.53 ± 2.23	22.10[a]
7d	/	/		>20	/	/	/
7e	/	/		>20	/	/	/

(*continued on next page*)

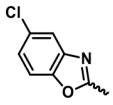
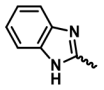
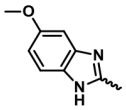
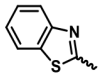
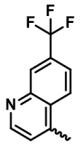
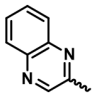
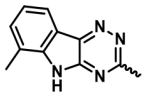
Table 1 (*continued*)



5c-e / 5g-n / 6a-e



7c-m

Compounds	A	R_1	FB	MRC-5 EC_{50} (μM)	MRC-5 CC_{50} (μM)	RD EC_{50} (μM)	RD CC_{50} (μM)
7f	/	/		>20	/	/	/
7g	/	/		>20	/	/	/
7h	/	/		>40	>40	>40	>40
7i	/	/		>20	/	/	/
7j	/	/		39.73[a]	>40	>40	>40
7k	/	/		27.98 ± 2.67	>40	12.68 ± 2.25	20.84 ± 1.92
7l	/	/		38.12 ± 3.13	>40	6.80 ± 3.23	>40
7 m	/	/		26.48 ± 2.25	15.62 ± 1.79	4.65 ± 1.87	8.89 ± 1.80
Vapendavir	/	/	/	0.36 ± 1.61	>20	0.53 ± 1.63	>63

[a] SD values not determined.

bromoderivatives **4a-e** were coupled by Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with functionalized associated boronic acid, providing yields of 43–64 %. To prepare compounds **6a-e**, the aldehyde was reduced to alcohol with sodium borohydride, giving 64–95 % yields.

During the synthesis of compound **3b**, we had some difficulties during the purification step. Indeed, except with mild conditions during the extraction, we observed a complete loss of our compounds (reagents and expected product). Likewise, increasing the reaction time produced the same results. By column chromatography, the degrading products remained on the silica gel and were not analyzed.

2.2.2. *Procedure B*

Considering synthesis problematic with pharmacophore, including non-aromatic nitrogen, during the synthesis of **3b**, we chose to synthesized compounds **10c** and **10d** with another procedure.

Moreover, once we determined the best toe-end modulation (benzyl alcohol), we designed this procedure to reduce the consumption of rare and costly boronic acid to functionalize the pore side. Indeed, from compound **9**, we obtain 4 potential inhibitors in only 2 steps. Except for our concern about atom economy, some boronic acids used to functionalize the pore side are quite expensive.

As presented in Scheme 2, the second strategy takes the opposite route to the first, for pore modulations. To prepare toe-end functionalized benzaldehyde **8** in 97 % yield, 4-bromobenzaldehyde was coupled by Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with (6-chloropyridin-3-yl) boronic acid). Then, chloro derivative **8** was coupled with (4-bromophenyl)methanethiol ($BrPhCH_2SH$) in the presence of K_2CO_3 in acetonitrile to give **9** in 85 % yield. Compounds **10a-d** were generated using a Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction with $Pd(dppf)Cl_2$ as catalyst, providing yields of up to 62–88 %. To prepare compounds **11a-d**, the benzaldehyde of compounds **10a-d** was reduced to alcohol with sodium borohydride **$NaBH_4$** and average yields of 49–99 % were obtained.

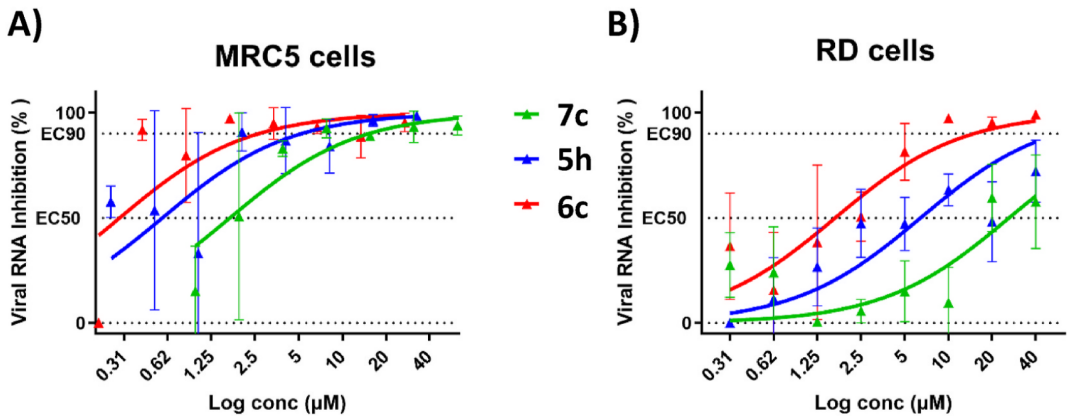


Fig. 3. Dose-response curve reporting the antiviral activity of **7c**, **5h**, and **6c** against EV-A71. Antiviral activity in A) MRC-5 cells and B) in RD cells. Data presented are from three technical replicates, and error bars show mean ± s.d.

2.3. *In vitro biological assays*

The newly synthesized compounds were evaluated for *in vitro* antiviral activity against a replicative EV-A71 clinical strain in a cell-based RNA yield reduction assay on two different cell lines. We chose this approach to avoid reporting a cell-dependent antiviral effect and to increase the level of confidence in our results. We used two cell lines (Rhabdomyosarcoma RD and Medical Research Council cell strain 5 MRC-5) that have been reported to support EV-A71 replication [13]. Antiviral activity is expressed as the concentration at which 50 % of virus-induced RNA yield reduction was inhibited (EC_{50}). Viral inhibition was assessed using a standard protocol measuring the RNA yield reduction in the cell supernatant after rounds of viral replication [14]. Compound cytotoxicity (CC_{50}) was assessed in parallel in compound-treated healthy uninfected cells. Vapendavir was used as reference capsid binder. Compounds were classified according to the nature of the cycle B (pyridine, phenyl or fused with cycle A) modulated pharmacophore at both extremities.

2.3.1. *Toe-end exploration*

Toe-end modulations were performed to identify new interactions between the inhibitor and the target. To reach this goal, a large spectrum of pharmacophores was synthesized. Activities for each modulation are presented in Table 1.

Our RNA yield-reduction antiviral assay revealed 3 promising molecules **5h**, **6c**, and **7c** in MRC-5, showing the lowest EC_{50} at the micromolar level without any sign of cytotoxicity in the tested conditions. This led to a good selectivity index (range from >20 to > 70). Importantly, derivatives **5h** and **6c** showed an inhibitory potency comparable with reference Vapendavir for MRC-5-infected cells. However, in RD cells only **5h** and **6c** conserved antiviral activity at the micromolar level, although this was higher than for MRC-5. In contrast, **7c** showed greater cytotoxicity in this cell line, resulting in a poor selectivity index SI (SI < 1). Interestingly, the dose-response curve (Fig. 3) revealed the same pattern between the two cell lines, **5p** being the most active and reaching full inhibition in both assays and **6c** being the least potent.

2.3.2. *Pore modifications*

Likewise, a short series of modified phenyl rings were tested as substituents at the pore side of the pocket and assayed by RNA yield-reduction antiviral assay. Activities of each compound are presented in Table 2.

Only compound **11d** showed inhibitory capacity, with EC_{50} in a micromolar range on MRC-5 cells and SI > 3.1. However, as observed for the toe-end modulated compounds, antiviral activity on RD cells decreased, even if the selectivity index remained above 2.

2.4. *Binding mode analyses*

The reported compounds were inspected by molecular docking to identify a reliable binding mode. The most active derivatives shared a superimposable binding mode, and it was possible to highlight some pharmacophoric interactions. The triazole ring was involved in hydrophobic interactions with residues F233 and F137, V190, and P177. The phenyl ring (C) was trapped between aromatic residues F155 and F135. The atoms of the linker made stabilizing interactions with V192 and I111. At the toe-end side of the pocket, ring B (phenyl or pyridine) established aromatic interactions with Y201, while ring D was involved in t-shaped interactions with W203. It is noteworthy that derivative **6c** had an H-bond contact with D112, which was not conserved in the other studied analog **5h** (Fig. 4A). Concerning derivatives with a fused bicycle at ring A/B, compound **7c** had all the described interactions and showed an H-bond between the oxygen atom of the methoxy moiety and the backbone of residue I113 (Fig. 4B).

A striking "all or nothing" pattern was observed in biological data. Even minor chemical modifications to the compounds' skeleton led to a complete drop-in antiviral activity. This might be related to cellular factors (permeability, distribution etc) and may not be entirely explained by docking experiments.

2.5. *Structure-activity relationships*

The results enabled us to identify some structure-interaction relationships. First, all the promising compounds present a hydrogen acceptor in the toe-end substitution or aromatic cycle. However, these are not in the same position. Our best compound **6c** possesses a final hydrogen acceptor and donor. Moreover, in **5h**, the 1-methylpyrazole has an aromaticity and hydrogen bond acceptor without a donor effect, which may explain its lower potential activity. Our compounds' number of nitrogens seems to be an important factor for activity. With 6 or more nitrogens, **5d** (pyridine equivalent of **5h**) is no longer efficient against EV-A71. High numbers of nitrogens could increase compounds' hydrophilicity too much, thereby possibly interrupting interactions with

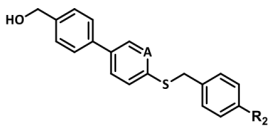
the VP1 hydrophobic pocket. On the other hand, only 3 nitrogens alone may not be sufficient to dissolve **6e** (phenyl analog of **6c**), that's preventing its activity.

Regarding other modulations, **5k** remains inactive even when the **6c** structure is modulated by small substitutions on the toe-end pharmacophore. Neither electro-donating modulations (**5e**, **5i**, **5j**) nor electro-withdrawing modulations (**5l**, **5m**) provide a better activity than **6c, 5e** and **5i** are no longer active. The bulky substitution might affect the binding mode by steric hindrance. Concerning 5,6-fused bicycles, aromatic cycle **A** of **7c** is substituted by a methoxy moiety. Without this specific substitution, none of the other compounds are inactive.

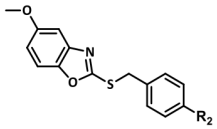
For our synthesis, we chose a different cycle **B**. A pyridine moiety should promote stacking with Y201 due to its electronic distribution. Moreover, the presence of a nitrogen may decrease the logP of our compound and reduce its desolvation cost.

In some cases, in the pore pharmacophore, according to the other efficient inhibitors, **11d** possesses a nitrogen near cycle **D** which seems essential for activity. Indeed, if this atom is too far from cycle **D**, the

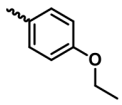
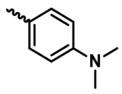
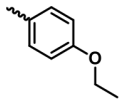
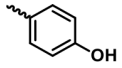
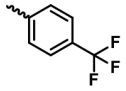
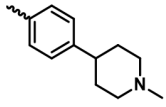
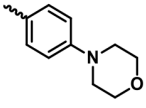
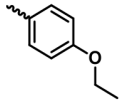
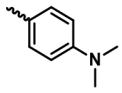
Table 2
Biological parameters of pore modulations against EV-A71.



6a-d / 11a-d



7a-b

Inhibitors	A	R_2	MRC-5 EC_{50} (μM)	MRC-5 CC_{50} (μM)	Rhabdomyosarcoma EC_{50} (μM)	Rhabdomyosarcoma CC_{50} (μM)
6a	N		>20	/	/	/
6b	N		>20	/	/	/
6c	N		0.29 ± 2.35	>20	1.66 ± 2.18	>40
6d	CH		>20	/	/	/
11a	N		>20	/	/	/
11b	N		>20	/	/	/
11c	N		>20	/	/	/
11d	N		6.38[a]	>20	19.71 ± 2.23	>40
7a	/		>20	/	/	/
7b	/		>20	/	/	/
Vapendavir	/	/	0.36 ± 1.61	>20	0.53 ± 1.63	>63

[a] SD values not determined.

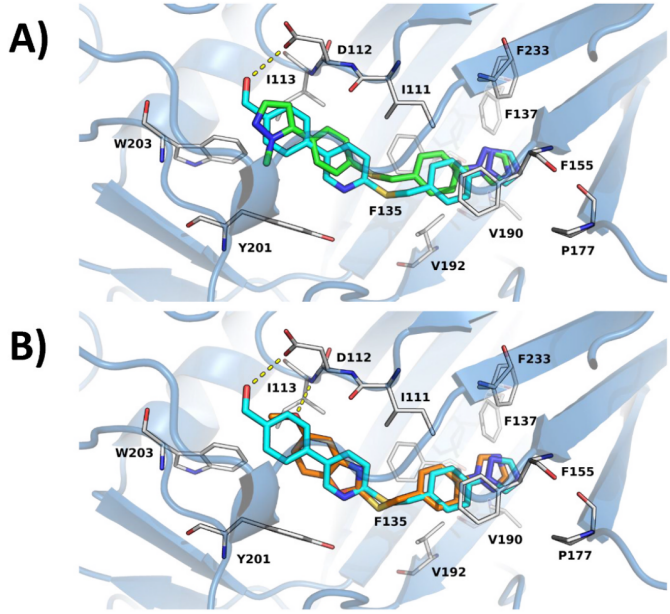


Fig. 4. Binding mode of most active compounds in the EV-A71 hydrophobic pocket (pdb code: 4ZFG). H-bonds are represented by a yellow discontinuous line between pocket amino acids and ligand moieties. A) Comparison of **6c** (cyan) and **5h** (green) binding modes in the hydrophobic pocket. B) Comparison of **6c** (cyan) and **7c** (orange) binding modes in the hydrophobic pocket.

compounds become inactive, as in **11c**. The morpholine steric effect also seems to be required for activity. For **6b**, the compound possesses lower steric hindrance in the pore pharmacophore. Here, dimethylamino substitution leads to a compound that is no longer active. When this nitrogen is replaced by oxygen (**6a** and **11a**), the hydrogen acceptor properties remain but not the activity. The electron-donor effect or modified polarization of **11a** should prevent the activity. In **6a**, the high symmetry between the two extremities (benzyl alcohol and ethoxybenzene) with respect to the thioether linker makes it very difficult to predict which pharmacophore will bind in the pore or toe-end side. A change of orientation in the pocket may explain the loss of activity. Moreover, **6a** ethoxy might be too bulky and generate a steric clash reducing the quality of interactions with the pocket. Likewise, the phenyl-methylpiperidine pharmacophore in **11c** might be too long. Eventually, combined with fused bicycles, ethoxybenzene (**7a**) and dimethylaniline (**7b**) proved to be inactive in our assays. Again, the position of nitrogen in the pore pharmacophore seems to comply with the "all or nothing" pattern for biological activity.

2.6. *In vitro* genotoxicity study

To deal with the preclinic-ready inhibitors, we evaluated the genocytotoxicity of our most promising compounds on Chinese Hamster Ovarian (CHO) cells. For this research, an *in vitro* micronucleus clastogenicity study was used [15].

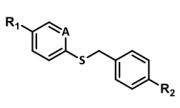
2.6.1. *Cytotoxicity assays on CHO cells*

The *in vitro* 50 % cytotoxic concentrations (CC_{50}) of compounds were assessed on the CHO cell line. They are reported in Table 3. Regarding the effect on cell viability of the CHO cells, no interferences should appear in our mutagenicity assays.

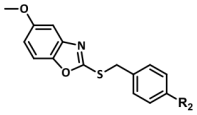
2.6.2. *Micronucleus assays*

The micronucleus assay protocol was performed as validated by the OECD [16]. It counts the partial nucleus due to abnormal DNA fragments caused by damage to chromosomes or interferences during mitosis. Compounds were tested at graduated concentrations from 1 to 100 g/L, with or without metabolic activation. The results were compared with one positive control (Mitomycin C – 0.05 g/L and 1 benzo*[a]*pyrene) and two positive controls (DMSO and without any compound controls). After compounds were solubilized in contact with cells, micronuclei formed were counted for a fixed time in the presence of cytochalasin B, a blocking agent of cytokinesis. Interphase cells were revealed with specific staining to count micronuclei. The results are reported in Supplementary Materials Table 1 without S9 mix (Table Suppl.1A) or with S9 mix (Table Suppl.1B). No significant increase in micronucleated cell rates was observed, with or without the metabolizing mixture. Consequently, neither **5h**, nor **6c**, nor **7c**, nor **11d** exerts cytogenetic effects on *in vitro* CHO cell lines or produces metabolites with cytogenetic effects. In these conditions, none of these capsid binders ever became devoid of clastogenic or aneugenic activities.

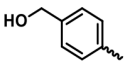
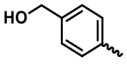
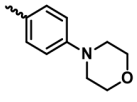
Table 3
In vitro antiviral activity, cytotoxicity and clastogenic/aneugenic activity of most efficient compounds.



5h / 6c / 11d



7c

				MRC-5		RD		Chinese Hamster Ovarian
Inhibitors	A	R_2	R_2	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
Vapendavir	/	/	/	0.36	>20	0.53	>63	/
5h	C			0.57	>20	4.38	>40	44.81 ± 2.89
6c	N			0.29	>20	1.66	>40	41.26 ± 3.33
7c	N	/		1.67	>20	28.53	22.10	32.15 ± 2.45
11d	N			6.38	>20	19.71	>40	45.84 ± 4.81

3. Conclusion

We synthesized heterocyclic compounds which were assessed against EV-A71 in two different cell lines. The *in silico* predictions, high-yielding reactions, and reflexivity of *in vitro* assays on modeling processes enabled us to design a wide range of modulations for our compounds. Some of them (**7c** and **11d**) displayed good activity on MRC-5 cells but were either cytotoxic or not active on RD. Two compounds (**5h** and **6c**) were promising candidates as EV-A71 inhibitors, with submicromolar and micromolar potency ($EC_{50,\ MRC\text{-}5} = 0.57$ μM; $EC_{50,\ RD} = 4.38$ μM and $EC_{50,\ MRC\text{-}5} = 0.29$ μM; $EC_{50,\ RD} = 1.66$ μM) on MRC-5 and RD cells. They also had a large selectivity index, respectively $SI_{MRC\text{-}5} > 35$; $SI_{RD} > 9$ and $SI_{MRC\text{-}5} > 68$; $SI_{RD} > 24$, due to their high cytotoxicity of 50 %. No mutagenicity (clastogenic/aneugenic) was identified for any of our compounds.

The next step towards obtaining a preclinical lead from our compounds will likely involve evaluating pharmacokinetic parameters by modeling. At the same time, antiviral assays on other enteroviruses will be considered to evaluate the spectrum of activity of our compounds and permit the design of broad-spectrum enterovirus inhibitors.

4. Materials and methods

4.1. Chemistry

4.1.1. General methods

Commercially available reagents and solvents were used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (plates coated with silica gel 25 DC-Fertigfolien from Macherey-Nagel). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents on a Brüker Avance-250 instrument (250 MHz), a Brüker Avance III nanobay-300 MHz or a Brüker Avance III nanobay-400 MHz. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent [^1H: (δ (DMSO) = 2.50 ppm, ($\delta(CDCl_3)$ = 7.26 ppm; ^{13}C: (δ (DMSO) = 39.52 ppm, (δ ($CDCl_3$) = 77.16 ppm]. Data are reported as follows: chemical shift, type of carbon (for ^{13}C NMR), multiplicity (s = singlet, bs = broad singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, dq = doublet of quarters, ddd = doublet of doublet of doublets, t = triplet, td = triplet of doublets, q = quartet, qd = quartet of doublets, qt = quartet of triplets, h = hexuplets, hept = heptuplets, and m = multiplet), coupling constant in Hertz, integration, and position on molecule (Box = benzoxazole, Bim = benzimidazole, Bth = benzothiazole, Ind = indole, Mpn = morpholine, Ph = phenyl, Prz = pyrazole, Ppn = piperidine, Py = pyridine, Qnl = quinoline, Qnx = quinoxaline, Trz = triazole, Tzn = triazine). Two-dimensional spectroscopy (HSQC and HMBC) was used to assist in assignment (data not reported). Accurate mass measurements (HRMS) were recorded on a TOF spectrometer, by the Spectropole of Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Marseille (France).

Purity of tested compounds was determined as > 95 % by liquid chromatography (LC).

4.1.2. General procedure for Suzuki-Miyaura cross-coupling (procedure A: compounds *1a-b* and *5a-n*/procedure B: compounds *8* and *10a-d*)

To a sealed glass vial were added the brominated derivated (1 equiv.), boronic acid derivative (1.2 equiv.), $Pd(dppf)Cl_2$ (5 mol %), and K_2CO_3. The vessel was capped and then evacuated and backfilled with N_2 (process repeated 3 ×). The 4:1 dioxane-water mixture was introduced, and the vessel was evacuated and backfilled with N_2 again (process repeated 3 ×). The solution was heated at 80 °C overnight. After cooling, the mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered off, and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel, the pure product was obtained as a powder.

Compounds **1a-b** were synthesized from the corresponding boronic acids with 2.1 equivalent of K_2CO_3.

*4.1.2.1. 4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-carbaldehyde (**1a**).* ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 10.03 (s, 1H, H^{CO}), 7.92 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.72 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (dt, J = 8.8, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.99 (dt, J = 8.8, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.10 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.45 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ = 192.06 (CH, 1C, C^{CO}), 159.65 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.78, (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.01 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.62 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.16 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.14 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.74 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 14.94 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{15}H_{14}O_2$

*4.1.2.2. 4′-(dimethylamino)-[1,1′-biphenyl]-4-carbaldehyde (**1b**).* ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.00 (s, 1H, H^{CO}), 7.89 (dt, J = 8.4, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.72 (dt, J = 8.4, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (dt, J = 9.0, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.80 (dt, J = 9.0, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 3.03 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 192.06 (CH, 1C, C^{CO}), 150.87 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.39 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.52 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.21 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.10 (C_q, 1C, C^{Ph}), 126.41 (CH, 2C, C^{Ph}), 112.69 (CH, 2C, C^{Ph}), 40.50 (CH_3, 2C, C^{NMe}).

$C_{15}H_{15}NO$

Compounds **5a-n**, **8** and **10a-d** were synthesized from the corresponding boronic acids with 2.5 equivalent of K_2CO_3.

*4.1.2.3. 4-(6-(((4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl) benzaldehyde (**5a**).* ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CO}), 8.92 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 8.02 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (m, 4H, H^{Ph}), 7.49 (dt + d, J = 8.5, 8.0, 2.2 Hz, 3H, $H^{Ph\ +\ Py}$), 6.99 (td, J = 8.8, 2.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.53 (s, 2H, H^{CS}), 4.06 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.34 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 192.71 (CH, 1C, C^{CO}), 158.54 (C_q, 1C, C^{Py}), 158.15 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.63 (CH, 1C, C^{Py}), 142.38 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.66 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.25 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.35 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.06 (CH, 1C, C^{Py}), 131.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.23 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.39 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.11 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.18 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.67 (CH, 1C, C^{Py}), 114.80 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.06 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 33.02 (CH_2, 1C, C^{CS}), 14.65 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{27}H_{23}NO_2S$

*4.1.2.4. 4-(6-(((4′-(dimethylamino)-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**5b**).* ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CO}), 8.92 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (dt, J = 8.3, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (dt, J = 8.9, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.46 (dt, J = 8.3, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.78 (dt, J = 8.9, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 2.93 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.21 (CH, 1C, C^{CO}), 159.13 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.35 (C_q, 1C, C^{Ph}), 148.12 (CH, 1C, C^{Py}), 142.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.62 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.84 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.80 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.53 (CH, 1C, C^{Py}), 130.93 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.70 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.47 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.15 (CH, 1C, C^{Py}), 113.13 (CH, 2C, C^{Ph}), 40.53 (CH_3, 2C, C^{NMe}), 33.61 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{27}H_{24}N_2OS$

*4.1.2.5. 4-(6-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**5c**).* ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CO}), 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.92 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.08 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.02 (td, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (td, J = 8.2, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.80 (td, J = 8.6, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.64 (td, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^{Py}), 4.57 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.21 (CH, 1C, C^{CO}), 158.62 (C_q,

1C, C^{Py}), 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 148.53 (CH, 1C, C^{Trz}), 148.13 (CH, 1C, C^{Py}), 142.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.33 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.14 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.86 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.60 (CH, 1C, C^{Py}), 131.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.26 (CH, 1C, C^{Py}), 119.96 (CH, 2C, C^{Ph}), 33.13 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{21}H_{16}N_4OS$: 372.1045 Da found 372.1045 Da.

*4.1.2.6. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)pyridine (**5d**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.74 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.93 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.83 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.79 (td, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (td, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.32 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.50 (s, 2H), 3.87 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 154.87 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.84 (CH, 1C, C^{Trz}), 146.25 (CH, 1C, C^{Py}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.62 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.57 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.06 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.49 (CH, 1C, C^{Py}), 130.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.45 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.61 (C_q, 1C, C^{Py}), 122.39 (CH, 1C, C^{Py}), 119.92 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.61 (C_q, 1C, C^{Prz}), 39.21 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 33.22 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{18}H_{16}N_6S$: 348.1157 Da found 348.1157 Da.

*4.1.2.7. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-(4-ethoxyphenyl)pyridine (**5e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.66 (dd, J = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.52 (s, 1H, H^{Trz}), 8.08 (s, 1H, H^{Trz}), 7.64 (dd, J = 8.3, 2.3 Hz, 1H, H^{Py}), 7.59 (dt, J = 9.0, 2.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, J = 9.0, 2.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (dt, J = 8.7, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.20 (dd, J = 8.3, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 6.97 (dt, J = 8.7, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 4.07 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.43 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.11 (C_q, 1C, C^{Py}), 155.81 (C_q, 1C, C^{Ph}), 152.73 (CH, 1C, C^{Trz}), 147.41 (CH, 1C, C^{Py}), 141.14 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.97 (C_q, 1C, C^{Py}), 134.36 (CH, 1C, C^{Py}), 132.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.26 (CH, 1C, C^{Py}), 120.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.21 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.68 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 33.87 (CH_2, 1C, C^{CS}), 14.92 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{22}H_{20}N_4OS$: 388.1358 Da found 388.1358 Da.

*4.1.2.8. 4'-(((4'-ethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)-[1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde (**5f**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.04 (s, 1H, H^{CO}), 7.98 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.91 (td, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.73 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.99 (dt, J = 8.7, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.37 (s, 2H, H^{CS}), 4.06 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.34 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10.05 (s, 1H, H^{CO}), 7.97 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.88 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.71 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 8.7, 2.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.55 (dt, J = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (dt, J = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.99 (dt, J = 8.7, 2.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.34 (s, 2H, H^{CS}), 4.08 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 192.05 (CH, 1C, C^{CO}), 157.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 144.81 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.46 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.79 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.93 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.40 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.29 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.20 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.82 (CH, 2C, C^{Ph}), 114.73 (CH, 2C, C^{Ph}), 62.93 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 36.12 (CH_2, 1C, C^{CS}), 14.26 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{28}H_{24}O_2S$

*4.1.2.9. 4'-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-[1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde (**5g**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.04 (s, 1H, H^{CO}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 7.97 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.40 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.16 (CH, 1C, C^{CO}), 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 145.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.74 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.52 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.16 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.50 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.66 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.99 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.05 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.49 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.92 (CH, 2C, C^{Ph}), 35.93 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{22}H_{17}N_3OS$

*4.1.2.10. 1-(4-(((4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5h**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.11 (s, 1H, H^{Prz}), 7.84 (s, 1H, H^{Prz}), 7.78 (td, J = 8.5, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (td, J = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.33 (td, J = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.29 (s, 2H, H^{CS}), 3.85 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.84 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.65 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.47 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.57 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.23 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.26 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.90 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.71 (C_q, 1C, C^{Prz}), 119.81 (CH, 2C, C^{Ph}), 39.14 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 36.96 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{19}H_{17}N_5S$: 347.1205 Da found 347.1205 Da.

*4.1.2.11. 1-(4-(((4'-ethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5i**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (s, 1H, H^{Trz}), 8.10 (s, 1H, H^{Trz}), 7.59 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dt, J = 8.8, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.34 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.95 (dt, J = 8.8, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.15 (s, 2H, H^{CS}), 4.07 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.43 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.83 (C_q, 1C, C^{Ph}), 152.69 (CH, 1C, C^{Trz}), 140.93 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.68 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.30 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.53 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.65 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.32 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.04 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.24 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.20 (CH, 2C, C^{Ph}), 114.97 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.67 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 39.04 (CH_2, 1C, C^{CS}), 14.97 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{23}H_{21}N_3OS$: 387.1405 Da found 387.1405 Da.

*4.1.2.12. 4'-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-N,N-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (**5j**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.78 (td, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (td, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (td, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (td, J = 8.9, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.37 (td, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.77 (td, J = 8.9, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.31 (s, 2H, H^{CS}), 2.93 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.84 (CH, 1C, C^{Trz}), 150.37 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.70 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.13 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.13 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.57 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.00 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.35 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.15 (C_q, 1C, C^{Ph}), 126.40 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.85 (CH, 2C, C^{Ph}), 113.10 (CH, 2C, C^{Ph}), 42.00 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 36.89 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{23}H_{22}N_4S$: 386.1565 Da found 386.1565 Da.

*4.1.2.13. 1-(4-(((4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5k**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.52 (s, 1H, H^{Trz}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.59 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (dt, J = 8.0, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.36 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.24 (dt, J = 8.0, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.17 (s, 2H, H^{CS}), 2.39 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.71 (CH, 1C, C^{Trz}), 140.92 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.20 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.46 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.43 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.06 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.96 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.30 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.69 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.51 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.85 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 38.89 (CH_2, 1C, C^{CS}), 21.22 (CH_3, 1C, C^{CH3}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{22}H_{19}N_3S$: 357.1300 Da found 357.1300 Da.

*4.1.2.14. 1-(4-(((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)thio)methyl) phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5l**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.53 (s, 1H, H^{Trz}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.67 (dt, J = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.64 (dt, J = 8.7, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.61 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.39 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.20 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.78 (CH, 1C, C^{Trz}), 143.84 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.02 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.43 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.38 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.43 (C_q, 1C, t, J = 32.6 Hz, C^{Ph}), 127.82 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.91 (CH, 2C, q, J = 3.9 Hz, C^{Ph}), 124.35 (C_q, 1C, q, J = 271.8 Hz, C^{CF3}), 120.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 38.37 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{22}H_{16}F_3N_3S$: 411.1017 Da found 411.1017 Da.

*4.1.2.15. 1-(4-(((4'-fluoro-3'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)thio) methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5m**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (s, 1H, H^{Trz}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.74 (dd, J = 6.8, 2.4 Hz, 1H, H^{Ph}), 7.68 (ddd, J = 7.5, 4.6, 2.4 Hz, 1H, H^{Ph}), 7.60 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (td, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.37 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.23 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H^{Ph}), 4.19 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 159.34 (C_q, 1C, dd, J = 257.1, 2.3 Hz, C^{Ph}), 152.71 (CH, 1C, C^{Trz}), 141.00 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.50 (CH, d, J = 61.9 Hz, 1C, C^{Ph}), 136.83 (CH, 1C, d, J = 3.6 Hz, C^{Ph}), 136.15 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.25 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.58 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.26 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.57 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.5 (CH, 1C, dq, J = 5.7, 4.9 Hz, C^{Ph}), 122.65 (C_q, 1C, q, J = 272.4 Hz, C^{CF3}), 120.23 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.81 (C_q, 1C, qd, J = 32.7, 12.6 Hz, C^{Ph}), 117.49 (C_q, 1C, d, J = 20.7, C^{Ph}), 38.38 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{22}H_{15}F_4N_3S$: 429.0923 Da found 429.0923 Da.

*4.1.2.16. 4-(4'-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)morpholine (**5n**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.52 (s, 1H, H^{Trz}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.97 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.15 (s, 2H, H^{CS}), 3.88 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.20 (t, 4H, H^{Mpn}).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.54 (m, 6H, H^{Ph}), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.00 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.32 (s, 2H, H^{CS}), 3.74 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.14 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H^{Mpn}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.85 (CH, 1C, C^{Trz}), 150.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.65 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.58 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.18 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.79 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.39 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.86 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.73 (CH, 2C, C^{Ph}), 66.53 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 48.61 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 36.71(CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{25}H_{24}N_4OS$: 428.1671 Da found 428.1671 Da.

*4.1.2.17. 4-(6-Chloropyridin-3-yl)benzaldehyde (**8**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.08 (s, 1H, H^{CO}), 8.84 (dd, J = 2.7, 0.7 Hz, 1H, H^{Py}), 8.27 (dd, J = 8.4, 2.7 Hz, 1H, H^{Py}), 8.03 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.99 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.67 (dd, J = 8.4, 0.7 Hz, 1H, H^{Py}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.27 (CH, 1C, C^{CO}), 150.79 (C_q, 1C, C^{Py}), 148.75 (CH, 1C, C^{Py}), 141.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.70 (CH, 1C, C^{Py}), 136.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.26 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.69 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.17 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.02 (CH, 1C, C^{Py}).

$C_{12}H_8ClNO$

*4.1.2.18. 4-(6-(((4'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**10a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CO}), 9.53 (s, 1H, H^{OH}), 8.91 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.07 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.99 (qt, J = 7.7, 2.2, 4H, H^{Ph}), 7.52 (dt, J = 8.4, 2.1, 2H, H^{Ph}), 7.46 (dd + m, J = 8.7, 2.5 Hz, 5H, $H^{Ph + Py}$), 6.82 (dt, J = 8.7, 2.5, 2H, H^{Ph}), 4.51 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.21 (CH, 1C, C^{CO}), 159.07 (C_q, 1C, C^{Py}), 157.60 (C_q, 1C, C^{Ph}), 148.12 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.53 (C_q, 1C, C^{Py}), 136.34 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.84 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.54 (CH, 1C, C^{Py}), 130.99 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.95 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.12 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.60 (CH, 1C, C^{Py}), 126.47 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.15 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.18 (CH, 2C, C^{Ph}), 33.55 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{25}H_{19}NO_2S$

*4.1.2.19. 4-(6-(((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio) pyridin-3-yl)benzaldehyde (**10b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.99 (s, 1H, H^{CO}), 8.69 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.91 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.68 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.66 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (s, 4H, H^{Ph}), 7.47 (s, 4H, H^{Ph}), 7.22 (dd, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.48 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.80 (CH, 1C, C^{CO}), 159.09 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.94 (CH, 1C, C^{Py}), 144.42 (C_q, 1C, C^{Ph}), 143.65 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.79 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.33 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.73 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.72 (CH, 1C, C^{Py}), 131.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.66 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.77 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.32 (C_q, 1C, t, J = 32.5 Hz, C^{Ph}), 127.56 (CH, 1C, C^{Py}), 127.43 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.38 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.87 (CH, 2C, q, J = 3.8 Hz, C^{Ph}), 124.42 (C_q, 1C, q, J = 271.9 Hz, C^{CF3}), 122.21 (CH, 2C, C^{Ph}), 34.11 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{26}H_{18}F_3NOS$

*4.1.2.20. 4-(6-(((4'-(1-methylpiperidin-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl) thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**10c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.06 (s, 1H, H^{CO}), 8.76 (dd, J = 2.5, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 7.97 (td, J = 8.4, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.74 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (h, J = 8.7, 8.7, 8.4 Hz, 6H, H^{Ph}), 7.28 (ddd, J = 8.4, 8.2, 0.8 Hz, 3H, $H^{Ph + Py}$), 4.53 (s, 2H, H^{CS}), 3.05 (d, J = 11.5 Hz, 2H, H^{Ppn}), 2.52 (hept, J = 5.3 Hz, 1H, H^{Ppn}), 2.38 (s, 3H, H^{NMe}), 2.14 (dd, J = 14.9, 11.5 Hz, 2H, H^{Ppn}), 1.90 (td, J = 9.9, 3.1 Hz, 4H, H^{Ppn}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.82 (CH, 1C, C^{CO}), 159.38 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.92 (CH, 1C, C^{Py}), 145.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 143.70 (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.80 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.68 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.67 (CH, 1C, C^{Py}), 131.35 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.51 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.44 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.37 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.28 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.23 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.16 (CH, 1C, C^{Py}), 56.38 (CH_2, 2C, C^{Ppn}), 46.37 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 41.66 (CH, 1C, C^{Ppn}), 34.28 (CH_2, 2C, C^{Ppn}), 33.30 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{31}H_{30}N_2OS$

*4.1.2.21. 4-(6-(((4'-morpholino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**10d**).* ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CO}), 8.89 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.04 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.95 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.55 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (dt, J = 8.7, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H^{Py}), 7.00 (dt, J = 8.7, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}), 3.76 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.16 (t, J = 4.8 Hz, 4H, H^{Mpn}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 192.54 (CH, 1C, C^{CO}), 158.79 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.60 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.72 (CH, 1C, C^{Py}), 142.59 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.09 (C_q, 1C, C^{Py}), 136.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.70 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.12 (CH, 1C, C^{Py}), 130.79 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.56 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.27 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.42 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.90 (CH, 1C, C^{Py}), 115.47 (CH, 2C, C^{Ph}), 66.24 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 48.52 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 33.54 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{29}H_{26}N_2O_2S$

*4.1.3. General procedure for reduction with sodium borohydride (procedure A: compounds **2a-c**, **6a-e**/procedure B: **11a-d**)*

In accordance with previously published synthesis pathways,

compounds **2a-c** were obtained using 2 equivalents of $NaBH_4$ [11]. Crude products were extracted with dichloromethane without any column chromatography purification.

*4.1.3.1. (4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methanol (**2a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 7.55$ (dt, $J = 8.1$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (dt, $J = 8.8$, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.41 (dt, $J = 8.1$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.97 (dt, $J = 8.8$, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.73 (s, 2H, H^{CO}), 4.08 (q, z$J = 7.0$ Hz, 2H, H^{OEt}), 1.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 158.72$ (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.33 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.33 (C_q, 1C, C^{Ph}), 128.22 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.02 (CH, 2C, C^{Ph}), 114.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 65.33 (CH_2, 1C, C^{CO}), 63.68 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 15.00 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{15}H_{16}O_2$

*4.1.3.2. (4′-(dimethylamino)-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methanol (**2b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.56 (dt, $J = 8.2$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (dt, $J = 8.8$, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (dt, $J = 8.2$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.82 (dt, $J = 8.8$, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.71 (s, 2H, H^{CO}), 3.00 (s, 6H, H^{NMe}), 1.83 (s, 1H, H^{OH}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 150.15 (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.80 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.66 (C_q, 1C, C^{Ph}), 128.93 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.76 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.52 (CH, 2C, C^{Ph}), 112.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 65.36 (CH_2, 1C, C^{CO}), 40.70 (CH_3, 2C, C^{NMe}).

$C_{15}H_{17}NO$

*4.1.3.3. (4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)methanol (**2c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 7.81 (td, $J = 8.6$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (td, $J = 8.6$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 5.31 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, H^{CO}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.79 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.93 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.80 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 128.06 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 62.71 (CH_2, 1C, C^{CO}).

$C_9H_9N_3O$

From the same reagents [11], compounds **6a-e** and **11a-d** were synthesized using 5 equivalents of $NaBH_4$.

*4.1.3.4. (4-(6-(((4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl) phenyl)methanol (**6a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 8.80$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H^{Py}), 7.95 (dt, $J = 8.5$, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.67 (dt, $J = 8.2$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (m, 4H, H^{Ph}), 7.48 (dt, $J = 8.2$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.41 (t, $J = 8.5$ Hz, 3H, $H^{Ph + Py}$), 6.98 (m, 2H, H^{Ph}), 5.25 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H^{OH}), 4.54 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, H^{CO}), 4.49 (s, 2H, H^{CS}), 4.05 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H^{OEt}), 1.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 158.17$ (C_q, 1C, C^{Ph}), 156.80 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.12 (CH, 1C, C^{Py}), 142.41 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.63 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.42 (C_q, 2C, C^{Ph}), 134.93 (CH, 1C, C^{Py}), 134.62 (C_q, 1C, C^{Py}), 132.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.81 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.40 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.18 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.21 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.18 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.64 (CH, 1C, C^{Py}), 114.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.08 (CH_2, 1C, C^{CH2}), 62.56 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.08 (CH_2, 1C, C^{CS}), 14.68 (CH_3, 1C, C^{CH3}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{27}H_{25}NO_2S$: 427.1606 Da found 427.1606 Da.

*4.1.3.5. (4-(6-(((4′-(dimethylamino)-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio) pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**6b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (dd, $J = 2.5$, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.96 (dd, $J = 8.3$, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, $J = 8.3$, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (dt, $J = 8.3$, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, $J = 8.7$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.44 (dt, $J = 8.7$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.41 (dt + dd, $J = 8.8.$, 8.3, 0.9 Hz, 2H, $H^{Ph + Py}$), 6.79 (dt, $J = 8.8.$, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 5.24 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H^{CO}), 4.49 (s, 2H, H^{CS}), 2.93 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.36 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.33 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.87 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.57 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.40 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.08 (CH, 1C, C^{Py}), 132.24 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.81 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.99 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.09 (CH, 1C, C^{Py}), 113.13 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.02 (CH_2, 1C, C^{CO}), 40.54 (CH_3, C^{NMe}), 33.63 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{27}H_{26}N_2OS$: 426.1766 Da found 426.1766 Da.

*4.1.3.6. (4-(6-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl) methanol (**6c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H), 8.81 (dd, $J = 2.5$, 0.9 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 8.5$, 2.5 Hz, 1H), 7.80 (dt, $J = 8.7$, 2.3 Hz, 2H), 7.68 (dt, $J = 8.3$, 1.8 Hz, 2H), 7.63 (dt, $J = 8.7$, 2.3 Hz, 2H), 7.43 (dt, $J = 8.3$,1.8 Hz, 2H), 7.40 (dd, $J = 8.5$, 2.5 Hz, 1H), 5.24 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 4.54 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 156.86 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.85 (CH, 1C, C^{Trz}), 147.60 (CH, 1C, C^{Py}), 142.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.73 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.34 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.14 (CH, 1C, C^{Py}), 132.38 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.68 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.22 (CH, 1C, C^{Py}), 119.95 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.15 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{21}H_{18}N_4OS$: 374.1201 Da found 374.1201 Da.

*4.1.3.7. (4′-(((4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methanol (**6d**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.66 (d + d, $J = 8.5$, 7.5 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.64 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H^{Ph}), 7.62 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H^{Ph}), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H^{Ph}), 7.05 (td, $J = 8.7$, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 5.26 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H^{OH}), 4.59 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, H^{CO}), 4.38 (s, 2H, H^{CS}), 4.12 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H^{CO}), 1.40 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.64 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.31 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.08 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.97 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.40 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.78 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.39 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.82 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.07 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.11 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.52 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.59 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.56 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.29 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.54 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 63.05 (CH_2, 1C, C^{CO}), 36.64 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.14 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{28}H_{26}O_2S$: 426.1654 Da found 426.1654 Da.

*4.1.3.8. (4′-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-[1,1′-biphenyl]-4-yl) methanol (**6e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.79 (dt, $J = 8.5$, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (dd, $J = 8.5$, 7.7 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.56 (td, $J = 8.5$, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, $J = 8.5$, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H^{Ph}), 5.20 (s, 1H, H^{OH}), 4.52 (s, 2H, H^{CO}), 4.35 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.65 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.93 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.21 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.59 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.52 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.48 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.58 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.89 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.05 (CH_2, 1C, C^{CO}), 36.41 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{22}H_{19}N_3OS$: 373.1249 Da found 373.1249 Da.

*4.1.3.9. 4′-(((5-(4-(hydroxymethyl)phenyl)pyridin-2-yl)thio)methyl)-[1,1′-biphenyl]-4-ol (**11a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.52 (s, 1H, H^{OH}), 8.80 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H^{Py}), 7.95 (dd, $J = 8.5$, 2.3 Hz, 1H, H^{Py}), 7.67 (td, $J = 8.4$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (td, $J = 8.4$, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (td, $J = 8.5$, 2.3 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.40 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H, $H^{Ph + Py}$), 6.83 (td, $J = 8.6$, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 5.23 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, H^{OH}), 4.54 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, H^{CO}), 4.49 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.58 (C_q, 1C, C^{Py}), 157.30 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.50 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.39 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.08 (CH, 1C, C^{Py}), 132.26 (C_q, 1C, C^{Py}), 131.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.80 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.11 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.63 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.45 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.09 (CH, 1C, C^{Py}), 116.17 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.02 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.56 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{25}H_{21}NO_2S$: 399.1293 Da found 399.1293 Da.

*4.1.3.10. (4-(6-(((4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio) pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**11b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.96 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.88 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.70 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.67 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (dd, J = 8.5, 8.1 Hz, 3H, $H^{Ph\ +\ Py}$), 5.24 (s, 1H, H^{OH}), 4.54 (s, 2H, H^{CO}), 4.54 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.05 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.60 (CH, 1C, C^{Py}), 144.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.76 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.13 (CH, 1C, C^{Py}), 132.34 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.09 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.08 (C_q, 1C, t, J = 32.0 Hz, C^{Ph}), 127.85 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.24 (CH, 2C, q, J = 3.9 Hz, C^{Ph}), 124.86 (C_q, 1C, q, J = 273.2 Hz, C^{CF3}), 122.15 (CH, 1C, C^{Py}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.39 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{26}H_{20}F_3NOS$: 451.1218 Da found 451.1218 Da.

*4.1.3.11. (4-(6-(((4'-(1-methylpiperidin-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl) methyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**11c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.81 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.96 (dd, J = 8.0, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (t, J = 8.3 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.51 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (dd, J = 8.0, 7.9 Hz, 3H, $H^{Ph\ +\ Py}$), 7.31 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 5.24 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H^{CO}), 4.51 (s, 2H, H^{CS}), 2.87 (dt, J = 11.5, 2.8 Hz, 2H, H^{Ppn}), 2.50 (m, 1H, H^{Ppn}), 2.19 (s, 3H, H^{NMe}), 1.96 (td, J = 11.5, 2.8 Hz, 2H, H^{Ppn}), 1.75 (dt, J = 13.1, 3.5 Hz, 2H, H^{Ppn}), 1.66 (td, J = 11.3, 3.5 Hz, 2H, H^{Ppn}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.22 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.59 (CH, 1C, C^{Py}), 146.04 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.48 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.38 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.10 (CH, 1C, C^{Py}), 132.29 (C_q, 1C, C^{Py}), 129.88 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.77 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.03 (CH, 4C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.11 (CH, 1C, C^{Py}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 56.30 (CH_2, 2C, C^{Ppn}), 46.72 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 41.40 (CH, 1C, C^{Ppn}), 33.50 (CH_2, 2C, C^{Ppn}), 33.45 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{31}H_{32}N_2OS$: 480.2235 Da found 480.2235 Da.

*4.1.3.12. (4-(6-(((4'-morpholino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**11d**).* ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 8.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H^{Py}), 7.93 (dd, J = 8.3, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.65 (dt, J = 8.1, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.54 (dt, J = 8.3, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (dt, J = 8.9, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (dt, J = 8.3,2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H^{Py}), 7.00 (dt, J = 8.9, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.56 (s, 2H, H^{CO}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 3.76 (t, J = 4.9 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.16 (t, J = 4.9 Hz, 4H, H^{Mpn}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 157.04 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.53 (C_q, 1C, C^{Ph}), 147.22 (CH, 1C, C^{Py}), 142.59 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.04 (C_q, 1C, C^{Py}), 136.25 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.18 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.72 (CH, 1C, C^{Py}), 132.14 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.67 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.41 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.35 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.21 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.33 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.00 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.90 (CH, 1C, C^{Py}), 115.53 (CH, 2C, C^{Ph}), 66.23 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 62.84 (CH_2, 1C, C^{CO}), 48.58 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 33.60 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{29}H_{28}N_2O_2S$: 468.1871 Da found 468.1872 Da.

4.1.4. General procedure for chlorination (procedure A: **3a-c**)

In accordance with previously published synthesis pathways, compounds **3a-c** were obtained with several quantities of base [11]. Both **3b** and **3c** were synthesized without trimethylamine NEt_3. **3c** synthesis was also performed in dimethylformamide DMF.

*4.1.4.1. 4-(chloromethyl)-4'-ethoxy-1,1'-biphenyl (**3a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.54 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (dt, J = 8.8, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.97 (dt, J = 8.8, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.63 (s, 2H, H^{CCl}), 4.08 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.44 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ = 158.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.21 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.97 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.27 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.15 (CH, 2C, C^{Ph}), 114.96 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.68 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 46.30 (CH_2, 1C, C^{CCl}), 14.99 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{15}H_{15}ClO$

*4.1.4.2. 4'-(chloromethyl)-N,N-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (**3b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.57 (dt, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.54 (dt, J = 8.2, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.38 (dt, J = 8.2, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.13 (bs, 2H, H^{Ph}), 4.49 (s, 2H, H^{CCl}), 3.06 (s, 6H, H^{NMe}).

^{1}H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*/DMSO-d_6) δ 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 2.99 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.95 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.74 (C_q, 1C, C^{Ph}), 128.30 (CH, 4C, C^{Ph}), 128.11 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.58 (CH, 2C, C^{Ph}), 74.47 (CH_2, 1C, C^{CCl}), 58.15 (CH_3, 2C, C^{NMe}).

$C_{15}H_{18}ClN$

^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*/DMSO-d_6) δ 148.65 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.46 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.66 (C_q, 1C, C^{Ph}), 128.02 (CH, 4C, C^{Ph}), 127.32 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 73.77 (CH_2, 1C, C^{CCl}), 57.57 (CH_2, 2C, C^{NMe}).

*4.1.4.3. 1-(4-(chloromethyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**3c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 9.32 (s, 1H, H^{Trz}), 8.25 (s, 1H, H^{Trz}), 7.89 (dt, J = 8.6, 2.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.64 (d, J = 8.6, 2.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.84 (s, 2H, H^{CCl}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.99 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.93 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.74 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.00 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.04 (CH, 2C, C^{Ph}), 45.82 (CH_2, 1C, C^{CCl}).

$C_9H_8ClN_3$

4.1.5. General procedure for bimolecular nucleophilic substitution with a thiol (procedure A: **4a-e** and **7a-m**)

To a sealed glass vial were added the chlorinated derivative (1 equiv.), thiol derivative (1.1 equiv.) and K_2CO_3 (1.5 equiv.). The vessel was capped and then evacuated and backfilled with N_2 (process repeated 3 ×). Under nitrogen flux, acetonitrile was introduced, and the vessel was evacuated and backfilled with N_2 again (process repeated 3 ×). The solution was heated at 80 °C overnight. After cooling, the mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered off, and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel, the pure product was obtained as a powder.

*4.1.5.1. 5-Bromo-2-(((4'-ethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)pyridine (**4a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.55 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.62 (dt, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.49 (dt, J = 8.9, 2.5 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.43 (m, 2H, H^{Ph}), 7.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^{Py}), 6.95 (dt, J = 8.9, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.47 (s, 2H, H^{CS}), 4.07 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.43 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ = 158.71 (C_q, 1C, C^{Py}), 157.52 (C_q, 1C, C^{Ph}), 149.78 (CH, 1C, C^{Py}), 140.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.34 (CH, 1C, C^{Py}), 135.71 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.20 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.50 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.16 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.98 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.71 (CH, 1C, C^{Py}), 116.42 (C_q, 1C, C^{Py}), 114.91 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.66 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 34.80 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.00 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{20}H_{18}BrNOS$

*4.1.5.2. 4'-(((4-bromophenyl)thio)methyl)-N,N-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-amine (**4b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.52 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 7.57 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.49 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (dt, J = 8.9, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.41 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.07 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 6.79 (dt, J = 8.9, 2.4 Hz,

2H, H^{Ph}), 4.43 (s, 2H, H^{CS}), 2.99 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.84 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.35 (CH, 1C, C^{Py}), 150.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.37 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.63 (CH, 1C, C^{Py}), 135.30 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.42 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.87 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.50 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.36 (CH, 1C, C^{Py}), 116.29 (C_q, 1C, C^{Py}), 112.88 (CH, 2C, C^{Ph}), 40.69 (CH_3, 2C, C^{NMe}), 34.57 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{20}H_{19}BrN_2S$

4.1.5.3. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-bromopyridine ***(4c)***. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (s, 1H, H^{Trz}), 8.50 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.59 (m, 3H, $H^{Ph\ +\ Py}$), 7.55 (dt, *J* = 8.6,1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H^{Py}), 4.44 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 156.83 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 150.40 (CH, 1C, C^{Py}), 140.93 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.79 (CH, 1C, C^{Py}), 138.60 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.49 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.50 (CH, 1C, C^{Py}), 120.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.62 (C_q, 1C, C^{Py}), 33.88 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{14}H_{11}BrN_4S$

4.1.5.4. (4-bromophenyl)((4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)sulfane ***(4d)***. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.49 (tt, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.37 (dt, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.31 (dt, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.18 (dt, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 6.96 (dt, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.12 (s, 2H, H^{CS}), 4.08 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 1.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 158.73 (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.04 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.63 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 131.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.31 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.14 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.93 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.46 (C_q, 1C, C^{Ph}), 114.93 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.66 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 38.95 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.00 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

$C_{21}H_{19}BrOS$

4.1.5.5. 1-(4-(((4-bromophenyl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole ***(4e)***. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.53 (s, 1H, H^{Trz}), 8.09 (s, 1H, H^{Trz}), 7.60 (dt, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.39 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.37 (dt, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.16 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.11 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 152.78 (CH, 1C, C^{Trz}), 140.93 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.73 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.20 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.59 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 132.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.28 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 120.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 38.85 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{15}H_{12}BrN_3S$

4.1.5.6. 2-(((4′-ethoxy-[1,1′-biphenyl]-4-yl)methyl)thio)-5-methoxybenzo[d]oxazole ***(7a)***. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.51 (d, 6H, H^{Ph}), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H^{Box}), 7.15 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H^{Box}), 6.96 (d, 2H, H^{Ph}), 6.84 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H^{Box}), 4.58 (s, 2H, H^{CS}), 4.07 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H^{OEt}), 3.85 (s, 3H, H^{MeO}), 1.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H^{OEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.88 (C_q, 1C, C^{Box}), 158.74 (C_q, 1C, C^{Box}), 157.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 146.35 (C_q, 1C, C^{Box}), 142.70 (C_q, 1C, C^{Box}), 139.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.52 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.99 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.78 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.29 (CH, 2C, C^{Ph}), 112.41 (CH, 1C, C^{Box}), 110.82 (CH, 1C, C^{Box}), 102.66 (CH, 1C, C^{Box}), 63.56 (CH_2, 1C, C^{OEt}), 56.28 (CH_3, 1C, C^{OMe}), 35.73 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.13 (CH_3, 1C, C^{OEt}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{23}H_{21}NO_3S$: 391.1242 Da found 391.1242 Da.

4.1.5.7. 4′-(((5-methoxybenzo[d]oxazol-2-yl)thio)methyl)-N,N-dimethyl-[1,1′-biphenyl]-4-amine ***(7b)***. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.56 (td, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H^{Box}), 7.50 (td, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (td, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.24 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H^{Box}), 6.89 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H, H^{Box}), 6.78 (td, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.62 (s, 2H, H^{CS}), 3.80 (s, 3H, H^{OMe}), 2.93 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.91 (C_q, 1C, C^{Box}), 157.46 (C_q, 1C, C^{Box}), 150.41 (C_q, 1C, C^{Ph}), 146.33 (C_q, 1C, C^{Box}), 142.71 (C_q, 1C, C^{Box}), 140.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.58 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.95 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.53 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.48 (C_q, 1C, C^{Ph}), 126.10 (CH, 2C, C^{Ph}), 113.10 (CH, 2C, C^{Ph}), 112.40 (CH, 1C, C^{Box}), 110.82 (CH, 1C, C^{Box}), 102.66 (CH, 1C, C^{Box}), 56.28 (CH_3, 1C, C^{OMe}), 40.51 (CH_3, 2C, C^{NMe}), 35.83 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{23}H_{22}N_2O_2S$: 390.1402 Da found 390.1403 Da.

4.1.5.8. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-methoxybenzo[d]oxazole ***(7c)***. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 7.83 (dt, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.69 (dt, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H^{Box}), 7.23 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H^{Box}), 6.89 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H, H^{Box}), 4.66 (s, 2H, H^{CS}), 3.79 (s, 3H, H^{OMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.66 (C_q, 1C, C^{Box}), 157.48 (C_q, 1C, C^{Box}), 152.92 (CH, 1C, C^{Trz}), 146.37 (C_q, 1C, C^{Box}), 142.73 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.65 (C_q, 1C, C^{Box}), 137.08 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.56 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.85 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 112.49 (CH, 1C, C^{Box}), 110.86 (CH, 1C, C^{Box}), 102.66 (CH, 1C, C^{Box}), 56.29 (CH_3, 1C, C^{OMe}), 35.32 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{17}H_{14}N_4O_2S$: 338.0837 Da found 338.0837 Da.

4.1.5.9. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)benzo[d]oxazole ***(7d)***. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.83 (td, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.70 (td, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 4.68 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.18 (C_q, 1C, C^{Box}), 152.91 (CH, 1C, C^{Trz}), 151.79 (C_q, 1C, C^{Box}), 142.74 (CH, 1C, C^{Trz}), 141.69 (C_q, 1C, C^{Box}), 137.02 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.57 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.88 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.18 (CH, 1C, C^{Box}), 124.90 (CH, 1C, C^{Box}), 120.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.85 (CH, 1C, C^{Box}), 110.74 (CH, 1C, C^{Box}), 35.32 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{16}H_{12}N_4OS$: 308.0732 Da found 308.0732 Da.

4.1.5.10. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-methylbenzo[d]oxazole ***(7e)***. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 7.83 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.69 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H^{Box}), 7.46 (dt, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H, H^{Box}), 7.12 (ddd, *J* = 8.3, 1.7, 0.7 Hz, 1H, H^{Box}), 4.66 (s, 2H, H^{CS}), 2.40 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 164.02 (C_q, 1C, C^{Box}), 152.90 (CH, 1C, C^{Trz}), 150.05 (C_q, 1C, C^{Box}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 141.89 (C_q, 1C, C^{Box}), 137.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.55 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.58 (C_q, 1C, C^{Box}), 130.87 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.69 (CH, 1C, C^{Box}), 120.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.77 (CH, 1C, C^{Box}), 110.11 (CH, 1C, C^{Box}), 35.30 (CH_2, 1C, C^{CS}), 21.40 (CH_3, 1C, C^{Me}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{17}H_{14}N_4OS$: 322.0888 Da found 322.0888 Da.

4.1.5.11. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-chlorobenzo[d]oxazole ***(7f)***. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.54 (s, 1H, H^{Trz}), 8.10 (s, 1H, H^{Trz}), 7.66 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.62 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (dd, *J* = 2.0, 0.5 Hz, 1H, H^{Box}), 7.35 (dd, *J* = 8.6, 0.5 Hz, 1H, H^{Box}), 7.23 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H^{Box}), 4.58 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.70 (C_q, 1C, C^{Box}), 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 150.71 (C_q, 1C, C^{Box}), 143.04 (C_q, 1C, C^{Box}), 140.97 (CH, 1C, C^{Trz}), 136.73 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.46 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.70 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.15 (C_q, 1C, C^{Box}), 124.43 (CH, 1C, C^{Box}), 120.43 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.78 (CH, 1C, C^{Box}), 110.74 (CH, 1C, C^{Box}), 35.94 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{16}H_{11}ClN_4OS$: 342.0342 Da found 342.0342 Da.

4.1.5.12. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-1H-benzo[d]imidazole ***(7g)***. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.59 (s, 1H, H^{NH}), 9.24 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.79 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.63 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (s, 1H, H^{Bim}), 7.38 (s, 1H, H^{Bim}), 7.12 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H^{Bim}), 7.11 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H^{Bim}), 4.62 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 149.90 (C_q, 1C, C^{Bim}), 144.31 (C_q, 1C, C^{Bim}), 142.68 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.29 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.90 (C_q, 1C, C^{Bim}), 130.68 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.19 (CH, 1C, C^{Bim}), 121.70 (CH, 1C, C^{Bim}), 119.95 (CH, 2C, C^{Ph}), 117.94 (CH, 1C, C^{Bim}), 110.87 (CH, 1C, C^{Bim}), 34.90 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{16}H_{13}N_5S$: 307.0892 Da found 307.0892 Da.

*4.1.5.13. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-methoxy-1H-benzo[d]imidazole (**7h**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.44 (bs, 1H, H^{NH}), 9.23 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.78 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.61 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.34 (bs, 1H, H^{Bim}), 6.96 (bs, 1H, H^{Bim}), 6.75 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H, H^{Bim}), 4.58 (s, 2H, H^{CS}), 3.76 (s, 3H, H^{MeO}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.27 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.27 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.63 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 111.29 (CH, 1C, C^{Bim}), 55.93 (CH_3, 1C, C^{CH3}), 35.14 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{17}H_{15}N_5OS$: 337.0997 Da found 337.0997 Da.

Some quaternary carbon are not detected, even with HMBC experiences as the associated protons are poorly defined.

*4.1.5.14. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)benzo[d]thiazole (**7i**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.27 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.91 (dd, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.84 (td, 2H), 7.70 (td, 2H), 7.49 (ddd, J = 8.3, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.38 (ddd, J = 8.3, 7.3, 1.2 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.30 (C_q, 1C, C^{Bth}), 153.05 (C_q, 1C, C^{Bth}), 152.90 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.74 (CH, 1C, C^{Trz}), 141.69 (C_q, 1C, C^{Bth}), 136.98 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.48 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.95 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.92 (CH, 1C, C^{Bth}), 125.08 (CH, 1C, C^{Bth}), 122.35 (CH, 1C, C^{Bth}), 121.71 (CH, 1C, C^{Bth}), 120.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 35.32 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{16}H_{12}N_4S_2$: 324.0503 Da found 324.0503 Da.

*4.1.5.15. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)quinoline (**7j**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.23 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 8.18 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.97 (d, J = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.91 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.79 (td, J = 8.6, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.74 (ddd, J = 8.4, 6.8, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.71 (td, J = 8.6, 2.2 Hz, J = 8.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (ddd, J = 8.2, 6.8, 1.0 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.40 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H^{Qnl}), 4.65 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.50 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 152.82 (CH, 1C, C^{Trz}), 147.97 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 142.72 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.78 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.69 (CH, 1C, C^{Qnl}), 136.04 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.92 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.61 (CH, 1C, C^{Qnl}), 128.52 (CH, 1C, C^{Qnl}), 127.90 (CH, 1C, C^{Qnl}), 126.28 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 126.08 (CH, 1C, C^{Qnl}), 121.11 (CH, 1C, C^{Qnl}), 119.85 (CH, 2C, C^{Ph}), 32.73 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{18}H_{14}N_4S$: 318.0939 Da found 318.0939 Da.

*4.1.5.16. 4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-7-(trifluoromethyl)quinoline (**7k**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.27 (s, 1H, H^{Trz}), 8.86 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.33 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.31 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.29 (s, 1H, H^{Trz}), 7.89 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.85 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.71 (dt + d, J = 8.5, 4.8 Hz, 3H, H^{Ph+Qnl}), 4.65 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.92 (CH, 1C, C^{Trz}), 151.69 (CH, 1C, C^{Qnl}), 147.19 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 146.47 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 142.82 (CH, 1C, C^{Trz}), 136.53 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.93 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.93 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.28 (C_q, 1C, t, J = 32.3 Hz, C^{Qnl}), 127.94 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 127.69 (CH, 1C, q, J = 4.4 Hz, C^{Qnl}), 125.88 (CH, 1C, C^{Qnl}), 124.34 (C_q, 1C, q, J = 272.5 Hz, C^{CF3}), 122.48 (CH, 1C, d, J = 3.5 Hz, C^{Qnl}), 120.11 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.42 (CH, 1C, C^{Qnl}), 34.36 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{19}H_{13}F_3N_4S$: 386.0813 Da found 386.0813 Da.

*4.1.5.17. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)quinoxaline (**7l**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.23 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.03 (ddd, J = 8.1, 3.7, 1.4 Hz, 2H), 7.84 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.80 (dt, J = 8.7, 2.2 Hz, 2H), 7.75 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.72 (dt, J = 8.7, 2.2 Hz, 2H), 4.66 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 155.73 (C_q, 1C, C^{Qnx}), 152.85 (CH, 1C, C^{Qnx}), 145.28 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.47 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.22 (C_q, 1C, C^{Qnx}), 139.91 (C_q, 1C, C^{Qnx}), 137.87 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.23 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.24 (CH, 1C, C^{Qnx}), 131.05 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.47 (CH, 1C, C^{Qnx}), 129.13 (CH, 1C, C^{Qnx}), 128.02 (CH, 1C, C^{Qnx}), 119.91 (CH, 2C, C^{Ph}), 32.60 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{17}H_{13}N_5S$: 319.0892 Da found 319.0892 Da.

*4.1.5.18. 3-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-6-methyl-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indole (**7m**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.64 (s, 1H, H^{NH}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 8.13 (dt, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.81 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.72 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (dt, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.34 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H^{Ind}), 4.63 (s, 2H, H^{CS}), 2.55 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 166.87 (C_q, 1C, C^{Tzn}), 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 147.33 (C_q, 1C, C^{Ind}), 142.82 (CH, 1C, C^{Trz}), 141.96 (C_q, 1C, C^{Ind}), 140.06 (C_q, 1C, C^{Ind}), 138.08 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.24 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.03 (CH, 1C, C^{Ind}), 130.89 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.04 (CH, 1C, C^{Ind}), 122.87 (C_q, 1C, C^{Ind}), 119.96 (CH, 2C, C^{Ph}), 119.28 (CH, 1C, C^{Ind}), 117.89 (C_q, 1C, C^{Ind}), 33.81 (CH_2, 1C, C^{CS}), 17.10 (CH_3, 1C, C^{Me}).

HRMS: *m/z* Calc. for $C_{19}H_{15}N_7S$: 373.1110 Da found 373.1111 Da.

*4.1.6. General procedure E for nucleophilic aromatic substitution with a thiol (procedure B: **9**)*

To a closed flask was added **8** (1 equiv.) and Cs_2CO_3 (1.1 equiv.). The vessel was capped and then evacuated and backfilled with N_2 (process repeated 3 ×). Under nitrogen flux, dimethylformamide was introduced, then warm liquid (4-bromophenyl)methanethiol (1.1 equiv.) was added. The vessel was evacuated and backfilled with N_2 (process repeated 3 ×). The solution was stirred at room temperature for 24h. The mixture was extracted with ethyl acetate (3x30mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered off, and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (**Solvent**), the pure product was obtained as a cream-colored powder **9**.

*4.1.6.1. 4-(6-((4-bromobenzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**9**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CO}), 8.90 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.07 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.97 (dt, J = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (dt, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.41 (dt, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.47 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 190.21 (CH, 1C, C^{CO}), 158.55 (C_q, 1C, C^{Py}), 148.12 (CH, 1C, C^{Py}), 142.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.15 (C_q, 1C, C^{Py}), 135.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.59 (CH, 1C, C^{Py}), 131.79 (CH, 2C, C^{Ph}), 131.55 (CH, 2C, C^{Ph}), 131.06 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.62 (CH, 1C, C^{Py}), 122.23 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.61 (C_q, 1C, C^{Ph}), 32.98 (CH_2, 1C, C^{CS}).

$C_{19}H_{14}BrNOS$

4.2. Biology

4.2.1. Cells and viruses

RD cells (CCL-136) were provided from ATCC. They were cultivated in DMEM Media supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), with 1 % of penicillin−streptomycin (PS), and 2 % non-essential amino-acid. MRC-5 (CCL-171) was obtained from RD Biotech. They were cultivated in BME media supplemented with 10 % FBS, 1 % PS, and 1 % L-Glutamine. Both cell lines were grown at 37 °C in a 5 % CO_2 atmosphere. Enterovirus A71, strain Laos2011 HFMD18TS (clinical strain), was provided through European Virus Archive – Global (EVA – Global).

4.2.2. RNA extraction and quantification

Viral RNA was extracted from 100 µL of cell supernatant from passages P8 and P16 using a QIAamp Viral RNA kit on the automated QIAcube (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Relative quantification of viral RNA was performed using the GoTaq® 1-Step RT-qPCR System kit (Promega). The mixture contained 5 µL of 2x Master Mix, 0.25 µL of each primer (250 nM), 0.07 µL of probe (75 nM), 0.2 µL of GoScript RT Mix and 3.8 µL of extracted nucleic acids. EV-A71F: AGATACCCACCCCCCTTACAA, EV-A71R: CACGTACGGGTGTTGCAACT and EV-A71P FAM-CTCAACCCGGCGCC-MGB were used as primers and probes. Assays were performed using the QuantStudio 12 K Flex real-time PCR machine (Life technologies). Viral RNA was exposed at 50 °C for 15 min, then 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 s then 60 °C for 30 s. Data collection took place during the 60 °C step. Synthetic RNA was used to calculate the amount of viral RNA from standard curves.

4.2.3. EC_{50} and CC_{50} determination

One day prior to infection, 50000 RD cells, or 37500000 MRC-5 cells, per well were seeded in 100 µL assay medium, containing 2.5 % FBS, in 96-well culture plates. After 24h exposure, antiviral compounds were added via the D300e dispenser (TECAN) with eight ½ dilutions. Then, 50 µL/well of a virus mix diluted in the medium was added to the wells. Each well was inoculated with XXX $TCID_{50}$ of virus. Prior to the assay, it was verified that viruses in the cell culture supernatants were harvested during the logarithmic growth phase of viral replication at 72 h post-infection [17]. On each plate, Vapendavir (Medchemexpress) was used as a positive control at the same concentrations. Four virus control wells were included within the plate. On day 3 post-infection, the supernatant was harvested, and RNA was quantified as described above. Viral inhibition VI was calculated as follows:

$$VI = 100 \times \frac{(\overline{VC} - SQ)}{\overline{VC}}$$

with $\overline{VC}$ the mean quantity of viral control and SQ the sample quantity.

The 50 % effective concentrations (EC_{50} compound concentration required to inhibit viral RNA replication by 50 %) and the 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) were determined by logarithmic interpolation after performing a nonlinear regression (log(inhibitor) vs. response –Variable slope (three parameters)) as previously described [17]. The standard deviation was calculated from the standard error using the following formula

$$St\ E = \frac{St\ D}{\sqrt{n}}$$

where St E is the standard error St D is the standard deviation and n is the number of replicates. All data obtained were analyzed using GraphPad Prism 9 software (Graphpad software).

4.3. Docking studies

All molecular modeling studies were performed on an Intel Xeon Silver powered machine running Ubuntu 20.04LTS. The crystallographic structure of EV-A71 capsid protein (PDB code: 3ZFG) was prepared by adding missing side chains and loops and hydrogens which were subsequently energetically minimized keeping all heavy atoms fixed until an RMSD gradient of 0.05 $kcal{\cdot}mol^{-1}{\cdot}A^{-1}$ was reached. The tridimensional structures of ligands were protonated at physiological pH and minimized using the OPLS4 force field. Maestro suite was used for both protein and ligand preparation steps. The docking simulations were performed via Plants using the default settings and selecting the geometrical center of the co-crystallized as the center of a 12 Å binding site sphere. Visualization of the resulting poses was via Pymol and the images in the manuscript were generated by the same software.

4.4. Micronucleus tests

4.4.1. Cell cultures and metabolic activation mixture (S9 mix)

Chinese Hamster Ovary cells (CHO–K1, ATCC) were used for the micronucleus assay. They were maintained in McCoy's 5A medium (Sigma) supplemented with 10 % fetal calf serum, 1 mM glutamine, and penicillin−streptomycin (100 U mL^{-1} – 10 µg mL^{-1}) and incubated overnight at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2. The liver homogenate used for metabolic activation (S9) was prepared from male Sprague-Dawley rats treated with Aroclor 1254 (500 mg/kg body weight). The S9 mix used for the test was a mixture of S9 and a solution of NADPH generating factors (Mix). The final composition of the S9 mix included 1 % S9, 0.5 mM G6P, and 0.4 mM NADP.

4.4.2. In vitro cytotoxicity evaluation

The NRU toxicity test is based on concentration-dependent reduction of the uptake of the vital dye Neutral Red measured 24 h after chemical treatment. The weak cationic dye Neutral Red penetrates cell membranes by non-diffusion and accumulates intracellularly in lysosomes. Alterations of the cell surface or metabolism cause an irreversible decrease in uptake and binding of Neutral Red in non-viable cells.

The cell line used was CHO–K1 Chinese Hamster Ovary cells (ATCC CCL61) with a low passage number (<50). They were grown in Mc Coy's medium supplemented with penicillin 100 $UI.mL^{-1}$, streptomycin 100 µg mL^{-1} and 10 % of inactivated calf serum, at pH 7.2, freshly prepared, and stored no longer than 1 week. The cells were seeded into two 96-well tissue culture plates (0.1 mL per well), at a concentration of 1.10^5 $cells.mL^{-1}$, and incubated at 37 °C with 5 % of CO_2 for 24 h until confluent. The culture medium was decanted and replaced by 100 µL of fresh medium containing the appropriate concentrations of the test substances (8 different concentrations in triplicate). Then the cells were incubated at 37 °C with 5 % of CO_2 in the dark for 24 h, after which they were washed, placed in Neutral Red medium (50 µg mL^{-1} Neutral Red in complete medium), and incubated for 3 h at 37 °C with 5 % CO_2. Then, the medium was removed, and the cells were washed three times with 0.2 mL of phosphate-buffered saline PBS to remove excess dye. The Neutral Red medium was removed. A distaining solution containing 50 % ethanol, 1 % acetic acid, and 49 % distilled water was prepared. 50 µL of solution was added per well. The plates were shaken for 15–20 min at room temperature in the dark. The degree of membrane damage, namely the increase in released Neutral Red, was measured by a fluorescence-luminescence reader. The Optical Density (OD) of each well was read at 540 nm. The results obtained for wells treated with the test material were compared to those of untreated control wells (100 % viability) and converted to percentage values of Viability V:

$$V = 100 \times \frac{\overline{OD_{wells}} - \overline{OD_{blanks}}}{\overline{OD_{NegCtrl}} - \overline{OD_{blanks}}}$$

with $\overline{OD_{wells}}$ the mean OD of test wells, $\overline{OD_{blanks}}$ the mean OD of blanks and $\overline{OD_{NegCtrl}}$ the mean OD of negative control.

The concentration of the test substances causing a 50 % release of Neutral Red as compared to the control culture was calculated by non-linear regression analysis using the Phototox Version 2.0 software (Zebet, Berlin, Germany).

4.4.3. Micronucleus assay MNvit (OCDE 487, June 2010) on CHO–K1 cells

The capacities of the test materials to induce micronuclei were assessed according to the previously described protocol validated by the OECD [16]. The protein concentration was 26 mg/ml as determined by the Lowry method [18]. All the assays were conducted in duplicate. The CHO–K1 cells, suspended in McCoy's 5A medium, were transferred into Labteck wells at a concentration of 50 000 cells/mL and incubated for 24 h at 37 °C in CO_2 (5 %). When the test was performed without metabolic activation, the test substances were added to cell cultures at

concentrations previously defined. A solvent control containing 1 % DMSO, and two positive controls containing respectively 0.05 μg mL^{-1} mitomycin C (MitC) without S9 mix and 5 μg mL^{-1} of benzo*[α]*pyrene with S9 mix, were performed. When the assay was performed in the presence of metabolic activation, S9 mix metabolizing mixture was added to the cell cultures at a concentration of 10 %. Then the test substances were added to the cell cultures at concentrations previously defined. A solvent control containing 1 % DMSO, and two positive controls containing respectively 0.05 μg mL^{-1} mitomycin C (MitC) without S9 mix and 5 μg mL^{-1} of benzo*[α]*pyrene with S9 mix, were added. After 3 h of incubation at 37 °C in CO_2 (5 %), the culture medium was removed, and the cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and then returned to culture in McCoy's 5A medium containing 3 μg mL^{-1} of cytochalasin B. After an additional 48-h incubation period at 37 °C, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) twice and fixed with methanol (HPLC purity grade solvent). Then they were stained with 10 % Giemsa stain in Milli-Q water for 15 min.

4.4.4. Analysis of results

The cells were examined under a microscope at × 1000 magnification. The proliferative index (PI) was considered the measure of cytotoxicity. PI of test substances was determined by scoring the number of mononucleated (M_1), binucleated (M_2) and trinucleated (M_3) cells among 500 Giemsa-stained cells with well-preserved cytoplasm. The proliferative index, or cytokinesis blocked proliferative index CBPI, was calculated using the following formula:

$$CBPI = \frac{M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3}{500}$$

The cytostasis index (CI), namely the percentage of cell replication inhibition, was calculated using the following formula:

$$CI = 100 - \left(100 \times \frac{CBPI_{Cmpd} - 1}{CBPI_{SlvtCtrl} - 1}\right)$$

with $CBPI_{Cmpd}$ the cytokinesis blocked proliferative index of the tested compound and $CBPI_{SlvtCtrl}$ the CBPI of the solvent as negative control.

After this step, only the doses inducing a decrease of less than 55 ± 5 % of CI% compared to the negative control were taken into account to count micronuclei. Micronucleated cell rates were determined for concentrations inducing less than a 50 % decrease in the PI: 2000 binucleated cells were examined, and micronuclei were identified. Micronuclei were identified as small nuclei well differentiated from the cell nucleus, stained similarly and having a diameter less than one-third of that of the cell nucleus. Statistical differences between negative controls and treated samples were determined using the $\chi 2$ test. The micronucleus assay was considered positive when a dose–response relationship could be established between the numbers of micronucleated cells and the concentrations of compounds, and when at least one concentration induced a significant increase ($P < 0.05$) in micronucleated cells as compared to the solvent-only control culture.

CRediT authorship contribution statement

Hugo Roux: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Franck Touret:** Writing – review & editing, Software, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Antonio Coluccia:** Software, Methodology, Investigation. **Omar Khoumeri:** Investigation. **Carole Di Giorgio:** Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Chaimae Majdi:** Data curation. **Pietro Sciò:** Software, Investigation. **Romano Silvestri:** Supervision. **Patrice Vanelle:** Validation, Formal analysis. **Manon Roche:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Aix Marseille Université (AMU) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. H. Roux thanks the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche for his Ph.D. Grant. We thank Dr. Vincent Remusat for NMR analyses and Spectropole (Fédération des Sciences Chimiques de Marseille) for mass spectrometry, and complementary NMR analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116658.

References

[1] M.A. Pallansch, R.P. Roos, Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, in: D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R. A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, E.S. Stephen (Eds.), Fields Virology, fourth ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 723–775.

[2] A) T. Solomon, P. Lewthwaite, D. Perera, M.J. Cardosa, P. McMinn, M.H. Ooi, Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71, Lancet Infect. Dis. 10 (11) (2010) 778–790. https://doi:10.1016/S1473-3099(10)70194-8;
B) D. Antona, M. Kossorotoff, I. Schuffenecker, A. Mirand, M. Leruez-Ville, C. Bassi, M. Aubart, F. Moulin, D. Lévy-Bruhl, C. Henquell, B. Lina, I. Desguerre, Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, may to october 2016, Euro Surveill. 21 (46) (2016) 30402. https://doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402;
C) A. Fall, S. Kenmoe, R. Njouom, Global prevalence and case fatality rate of enterovirus D68 infections, a systematic review and meta-analysis, PLoS Neglected Trop. Dis. 16 (2) (2022) e0010073. https://doi:10.1371/journal.pntd.0010073.

[3] A) J. Wang, Z. Teng, X. Cui, C. Li, H. Pan, Y. Zheng, S. Mao, Y. Yang, L. Wu, X. Guo, X. Zhang, Y. Zhu, Epidemiological and serological surveillance of hand-foot-and-mouth disease in Shanghai, China, 2012-2016, Emerg. Microb. Infect. 7 (1) (2018) 8. https://doi.org/10.1038/s41426-017-0011-z;
B) J. Li, H. Pan, X. Wang, Q. Zhu, Y. Ge, J. Cai, Y. Li, A. Xia, J. Hu, M. Zeng, Epidemiological surveillance of hand, foot and mouth disease in Shanghai in 2014-2016, prior to the introduction of the enterovirus 71 vaccine, Emerg. Microb. Infect. 7 (1) (2018) 37. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0035-z;
C) J. Wang, T. Hu, D. Sun, S. Ding, M.J. Carr, W. Xing, S. Li, X. Wang, W. Shi, Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shandong, China, 2009-2016, Sci. Rep. 7 (1) (2017) 8900. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09196-z;
D) M.H. Ooi, S.C. Wong, P. Lewthwaite, M.J. Cardosa, T. Solomon, Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71, Lancet Neurol. 9 (2010) 1097–1105. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X;
E) H.L. Teoh, S.S. Mohammad, P.N. Britton, T. Kandula, M.S. Lorentzos, R. Booy, C.A. Jones, W. Rawlinson, V. Ramachandran, M.L. Rodriguez, P.I. Andrews, R. C. Dale, M.A. Farrar, H. Sampaio, Clinical characteristics and functional motor outcomes of enterovirus 71 neurological disease in children, JAMA Neurol. 73 (2016) 300–307. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4388;
F) S.M. Wang, C.C. Liu, H.W. Tseng, J.R. Wang, C.C. Huang, Y.J. Chen, Y. Yang, S. Lin, T. Yeh, Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern taiwan, with an emphasis on neurological complications, Clin. Infect. Dis. 29 (1999) 184–190. https://doi.org/10.1086/520149;
G) P. McMinn, I. Stratov, L. Nagarajan, S. Davis, Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in western Australia, Clin. Infect. Dis. 2 (2001) 236–242. https://doi.org/10.1086/318454;
H) C.M. Pérez-Vélez, M.S. Anderson, C.C. Robinson, E.J. McFarland, W.A. Nix, M. A. Pallansch, M.S. Oberste, M.P. Glodé, Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a Diagnostic challenge, Clin. Infect. Dis. 5 (2007) 950–957. https://doi.org/10.1086/521895;
I) C.Y. Chen, Y.C. Chang, C.C. Huang, C.C. Lui, K.W. Lee, S.C. Huang, Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates, Am. J. Neuroradiol. 22 (2001) 200–205.

[4] M. Bessaud, R. Razafindratsimandresy, A. Nougairède, M.L. Joffret, J. M. Deshpande, A. Dubot-Pérès, J.M. Héraud, X. De Lamballerie, F. Delpeyroux, J. L. Bailly, Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity, PLoS One 9 (2014) e90624. https://doi:10.1371/journal.pone.0090624.

[5] A) A.S. Bandyopadhyay, J. Garon, K. Seib, W.A. Orenstein, Polio vaccination: past, present and future, Future Microbiol. 10 (5) (2015) 791–808. https://doi:10.2217/fmb.15.19;
B) Q.Y. Mao, Y. Wang, L. Bian, M. Xu, Z. Liang, EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD), Expert Rev. Vaccines 15 (5) (2016) 599–606. https://doi:10.1586/14760584.2016.1138862.

[6] F.G. Hayden, D.T. Herrington, T.L. Coats, K. Kim, E.C. Cooper, S.A. Villano, S. Liu, S. Hudson, D.C. Pevear, M. Collett, M. McKinlay, Pleconaril respiratory infection study group. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials, Clin. Infect. Dis. 36 (12) (2003) 1523–1532. https://doi:10.1086/375069.

[7] A) R.M. Ledford, N.R. Patel, T.M. Demenczuk, A. Watanyar, T. Herbertz, M. S. Collett, D.C. Pevear, VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds, J. Virol. 78 (7) (2004) 3663–3674. https://doi:10.1128/jvi.78.7.3663-3674.2004;
B) Y.L. Huang, T.M. Lin, S.Y. Wang, J.R. Wang, The role of conserved arginine and proline residues in enterovirus VP1 protein, J. Microbiol. Immunol. Infect. 55 (4) (2022) 590–597. https://doi:10.1016/j.jmii.2022.01.004;
C) M.S. Oberste, S. Peñaranda, K. Maher, M.A. Pallansch, Complete genome sequences of all members of the species human enterovirus A, J. Gen. Virol. 85 (Pt 6) (2004) 1597–1607. https://doi:10.1099/vir.0.79789-0.

[8] M.S. Oberste, K. Maher, D.R. Kilpatrick, M.A. Pallansch, Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification, J. Virol. 73 (3) (1999) 1941–1948. https://doi:10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

[9] M. Roche, C. Lacroix, O. Khoumeri, D. Franco, J. Neyts, T. Terme, P. Leyssen, P. Vanelle, Synthesis, biological activity and structure-activity relationship of 4,5-dimethoxybenzene derivatives inhibitor of rhinovirus 14 infection, Eur. J. Med. Chem. 76 (2014) 445–459. https://doi:10.1016/j.ejmech.2014.01.034.

[10] C. Lacroix, J. Querol-Audí, M. Roche, D. Franco, M. Froeyen, P. Guerra, T. Terme, P. Vanelle, N. Verdaguer, J. Neyts, P. Leyssen, A novel benzonitrile analogue inhibits rhinovirus replication, J. Antimicrob. Chemother. 69 (10) (2014) 2723–2732. https://doi:10.1093/jac/dku200.

[11] L. Da Costa, M. Roche, E. Scheers, A. Coluccia, J. Neyts, T. Terme, P. Leyssen, R. Silvestri, P. Vanelle, VP1 crystal structure-guided exploration and optimization of 4,5-dimethoxybenzene-based inhibitors of rhinovirus 14 infection, Eur. J. Med. Chem. 115 (2016) 453–462. https://doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.049.

[12] L. Da Costa, E. Scheers, A. Coluccia, A. Casulli, M. Roche, C. Di Giorgio, J. Neyts, T. Terme, R. Cirilli, G. La Regina, R. Silvestri, C. Mirabelli, P. Vanelle, Structure-based drug design of potent pyrazole derivatives against rhinovirus replication, J. Med. Chem. 61 (18) (2018) 8402–8416. https://doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00931.

[13] Y. Liu, Z. Zhang, X. Zhao, R. Yu, X. Zhang, S. Wu, J. Liu, X. Chi, X. Song, L. Fu, Y. Yu, L. Hou, W. Chen, Enterovirus 71 inhibits cellular type I interferon signaling by downregulating JAK1 protein expression, Viral Immunol. 27 (6) (2014) 267–276. https://doi:10.1089/vim.2013.0127.

[14] F. Touret, C. Baronti, O. Goethals, M. Van Loock, X. de Lamballerie, G. Querat, Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery, Antivir. Res. 168 (2019) 109–113. https://doi:10.1016/j.antiviral.2019.05.005.

[15] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen, The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 392 (1–2) (1997) 19–30. https://doi:10.1016/s0165-1218(97)00042-6.

[16] OCDE, Test No. 487: in Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, first ed., OCDE, Paris, 2010. https://doi.org/10.1787/9789264091016-en.

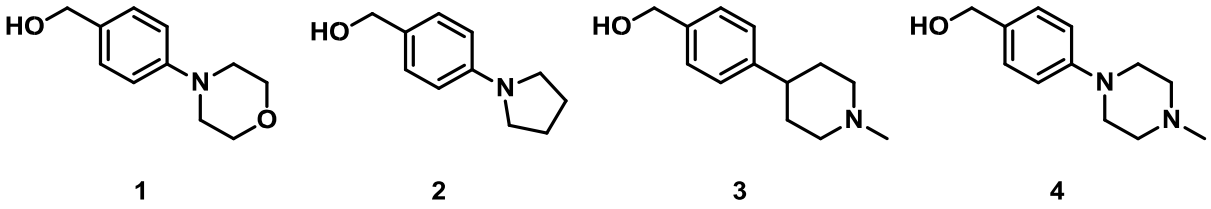
[17] F. Touret, C. Baronti, O. Goethals, M. Van Loock, X. de Lamballerie, G. Querat, Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery, Antivir. Res. 168 (2019) 109–113. https://doi:10.1016/j.antiviral.2019.05.005.

[18] R.C. Noble, J.H. Shand, The colorimetric estimation of protein by the Lowry technique using a liquid scintillation counter, J. Biochem. Biophys. Methods 8 (3) (1983) 223–226. https://doi.org/10.1016/0165-022X(83)90070-2.

2) Discussion.

Dans ce travail, nous avons réalisé différentes modulations des côtés *pore* et *toe-end* afin d'identifier un « hit » agissant contre l'EV-A71 et de valider les relations structure-activité déjà observées dans d'autres conditions expérimentales et d'autres virus.

La synthèse a été menée selon deux stratégies différentes pour diminuer le nombre d'étapes à réaliser (6 pour le processus A, 4 pour le processus B) mais aussi favoriser la modulation de chaque extrémité en synthétisant un intermédiaire en 1 ou 2 étapes avant l'obtention de nos composés finaux. Pour le processus A, certains problèmes de réactivité ont été observés pour les chlorations sur des composés comportant une amine non aromatique, lors des étapes de neutralisation du milieu réactionnel acide ou de purification par colonne chromatographique sur gel de silice [**Figure 33**]. Cependant, même si le processus B est plus court, il nécessite la présence d'un cycle B de type pyridine, ou substitué avec un groupe électroattracteur, pour rendre possible la substitution nucléophile aromatique.



1 2 3 4

Figure 33. Substrats pour laquelle la chloration du processus A n'a pas donné le produit attendu.

Grâce aux différentes modulations effectuées dans cet article, nous avons pu identifier deux composés **5h** et **6c**, respectivement nommés **AB112** et **AB113**, ayant de fortes interactions avec la poche hydrophobe et une activité contre EV-A71.

Afin d'atteindre nos objectifs de synthèse d'inhibiteurs à large spectre, nous nous intéresserons à la modulation de ces composés pour étendre leur activité aux types de virus de l'espèce EVB et EV-C, avec leurs représentants (E30 et CVA24).

B. Étude d'inhibition à large spectre pour des dérivés bicycliques.

Ayant évalué différents composés avec des interactions très diverses, nous avons décidé de modifier la structure de nos molécules en gardant les interactions identifiées tout en ayant un spectre d'activité sur 3 virus (EV-A71, E30, CVA24), représentant des espèces respectives EVA, EV-B et EV-C.

Outre sa facilité de culture, l'E30 est un virus particulièrement présent en Europe, avec une augmentation importante de son incidence en 2018. Il est une des raisons fréquentes des infections neurologiques en France.[567] De même, le CVA24, dont la culture est maîtrisée à l'Unité des Virus Emergents (UVE), est le virus de l'espèce EV-C le plus prévalent dans le monde. Il possède aussi un variant qui cause des conjonctivites aigües, avec un modèle de réplication particulier, qui a pu former des foyers épidémiques en France par le passé.[568] Dans un premier temps, nous présenterons des modulations de la structure du composé **6c**, aussi nommé **AB113**. En effet, afin d'identifier les diverses interactions polaires de l'alcool benzylique du côté *toe-end*, nous avons synthétisé un analogue substitué en position *méta*. De même, pour déterminer le rôle de la position des atomes d'azote de l'hétérocycle côté *pore*, nous avons synthétisé une série substituant le triazole par des pyrimidines fonctionnalisées en position *para*. Pour cela, nous utiliserons les mêmes stratégies de synthèse que celles présentées dans la première partie de ce chapitre.

Dans un second temps, nous avons voulu combiner les avantages des pharmacophores polaires et l'hydrophobicité des cycles aromatiques fusionnés, décrits dans la section précédente. De plus, l'accolement d'hétérocycles est réalisé toujours dans le but de recherche des interactions supplémentaires avec la capside. Pour cela, nous avons substitué l'alcool benzylique par des bicycles portant pour la plupart des hétéroatomes (azote, oxygène). De plus, nous avons modulé le côté *pore* par d'autres hétérocycles aromatiques à 5 atomes toujours afin d'optimiser les interactions polaires avec le côté ouvert de la poche hydrophobe.

Les essais biologiques sur nos composés évaluant l'efficacité, leur cytotoxicité ou leur effet mutagène ont été effectués.

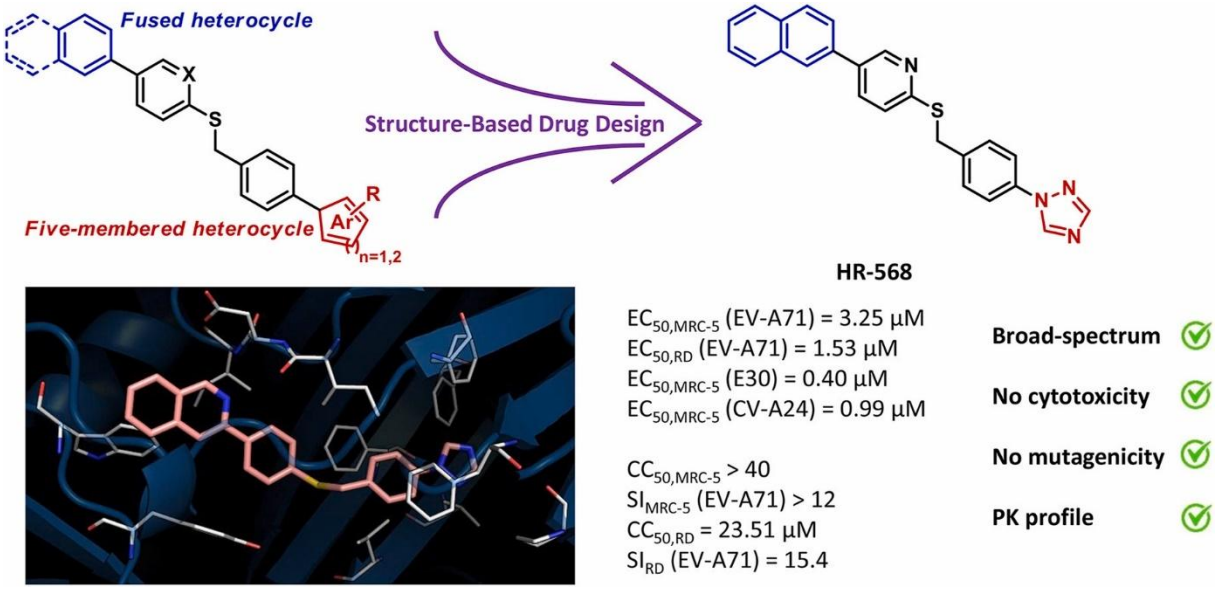
---

[567] Point sur les infections à entérovirus au 05/07/2023. Santé Publique France. Lien.

[568] A major outbreak of conjunctivis caused by coxsackievirus A24, Réunion, January to April 2015. Santé Publique France. Lien.

Enfin, une modélisation des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés les plus intéressants a été réalisée afin de discuter de leur drugabilité, à travers leur biodisponibilité, leur hydrophilie, leur masse molaire, leur perméabilité et leur solubilité.
Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *Journal of Medicinal Chemistry* » en 2025.

"Design and Synthesis of Novel Thioether Analogs as Promising Antiviral Agents: Evaluation of *In Vitro* Activity against Enteroviruses of Interest." Roux, H.; Touret, F.; Coluccia, A.; Sciò, P.; Bouzidi, H.S.; Di Giorgio, C.; Gattacceca F.; Khoumeri, O.; Silvestri, R.; Vanelle, P.; Roche, M.
Eur. J. Med. Chem. **2025**, *288*, 117395. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116658.



European Journal of Medicinal Chemistry 288 (2025) 117395

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

Design and synthesis of novel thioether analogs as promising antiviral agents: *In vitro* activity against enteroviruses of interest

Hugo Roux [a], Franck Touret [b], Antonio Coluccia [c], Pietro Scio [c], Hawa Sophia Bouzidi [b], Carole di Giorgio [d], Florence Gattacceca [e], Omar Khoumeri [a], Romano Silvestri [c], Patrice Vanelle [a,*], Manon Roche [a,**]

[a] Aix-Marseille Université, CNRS, ICR UMR 7273, PCR, Faculté de Pharmacie, 13005, Marseille, France
[b] Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), France
[c] Department of Drug Chemistry and Technologies, Laboratory Affiliated with the Institute Pasteur Italy – Cenci Bolognetti Foundation, Sapienza University of Rome, Italy
[d] Aix-Marseille Université, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Faculty of Pharmacy, Service of Environmental Mutagenesis, Marseille, France
[e] Aix-Marseille Université, COMPO INRIA–CRCM-INSERM-U1068, CNRS UMR7258, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Enterovirus
Capsid binder
Broad-spectrum
Structure-activity relationships
Fused bicycles
Heterocyclic compounds

ABSTRACT

The *Enterovirus* genus contains two major subgroups: rhinovirus (RV) species A-C and enterovirus (EV) ones A-D. While RV only infects the respiratory system, the EV can cause a wide variety of diseases, ranging from non-specific febrile illness to severe neurologic complications. To date, no curative treatments are commercially available. Our research team had recently developed EV-A71 inhibitors. To improve their activity and broaden their spectrum, we performed optimization of the structure following an iterative cycle of chemical modulations. As a result, we obtained two broad-spectrum inhibitors with micromolar activity against these 3 types of viruses (**OM1260**: EC_{50} (MRC-5, EV-A71) = 1.15 μM; EC_{50} (RD, EV-A71) = 4.38 μM; EC_{50} (MRC-5, E30) = 0.41 μM; EC_{50} (MRC-5, CVA24) = 1.15 μM; **HR-568**: EC_{50} (MRC-5, EV-A71) = 3.25 μM; EC_{50} (RD, EV-A71) = 1.53 μM; EC_{50} (MRC-5, E30) = 0.40 μM; EC_{50} (MRC-5, CVA24) = 1.22 μM). Docking studies shed light on structure-activity relationships, while time-of-drug addition assays confirmed their intervention during the early step of viral replication. Eventually, some pharmacokinetic modelling has been carried out to evaluate their druggability. All these results showed that **OM1260** and **HR-568** are promising candidates for further development.

1. Introduction

The *Enterovirus* genus of the *Picornaviridæ* family contains many important human pathogens. It is composed of 7 species, namely 4 enterovirus species (EV-A, -B, –C, -D) and 3 human rhinovirus species (RV-A, -B, –C). Some types of virus can be associated with severe and specific clinical manifestations for immunocompromised or pediatric patients. EVs are ubiquitous, with a diversity of species and variants among continental regions [1]. EV-B is the most detected species worldwide, while EV-A has been mainly observed in Pacific Asia in contrast to North America, where most of the infections reported have been caused by EV-D. In addition, new viral variants have emerged these last decades, such as enterovirus-A71 (EV-A71) and enterovirus-D68 (EV-D68), causing outbreaks associated with more severe disease manifestations than previously described [2–4]. Moreover, even if the number of infections due to EV decreased during and shortly after the (SARS-Cov2) lockdown, numerous enterovirus outbreaks were once again detected. Indeed, EV-D outbreaks were detected as early as 2021 [5]. Eventually, as a greater sensitivity in young children was identified in CV-B5 and E11 infections, there is a need to develop a broad-spectrum enterovirus inhibitor to address their growing threat [6].

In our previous projects to design some broad-spectrum anti-enteroviral compounds, we developed 210 molecules inhibiting rhinoviruses or EV-A71 [7–12]. From the last works, we observe that the

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: hugo.roux@univ-amu.fr (H. Roux), franck.touret@univ-amu.fr (F. Touret), antonio.coluccia@uniroma1.it (A. Coluccia), pietro.scio@uniroma1.it (P. Scio), hawa-sophia.BOUZIDI@univ-amu.fr (H.S. Bouzidi), carole.di-giorgio@univ-amu.fr (C. di Giorgio), florence.gattacceca@univ-amu.fr (F. Gattacceca), omar.khoumeri@univ-amu.fr (O. Khoumeri), romano.silvestri@uniroma1.it (R. Silvestri), patrice.vanelle@univ-amu.fr (P. Vanelle), manon.roche@univ-amu.fr (M. Roche).

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117395
Received 27 December 2024; Received in revised form 3 February 2025; Accepted 11 February 2025
Available online 14 February 2025
0223-5234/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

thioether linker improved EV growth inhibition. This is the first compound series using sulfur as a heteroatom in the linker with 4 aromatic cycles for EV capsid binders [13–16]. Four molecules were defined as potent inhibitors on MRC-5 against EV-A71 [Table 1]. **AB112** and **AB113** were the most promising candidates against EV-A71, considering two cell lines: MRC-5 and rhabomyosarcoma (RD).

To analyze the interactions of AB113, our most promising compound, with the hydrophobic pocket, we modulated configurations of benzyl alcohol on the toe-end side and nitrogen of the pore aromatic cycle [Fig. 1]. Then, to combine the properties of AB109 and AB113 derivatives, we decided to modulate the toe-end side with fused cycles. Likewise, new five- or six-membered aromatic heterocycles were evaluated as pore pharmacophores.

To access a preclinical lead from our compounds, some *in silico* predictions of pharmacokinetic parameters were performed. Moreover, some antiviral assays on other enteroviruses are considered to evaluate the spectrum of activity of our compounds and move toward broad-spectrum enterovirus inhibitors design. In addition to the EV-A71, the E30 has been selected for its prevalence, particularly in Europe, while CVA24 is known for its variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis. A time-of-addition assay (TOA) was carried out to confirm the action of our compounds when the virus enters the host cell.

2. Results

2.1. Chemistry

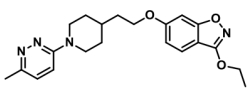
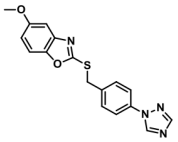
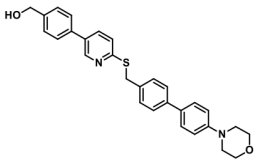
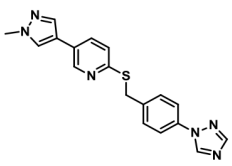
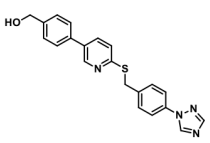
2.1.1. Synthesis pathways

Twenty-two compounds were synthesized according to the synthesis pathways detailed in Scheme 1, already reported in our previous works [17]. Functionalization of both toe-end and pore sides was performed using various boronic acids.

As presented before, we change the substitution of the toe-end alcohol function and the nitrogen position in the pore side aromatic cycle for **AB113** optimization. Moreover, we also decided to gather both **AB113** and **AB109** toe-end pharmacophores to enhance the activity of our newly synthesized compounds. Consequently, we modulated the toe-end side with fused aromatic cycles or aromatic heterocycles. Likewise, we also changed the pore triazole pharmacophore, selecting five-membered heterocycles, namely *N*-benzyl or *N*-methylpyrazole, and 3,5-dimethylisoxazole, or six-membered heterocycles, namely 3- or 4-*N*-dimethylaniline. Preliminary docking assays predicted that *meta* dimethylaniline at the pore side could have an effective binding of bicycle derivatives (compounds **5d** and **5e**). Thus, the compounds **5a-e** were also synthesized with this procedure. At last, cycle B was also modulated between aromatic heterocycles (phenyl, pyridine, 2-thiohydantoin).

The Supplementary Materials contain all the 1H NMR, and 13C NMR spectra, HRMS-ESI, and chemical purity data of target compounds.

Table 1
The activity of thioether derivatives against enterovirus EV-A71.

Compound	Structure	EC_{50} (MRC-5, μM)	EC_{50} (RD, μM)
Vapendavir		0.36 ± 1.61	0.56 ± 1.63
AB109		1.67 ± 2.23	28.53 ± 2.23[a]
HR266		6.38	19.71 ± 2.33
AB112		0.57 ± 2.5	4.38 ± 2.16
AB113		0.29 ± 2.35	1.66 ± 2.18

[a] Cytotoxicity detected: CC50 (RD) = 22.10 μM.

2.1.2. General Procedure

We have chosen to keep the synthesis strategy previously described to obtain the desired compounds by considering the difficulty of synthesis, the economy of atoms, and the synthesis steps [7]. Most of boronic acids used in these pathways are commonly used [17].

The functionalization of the pore side was performed by Suzuki-Miyaura cross-coupling, with the highly reactive catalyst **Pd(dppf)Cl_2**, to lead to derivatives **1a-e**, in yields of between 76 % and 94 % (Scheme 1, route a). A reduction with sodium borohydride **$NaBH_4$** led to benzyl alcohol derivatives **2a-f**, with yields of 93 % and 100 %. Then a chlorination with thionyl chloride **$SOCl_2$** was performed to obtain chloro derivatives **3a-f** in yield between 85 % and 97 % (Scheme 1, routes b and c). To prepare derivatives **4a-f, h**, the chloro derivatives **3a-f** were coupled with 3-bromo-6-mercaptopyridine (**BrPhSh**) or 4-bromothiophenol (**BrPySH**), providing yields ranging from 73 % to 100 % (Scheme 1, routes d). Eventually, final products **5a-n** were synthesized using a Suzuki-Miyaura cross-coupling, catalyzed with **Pd(dppf)Cl_2** (Scheme 1, routes e). This step had yields from 40 % to 99 %.

A bimolecular nucleophilic substitution between **3f** and **(*Z*)-5-((1*H*-indol-3-yl)methylene)-2-thiohydantoin** was performed with yields of 50 % to synthesize derivative **6** (Scheme 2) [7].

2.1.3. Pyrimidine functionalization

The functionalization with appropriate pyrimidine was performed using a procedure already reported (Scheme 3) [7].

This strategy led to intermediate **7**, which allows us to functionalize the pore side easily. 6 final products were synthesized in two steps from the bromo derivative **7**. The pore functionalization for compounds **8a-f** was made by Suzuki-Miyaura cross-coupling, catalyzed with Pd(dppf)Cl2, with yields ranging from 73 % to 93 %. Eventually, a reduction of compounds **8a-f** with NaBH4 led to final compounds **9a-f** with yields between 24 % and 100 %.

2.2. In vitro biological assays

To determine the activity of our new compounds against enteroviruses, we performed our standardized *in vitro* RNA yield-reduction antiviral assays [18]. These assays allowed us to estimate their antiviral activity through their half-maximal effective concentration (EC_{50}). We used two different cell lines: Rhabdomyosarcoma (RD) and Medical Research Council cell strain 5 (MRC-5). By assessing antiviral activity in two different cell lines, we reduce the risk of cell-specific activity and increase the confidence of our results [19]. Half-maximal cytotoxic concentration (CC50) was also measured in parallel in compound-treated uninfected cells.

To determine the most effective inhibitor among our synthesized compounds, first, we performed assays with an EV-A71 strain. Then, we

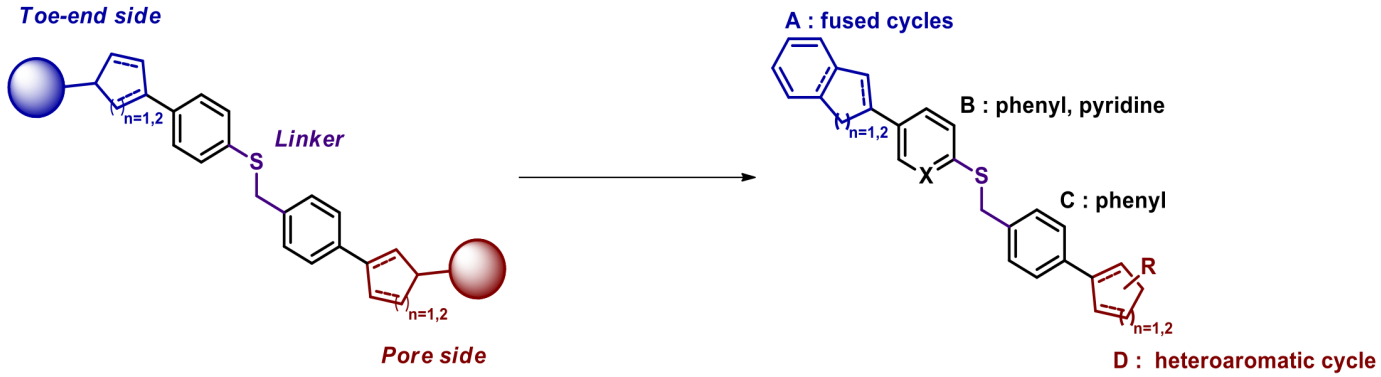
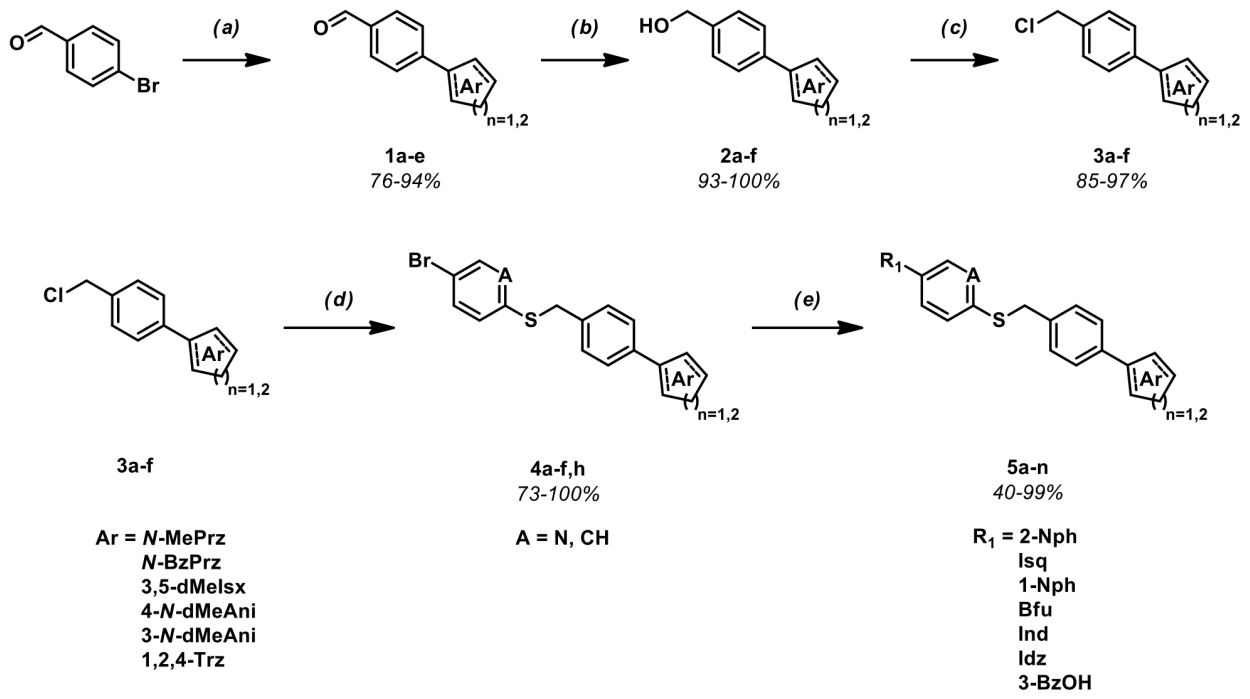
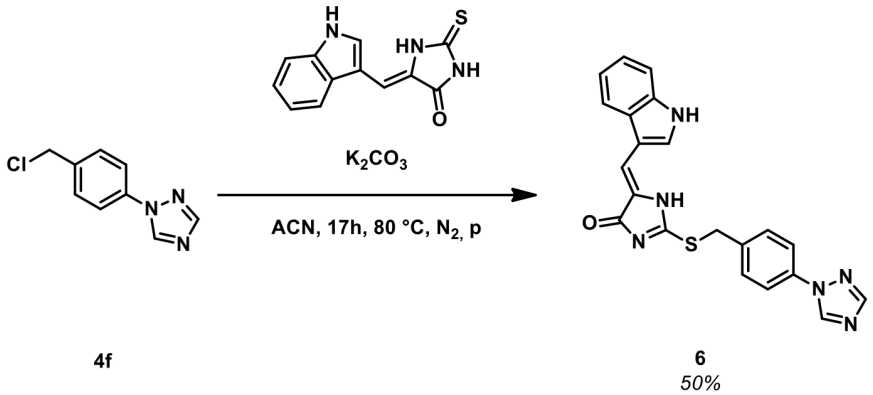


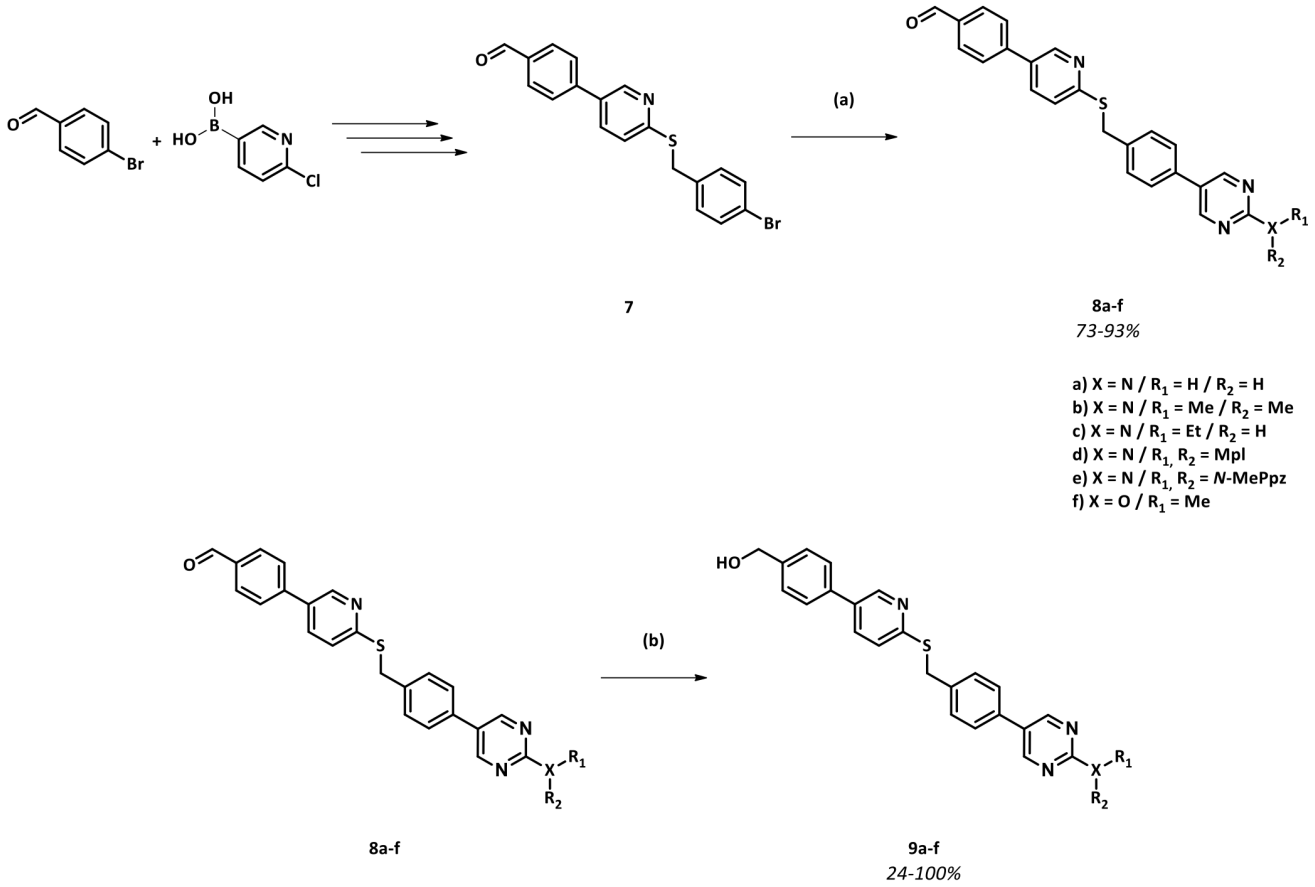
Fig. 1. Combination of AB109 bicycles with AB113 derivatives, introducing cycle's nomenclatures and hydrophobic pocket sides.



Scheme 1. Procedure A for the Synthesis of the toe-end modulated AB113 analogs and bicycle derivatives [a].[a]Reagents and conditions: (*a*) $ArB(OH)_2$, $Pd(dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxane:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (*b*) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), 0 °C to rt, 2 h, N_2, p; (*c*) $SOCl_2$, DCM or DMF, 0 °C to rt, 3 h, N_2; (*d*) **BrPhSh** or **BrPySH**, K_2CO_3, ACN, 80 °C, N_2, p; (*e*) $ArB(OH)_2$, $Pd(dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxane:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (*f*) **IndThd**, K_2CO_3, ACN, 80 °C, N_2, p.



Scheme 2. General Procedure for the synthesis derivative 6.



Scheme 3. Pyrimidine pore functionalization synthesis pathway [a]. [a]Reagents and conditions: (a) $ArB(OH)_2$, $Pd(Dppf)Cl_2$, K_2CO_3, Dioxane:H_2O (4:1), 80 °C, N_2, p; (b) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), rt, 2 h, N_2, p.

explored the broad-spectrum activity against E30 and CV-A24, respectively, from EV species B and C. Vapendavir, a capsid binder, was used as a reference compound in our assays [20]. We chose MRC-5 and RD cells line as they were already used in other antienteroviral works against EV-A71 for both and against E30 and CV-A24 for MRC-5 [7,21–23].

2.2.1. Evaluation of AB113 analogs

From the previous works, two molecules were defined as promising candidates: **AB112** and **AB113**. However, some interactions remain unclear. Indeed, the orientation of methylalcohol in the toe-end was not evaluated yet, as well as the role of nitrogen atoms of the pore side aromatic cycle, in the activity enhancement. Consequently, to assess **AB113** structure optimization, we first synthesized a derivative with a toe-end *meta*-substituted methylalcohol instead of *para*-substituted. Moreover, we decided to modulate the pore side, introducing an aminopyrimidine ring instead of a triazole (to retain the number of nitrogen atoms) and using various substitutions on 2-aminopyrimidine. Antiviral assays' results are presented in Table 2.

The *in vitro* biological assays clarified that the para methanol substituent at the toe-end was crucial because its shifting to the *meta* position markedly affected the potency. In the same way, the triazole ring at the pore side was crucial too. Indeed, the introduction of 2-aminopyrimidine affected potency, and substituted 2-aminopyridine completely abrogated the antiviral activity.

2.2.2. Bicycle pharmacomodulation at the toe-end side

Considering the pharmacophoric elements of **AB109** and **AB113** compounds, we modulated both the toe-end and pore sides. Thus, we replaced the benzyl alcohol of **AB113** with various fused aromatic bicycles, retaining the other part of the scaffold. Oxygen or nitrogen atoms were inserted in the bicycle rings, trying to retain the alcohol group's capabilities to form hydrogen bond contacts. Activities for each modulation are presented in Table 3.

By comparing the different results on the two cell lines, we were able to identify the most promising inhibitors. **OM1260**, **HR-394**, and **HR-568** were the most effective compounds against EV-A71 [Fig. 2]. **HR-478** has a lower potency on RD cells, while no activity was quantified in MRC-5 cells. Other compounds did not show antiviral activity against EV-A71 in these conditions.

2.2.3. Evaluation of heteroaromatic pharmacophores at the pore side

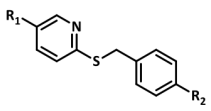
Having determined the best toe-end functionalization, we also modulated the pore side with five-membered aromatic cycles, as triazole seemed to be the best pharmacophore. Activities for each modulation are presented in Table 4.

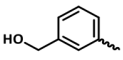
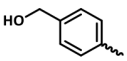
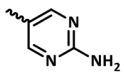
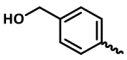
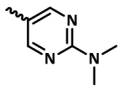
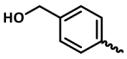
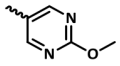
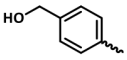
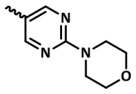
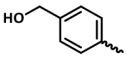
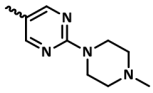
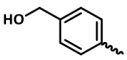
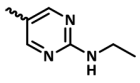
Any of the *pore* modulations presented a better activity than triazole derivatives. Indeed, the more the five-membered aromatic heterobicycles are substituted with bulky moieties, the more the steric hindrance seems to decrease the potency of the compound. *N*-methylpyrazole is more effective than dimethylisoxazole, itself being more active than *N*-benzylpyrazole. Loss of activity was observed for *N*-dimethylaniline, for both *meta* and *para* substitution. Six-membered modulation led to loss of activity.

2.2.4. Inhibition of enteroviruses from 3 different species (CVA24, E30, EV-A71)

As our main objective is to synthesize broad-spectrum enterovirus inhibitors, we performed RNA yield-reduction antiviral assays against other types of viruses. Here, we focus on 3 types of viruses, namely EV-A71, E30, and CVA24, included in EV-A, EV-B, and EV-C species

Table 2
In vitro antiviral activity of AB113 derivatives against EV-A71 on MRC-5 and RD cells.[a]



			MRC-5			Rhabdomyosarcoma		
Inhibitors	R1	R2	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]
Vapendavir	/	/	0.36 ± 1.61	>20	>55	0.53 ± 1.65	>63	>118
5n			22.01	>40	>1.8	2.78	>40	>14
9a = HR-267			<0.37	>20	>54	24.7	44.66	1.81
9b			/	/	/	>40	/	/
9f			/	/	/	>40	/	/
9d			/	/	/	>40	/	/
9e			/	/	/	>40	/	/
9c			/	/	/	>40	/	/

[a] Values reported as median ± std are from two independent experiments.
[b] EC_{50} = 50 % effective concentration (concentration at which 50 % inhibition of virus-induced cell death is observed).
[c] CC_{50} = 50 % cytotoxic concentration (concentration at which 50 % adverse effect is observed on host cell viability).
[d] SI = selectivity index for EV-A71, SI=CC_{50}/EC_{50}.

[Table 5]. EV-A71 is the main cause of hand-foot-mouth disease, which is circulating in many Asia-Pacific countries. Moreover, severe infections were responsible for neurologic conditions as well as E30 ones, while a variant of CVA24 causes acute hemorrhagic conjunctivitis.

2.2.5. Early step inhibition by HR-568

To gain a better understanding of the **HR-568** mode of action, we performed TOA using the same conditions as the EC_{50} determination. To clearly distinguish the difference in inhibition, we performed the experiment, higher than the EC_{50}, at 10 μM in RD cells. We tested 4 different times, 1 h before infection, at the same time (0), 1 and 4 h after infection. We used two complementary readouts: viral RNA copy number in the supernatant and % viral inhibition [Fig. 3].

The experiment was conducted using the same conditions as the EC_{50} determination. Data presented are from 3 or 6 technical replicates, and error bars show mean ± s.d.

First, 1-h pre-incubation is the condition with the greatest reduction (1.5 log compared to VC) and over 90 % inhibition. The standard condition gives a 1.25 log reduction and over 90 % inhibition. At 1-h post-infection, we observed a further slight decrease in reduction to 1.14 log, but still over 90 % inhibition. At 4 h post-infection we observe the greatest inhibition decrease with only 0.7 log, translating into less than 90 % inhibition. These results seem to indicate that HR-568, which is a capsid binder, does have an antiviral effect on the early phase of viral replication. Given that, in our assay, there are several replication cycles, and our reduction in antiviral activity is not total, we cannot exclude a minor antiviral activity in the late phase of viral replication.

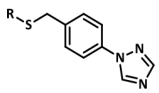
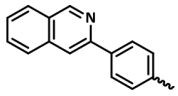
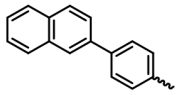
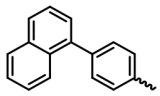
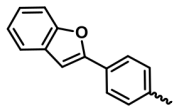
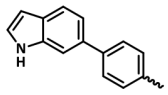
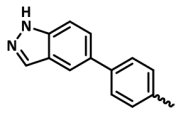
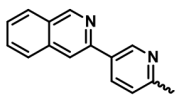
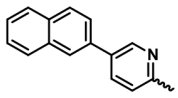
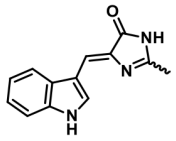
2.3. Evaluation of mutagenic activity of active compounds (HR-267, HR-394, HR-568, OM1260)

To completely evaluate the toxicity of our compounds, in addition to simple cytotoxicity ones, we performed mutagenic assays on Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. This is why, firstly, we assess the cytotoxicity of our most promising compounds. Then, we evaluate the clastogenic and aneugenic power of these compounds, with or without metabolic activation.

2.3.1. Cytotoxicity evaluation of our most promising compounds

To check every pre-clinical criterion, we didn't only evaluate the activity of our compound but also their cytotoxicity. Half-maximal cytotoxic concentration (CC_{50}) on MRC-5 and RD cells for all synthesized compounds are represented in Table 2, Table 3, or Table 4. Rh most promising compounds were also assayed to evaluate CC_{50} on CHO cells. Results are presented in Table 6. Most of them have a selective index superior of 10. Only **HR-267** or **OM1260** in RD cells have respectively 1.81 and 6.62 for selective index. Moreover, all of them have a CC_{50} superior to 20 μM on every cell line. On MRC-5, the upper limit of measure is too low to identify the precise CC_{50}. On RD cells, our most promising compounds can be ranged with a CC_{50} from 23.51 μM to 96.29 μM. On the contrary, on CHO, all values are between 30 and 45 μM. Regarding the effect on the cell viability of the CHO cells, no

Table 3
In vitro antiviral activity of toe-end modulation against EV-A71 on MRC-5 and RD cells.[a]

		MRC-5			Rhabdomyosarcoma		
Inhibitors	R	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]
Vapendavir	/	0.36 ± 1.61	>20	>55	0.53 ± 1.65	>63	>118
5j = OM1260		1.15 ± 0.62	>40	>25	4.30 ± 1.29	30.54 ± 4.95	7.10
5h		/	/	/	>40	/	/
5i		/	/	/	>40	/	/
5k		/	/	/	>40	/	/
5l		/	/	/	>40	/	/
5m		/	/	/	>40	/	/
5g		>20	/	/	22.10 ± 1.76	>40	>1.8
5f = HR-568		3.25 ± 0.12	>40	>12	1.86 ± 0.47	23.51	12.5
6 = HR-394		>40	/	/	4.65	96.29	20.7

[a] Values reported as median ± std are from two independent experiments.
[b] EC_{50} = 50 % effective concentration (concentration at which 50 % inhibition of virus-induced cell death is observed).
[c] CC_{50} = 50 % cytotoxic concentration (concentration at which 50 % adverse effect is observed on host cell viability).
[d] SI = selectivity index for EV-A71, SI=CC_{50}/EC_{50}.

interferences should appear in our mutagenicity assays.

2.3.2. *Evaluation of clastogenic and aneugenic effects of effective agents*

The micronucleus assay protocol was performed as validated by the Organisation for Economic Co-operation and Development [24]. The procedure for assessing mutagenicity has already been described in our previous work [7]. The results are reported in Supplementary Materials Table 1 without S9 mix [Suppl. Table 1A] or with S9 mix [Suppl. Table 1B].

According to these results, none of our promising compounds significantly increased micronucleated cell rates. Consequently, neither **OM1260**, **HR-267**, **HR-394**, nor **HR-568** exerts cytogenetic effects on *in vitro* CHO cell lines or produces metabolites with cytogenetic effects. In these conditions, none of these capsid binders ever became devoid of clastogenic or aneugenic activities.

2.4. *Docking studies*

All the newly reported compounds were studied by docking experiments to gain more insight into the binding mode and highlight the pharmacophoric interactions. In general, all derivatives shared a consistent binding mode superimposable with the one described for the parent compound **AB113** [7]. Only derivative **HR-394** had an unrelated binding pose.

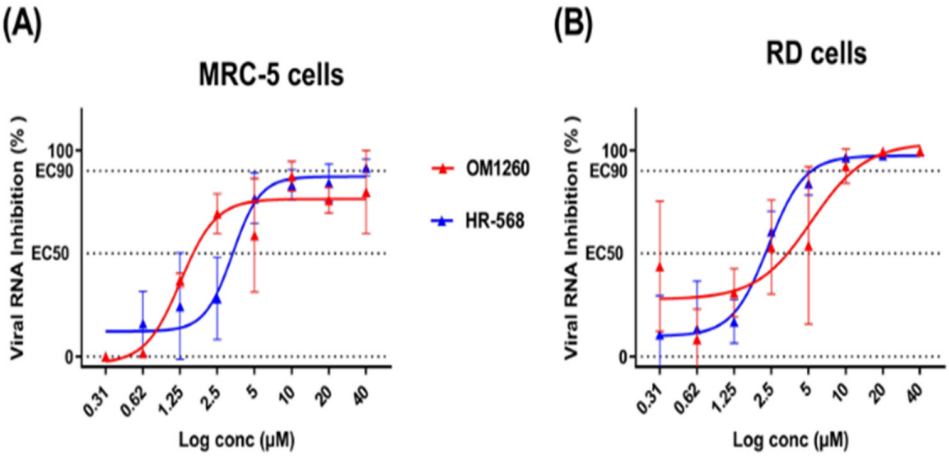
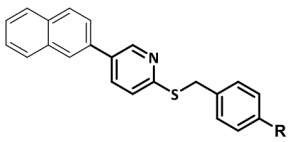
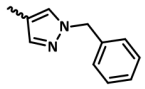
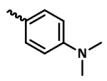
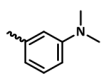


Fig. 2. Dose-response curve reporting the antiviral activity of OM1260/HR-568 against EV-A71. Antiviral activity in A) MRC-5 cells and B) RD cells. Data presented are from three technical replicates, and error bars show mean ± s.d.

Table 4
In vitro antiviral activity of toe-end modulation against EV-A71 on MRC-5 and RD cells.[a]



		MRC-5			Rhabdomyosarcoma		
Inhibitors	R	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]	EC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]	SI[d]
Vapendavir	/	0.36 ± 1.61	>20	>55	0.53 ± 1.65	>63	>118
5f = HR-568		3.25 ± 0.12	>40	>12	1.53 ± 0.47	23.51	12.5
5a		22.41	>40	>1.8	11.96	>40	>3.3
5c		>40	/	/	22.28	>40	>1.8
5b		/	/	/	>40	/	/
5d		/	/	/	>40	/	/
5e		/	/	/	>40	/	/

[a] Values reported as median ± std are from two independent experiments.
[b] EC_{50} = 50 % effective concentration (concentration at which 50 % inhibition of virus-induced cell death is observed).
[c] CC_{50} = 50 % cytotoxic concentration (concentration at which 50 % adverse effect is observed on host cell viability).
[d] SI = selectivity index for EV-A71, SI=CC_{50}/EC_{50}.

The inspections of the proposed binding poses highlighted a series of crucial interactions. The triazole ring at the pore side was involved in hydrophobic interactions with F233, F137, V190, and P177 residues (**5g**, **HR-568**, **OM1260**) [Fig. 4, Suppl. Fig. 1]. Likewise, pyrimidine moiety is involved in the same interactions (**HR-267**). The introduction of bulkier moieties instead of the triazole (**9b**, **9c**, **9d**, **9e**, **9f**) negatively affected the binding mode mainly for steric clashes (Data not shown).

H-bonds are also reported as yellow dot lines while stacking/aromatic contacts are depicted as black dot lines.

The scaffold of the compounds (ring C-linker-ring B) had extensive stabilization. In particular, the phenyl ring C was involved in aromatic interactions with F155 and F135, linker atoms were stabilized by V192 and I111, and ring B (phenyl/pyridine) had aromatic contacts with Y201 [Fig. 4].

The introduction of a bicycle instead of ring A did not affect the binding mode. For 6-member bicycle rings (**OM1260**, **HR-568**), a large hydrophobic interaction with W203 and I113 was observed [Fig. 4].

Worthily, derivative **5n**, with the alcohol moiety in *meta*, did not show differences compared to the parent compound; also, the H-bond with D112 was conserved [Suppl. Fig. 2].

Table 5
In vitro evaluation of pan-EV activities of most promising compounds on MRC-5 cells.[a]

Compound	EC_{50} (EV-A71)[b]	EC_{50} (E30)[b]	EC_{50} (CVA24)[b]	CC_{50}[c]	SI (EV-A71)[d]	SI (E30)[d]	SI (CVA24)[d]
AB113	0.29 ± 2.35	>40	23.25	>40	>181	/	>1.7
OM1260 = 5j	1.15 ± 0.62	0.41	1.22	>40	>25	>100	>32
HR-568 = 5f	3.25 ± 0.12	0.40	0.99	>40	>12	>100	>40

[a] Values reported as median ± std are from two independent experiments.
[b] EC_{50} = 50 % effective concentration (concentration at which 50 % inhibition of virus-induced cell death is observed).
[c] CC_{50} = 50 % cytotoxic concentration (concentration at which 50 % adverse effect is observed on host cell viability).
[d] SI = selectivity index for several viruses (EV-A71, E30, CVA24), SI=CC_{50}/EC_{50}.

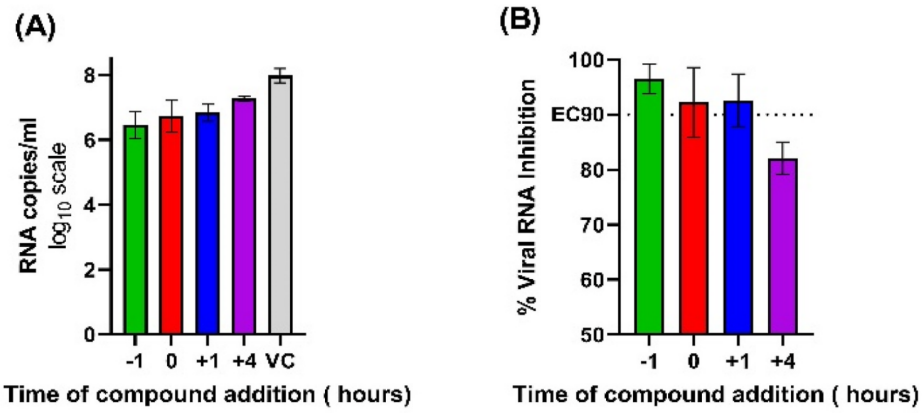


Fig. 3. Time of addition experiment of HR-568 at 10 μM in RD cells A) measured in viral RNA copies/ml and B) % viral RNA inhibition.

Table 6
In vitro anti-EV-A71 activity and cytotoxicity of promising candidates on CHO, MRC-5, and RD cells.[a]

Compound	EC_{50} (MRC-5, EV-A71)[b]	CC_{50} (MRC-5)[c]	SI (MRC-5)[d]	EC_{50} (RD, EV-A71)[b]	CC_{50} (RD)[c]	SI (RD)[d]	CC_{50} (CHO)[b]
HR-394 = 6	>40	/	/	4.65	96.29	20.7	33.56 ± 2.56
HR-267 = 9a	<0.37	>20	>54	24.68	44.66	1.81	36.89 ± 1.98
OM1260 = 5j	0.71	>20	>28	4.61	30.54	6.62	31.26 ± 2.06
HR-568 = 5f	3.16	>40	>13	1.53	23.51	15.4	43.18 ± 2.96

[a] Values reported as median ± std are from two independent experiments.
[b] EC_{50} = 50 % effective concentration (concentration at which 50 % inhibition of virus-induced cell death is observed).
[c] CC_{50} = 50 % cytotoxic concentration (concentration at which 50 % adverse effect is observed on host cell viability).
[d] SI = selectivity index for EV-A71, SI=CC_{50}/EC_{50}.

2.5. In silico pharmacokinetic evaluation of broad-spectrum inhibitors

Our compounds contain numerous aromatic cycles and interact with a hydrophobic pocket. Thus, solubility and bioavailability should be impacted by physicochemical properties related to the data. The analysis of pharmacokinetic parameters seems essential in the preclinical evaluation phases. To evaluate these parameters, we used GastroPlus™ (Version 9.9; Simulations Plus, Inc., Lancaster, California, USA) to predict pharmacokinetic parameters [Table 7].

Solubility in water, according to pH, influences the solubilization of compounds in the intestinal tract for absorption, and in blood for distribution. Log P and permeability measure the capacity to pass through cell membranes. Molar mass is involved in this process with an inversely proportional correlation [25]. Fraction absorbed represents the predicted percentage of compound absorbed just after the intestinal tract absorption, while bioavailability is the percentage after hepatic metabolism.

3. Discussion

Modulating both sides, we synthesized two promising compounds, namely **OM1260** and **HR-568**, with a broad-spectrum against Enteroviruses. They have a (sub)micromolar potency against EV-A71, E30, and CVA24. To assess the druggability of these compounds, we used innovative and rigorous methods to evaluate broad-spectrum activity against EV-A71, E30, and CVA24 in 2 cell lines. In addition, to obtain a comprehensive assessment of the compounds, we also carried out an *in-silico* study of their pharmacokinetic parameters.

3.1. Assays on 2 cell lines

As described in the results section, we worked with two different cell lines.

We successfully identified compounds with micromolar activity in both cell lines (AB113, OM1260 and HR-568), which reduces the risk of cell-specific antiviral effects. Interestingly, we observe that they are more potent on MRC-5 cells than on RD cells. These differences in potency have already been observed with direct-acting antivirals such as remdesivir and sofosbuvir, where antiviral activity may depend on the cell line tested [26,27]. This could be explained either by differences in drug metabolism or stability within the cell or by the presence of the ABC transporter p-gp, which can cause the compounds to be effluxed from the cell [28,29].

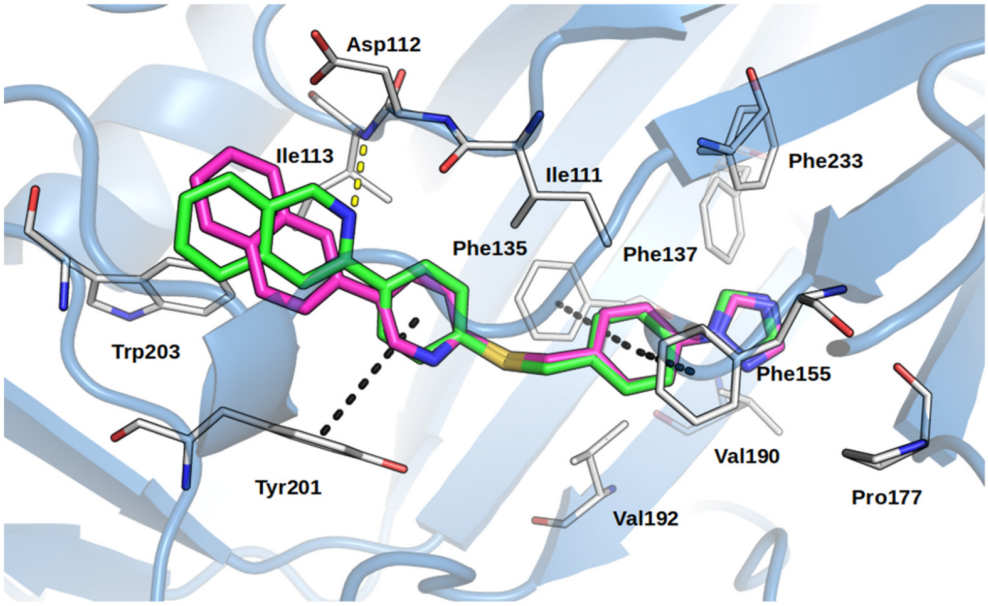


Fig. 4. Proposed binding mode for derivatives OM1260 (in green) and HR-5-068 (in magenta). Residues involved in main interactions are depicted as white stick.

Table 7
Physicochemical and absorption parameters of our most promising compounds, predicted with GatroPlus™.

Pharmacokinetic parameters	OM1260	HR-568	Vapendavir
Solubility (mg/L)	0.698	0.794	10.2
Permeability (10^{-3} cm/s)	39.9	30.8	67.6
Log P	5.28	5.19	4.00
Molecular Weight (g/mol)	394.50	394.50	382.47
Fraction absorbed (%)	83	76	100
Bioavailability (%)	81	74	92

3.2. Broad-spectrum

Even if **AB113** is more effective against EV-A71 than **OM1260** and **HR-568**, both inhibit E30 and CV-A24. These viruses belong to different species of enterovirus, respectively EV-A, EV-B, and EV-C.

We can consider that they have a broad spectrum as the capsid's hydrophobic pocket is like other viruses. Although the capsids is often the region with the highest frequency of mutation, it also has a high sequence identity among the various enterovirus species (between 55.4 % and 83.3 % in EV-A, and between 68.5 % and 87.0 % in EV-B) [30,31]. Moreover, the residues that lined the targeted hydrophobic pocket by capsid binder analyzed in RV species and on the complete Enterovirus genus [32,33]. Of the 26 amino acids in the EV-A71 hydrophobic pocket, 22 are conserved for all viruses belonging to the enterovirus genus.

3.3. Target validation

One of our working hypotheses is that our compounds target the hydrophobic canyon pocket of the capsid. This is supported by the co-crystallization of the first hit compound LPCRW_0005 in the capsid [9]. In fact, the crystal structure of HRV14 in complex with LPCRW_0005 was solved to 3.0 Å resolution to fully characterize the interactions between the compound and the viral capsid (PDB ID: 4PDW). In addition, the various modulations presented here have been modeled with a consistent binding mode. The key interactions of the molecules with the capsid have been highlighted for each hit Fig. 3.

The time-of-addition drug assay results showed a time-dependent decrease in the efficacy of our compounds when added after infection. These results confirm the inhibition of virus entry into the cell, where only the capsid is mobilized. This observation is consistent with the previously reported EV-A71 kinetic replication on rhabomyosarcoma cell line [34]. Indeed, VP1 protein is no longer detected in the cell 6 h after infection. On the contrary, from 3 h post-infection, the amount of viral RNA increases exponentially. This timing of VP1 disappearance and RNA synthesis is consistent with an activity of HR-568 on viral entry. Indeed, a decrease in activity (below 90 % of inhibition) is observed when the compound is added 4 h after infection.

The fact that this activity is not zero may be explained by a possible action at the end of the replication cycle, bearing in mind that non-lytic pathways of exit from the cell may be used by recognition of the EV-A71 capsid [35].

A large body of evidence therefore supports the link between the hydrophobic capsid pocket and our compounds as an inhibitors of enteroviruses.

3.4. Pharmacokinetic parameters

All our active compounds have similar molecular weights (less than 400 g/mol). They have a bioavailability superior to 70 %, which should mean compatibility for their development as drugs. Of note, first-pass effects appear limited for all compounds. However, the permeability of membranes to our compounds is lower than that of vapendavir. Consequently, variation in membrane permeability to our compounds does not seem to affect their bioavailability as much as might be expected.

Our broad-spectrum inhibitors (**OM1260** and **HR-568**) have a lower bioavailability than vapendavir. This could be explained by a one-grade higher log P and a predicted solubility 100 times lower.

4. Materials and methods

4.1. Chemistry

4.1.1. General methods

Commercially available reagents and solvents were used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (plates coated with silica gel 25 DC-Fertigfolien from Macherey-Nagel).

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents on a Brüker Avance-250 instrument (250 MHz), a

Brüker Avance III nanobay-300 MHz or a Brüker Avance III nanobay-400 MHz. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent [^{1}H: (δ (DMSO) = 2.50 ppm, (δ(CDCl3) = 7.26 ppm; ^{13}C: (δ (DMSO) = 39.52 ppm, (δ (CDCl3) = 77.16 ppm]. Data are reported as follows: chemical shift, type of carbon (for ^{13}C NMR), multiplicity, coupling constant in Hertz, integration, and position on the molecule. Two-dimensional spectroscopy (HSQC and HMBC) was used to assist in assignment (data not shown).

Accurate mass measurements (HRMS) were recorded on a TOF spectrometer, by the Spectropole of Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Marseille (France). The purity of tested compounds was determined as > 95 % by liquid chromatography (LC).

In accordance with our reported works, each synthesized compound was obtained using previous synthesis pathways [7].

Likewise, compounds **1d**, **1f**, **2d**, **2f**, **3d**, **3f**, **4d**, **4f**, **4h**, and **7** were already described in previous reported works [7].

4.1.2. Products of Suzuki Miyaura cross-coupling

*4.1.2.1. 4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzaldehyde (**1a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.96 (s, 1H, H^{CHO}), 7.86 (dt J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.84 (s, 1H, H^{Prz}), 7.72 (s, 1H, H^{Prz}), 7.61 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 3.96 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.72 (CH, 1C, C^{CHO}), 139.01 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.34 (CH, 1C, C^{Prz}), 134.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.69 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.94 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.14 (C_q, 1C, C^{Prz}), 39.37 (CH, 1C, C^{NMe}).

*4.1.2.2. 4-(1-benzyl-1H-pyrazol-4-yl)benzaldehyde (**1b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.97 (s, 1H, H^{CHO}), 7.91 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.85 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.72 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.61 (dt, J = 8.0, 1.7 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.37 (dt + m, J = 8.0, 1.7 Hz, 3H, H^{Bz}), 7.28 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 2H, H^{Bz}), 5.36 (s, 2H, H^{Bz}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.73 (CH, 1C, C^{CHO}), 138.94 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.59 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.06 (C_q, 1C, C^{Bz}), 134.58 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.68 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.14 (CH, 2C, C^{Bz}), 128.54 (CH, 1C, C^{Bz}), 128.02 (CH, 2C, C^{Bz}), 127.17 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.47 (C_q, 1C, C^{Prz}), 56.61 (CH_2, 1C, C^{Bz}).

*4.1.2.3. 4-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)benzaldehyde (**1c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.05 (s, 1H, H^{CHO}), 7.96 (dt, J = 8.3, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.44 (dt, J = 8.3, 1.8 Hz, 2H, H^{Ph}), 2.45 (s, 3H, H^{Me}), 2.31 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.72 (CH, 1C, C^{CHO}), 166.17 (C_q, 1C, C^{Isx}), 158.43 (C_q, 1C, C^{Isx}), 137.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.45 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.30 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.00 (C_q, 1C, C^{Isx}), 11.90 (CH_3, 1C, C^{Me}), 11.03 (CH_3, 1C, C^{Me}).

*4.1.2.4. 3'-(dimethylamino)-[1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde (**1e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 7.94 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.76 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.35 (dd, J = 8.3, 7.6 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.98 (dt, J = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.94 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.80 (ddd, J = 8.3, 2.6, 1.0 Hz, 1H, H^{Ph}), 3.03 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 192.16 (CH, 1C, C^{CHO}), 151.14 (C_q, 1C, C^{Ph}), 148.50 (C_q, 1C, C^{Ph}), 140.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.24 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.30 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.82 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.00 (CH, 1C, C^{Ph}), 115.92 (CH, 1C, C^{Ph}), 112.77 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.49 (CH, 1C, C^{Ph}), 40.77 (CH, 2C, C^{NMe}).

*4.1.2.5. 2-((4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)thio)-5-(naphthalen-2-yl)pyridine (**5a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.84 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.89 (dd, J = 6.9, 2.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.87 (dd, J = 6.9, 2.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.82 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.74 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.69 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.58 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.52 (m, 2H, H^{Nph}), 7.43 (dt, J = 8.5, 1.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.41 (dt, J = 8.5, 1.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.28 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 3.93 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.78 (C_q, 1C, C^{Py}), 148.08 (CH, 1C, C^{Py}), 136.91 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.21 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.03 (C_q, 1C, C^{Nph}), 134.89 (CH, 1C, C^{Py}), 133.79 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.92 (C_q, 1C, C^{Py}), 132.85 (C_q, 1C, C^{Nph}), 131.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.02 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.31 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.86 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.01 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.75 (CH, 1C, C^{Prz}), 126.46 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.78 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.75 (CH, 1C, C^{Nph}), 124.96 (CH, 1C, C^{Nph}), 123.11 (C_q, 1C, C^{Prz}), 122.21 (CH, 1C, C^{Py}), 39.24 (CH, 1C, C^{NMe}), 34.51 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{26}H_{21}N_3S$ [M + H]$^+$, 407.1456; observed, 407.1456.

*4.1.2.6. 2-((4-(1-benzyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)thio)-5-(naphthalen-2-yl)pyridine (**5b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.83 (dd, J = 2.1, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.94 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.90 (dd, 1H, H^{Nph}), 7.86 (dd, J = 7.4, 2.6 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.82 (dd, J = 8.3, 2.4, 1H, H^{Nph}), 7.80 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.68 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H, H^{Py}), 7.59 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.52 (m, 2H, H^{Nph}), 7.43 (dt, J = 8.6, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (dt, J = 8.6, 2.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.34 (m, 3H, H^{Bz}), 7.28 (dd, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.24 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 2H, H^{Bz}), 5.33 (s, 2H, H^{Bz}), 4.49 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.77 (C_q, 1C, C^{Py}), 148.07 (CH, 1C, C^{Py}), 137.15 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.52 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.27 (C_q, 1C, C^{Bz}), 135.02 (C_q, 1C, C^{Nph}), 134.88 (CH, 1C, C^{Py}), 133.79 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.92 (C_q, 1C, C^{Py}), 132.85(C_q, 1C, C^{Nph}), 131.60 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.03 (CH, 2C, C^{Bz}), 129.02 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.31 (CH, 1C, C^{Bz}), 127.88 (CH, 2C, C^{Bz}), 127.87 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.75 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.46 (CH, 2C, C^{Nph}), 126.29 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.76 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.75 (CH, 1C, C^{Nph}), 124.96 (CH, 1C, C^{Nph}), 123.38 (C_q, 1C, C^{Prz}), 122.22 (CH, 1C, C^{Py}), 56.40 (CH_2, 1C, C^{Bz}), 34.53 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{32}H_{25}N_3S$ [M + H]$^+$, 483.1769; observed, 483.1769.

*4.1.2.7. 3,5-dimethyl-4-(4-(((5-(naphthalen-2-yl)pyridin-2-yl)thio) methyl)phenyl)isoxazole (**5c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.85 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.02 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.91 (dd, J = 7.3, 2.7 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.88 (dd, J = 7.3, 2.7 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.85 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.70 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.52 (dt + m, J = 8.5, 2.0 Hz, 4H, $H^{Ph + Naph}$), 7.31 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.21 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.55 (s, 2H, H^{CS}), 2.40 (s, 3H, H^{Me}), 2.27 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.37 (C_q, 1C, C^{Isx}), 158.87 (C_q, 1C, C^{Isx}), 157.47 (C_q, 1C, C^{Py}), 148.10 (CH, 1C, C^{Py}), 137.75 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.95 (CH, 1C, C^{Py}), 133.79 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.97 (C_q, 2C, C^{Nph}), 132.94 (C_q, 1C, C^{Py}), 129.57 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.43 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.33 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.07 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.30 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.87 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.79 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.51 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.76 (CH, 1C, C^{Nph}), 124.91 (CH, 1C, C^{Nph}), 122.19 (CH, 1C, C^{Py}), 116.47 (C_q, 1C, C^{Isx}), 34.22 (CH_2, 1C, C^{CS}), 11.75 (CH_3, 1C, C^{Me}), 11.00 (CH_3, 1C, C^{Me}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{27}H_{22}N_3OS$ [M + H]$^+$, 422.1453; observed, 422.1453.

*4.1.2.8. N,N-dimethyl-4'-(((5-(naphthalen-2-yl)pyridin-2-yl)thio) methyl)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (**5d**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.85 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.02 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.90 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.87 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.83 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.70 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.52 (m, 5H, $H^{Nph + Ph}$), 7.47 (m, 3H, $H^{Nph + Ph}$), 7.29 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 6.80 (dt, J = 8.8, 2.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.53 (s, 2H, H^{CS}), 2.99 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.99 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 148.09 (CH, 1C, C^{Py}), 140.29 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.69 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.08 (C_q, 1C, C^{Nph}), 134.88 (CH, 1C, C^{Py}), 133.80 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.91 (C_q, 1C, C^{Py}), 132.80 (C_q, 1C, C^{Nph}), 129.47 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.01 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.32 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.86 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.76 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.73 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.53 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.43 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.75(CH, 1C, C^{Nph}), 124.99(CH, 1C, C^{Nph}), 122.17 (CH, 1C, C^{Py}), 112.91 (CH, 2C, C^{Ph}), 111.65 (C_q, 1C, C^{Nph}), 40.72 (CH, 2C, C^{NMe}), 34.56 (CH, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{30}H_{26}N_2S$ [M + H]$^+$, 446.1817; observed, 446.1817.

*4.1.2.9. N,N-dimethyl-4'-(((5-(naphthalen-2-yl)pyridin-2-yl)thio) methyl)-[1,1′-biphenyl]-3-amine (**5e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.86 (dd, *J* = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.91 (dd, *J* = 7.3, 2.3 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.88 (dd, *J* = 7.3, 2.3 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.83 (dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.70 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (d + m, *J* = 8.5 Hz, 3H, H^{Nph}), 7.30 (dd + dd, *J* = 8.3, 7.5, 0.9 Hz, 2H, $H^{Ph + Py}$), 6.94 (ddd, *J* = 7.5, 1.7, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.92 (dd, *J* = 2.5, 1.7 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.74 (ddd, *J* = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 4.56 (s, 2H, H^{CS}), 3.00 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.82 (C_q, 1C, C^{Py}), 151.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 148.08 (CH, 1C, C^{Py}), 142.02 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.28 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.02 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.03 (C_q, 1C, C^{Nph}), 134.88 (CH, 1C, C^{Py}), 133.78 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.91 (C_q, 1C, C^{Py}), 132.82 (C_q, 1C, C^{Nph}), 129.54 (CH, 1C, C^{Ph}), 129.39 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.01 (CH, 1C, C^{Ph}), 128.31 (CH, 1C, C^{Ph}), 127.85 (CH, 1C, C^{Ph}), 127.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.73 (CH, 1C, C^{Ph}), 126.44 (CH, 1C, C^{Ph}), 125.74 (CH, 1C, C^{Ph}), 124.96 (CH, 1C, C^{Ph}), 122.17 (CH, 1C, C^{Py}), 115.91 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.79 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.63 (CH, 1C, C^{Ph}), 40.85 (CH, 2C, C^{NMe}), 34.45 (CH, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{30}H_{26}N_2S$ [M + H]$^+$, 446.1817; observed, 446.1817.

*4.1.2.10. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-(naphthalen-2-yl) pyridine (**5f**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.97 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 8.30 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H^{Nph}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.13 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H^{Nph}), 8.00 (dd, *J* = 6.3, 2.6 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.96 (dd, *J* = 6.3, 2.6 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.81 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.65 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (m, 2H, H^{Nph}), 7.48 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 4.57 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.26 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 148.00 (CH, 1C, C^{Py}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.49 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.47 (CH, 1C, C^{Py}), 134.37 (C_q, 1C, C^{Nph}), 133.77 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.88 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.26 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.20 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.67 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.04 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.07 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.89 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.72 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.06 (CH, 1C, C^{Nph}), 122.30 (CH, 1C, C^{Py}), 119.97 (CH, 2C, C^{Ph}), 33.18 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{23}H_{17}N_5S$ [M + H]$^+$, 394.1252; observed, 394.1252.

*4.1.2.11. 3-(6-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)iso-quinoline (**5g**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H^{Qnl}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 9.03 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 8.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.20 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.07 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.04 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.81 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.78 (dd, *J* = 6.9, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.67 (dd, *J* = 6.9, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.64 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 4.57 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 158.10 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.85 (CH, 1C, C^{Trz}), 149.51 (CH, 1C, C^{Qnl}), 148.15 (CH, 1C, C^{Py}), 147.42 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.41 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.62 (CH, 1C, C^{Py}), 133.36 (CH, 1C, C^{Qnl}), 130.66 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.30 (CH, 1C, C^{Qnl}), 129.98 (C_q, 1C, C^{Py}), 129.55 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 129.19 (CH, 1C, C^{Qnl}), 128.87 (CH, 1C, C^{Qnl}), 128.04 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 127.67 (CH, 1C, C^{Qnl}), 122.36 (CH, 1C, C^{Py}), 119.96 (CH, 2C, C^{Ph}), 33.15 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{24}H_{18}N_4S$ [M + H]$^+$, 395.1205; observed, 395.1205.

*4.1.2.12. 1-(4-(((4-(naphthalen-2-yl)phenyl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5h**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 8.00 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.98 (dd, *J* = 7.4, 2.4 Hz, 2H, H^{Nph}), 7.94 (dd, *J* = 7.5, 2.2 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.84 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.81 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.78 (dt, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.59 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (m, 2H, H^{Nph}), 7.50 (dt, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.39 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.00 (C_q, 1C, C^{Nph}), 137.93 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.10 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.14 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.70 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.82 (C_q, 1C, C^{Nph}), 132.72 (C_q, 1C, C^{Nph}), 130.62 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.46 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.99 (CH, 1C, C^{Nph}), 128.67 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.97 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.90 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.93 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.64 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.43 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.28 (CH, 1C, C^{Nph}), 119.92 (CH, 2C, C^{Ph}), 36.34 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{25}H_{19}N_3S$ [M + H]$^+$, 393.1300; observed, 393.1300.

*4.1.2.13. 2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-(naphthalen-1-yl) pyridine (**5i**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.27 (s, 1H, H^{Trz}), 8.23 (s, 1H, H^{Trz}), 8.00 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.95 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.82 (dt, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.77 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.60 (dt, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.54 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.51 (dt, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H^{Nph}), 7.41 (dt, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 3H, $H^{Ph + Nph}$), 4.40 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.88 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.79 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.24 (C_q, 1C, C^{Nph}), 138.10 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.64 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.94 (C_q, 1C, C^{Nph}), 131.22 (C_q, 1C, C^{Nph}), 130.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.88 (CH, 3C, $C^{Nph + Ph}$), 128.22 (CH, 1C, C^{Nph}), 127.34 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.93 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.47 (CH, 1C, C^{Nph}), 126.09 (CH, 1C, C^{Nph}), 125.57 (CH, 1C, C^{Nph}), 119.91 (CH, 2C, C^{Ph}), 36.42 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{25}H_{19}N_3S$ [M + H]$^+$, 393.1300; observed, 393.1300.

*4.1.2.14. 3-(4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)phenyl)isoquinoline (**5j**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H, H^{Trz}), 9.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.64 (dd, *J* = 2.4 Hz, 2H, H^{Qnl}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.05 (t, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H, H^{Qnl}), 8.03 (t, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.84 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.81 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.76 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.64 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H^{Qnl}), 7.60 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.53 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.41 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 149.71 (CH, 1C, C^{Qnl}), 147.27 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 142.75 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.81 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.69 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.16 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.97 (CH, 1C, C^{Qnl}), 132.46 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 130.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.02 (CH, 1C, C^{Qnl}), 129.31 (CH, 2C, C^{Ph}), 128.15 (C_q, 1C, C^{Qnl}), 128.07 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.54 (CH, 1C, C^{Qnl}), 119.93 (CH, 2C, C^{Ph}), 36.09 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{24}H_{18}N_4S$ [M + H]$^+$, 394.1252; observed, 394.1252.

*4.1.2.15. 1-(4-(((4-(benzofuran-2-yl)phenyl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazole (**5k**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 7.84 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.79 (dt, J = 8.5, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.65 (dd, J = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H^{Fur}), 7.61 (dd, J = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H^{Fur}), 7.57 (dt, J = 8.5, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H^{Fur}), 7.32 (td, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H^{Fur}), 7.25 (td, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H^{Fur}), 4.40 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 155.23 (C_q, 1C, C^{Fur}), 154.66 (C_q, 1C, C^{Fur}), 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.73 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.68 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.35 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.66 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.34 (C_q, 1C, C^{Fur}), 129.05 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.73 (C_q, 1C, C^{Ph}), 125.62 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.10 (CH, 1C, C^{Fur}), 123.78 (CH, 1C, C^{Fur}), 121.61 (CH, 1C, C^{Fur}), 119.92 (CH, 2C, C^{Ph}), 111.56 (CH, 1C, C^{Fur}), 102.40 (CH, 1C, C^{Fur}), 36.03 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{23}H_{17}N_3OS$ $[M + H]^+$, 383.1092; observed, 383.1092.

*4.1.2.16. 5-(4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)phenyl)-1H-indole (**5l**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.15 (s, 1H, H^{NH}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.80 (dt, J = 8.6, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.61 (dt, J = 8.4, 2.3 Hz, 3H, $H^{Ind + Ph}$), 7.58 (s, 1H, H^{Ind}), 7.56 (dt, J = 8.6, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.4, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.37 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.28 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H^{Ind}), 6.43 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H^{Ind}), 4.35 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.87 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.74 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.99 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.98 (C_q, 1C, C^{Ind}), 136.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.06 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.95 (C_q, 1C, C^{Ind}), 130.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.79 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.70 (C_q, 1C, C^{Ind}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.78 (CH, 1C, C^{Ind}), 120.95 (CH, 1C, C^{Ind}), 119.89 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.51 (CH, 1C, C^{Ind}), 109.64 (CH, 1C, C^{Ind}), 101.45 (CH, 1C, C^{Ind}), 36.73 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{23}H_{20}N_4S$ $[M + H]^+$, 382.1252; observed, 382.1252.

*4.1.2.17. 6-(4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)phenyl)-1H-indazole (**5m**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13.11 (s, 1H, H^{NH}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.22 (s, 1H, H^{Trz}), 8.11 (s, 1H, H^{Idz}), 8.01 (s, 1H, H^{Idz}), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 3H, $H^{Idz + Ph}$), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H^{Idz}), 7.56 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.35 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.85 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.72 (CH, 1C, C^{Trz}), 139.84 (C_q, 1C, C^{Idz}), 139.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.99 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.52 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.48 (CH, 1C, C^{Idz}), 132.36 (C_q, 1C, C^{Idz}), 130.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.75 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.85 (CH, 1C, C^{Idz}), 124.02 (C_q, 1C, C^{Idz}), 119.88 (CH, 2C, C^{Ph}), 118.54 (CH, 1C, C^{Idz}), 111.06 (CH, 1C, C^{Idz}), 36.58 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{22}H_{19}N_5S$ $[M + H]^+$, 383.1205; observed, 383.1205.

*4.1.2.18. (3-(6-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**5n**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.79 (dd, J = 2.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 7.95 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.79 (dt, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.63 (dt + m, J = 8.8, 2.3 Hz, 3H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H^{Ph}), 7.43 (dd + t, J = 8.4, 5.6, 1.0 Hz, 2H, $H^{Ph + Py}$), 7.35 (dt, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H^{Ph}), 5.25 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{OH}), 4.57 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H^{CO}), 4.54 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 157.07 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.86 (CH, 1C, C^{Trz}), 147.67 (CH, 1C, C^{Py}), 144.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.81 (CH, 1C, C^{Trz}), 138.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.79 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.26 (CH, 1C, C^{Py}), 132.59 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.42 (CH, 1C, C^{Ph}), 126.54 (CH, 1C, C^{Ph}), 125.32 (CH, 1C, C^{Ph}), 124.98 (CH, 1C, C^{Ph}), 122.25 (CH, 1C, C^{Py}), 119.95 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.26 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.17 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{21}H_{18}N_4OS$ $[M + H]^+$, 374.1201; observed, 374.1201.

*4.1.2.19. 4-(6-((4-(2-aminopyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**8a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.91 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.55 (s, 2H, H^{Pym}), 8.07 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.97 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H^{Py}), 6.76 (s, 2H, H^{NH2}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.19 (CH, 1C, C^{CHO}), 163.38 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.96 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.33 (CH, 1C, C^{Pym}), 148.10 (CH, 1C, C^{Py}), 142.85 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.05 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.84 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.54 (CH, 1C, C^{Py}), 134.58 (C_q, 1C, C^{Pym}), 130.97 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.02 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.59 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.76 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 122.17 (CH, 1C, C^{Py}), 33.51 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.2.20. 4-(6-((4-(2-(dimethylamino)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**8b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.92 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.67 (s, 2H, H^{Pym}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}), 3.16 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.22 (CH, 1C, C^{CHO}), 161.65 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.96 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.00 (CH, 2C, C^{Pym}), 148.12 (CH, 1C, C^{Py}), 142.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.85 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.56 (CH, 1C, C^{Py}), 134.45 (C_q, 1C, C^{Pym}), 130.98 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.74 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.06 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.19 (CH, 1C, C^{Py}), 121.17 (C_q, 1C, C^{Ph}), 37.21 (CH_3, 2C, C^{NMe}), 33.51 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.2.21. 4-(6-((4-(2-(ethylamino)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**8c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.92 (dd, J = 2.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Py}), 8.59 (s, 2H, H^{Pym}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (dt, J = 8.6, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.29 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{NH}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}), 3.33 (qd, J = 7.1, 5.7 Hz, 2H, H^{NEt}), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H^{NEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 193.21 (CH, 1C, C^{CHO}), 161.99 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.97 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.23 (CH, 2C, C^{Pym}), 148.11 (CH, 1C, C^{Py}), 142.85 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.01 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.84 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.55 (CH, 1C, C^{Py}), 134.63 (C_q, 1C, C^{Pym}), 130.97 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.72 (CH, 2C, C^{Ph}), 130.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.60 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.73 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.18 (CH, 1C, C^{Py}), 121.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 35.94 (CH_2, 1C, C^{NEt}), 33.50 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.18 (CH_3, 1C, C^{NEt}).

*4.1.2.22. 4-(6-((4-(2-morpholinopyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)benzaldehyde (**8d**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.92 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.69 (s, 2H, H^{Pym}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H^{Py}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}), 3.77 (s, 4H, H^{Mpn}), 2.24 (s, 4H, H^{Mpn}).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CHO}), 8.89 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H^{Py}), 8.68 (s, 2H, H^{Pmy}), 8.04 (dd, J = 8.2, 2.6 Hz, 1H, H^{Py}), 8.00 (dt, J = 8.2, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.95 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.58 (dt, J = 8.3, 2.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H^{Py}), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.53 (s, 2H, H^{CS}), 3.76 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.68 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H^{Mpn}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 192.11 (CH, 1C, C^{CHO}), 160.47 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.19 (C_q, 1C, C^{Py}), 155.29 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.27 (CH, 1C, C^{Py}), 142.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.71 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.26 (C_q, 1C, C^{Ph}),

134.69 (CH, 1C, C^{Py}), 133.46 (C_q, 1C, C^{Pym}), 130.39 (C_q, 1C, C^{Py}), 129.83 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.22 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.79 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.28 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.85 (C_q, 1C, C^{Ph}), 121.49 (CH, 1C, C^{Py}), 65.68 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 43.89 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 33.03 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.2.23. 4-(6-((4-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio) pyridin-3-yl)benzaldehyde (**8e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.92 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.71 (s, 2H, H^{Pym}), 8.08 (dd, J = 8.6, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H^{Py}), 4.52 (s, 2H, H^{CS}), 3.74 (dt, J = 11.1, 4.2 Hz, 4H, H^{Ppn}), 3.65 (dt, J = 11.1, 4.2 Hz, 4H, H^{Ppn}), 1.27 (s, 3H, H^{NMe}).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CHO}), 8.89 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H^{Py}), 8.65 (s, 2H, H^{Pym}), 8.04 (dd, J = 8.3, 2.7 Hz, 1H, H^{Py}), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.95 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H^{Py}), 4.53 (s, 2H, H^{CS}), 3.79 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H^{Ppz}), 2.41 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H^{Ppz}), 2.25 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 192.54 (CH, 1C, C^{CHO}), 160.85 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.65 (C_q, 1C, C^{Py}), 155.73 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.72 (CH, 1C, C^{Py}), 142.57 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.07 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.72 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.13 (CH, 1C, C^{Py}), 134.00 (C_q, 1C, C^{Pym}), 130.84 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.28 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.25 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.94 (CH, 1C, C^{Py}), 121.57 (C_q, 1C, C^{Ph}), 54.47 (CH_2, 2C, C^{Ppz}), 45.74 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 43.61 (CH_2, 2C, C^{Ppz}), 33.49 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.2.24. 4-(6-((4-(2-methoxypyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl) benzaldehyde (**8f**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.06 (s, 1H, H^{CHO}), 8.92 (d, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{CHO}), 8.92 (s, 2H, H^{Pym}), 8.08 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.98 (dt, J = 8.5, 2.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.68 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.48 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.55 (s, 2H, H^{CS}), 3.95 (s, 3H, H^{OMe}).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10.07 (s, 1H, H^{CHO}), 8.89 (dd, J = 2.6, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.87 (s, 2H, H^{Pym}), 8.04 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H, H^{Py}), 8.01 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.95 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.66 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 8.2, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.46 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.55 (s, 2H, H^{CS}), 3.98 (s, 3H, H^{OMe}).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 192.12 (CH, 1C, C^{CHO}), 164.38 (C_q, 1C, C^{Pym}), 158.09 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.80 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.29 (CH, 1C, C^{Py}), 142.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.76 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.27 (C_q, 1C, C^{Ph}), 134.72 (CH, 1C, C^{Py}), 132.42 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.42 (C_q, 1C, C^{Py}), 129.84 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.31 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.89 (C_q, 1C, C^{Pym}), 126.81 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.10 (CH, 2C, C^{Ph}), 121.52 (CH, 1C, C^{Py}), 54.30 (CH_3, 1C, C^{OMe}), 32.94 (CH_2, 1C, C^{CS}).

4.1.3. Products of reduction reaction

*4.1.3.1. (4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)methanol (**2a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 (s, 1H, H^{Prz}), 7.61 (s, 1H, H^{Prz}), 7.47 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.69 (s, 2H, H^{CO}), 3.95 (s, 3H, H^{NMe}), 1.68 (s, 1H, H^{OH}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.08 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.92 (CH, 1C, C^{Prz}), 132.26 (C_q, 1C, C^{Ph}), 127.80 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.07 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.80 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.06 (C_q, 1C, C^{Prz}), 65.34 (CH_2, 1C, C^{CO}), 39.25 (CH, 1C, C^{NMe}).

*4.1.3.2. (4-(1-benzyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)methanol (**2b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.82 (s, 1H, H^{Prz}), 7.62 (s, 1H, H^{Prz}), 7.46 (dt, J = 8.1, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.35 (dt + m, J = 8.1, 2.1 Hz, 5H, $H^{Bz\ +\ Ph}$), 7.26 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Bz}), 5.34 (s, 2H, H^{Bz}), 4.68 (s, 2H, H^{CO}), 1.66 (s, 1H, H^{OH}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 139.13 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.17 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.48 (C_q, 1C, C^{Bz}), 132.15 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.05 (CH, 2C, C^{Bz}), 128.34 (CH, 1C, C^{Bz}), 127.93 (CH, 1C, C^{Bz}), 127.75 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.32 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.80 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.33 (C_q, 1C, C^{Prz}), 65.32 (CH_2, 1C, C^{CO}), 56.43 (CH_2, 1C, C^{Bz}).

*4.1.3.3. (4-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)phenyl)methanol (**2c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.45 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.25 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.75 (s, 2H, C^{CO}), 2.40 (s, 3H, H^{Me}), 2.27 (s, 3H, H^{Me}), 1.80 (s, 1H, C^{OH}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.40 (C_q, 1C, C^{Isx}), 158.85 (C_q, 1C, C^{Isx}), 140.31 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.42 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.57 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.52 (C_q, 1C, C^{Isx}), 65.13 (CH_2, 1C, C^{CO}), 11.69 (CH_3, 1C, C^{Me}), 10.93 (CH_3, 1C, C^{Me}).

*4.1.3.4. (3'-(dimethylamino)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methanol (**2e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.60 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H^{Ph}), 7.31 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H), 6.94 (ddd, J = 7.5, 1.6, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.92 (dd, J = 2.6, 1.6 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.75 (ddd, J = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 4.74 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H^{CO}), 3.01 (s, 6H, H^{NMe}), 1.66 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H^{OH}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.12 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.86 (C_q, 1C, C^{Ph}), 139.85 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.59 (CH, 1C, C^{Ph}), 127.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.49 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.91 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.86 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.62 (CH, 1C, C^{Ph}), 65.35 (CH, 1C, C^{CO}), 40.85 (CH, 2C, C^{NMe}).

*4.1.3.5. (4-(6-((4-(2-aminopyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl) phenyl)methanol (**9a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 8.55 (s, 2H, H^{Pym}), 7.96 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, J = , Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, J = , Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, J = , Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (d, J = Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (d, J = Hz, 1H, H^{Py}), 6.76 (s, 2H, H^{NH2}), 5.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H^{CO}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 163.38 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.20 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.33 (CH, 1C, C^{Pym}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.22 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.38 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.10 (CH, 1C, C^{Py}), 134.53 (C_q, 1C, C^{Pym}), 132.29 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.00 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.75 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.21 (C_q, 1C, C^{Py}), 122.13 (CH, 1C, C^{Py}), 63.02 (CH_2, 1C, C^{CO}), 33.53 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{23}H_{20}N_4OS$ $[M + H]^+$, 400.1358; observed, 400.1358.

*4.1.3.6. (4-(6-((4-(2-(dimethylamino)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**9b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.67 (s, 2H, H^{Pym}), 7.95 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.67 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.50 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.4, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (dd, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 5.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{OH}), 4.54 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H^{CO}), 4.49 (s, 2H, H^{CS}), 3.15 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.00 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.16 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.16 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.51 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.10 (CH, 1C, C^{Py}), 134.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.29 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.14 (CH, 1C, C^{Py}), 122.08 (C_q, 1C, C^{Pym}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 37.21 (CH_3, 2C, C^{NMe}), 33.51 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{25}H_{24}N_4OS$ $[M + H]^+$, 428.1671; observed, 428.1671.

*4.1.3.7. (4-(6-((4-(2-(ethylamino)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**9c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.80 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.59 (s, 2H, H^{Pym}), 7.96 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.56 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.49 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.4, 1.9 Hz, 2H,

H^{Ph}), 7.40 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.29 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{NH}), 5.24 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H^{CO}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 3.31 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H^{NEt}), 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H^{NEt}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.99 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.07 (C_q, 1C, C^{Py}), 152.85 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.67 (CH, 1C, C^{Py}), 144.00 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.47 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.79 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.11 (C_q, 1C, C^{Pym}), 135.26 (CH, 1C, C^{Py}), 132.58 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.41 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.31 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.24 (CH, 1C, C^{Py}), 121.82 (C_q, 1C, C^{Py}), 119.65 (CH, 2C, C^{Ph}), 63.26 (CH_2, 1C, C^{CO}), 35.94 (CH_2, 1C, C^{NEt}), 33.17 (CH_2, 1C, C^{CS}), 15.18 (CH_3, 1C, C^{NEt}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{25}H_{26}N_4OS$ [M + H]$^+$, 428.1671; observed, 428.1671.

*4.1.3.8. (4-(6-((4-(2-morpholinopyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl) phenyl)methanol (**9d**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.81 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.72 (s, 2H, H^{Pym}), 7.96 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.60 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.52 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 5.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H^{CO}), 4.51 (s, 2H, H^{CS}), 3.74 (td, J = 4.6, 1.5 Hz, 4H, H^{Mpn}), 3.68 (td, J = 4.6, 1.5 Hz, 4H, H^{Mpn}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.08 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.15 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.17 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.62 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.10 (CH, 1C, C^{Py}), 134.09 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.29 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.05 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.49 (C_q, 1C, C^{Pym}), 122.15 (CH, 1C, C^{Py}), 66.44 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 44.49 (CH_2, 2C, C^{Mpn}), 33.50 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{27}H_{26}N_4O_2S$ [M + H]$^+$, 470.1776; observed, 470.1776.

*4.1.3.9. (4-(6-((4-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl)benzyl)thio) pyridin-3-yl)phenyl)methanol (**9e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.81 (dd, J = 2.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 8.69 (s, 2H, H^{Pym}), 7.96 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.59 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.51 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.40 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 5.24 (t, J = 5.8 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.8 Hz, 2H, H^{CO}), 4.50 (s, 2H, H^{CS}), 3.77 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H^{Ppz}), 2.37 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H^{Ppz}), 2.22 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161.00 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.16 (C_q, 1C, C^{Py}), 156.16 (CH, 2C, C^{Pym}), 147.58 (CH, 1C, C^{Py}), 142.88 (C_q, 1C, C^{Ph}), 137.51 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.36 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.10 (CH, 1C, C^{Py}), 134.19 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.29 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.03 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 125.94 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.14 (CH, 1C, C^{Py}), 122.08 (C_q, 1C, C^{Pym}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 54.85 (CH_2, 2C, C^{Ppz}), 46.30 (CH_3, 1C, C^{NMe}), 43.89 (CH_2, 2C, C^{Ppz}), 33.51 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{28}H_{29}N_3OS$ [M + H]$^+$, 483.2093; observed, 483.2093.

*4.1.3.10. (4-(6-((4-(2-methoxypyrimidin-5-yl)benzyl)thio)pyridin-3-yl) phenyl)methanol (**9f**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.92 (s, 2H, H^{Pym}), 8.81 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.96 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.68 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 4H, H^{Ph}), 7.57 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.43 (dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.42 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 5.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H^{OH}), 4.55 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H^{CO}), 4.53 (s, 1H, H^{CS}), 3.96 (s, 3H, H^{OMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 165.01 (C_q, 1C, C^{Pym}), 157.70 (CH, 2C, C^{Pym}), 157.05 (C_q, 1C, C^{Py}), 147.59 (CH, 1C, C^{Py}), 142.90 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.67 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.35 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.12 (CH, 1C, C^{Py}), 133.06 (C_q, 1C, C^{Ph}), 132.32 (C_q, 1C, C^{Py}), 130.13 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.64 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.57 (C_q, 1C, C^{Pym}), 126.86 (CH, 2C, C^{Ph}), 126.67 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.17 (CH, 1C, C^{Py}), 63.01 (CH_2, 1C, C^{CO}), 55.19 (CH_3, 1C, C^{OMe}), 33.43 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{24}H_{21}N_3O_2S$ [M + H]$^+$, 415.1354; observed, 415.1354.

4.1.4. Products of chlorination reaction

*4.1.4.1. 4-(4-(chloromethyl)phenyl)-1-methyl-1H-pyrazole (**3a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.61 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.45 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.38 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.59 (s, 2H, H^{CCl}), 3.94 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 136.92 (CH, 1C, C^{Prz}), 135.57 (C_q, 1C, C^{Ph}), 133.01 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.35 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.19 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.89 (CH, 2C, C^{Ph}), 122.77 (C_q, 1C, C^{Prz}), 46.32 (CH_2, 1C, C^{CCl}), 39.26 (CH, 1C, C^{NMe}).

*4.1.4.2. 1-benzyl-4-(4-(chloromethyl)phenyl)-1H-pyrazole (**3b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.83 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.62 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.45 (dt, J = 8.2, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.36 (dt + m, J = 8.2, 2.0 Hz, 5H, $H^{Bz + Ph}$), 7.27 (dd, J = 7.8, 1.9 Hz, 2H, H^{Bz}), 5.34 (s, 2H, H^{Bz}), 4.59 (s, 2H, H^{CCl}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 137.19 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.41 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.62 (C_q, 1C, C^{Bz}), 132.92 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.31 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.04 (CH, 2C, C^{Bz}), 128.34 (CH, 1C, C^{Bz}), 127.90 (CH, 2C, C^{Bz}), 126.44 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.88 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.04 (C_q, 1C, C^{Prz}), 56.42 (CH_2, 1C, C^{Bz}), 46.30 (CH_2, 1C, C^{CCl}).

*4.1.4.3. 4-(4-(chloromethyl)phenyl)-3,5-dimethylisoxazole (**3c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.46 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.25 (dt, J = 8.4, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 4.63 (s, 2H, H^{CCl}), 2.41 (s, 3H, H^{Me}), 2.27 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.56 (C_q, 1C, C^{Isx}), 158.75 (C_q, 1C, C^{Isx}), 136.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 130.83 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.54 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.19 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.25 (C_q, 1C, C^{Isx}), 45.98 (CH_2, 1C, C^{CCl}), 11.71 (CH_3, 1C, C^{Me}), 10.94 (CH_3, 1C, C^{Me}).

*4.1.4.4. 4'-(chloromethyl)-N,N-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-amine (**3e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.59 (dt, 2H, H^{Ph}), 7.45 (dt, 2H, H^{Ph}), 7.31 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.93 (ddd, J = 7.5, 1.7, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.90 (dd, J = 2.6, 1.7 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.75 (dd, J = 2.6, 0.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 4.64 (s, 2H, H^{CCl}), 3.01 (s, 6H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 151.11 (C_q, 1C, C^{Ph}), 142.63 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.71 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.40 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.63 (CH, 1C, C^{Ph}), 129.06 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.84 (CH, 2C, C^{Ph}), 115.88 (CH, 1C, C^{Ph}), 112.00 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.59 (CH, 1C, C^{Ph}), 46.30 (CH, 1C, C^{CCl}), 40.83 (CH, 2C, C^{NMe}).

4.1.5. Products of bimolecular nucleophilic substitution

*4.1.5.1. 5-bromo-2-((4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)thio)pyridine (**4a**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 7.73 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.57 (d + dd, J = 8.5, 2.4, 0.9 Hz, 2H, $H^{Prz + Py}$), 7.39 (m, 4H, H^{Ph}), 7.06 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 4.40 (s, 2H, H^{CS}), 3.93 (s, 3H, H^{NMe}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.65 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.36 (CH, 1C, C^{Py}), 138.66 (CH, 1C, C^{Py}), 136.90 (CH, 1C, C^{Prz}), 135.83 (C_q, 1C, C^{Ph}), 131.82 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.00 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.76 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.39 (C_q, 1C, C^{Prz}), 123.04 (C_q, 1C, C^{Py}), 116.36 (CH, 1C, C^{Py}), 39.24 (CH, 1C, C^{NMe}), 34.53 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.5.2. 2-((4-(1-benzyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)thio)-5-bromopyridine (**4b**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.50 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 7.79 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.59 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H^{Prz}), 7.56 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.37 (dt + dt + m, J = 8.6, 1.9 Hz, 7H, $H^{Bz + Ph}$), 7.24 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 2H, H^{Bz}), 7.05 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 5.33 (s, 2H, H^{Bz}), 4.38 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.63 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.36 (CH, 1C, C^{Py}), 138.65 (CH, 1C, C^{Py}), 137.13 (CH, 1C, C^{Prz}), 136.50 (C_q,

1C, C^{Ph}), 135.89 (C_q, 1C, C^{Bz}), 131.69 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.04 (CH, 2C, C^{Bz}), 128.32 (CH, 1C, C^{Bz}), 127.88 (CH, 2C, C^{Bz}), 126.30 (CH, 1C, C^{Prz}), 125.75 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.40 (CH, 1C, C^{Py}), 123.31 (C_q, 1C, C^{Prz}), 116.36 (C_q, 1C, C^{Py}), 56.40 (CH_2, 1C, C^{Bz}), 34.54 (CH_2, 1C, C^{CS}).

*4.1.5.3. 4-(4-(((5-bromopyridin-2-yl)thio)methyl)phenyl)-3,5-dimethylisoxazole (**4c**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.52 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 7.59 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H^{Py}), 7.46 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.18 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.08 (dd, J = 8.5, 0.9 Hz, 1H, H^{Py}), 4.44 (s, 2H, H^{CS}), 2.39 (s, 3H, H^{Me}), 2.26 (s, 3H, H^{Me}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 165.38 (C_q, 1C, C^{Isx}), 158.83 (C_q, 1C, C^{Isx}), 157.37 (C_q, 1C, C^{Py}), 150.41 (CH, 1C, C^{Py}), 138.73 (CH, 1C, C^{Py}), 137.37 (C_q, 2C, C^{Ph}), 129.52 (CH, 2C, C^{Ph}), 129.32 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.37 (CH, 1C, C^{Py}), 116.45 (C_q, 1C, C^{Isx}), 116.42 (C_q, 1C, C^{Py}), 34.24 (CH_2, 1C, C^{CS}), 11.75 (CH_3, 1C, C^{Me}), 10.99 (CH_3, 1C, C^{Me}).

*4.1.5.4. 4'-(((5-bromopyridin-2-yl)thio)methyl)-N,N-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-amine (**4e**).* ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.52 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 7.58 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H^{Py}), 7.52 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.44 (dt, J = 8.3, 2.0 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.29 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H, H^{Ph}), 7.07 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1H, H^{Py}), 6.92 (ddd, J = 7.5, 1.9, 1.0 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.89 (dd, J = 2.4, 1.9 Hz, 1H, H^{Ph}), 6.73 (ddd, J = 8.3, 2.4, 1.0 Hz, 1H, H^{Ph}), 4.44 (s, 2H, H^{CS}), 2.99 (s, 6H, H^{Ph}).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.70 (C_q, 1C, C^{Py}), 151.08 (C_q, 1C, C^{Ph}), 150.38 (CH, 1C, C^{Py}), 141.96 (C_q, 1C, C^{Ph}), 141.39 (C_q, 1C, C^{Ph}), 138.67 (CH, 1C, C^{Py}), 136.65 (C_q, 1C, C^{Ph}), 129.55 (CH, 1C, C^{Ph}), 129.35 (CH, 2C, C^{Ph}), 127.61 (CH, 2C, C^{Ph}), 123.38 (CH, 1C, C^{Py}), 116.35 (C_q, 1C, C^{Py}), 115.87 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.80 (CH, 1C, C^{Ph}), 111.59 (CH, 1C, C^{Ph}), 40.84 (CH, 1C, C^{CS}), 34.47 (CH, 2C, C^{NMe}).

*4.1.5.5. (Z)-2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-4-((1H-indol-3-yl)methylene)-1H-imidazole-5(4H)-one (**6**).* ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.89 (t, J = 1.5 Hz, 1H, H^{NH}), 11.57 (s, 1H, H^{NH}), 9.25 (s, 1H, H^{Trz}), 8.45 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H^{Vyn}), 8.21 (s, 1H, H^{Trz}), 8.13 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.84 (dt, J = 8.5, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.73 (dt, J = 8.5, 2.3 Hz, 2H, H^{Ph}), 7.47 (dt, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.20 (ddd, J = 8.0, 7.0, 1.2 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.14 (ddd, J = 8.0, 7.0, 1.2 Hz, 1H, H^{Ind}), 7.13 (s, 1H, H^{Ind}), 4.67 (s, 2H, H^{CS}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.50 (C_q, 1C, C^{Thd}), 158.57 (C_q, 1C, C^{Thd}), 152.90 (CH, 1C, C^{Trz}), 142.77 (CH, 1C, C^{Trz}), 137.89 (C_q, 1C, C^{Ph}), 136.81 (C_q, 1C, C^{Ind}), 136.38 (C_q, 1C, C^{Ph}), 135.23 (C_q, 1C, C^{Thd}), 132.57 (CH, 1C, C^{Vyn}), 130.79 (CH, 1C, C^{Ind}), 127.22 (C_q, 1C, C^{Ind}), 122.99 (CH, 1C, C^{Ind}), 121.14 (CH, 1C, C^{Ind}), 120.04 (CH, 2C, C^{Ph}), 120.01 (CH, 2C, C^{Ph}), 116.80 (CH, 1C, C^{Ind}), 112.66 (CH, 1C, C^{Ind}), 111.57 (C_q, 1C, C^{Ind}), 33.08 (CH_2, 1C, C^{CS}).

HRMS (ESI): calcd for $C_{21}H_{16}N_6OS$ $[M + H]^+$, 400.1106; observed, 400.1106.

4.2. Biology

4.2.1. Cells and viruses

RD cells (CCL-136) were provided by ATCC. They were cultivated in DMEM Media supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin – streptomycin (PS), and 2 % non-essential amino acid. MRC-5 cells (CCL-171) were obtained from RD Biotech. They were cultivated in BME media supplemented with 10 % FBS, 1 % PS, and 1 % L-Glutamine. Both cell lines were grown at 37 °C in a 5 % CO_2 atmosphere.

EV A71 strain Laos2011 HFMD18TS (clinical strain), echovirus 30 strain UVE/E−30/2013/FR/4-MRS2013 and coxsackievirus A24 strain UVE/CV-A24/2010/LA/HFMK14St were provided through European Virus Archive – Global (respectively EVA – Global ***Ref-SKU:** 001v-EVA1553*, EVA – Global ***Ref-SKU:** 001v-EVA1517*, and EVA – Global ***Ref-SKU:** 001v-EVA1546*).

We selected these viruses to represent EV-A, EV-B, and EV-C species. EV-A and EV-B cause a variety of diseases, including hand-foot-mouth disease (HFMD) [1,36]. For instance, EVA-71, CV-A16, and E11 can be responsible for neurological symptoms, cardiopulmonary complications or acute hemorrhagic conjunctivitis in case of severe infections [37,38]. Likewise, acute flaccid paralysis, meningitis, or encephalitis can be caused by EV-B [4]. Finally, CVA24 has a variant that causes acute hemorrhagic conjunctivitis, a highly specific feature of this type of infection.

4.2.2. RNA extraction and quantification

Viral RNA was extracted from 100 µL of cell supernatant from passages P8 and P16 using a QIAamp Viral RNA kit on the automated QIAcube (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Relative quantification of viral RNA was performed using the GoTaq® 1-Step RT-qPCR System kit (Promega). The mixture contained 5 µL of 2x Master Mix, 0.25 µL of each primer (250 nM), 0.07 µL of probe (75 nM), 0.2 µL of GoScript RT Mix and 3.8 µL of extracted nucleic acids. For Enterovirus A, EV-A71F: AGATACCCACCCCCCTTACAA, EV-A71R: CACGTACGGGTGTTGCAACT, and EV-A71P FAM-CTCAACCCGGCGCC-MGB were used as primers and probes. For Enterovirus B and C, an already reported pan Enterovirus probe and primers were used [39]. Assays were performed using the QuantStudio 12 K Flex real-time PCR machine (Life technologies). Viral RNA was exposed at 50 °C for 15 min, then 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 s, then 60 °C for 30 s. Data collection took place during the 60 °C step. Synthetic RNA was used to calculate the amount of viral RNA from standard curves.

4.2.3. EC_{50} and CC_{50} determination

One day prior to infection, 50000 RD cells, or 37500000 MRC-5 cells, per well were seeded in 100 µL assay medium containing 2.5 % FBS in 96-well culture plates. After 24 h exposure, antiviral compounds were added via the D300e dispenser (TECAN) with eight ½ dilutions. Then, 50 µL/well of a virus mix diluted in the medium was added to the wells. Each well was inoculated with XXX $TCID_{50}$ of the virus. Prior to the assay, it was verified that viruses in the cell culture supernatants were harvested during the logarithmic growth phase of viral replication at 72 h postinfection [40]. On each plate, Vapendavir (Medchemexpress) was used as a positive control at the same concentrations. Four virus control wells were included within the plate. On day 3 post-infection, the supernatant was harvested, and RNA was quantified as described above. Viral inhibition VI was calculated as follows:

$$VI = 100 \times \frac{(\overline{VC} - SQ)}{\overline{VC}}$$

with $\overline{VC}$ the mean quantity of viral control and SQ the sample quantity. The 50 % effective concentrations (EC_{50} compound concentration required to inhibit viral RNA replication by 50 %) and the 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) were determined by logarithmic interpolation after performing a nonlinear regression (log(inhibitor) vs. response–variable slope (three parameters)) as previously described [41]. All data obtained were analyzed using GraphPad Prism 9 software (GraphPad software).

4.2.4. Time-of-drug addition assays

For the TOA, we used the same experimental conditions as for the EC_{50} determination with the EV-A71 strain in RD cells. We used a non-cytotoxic concentration of HR-568 (10 µM). RD cell wells were treated 1 h before infection, at the time of infection, 2 h and 4 h post-infection. The viral supernatants were collected 72 h later and processed and analyzed as described above.

4.3. Docking

Docking calculations were performed on an Intel Xeon Silver-powered machine running Ubuntu 20.04 LTS. The X-ray crystal

structure of the EV-A71 capsid protein (PDB ID: 3ZFG) was initially prepared by reconstructing the missing loops and amino acid side chains. Subsequently, hydrogen atoms were added and minimized, fixing the positions of all heavy atoms until an RMSD gradient of 0.05 kcal mol^{-1} $Å^{-1}$ was reached. The 3D structures of the compounds were protonated at physiological pH and minimized using the OPLS4 force field [42]. The Maestro suite was used for both protein and ligand preparation steps [43]. PLANTS was utilized as the docking engine with default settings [44]. The geometrical center of the co-crystallized ligand was selected as the center of the docking sphere, with a radius of 12 Å. Molecular visualization and image processing were accomplished using PyMOL [45].

4.4. Evaluation of pharmacokinetic parameters

GastroPlus™ (Version 9.9; Simulations Plus, Inc., Lancaster, California, USA) software was used with a default parameter, namely the intake of a single tablet containing 100 mg of active compound, diluted in 250 mL of water, by a man on an empty stomach.

Only the bioavailability, the absorbed fraction, the log P, the molecular weight, the permeability, and the solubility were analyzed.

5. Conclusions

To obtain a broad-spectrum inhibitor of enteroviruses, we synthesized 21 thioether derivatives by optimized strategies and high yields.

The first series, containing **AB113** analogs, was developed to understand precisely each interaction between our compounds and the hydrophobic pocket. Unfortunately, except for **HR-267**, none of the derivatives were active anymore. Docking studies could explain this loss of activity by a steric hindrance with capsid amino acids.

In a second phase, fused bicycle derivatives were synthesized to combine **AB113** global structure with hydrophobic interactions of our previous series of **AB109** analogs. This time, according to docking studies, an extension of the *toe-end* side with this type of chemical structure should have favorable interactions. Among these derivatives, **OM1260** and **HR-568** inhibit EV-A71, from EV-A species, with micromolar potency (**OM1260**: EC_{50} (MRC-5, EV-A71) = 1.15 μM; EC_{50} (RD, EV-A71) = 4.38 μM; **HR-568**: EC_{50} (MRC-5, EV-A71) = 3.25 μM; EC_{50} (RD, EV-A71) = 1.53 μM). Admittedly, both derivatives are less effective than **AB113**, but with the great advantage of a broader spectrum. Indeed, both derivatives have micromolar activity against E30 and CVA24 virus, members respectively of the EV-B and the EV-C species (**OM1260**: EC_{50} (MRC-5, E30) = 0.41 μM; EC_{50} (MRC-5, CVA24) = 1.15 μM; **HR-568**: EC_{50} (MRC-5, E30) = 0.40 μM; EC_{50} (MRC-5, CVA24) = 1.22 μM). However, **OM1260** and **HR-568** have a lower selectivity index (SI between 7.1 and 17) than **AB113**. These could be an effect of the fused bicycles that are known to insert between the nucleic acid of DNA [46]. Works about substitutions to reduce cytotoxicity must be led, even if any aneugenic or clastogenic toxicity has been observed.

Eventually, these promising compounds possess sufficient bioavailability and associated permeability but poor solubility (<1 mg/L). A study about increasing solubility without reducing the activity has to be performed to come back to more favorable parameters.

CRediT authorship contribution statement

Hugo Roux: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Franck Touret:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Data curation. **Antonio Coluccia:** Writing – original draft, Methodology, Data curation. **Pietro Scio:** Software, Data curation. **Hawa Sophia Bouzidi:** Data curation. **Carole di Giorgio:** Data curation. **Florence Gattacceca:** Software. **Omar Khoumeri:** Data curation. **Romano Silvestri:** Supervision, Software. **Patrice Vanelle:** Writing – review & editing, Supervision. **Manon Roche:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Associated content

(Word Style "TE_Supporting_Information"). Supporting Information. A brief statement in nonsentence format listing the contents of material supplied as Supporting Information should be included, ending with "This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org." For instructions on what should be included in the Supporting Information as well as how to prepare this material for publication, refer to the journal's Instructions for Authors.

Funding sources

The authors declare no competing funding source.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Aix Marseille Université (AMU) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. H. Roux thanks the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche for his Ph.D. Grant. We thank Dr. Vincent Remusat for NMR analyses and Spectropole (Fédération des Sciences Chimiques de Marseille) for mass spectrometry, and complementary NMR analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117395.

Abbreviations

Multiplicity of NMR peak: d = doublet; dd = doublet of doublets; dt = doublet of triplets; ddd = doublet of doublet of doublets; m = multiplet; qd = quartet of doublets; t = triplet; td = triplet of doublets; s = singlet.

Chemical structures: Bzn, benzofurane; Idz, indazole; Ind, indole; Isq, isoquinoline; Nph, naphthalene; *N*-BzPrz, benzylpyrazole; *N*-MePrz, methylpyrazole; Ph, phenyl; Prz, pirazole; Py, pyridine; Thd, thiohydanthoin; Trz, triazole; 3-*N*dMeAni, 3-dimethylaniline; 4-*N*dMAni, 4-dimethylaniline; 3,5-dMeIsx, dimethylisoxazole.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

[1] D.M. Brown, Y. Zhang, R.H. Scheuermann, Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses, Microorganisms 8 (12) (2020) 1856, https://doi.org/10.3390/microorganisms8121856.
[2] T. Solomon, P. Lewthwaite, D. Perera, M.J. Cardosa, P. McMinn, M.H. Ooi, Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71, Lancet Infect. Dis. 10 (11) (2010) 778–790, https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70194-8.
[3] D. Antona, M. Kossorotoff, I. Schuffenecker, A. Mirand, M. Leruez-Ville, C. Bassi, M. Aubart, F. Moulin, D. Lévy-Bruhl, C. Henquell, B. Lina, I. Desguerre, Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016, Euro Surveill. 21 (46) (2016) 30402, https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402.
[4] A. Fall, S. Kenmoe, J.T. Ebogo-Belobo, D.S. Mbaga, A. Bowo-Ngandji, J.R. Foe-Essomba, S. Tchatchouang, M. Amougou Atsama, J.F. Yéngué, R. Kenfack-Momo, A.F. Feudjio, A.D. Nka, C.A. Mbongue Mikangue, J.B. Taya-Fokou, J. N. Magoudjou-Pekam, E.A. Noura, C. Zemnou-Tepap, D. Meta-Djomsi, M. Maïdadi-

Foudi, G.I. Kame-Ngasse, I. Nyebe, L.G. Djukouo, L. Kengne Gounmadje, D. Tchami Ngongang, M.G. Oyono, C.P. Demeni Emoh, H.R. Tazokong, G. Mahamat, C. Kengne-Ndé, S.A. Sadeuh-Mba, N. Dia, G. La Rosa, L. Ndip, R. Njouom, Global prevalence and case fatality rate of Enterovirus D68 infections, a systematic review and meta-analysis, PLoS Neglected Trop. Dis. 16 (2) (2022) e0010073, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010073.

[5] K.S. Benschop, J. Albert, A. Anton, C. Andrés, M. Aranzamendi, B. Armannsdóttir, J.L. Bailly, F. Baldanti, G.E. Baldvinsdóttir, S. Beard, N. Berginc, S. Böttcher, S. Blomqvist, L. Bubba, C. Calvo, M. Cabrerizo, A. Cavallero, C. Celma, F. Ceriotti, I. Costa, S. Cottrell, M. Del Cuerpo, J. Dean, J.L. Dembinski, S. Diedrich, J. Diez-Domingo, D. Dorenberg, E. Duizer, R. Dyrdak, D. Fanti, A. Farkas, S. Feeney, J. Flipse, C. De Gascun, C. Galli, I. Georgieva, L. Gifford, R. Guiomar, M. Hönemann, N. Ikonen, M. Jeannoël, L. Josset, K. Keeren, F.X. López-Labrador, M. Maier, J. McKenna, A. Meijer, B. Mengual-Chuliá, S.E. Midgley, A. Mirand, M. Montes, C. Moore, U. Morley, J.L. Murk, L. Nikolaeva-Glomb, S. Numanovic, M. Oggioni, P. Palminha, E. Pariani, L. Pellegrinelli, A. Piralla, C. Pietsch, L. Piñeiro, N. Rabella, P. Rainetova, S.C. Uceda Renteria, M.P. Romero, M. Reynders, L. Roorda, C. Savolainen-Kopra, I. Schuffenecker, A. Soynova, C. M. Swanink, T. Ursic, J.J. Verweij, J. Vila, T. Vuorinen, P. Simmonds, T.K. Fischer, H. Harvala, Re-emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19 lockdown, September 2021, Euro Surveill. 26 (45) (2021) 2100998, https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2100998.

[6] E.L. Forero, M. Knoester, L. Gard, A. Ott, A.H. Brandenburg, M.B.B. McCall, H.G. M. Niesters, C. Van Leer-Buter, Changes in enterovirus epidemiology after easing of lockdown measures, J. Clin. Virol. 169 (2023) 105617, https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105617.

[7] H. Roux, F. Touret, A. Coluccia, O. Khoumeri, C. Di Giorgio, C. Majdi, P. Sciò, R. Silvestri, P. Vanelle, M. Roche, New potent EV-A71 antivirals targeting capsid, Eur. J. Med. Chem. 276 (2024) 116658, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116658.

[8] M. Roche, C. Lacroix, O. Khoumeri, D. Franco, J. Neyts, T. Terme, P. Leyssen, P. Vanelle, Synthesis, biological activity and structure-activity relationship of 4,5-dimethoxybenzene derivatives inhibitor of rhinovirus 14 infection, Eur. J. Med. Chem. 76 (2014) 445–459, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.034.

[9] C. Lacroix, J. Querol-Audí, M. Roche, D. Franco, M. Froeyen, P. Guerra, T. Terme, P. Vanelle, N. Verdaguer, J. Neyts, P. Leyssen, A novel benzonitrile analogue inhibits rhinovirus replication, J. Antimicrob. Chemother. 69 (10) (2014) 2723–2732, https://doi.org/10.1093/jac/dku200.

[10] L. Da Costa, E. Scheers, A. Coluccia, A. Rosetti, M. Roche, J. Neyts, T. Terme, R. Cirilli, C. Mirabelli, R. Silvestri, P. Vanelle, Heterocyclic pharmacochemistry of new rhinovirus antiviral agents: a combined computational and experimental study, Eur. J. Med. Chem. 140 (2017) 528–541, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.036.

[11] L. Da Costa, E. Scheers, A. Coluccia, A. Casulli, M. Roche, C. Di Giorgio, J. Neyts, T. Terme, R. Cirilli, G. La Regina, R. Silvestri, C. Mirabelli, P. Vanelle, Structure-Based drug design of potent pyrazole derivatives against rhinovirus replication, J. Med. Chem. 61 (18) (2018) 8402–8416, https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00931.

[12] L. Da Costa, M. Roche, E. Scheers, A. Coluccia, J. Neyts, T. Terme, P. Leyssen, R. Silvestri, P. Vanelle, VP1 crystal structure-guided exploration and optimization of 4,5-dimethoxybenzene-based inhibitors of rhinovirus 14 infection, Eur. J. Med. Chem. 115 (2016) 453–462, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.049.

[13] C. Tammaro, M. Guida, F. Appetecchia, M. Biava, S. Consalvi, G. Poce, Direct-acting antivirals and host-targeting approaches against enterovirus B infections: recent advances, Pharmaceuticals 16 (2) (2023) 203, https://doi.org/10.3390/ph16020203.

[14] J. Wang, Y. Hu, M. Zheng, Enterovirus A71 antivirals: past, present, and future, Acta Pharm. Sin. B 12 (4) (2022) 1542–1566, https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.017.

[15] Y. Hu, R. Musharrafieh, M. Zheng, J. Wang, Enterovirus D68 antivirals: past, present, and future, ACS Infect. Dis. 6 (7) (2020) 1572–1586, https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00120.

[16] J.Y. Lin, Y.A. Kung, S.R. Shih, Antivirals and vaccines for enterovirus A71, J. Biomed. Sci. 26 (1) (2019) 65, https://doi.org/10.1186/s12929-019-0560-7.

[17] S. Akkoç, Importance of some factors on the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction, J. Chin. Chem. Soc. 68 (6) (2021) 942–951, https://doi.org/10.1002/jccs.202000351.

[18] F. Touret, C. Baronti, O. Goethals, M. Van Loock, X. de Lamballerie, G. Querat, Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery, Antivir. Res. 168 (2019) 109–113, https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.005.

[19] F. Touret, C. Baronti, O. Goethals, M. Van Loock, X. de Lamballerie, G. Querat, Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery, Antivir. Res. 168 (2019) 109–113, https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.005.

[20] A. Tijsma, D. Franco, S. Tucker, R. Hilgenfeld, M. Froeyen, P. Leyssen, J. Neyts, The capsid binder Vapendavir and the novel protease inhibitor SG85 inhibit enterovirus 71 replication, Antimicrob. Agents Chemother. 58 (11) (2014) 6990–6992, https://doi.org/10.1128/AAC.03328-14.

[21] Y. Liu, Z. Zhang, X. Zhao, R. Yu, X. Zhang, S. Wu, J. Liu, X. Chi, X. Song, L. Fu, Y. Yu, L. Hou, W. Chen, Enterovirus 71 inhibits cellular type I interferon signaling by downregulating JAK1 protein expression, Viral Immunol. 27 (6) (2014) 267–276, https://doi.org/10.1089/vim.2013.0127.

[22] J.R. Wang, H.P. Tsai, S.W. Huang, P.H. Kuo, D. Kiang, C.C. Liu, Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001, J. Clin. Microbiol. 40 (12) (2002) 4439–4444, https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4439-4444.2002.

[23] K.C. Tsao, C.G. Huang, Y.L. Huang, F.C. Chen, P.N. Huang, Y.C. Huang, T.Y. Lin, S. R. Shih, S.C. Chang, Epidemiologic features and virus isolation of enteroviruses in Northern Taiwan during 2000-2008, J. Virol Methods 165 (2) (2010) 330–332, https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.001.

[24] OCDE, Test No. 487: *in Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, first ed., OCDE, Paris, 2010 https://doi.org/10.1787/9789264091016-en.

[25] K. Kobayashi, S. Koike, Adaptation and virulence of enterovirus-A71, Viruses 13 (8) (2021) 1661, https://doi.org/10.3390/v13081661.

[26] S. Tao, K. Zandi, L. Bassit, Y.T. Ong, K. Verma, P. Liu, J.A. Downs-Bowen, T. McBrayer, J.C. LeCher, J.J. Kohler, P.R. Tedbury, B. Kim, F. Amblard, S. G. Sarafianos, R.F. Schinazi, Comparison of anti-SARS-CoV-2 activity and intracellular metabolism of remdesivir and its parent nucleoside, Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov. 2 (2021) 100045, https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100045. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34870151; PMCID: PMC8357487.

[27] C.Q. Sacramento, G.R. de Melo, C.S. de Freitas, N. Rocha, L.V. Hoelz, M. Miranda, N. Fintelman-Rodrigues, A. Marttorelli, A.C. Ferreira, G. Barbosa-Lima, J. L. Abrantes, Y.R. Vieira, M.M. Bastos, E. de Mello Volotão, E.P. Nunes, D. A. Tschoeke, L. Leomil, E.C. Loiola, P. Trindade, S.K. Rehen, F.A. Bozza, P.T. Bozza, N. Boechat, F.L. Thompson, A.M. de Filippis, K. Brüning, T.M. Souza, The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication, Sci. Rep. 7 (2017 Jan 18) 40920, https://doi.org/10.1038/srep40920. Erratum in: Sci Rep. 2017 Apr 24;7:46772. doi: 10.1038/srep46772. PMID: 28098253; PMCID: PMC5241873.

[28] S. Tao, K. Zandi, L. Bassit, Y.T. Ong, K. Verma, P. Liu, J.A. Downs-Bowen, T. McBrayer, J.C. LeCher, J.J. Kohler, P.R. Tedbury, B. Kim, F. Amblard, S. G. Sarafianos, R.F. Schinazi, Comparison of anti-SARS-CoV-2 activity and intracellular metabolism of remdesivir and its parent nucleoside, Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov. 2 (2021) 100045, https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100045. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34870151; PMCID: PMC8357487.

[29] a) C.Q. Sacramento, G.R. de Melo, C.S. de Freitas, N. Rocha, L.V. Hoelz, M. Miranda, N. Fintelman-Rodrigues, A. Marttorelli, A.C. Ferreira, G. Barbosa-Lima, J.L. Abrantes, Y.R. Vieira, M.M. Bastos, E. de Mello Volotão, E.P. Nunes, D. A. Tschoeke, L. Leomil, E.C. Loiola, P. Trindade, S.K. Rehen, F.A. Bozza, P.T. Bozza, N. Boechat, F.L. Thompson, A.M. de Filippis, K. Brüning, T.M. Souza, The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication, Sci. Rep. 7 (2017 Jan 18) 40920, https://doi.org/10.1038/srep40920. Erratum in: Sci Rep. 2017 Apr 24;7:46772. doi: 10.1038/srep46772. PMID: 28098253; PMCID: PMC5241873; b) D.R. Owen, C.M.N. Allerton, A.S. Anderson, L. Aschenbrenner, M. Avery, S. Berritt, B. Boras, R.D. Cardin, A. Carlo, K.J. Coffman, A. Dantonio, L. Di, H. Eng, R. Ferre, K.S. Gajiwala, S.A. Gibson, S.E. Greasley, B.L. Hurst, E.P. Kadar, A. S. Kalgutkar, J.C. Lee, J. Lee, W. Liu, S.W. Mason, S. Noell, J.J. Novak, R.S. Obach, K. Ogilvie, N.C. Patel, M. Pettersson, D.K. Rai, M.R. Reese, M.F. Sammons, J. G. Sathish, R.S.P. Singh, C.M. Steppan, A.E. Stewart, J.B. Tuttle, L. Updyke, P. R. Verhoest, L. Wei, Q. Yang, Y. Zhu, An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19, Science 374 (6575) (2021 Dec 24) 1586–1593, https://doi.org/10.1126/science.abl4784. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34726479.

[30] M.S. Oberste, S. Peñaranda, K. Maher, M.A. Pallansch, Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A, J. Gen. Virol. 85 (Pt 6) (2004) 1597–1607, https://doi.org/10.1099/vir.0.79789-0.

[31] M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch, Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes, J. Virol. 78 (2) (2004) 855–867, https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.855-867.2004.

[32] R.M. Ledford, N.R. Patel, T.M. Demenczuk, A. Watanyar, T. Herbertz, M.S. Collett, D.C. Pevear, P1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds, J. Virol. 78 (7) (2004) 3663–3674, https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3663-3674.2004.

[33] Y.L. Huang, T.M. Lin, S.Y. Wang, J.R. Wang, The role of conserved arginine and proline residues in enterovirus VP1 protein, J. Microbiol. Immunol. Infect. 55 (4) (2022) 590–597, https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.01.004.

[34] J. Lu, Y.Q. He, L.N. Yi, H. Zan, H.F. Kung, M.L. He, Viral kinetics of enterovirus 71 in human abdomyosarcoma cells, World J. Gastroenterol. 17 (36) (2011) 4135–4142, https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i36.4135.

[35] W.T. Jackson, T.H. Giddings Jr., M.P. Taylor, S. Mulinyawe, M. Rabinovitch, R. R. Kopito, K. Kirkegaard, PLoS Biol. 3 (5) (2005) e156, https://doi.org/10.1371/journal.pbio.00156.

[36] J.C. Haston, T.C. Dixon, Nonpolio enterovirus infections in neonates, Pediatr. Ann. 44 (5) (2015) e103–e107, https://doi.org/10.3928/00904481-20150512-09.

[37] L. Sun, A. Tijsma, C. Mirabelli, J. Baggen, M. Wahedi, D. Franco, A. De Palma, P. Leyssen, E. Verbeken, F.J.M. van Kuppeveld, J. Neyts, H.J. Thibaut, Intra-host emergence of an enterovirus A71 variant with enhanced PSGL1 usage and neurovirulence, Emerg. Microb. Infect. 8 (1) (2019) 1076–1085, https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1644142.

[38] P.G. Higgins, Enteroviral conjunctivitis and its neurological complications, Arch. Virol. 73 (2) (1982) 91–101, https://doi.org/10.1007/BF01314718.

[39] T. Watkins-Riedel, M. Woegerbauer, D. Hollemann, P. Hufnagl, Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 42 (2) (2002) 99–105, https://doi.org/10.1016/s0732-8893(01)00330-3.

[40] F. Touret, C. Baronti, O. Goethals, M. Van Loock, X. de Lamballerie, G. Querat, Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery, Antivir. Res. 168 (2019) 109–113, https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.005.

[41] C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi, W. Chen, L. Wang, W. Damm, G.A. Ross, M.K. Dahlgren, E. Russell, C.D. Von Bargen, R. Abel, R.A. Friesner, E.D. Harder, OPLS4: improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space, J. Chem. Theor. Comput. 17 (7) (2021) 4291–4300, https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00302.
[42] Schrödinger Release 2024-2, Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024.
[43] O. Korb, T. Stützle, T.E. Exner, Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS, J. Chem. Inf. Model. 49 (1) (2009) 84–96, https://doi.org/10.1021/ci800298z.
[44] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
[45] Sechi, M.; Derudas, M.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Cosseddu, A.; Paglietti, G. DNA Binders:.
[46] Evaluation of DNA-interactive ability, design, and synthesis of novel intercalating agents, Lett. Drug Des. Discov. 6 (1) (2009) 56–62, https://doi.org/10.2174/157018009787158472.

Conclusion.

Dans ces deux publications, nous avons pu synthétiser 51 molécules en modulant soit le cycle A ou le cycle D. Quatre composés intéressants se sont révélés actifs de l'ordre du micromolaire contre EV-A71 sur deux lignées cellulaires, MRC-5 et RD.

Parmi ces composés, **OM1260** et **HR-568** ont aussi eu une activité de l'ordre du micromolaire contre E30 et CVA24 sur la lignée cellulaire MRC-5. Nous avons donc démontré une activité à large spectre en inhibant des virus provenant de 3 espèces d'entérovirus. L'application à d'autres types de virus est encouragée, compte tenu de l'analogie de structure de la cible entre certaines espèces. Elle reste cependant à vérifier en effectuant d'autres essais, ainsi que de nouveaux essais ciblant les rhinovirus.

Le mécanisme d'action **d'OM1260** et de **HR-568** a été validé, à l'image des essais mécanistiques des premiers travaux sur les rhinovirus, comme se produisant durant les étapes d'entrée du virus. Une possible action en fin de cycle de réplication pourrait être aussi avancée.

Certaines molécules aux structures similaires n'ont pas présenté d'activité contre EV-A71. Une hypothèse pour expliquer ces écarts vient des différences avec les solubilités prédites. En effet, le composé **5h**, associant un naphtalène (cycle A) et un phényl (cycle B), serait trop peu soluble et précipiterait dans le milieu lors de l'évaluation. Au contraire, **5g**, associant une isoquinoline (cycle A) et une pyridine (cycle B), aurait des pharmacophores trop polaires du côté *toe-end* pour pouvoir se lier avec la poche hydrophobe de la capside ciblée.

Notre objectif de recherche d'inhibiteur pouvant avoir une activité à large spectre contre les Entérovirus semble donc avoir été atteint.

Chapitre V : Étude des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques

Le **Chapitre V** sera divisé en six parties. En dehors des données d'efficacité et de toxicité, les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés les plus prometteurs sont essentiels pour se projeter vers leur formulation galénique, vers leur administration *per os* ou pour anticiper le devenir du composé dans l'organisme. Au vu du pouvoir pathogène des virus et de la file active de patient·es ciblé·es, la voie orale est la plus adaptée.

Dans une première partie, nous introduirons les différentes connaissances théoriques associées aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques évalués dans ce projet de thèse, avec un focus sur les paramètres d'absorption et de métabolisation.

Dans une seconde partie, nous décrirons les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques *in silico* de chaque composé synthétisé et évalué biologiquement. Cette évaluation a été effectué grâce aux logiciels GastroPlus™ et ADMET_Predictor™. Afin d'ajuster le modèle et comparer les résultats indiqués par ce logiciel, nous comparerons ceux obtenus pour nos composés les plus intéressants avec les résultats donnés par les sites en ligne
SwissADME et l'algorithme FAFDrugs4.1.

La troisième partie sera consacrée au développement de tests *in vitro* afin de valider expérimentalement les prédictions *in silico* de la seconde partie. Pour cela, nous avons considéré la perméabilité et la solubilité comme paramètres importants dans notre étude. Les évaluations s'appuient sur un dosage par détection UV-visible. Des cellules Caco-2 sont utilisées comme modèle de la barrière intestinale lors des mesures de perméabilité.

La quatrième partie nous présentera une méthode de génération de composés *de novo* assistée par intelligence artificielle. A partir des données obtenues par la modélisation des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques d'une chimiothèque que nous avons construite, nous avons pu isoler les structures chimiques les plus favorables pour obtenir des paramètres optimisés. Enfin, à partir de ces fragments, des molécules sont générées en fonction de différents critères, portant sur leur cytotoxicité, leur facilité de synthèse et leur ressemblance à nos composés initiaux.

La cinquième partie détaillera les différentes synthèses de sels et d'ester de phosphate menées afin d'augmenter la solubilité de nos composés. Après les avoir identifiés, leur activité a été évaluée afin de lier nos hypothèses de travail sur les relations entre pharmacocinétique et activité antivirale.

Une dernière partie présentera les perspectives à court terme afin de terminer les différentes évaluations engagées dans ce projet de thèse.

A. Absorption, distribution, métabolisme, élimination : aspects théoriques.

Dans cette partie, nous aborderons le contexte théorique associé à l'évaluation des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés. Il permet d'évaluer les différentes phases du devenir d'un médicament dans l'organisme : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME) de nos composés. Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous intéresserons principalement à leur absorption et à leur métabolisme afin de caractériser leur biodisponibilité par voie orale.

1) Absorption des médicaments par voie orale.

Présentation du concept d'absorption.

L'absorption est le passage d'un médicament du site d'administration vers la circulation générale. Il est donc nécessaire de considérer la résorption au niveau de la muqueuse gastrointestinale et les effets du premier passage intestinal et hépatique.

Différents types de paramètres sont à prendre en compte dans cette évaluation, à savoir l'impact des propriétés du principe actif en lui-même, de la formulation pharmaceutique (non traitée dans ce projet de thèse) et la variabilité due à la physiologie du tractus gastro-intestinal.[569]

Impact de la nature du principe actif.

Dans notre cas, nous considérerons que l'impact de la nature du médicament est principalement régi par la perméabilité des membranes au principe actif et sa solubilité, paramètres à la base de la classification BCS. Cette dernière est un indicateur de la biodisponibilité de médicaments basé sur ces deux paramètres. En effet, Amidon *et al.* ont déduit la capacité d'absorption d'un composé à l'analyse unique de sa perméabilité aux membranes et sa solubilité.[570] Pour avoir une bonne solubilité, il faut que la dose maximale à recevoir soit soluble dans 250 mL de solution aqueuse.[571]

---

[569] Baklouti, S. *Utilisation de la pharmacocinétique de population pour l'individualisation des schémas posologiques*. Université de Toulouse. Thèse soutenue le 9 octobre 2023.

[570] Amidon, G.L.; Lennernäs, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. *Pharm. Res*. **1995**, 12 (3), 413-420. DOI: 10.1023/a:1016212804288.

[571] Batchelor, H.; European Paediatric Formulation Initiative (EUPFI). *Int. J. Pharm*. **2014**, *469* (2), 251-253. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.02.046.

Variabilité due à la physiologie du tractus gastro-intestinal.

La physiologie du tractus gastro-intestinal est aussi un facteur jouant sur l'absorption des composés.[553] La vitesse de vidange gastrique va jouer sur le temps d'exposition aux muqueuses intestinales et donc sur la possibilité d'absorption des principes actifs. Le pH intestinal détermine la part ionisée de la molécule d'intérêt et donc sa solubilité. Or, les molécules ne peuvent être absorbées que si elles sont dissoutes et non chargées. La prise alimentaire modifie aussi l'absorption des médicaments. Enfin, des phénomènes d'inhibition ou d'induction du métabolisme intestinal influencent la fraction de médicament susceptible de traverser la barrière intestinale.

Quantification de l'absorption d'un composé.

La fraction de la dose atteignant la circulation sanguine générale, appelée coefficient de biodisponibilité (F), est évaluée à partir de « l'aire sous la courbe (AUC) » des concentrations sanguines ou plasmatiques en fonction du temps (C=f(t))[572], en faisant le rapport entre l'AUC après administration orale et l'AUC après administration intraveineuse, pour une même dose. Le coefficient de biodisponibilité est le produit de la fraction de la dose ayant passé la barrière des entérocytes, avant métabolisation intestinale ou hépatique, nommée fraction absorbée (Fa) et de la fraction ayant échappé au métabolisme intestinal et hépatique. La biodisponibilité inclue également la vitesse de l'absorption, caractérisée par la concentration maximale (C_{max}) ainsi que le temps correspondant (T_{max}) de la courbe C=f(t).[573,574]

---

[572] Marzo, A.; Monti, N.C.; Vuksic, D. *Eur. J. Clin Pharmacol*. **1999**, 55 (9), 627-631. DOI: 10.1007/s002280050684.

[573] Bois, F.Y.; Tozer, T.N.; Hauck, W.W.; Chen, M.L.; Patnaik, R.; Williams, R.L. *Pharm. Res*. **1994**, *11* (7), 966974. DOI: 10.1023/a:1018970901116.

[574] Chen, M.L.; Lesko, L.; Williams, R.L. *Clin. Pharmacokinet*. **2001**, *40* (8),565-572. DOI: 10.2165/00003088200140080-00001.

Présentation de la prédiction informatique de l'absorption.

Afin d'accélérer et d'optimiser la découverte et le développement de nouveaux médicaments, et de réduire le recours à l'expérimentation animale, plusieurs modèles prédictifs de l'absorption des médicaments ont été développés. Ce type de modèle existe depuis les années 90, mais nous présenterons uniquement les modèles les plus récents, par souci de synthèse.[575]

Le premier fut le modèle d'absorption et de transit compartimental (ATC). Il a été développé pour des médicaments très solubles et non dégradables (stables d'un point de vue chimique et enzymatique) en prenant en compte l'absorption passive à travers la muqueuse intestinale, une dissolution instantanée et des cinétiques de transfert linéaires.[576]

En incluant le premier passage hépatique et l'absorption au niveau du colon, un second modèle, celui d'absorption et de transit compartimental avancé (ATCA), a été développé [**Schéma 24**].[577] C'est celui-ci qui est repris par le logiciel GastroPlus™, utilisé dans ce projet de thèse afin de prédire les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques d'absorption de nos composés. Ce modèle intègre des paramètres physico-chimiques, tels que le pKa, la solubilité et la taille des particules, des paramètres physiologiques, comme la vitesse de vidange gastrique et de transit intestinal, et paramètres de mode d'administration, parmi lesquels la dose administrée et le type de formulation. Lorsque l'on regarde la concentration solubilisée dans le tractus gastro-intestinal, seule la partie non-ionisée est à considérer comme pouvant être absorbée.[578]

Un autre modèle développé par Grass se construit autour des flux intestinaux (vidange et transit) à travers la solubilité, la perméabilité des molécules ainsi que la surface d'échange disponible.[579] Malgré le fait qu'il ait été développé pour une prédiction de la biodisponibilité chez l'animal, le modèle d'absorption du transit gastro-intestinal (ATGI) a été appliqué pour des administrations chez

---

[575] Strand, S.E.; Zanzonico, P.; Johnson, T.K. *Med. Phys*. **1993**, *20* (2 Pt 2), 515-527. DOI: 10.1118/1.597047.

[576] Yu, L.X.; Lipka, E.; Crison, J.R.; Amidon, G.L. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **1996**, *19* (3), 359-376. DOI: 10.1016/0169-409x(96)00009-9.

[577] Agoram, B.; Woltosz, W.S.; Bolger, M.B. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **2001**, *50* (Suppl 1), S41-S67. DOI: 10.1016/s0169409x(01)00179-x.

[578] Al Za'abi, M.; Lanner, A.; Xiaonian, X.; Donovan, T.; Charles, B. *Ther. Drug Monit*. **2006**, *28* (6), 793-799. DOI: 10.1097/01.ftd.0000249948.95749.f3.

[579] Grass, G.M. *Pharm. Res*. **2003**, *20*, 1595–1599. DOI: 10.1023/A:1026183200740.

l'être humain.[580] Il prend en compte le fait que la vitesse de transit dans chaque compartiment peut varier, du fait de leur nature ou de celle de la molécule ingérée.

Enfin, le modèle de données d'analyse (MDA) est une adaptation du modèle ATCA prenant aussi en compte la dégradation des composés, notamment par la formation de métabolites dans le tractus intestinal, et les transports actifs.[581]

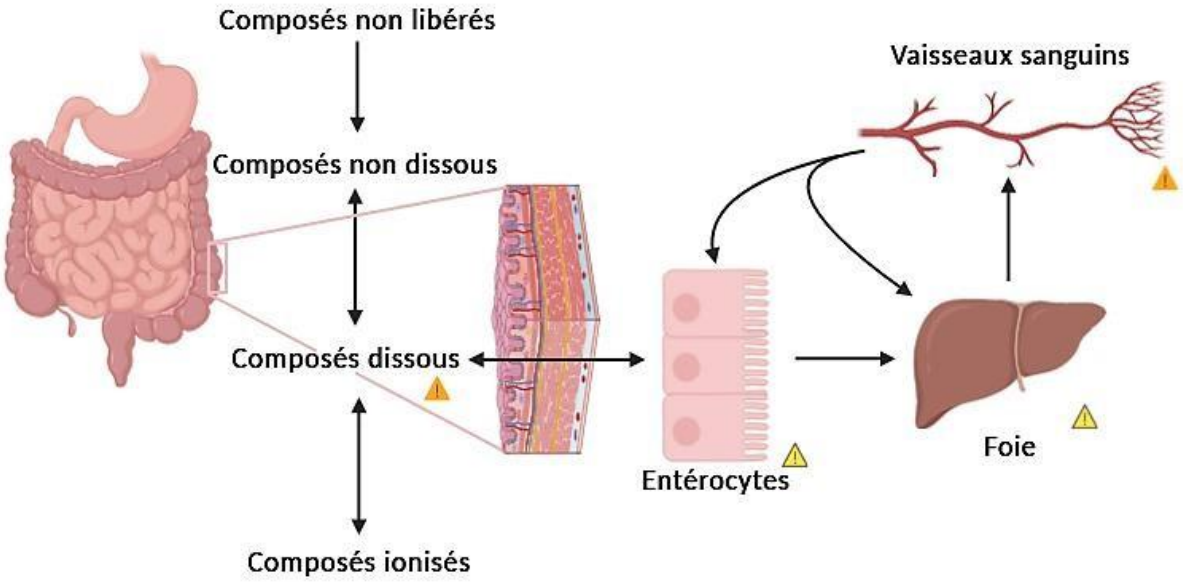


Schéma 24. Représentation du modèle d'absorption et de transit compartimental avancé (ATCA). Adapté de la référence 561. Les signes d'attention en orange symbolisent une potentielle dégradation physico-chimique (pour les composés dissous) ou une excrétion par le rein (vaisseaux sanguins). Les signes d'attention en jaunes symbolisent un potentiel métabolisme intestinal (entérocytes) ou hépatique (foie).

[580] Sawamoto, T.; Haruta, S.; Kurosaki, Y.; Higaki, K.; Kimura, T. *J. Pharm. Pharmacol*. **1997**, *49* (4), 450-457. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06823.x.

[581] Dokoumetzidis, A.; Kalantzi, L.; Fotaki, N. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol*. **2007**, *3* (4), 491-505. DOI: 10.1517/17425225.3.4.491.

2) Distribution des médicaments.

La distribution des médicaments se caractérise par leur transfert dans la circulation générale. Son évaluation *in vivo* reste difficile à ce jour. Deux types de paramètres sont essentiels pour la déterminer : ceux propres au principe actif et ceux des tissus infectés.[553]

Paramètres propres aux médicaments.

Différents paramètres physico-chimiques du composé étudié peuvent influencer sa distribution. Les principaux facteurs sont ses propriétés acido-basiques, son affinité avec les protéines plasmatiques ou tissulaires ainsi que sa diffusion dans les cellules sanguines.

Paramètres dépendant des tissus infectés.

Les Entérovirus peuvent se développer dans différents types de tissus, induisant des pathologies différentes. Le caractère hydrophile ou lipophile du tissu, l'épaisseur de sa membrane, son volume ainsi que son imperméabilité aux principes actifs influent sur la distribution de ces derniers. Le débit sanguin est aussi un autre facteur de la distribution. Ce débit, la présence ou la mutation de certains transporteurs sont aussi dépendants de la variabilité inter-individuelle.

3) Métabolisme des médicaments.

Le métabolisme correspond aux modifications chimiques, souvent oxydantes, des molécules dans l'organisme. Les métabolites obtenus seront généralement plus polaires, et donc plus facilement excrétés par voie rénale. [582] Ici, ils peuvent avoir un effet non souhaitable, en augmentant leur élimination, ou bénéfique, dans le cas de pro-médicaments. Les enzymes de métabolisation les plus importantes sont les cytochromes P450 (CYP450), composés principalement d'oxydases, de réductases et d'hydrolases. Le système hépatique est le premier lieu de ces transformations se produisant dans le foie. Trois phases principales de métabolisation ont été identifiées.[583]

Première phase du métabolisme.

La première phase active principalement les CYP450 de la barrière hépatique. Les réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de déalkylation d'hétéroatomes et de déamination sont les plus courantes.[584] Les réductases ciblent, quant à elles, plutôt les fonctions chimiques possédant un atome d'azote oxydé (nitro, nitroso, azoture…). Les composés qui inhibent ces enzymes permettent la synthèse de substrats endogènes, qui en trop grand nombre peuvent devenir toxiques.[584]

Deuxième phase du métabolisme.

Durant la deuxième phase, les métabolites sont conjugués avec des entités hydrophiles endogènes. Ils subissent le plus souvent une glucurono-conjugaison (addition d'acide glucuronique).[585] Ces conjugués peuvent être ainsi plus hydrophiles et prêts à être excrétés. La sulfonation d'alcools et d'amines, l'acétylation d'amines, la formation de ponts disulfures, la méthylation de thiopurines, de noyaux catéchols sont aussi possibles.[584] Ces transformations sont résumées dans la **Figure 34**.

---

[582] Ionescu, C.; Caira, M.R. ***Drug metabolism: current concepts***. Springer. Dordrecht, Netherlands. **2005**. DOI: 10.1007/1-4020-4142-X.

[583] Almazroo, O.A.; Kowser Miah, M.; Venkataramanan, R. *Clin. Liver. Dis*. **2017**, *21*, 1–20. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.

[584] Tischer; S.: Fontana; R.J. *J. Hepatol*. **2014**, *60* (4), 872–884. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.11.013.

[585] Wang, Q.; Jia, R..; Ye, C.; Garcia, M.; Li, J.; Hidalgo, IJ. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*. **2005**, *41* (3-4), 97-103. DOI: 10.1290/0501005.1.

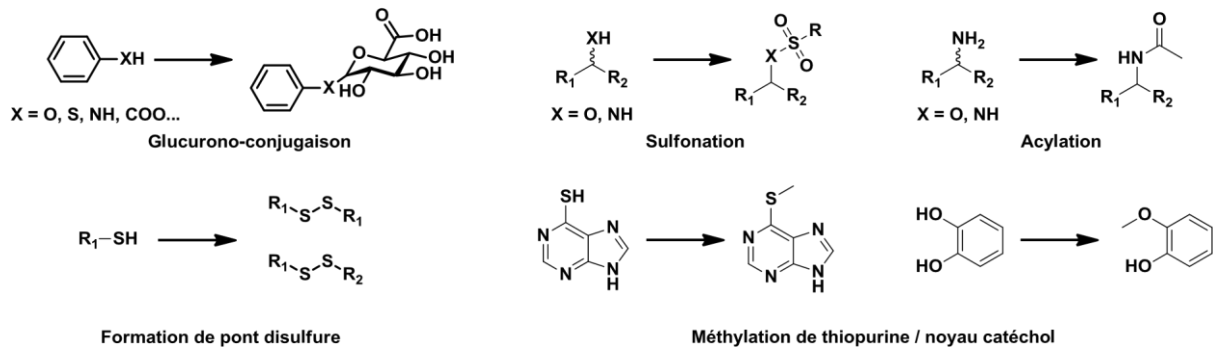


Figure 34. Conjugaisons les plus fréquentes durant la deuxième phase de métabolisation hépatique.

Troisième phase du métabolisme.

Différents transports interviennent dans la dernière phase de métabolisation hépatique afin d'excréter les conjugués formés. Outre les enzymes spécifiquement conçues pour la métabolisation, certaines enzymes ont pour fonction secondaire de participer à cette phase.[586] Même si la métabolisation des médicaments aboutit souvent à une réduction de leur activité, elle peut aussi former des espèces plus actives dans le cas des pro-drogues.

[586] Jeffery, C.J. *Trends Biochem. Sci*. **1999**, *24* (1), P8-P11. DOI: 10.1016/S0968-0004(98)01335-8.

4) Élimination des médicaments.

L'élimination des composés, sous forme active ou inactive, se fait généralement par voie rénale. Elle implique trois mécanismes : la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire.[553]

Filtration glomérulaire.

La filtration glomérulaire concerne uniquement les principes actifs hydrophiles, neutres avec un poids inférieur à 68 kDa. Elle n'affecte donc pas les molécules liées aux protéines plasmatiques. Le principal facteur influençant la filtration glomérulaire, physiologique ou pathologique, est son débit. Souvent, elle est suffisante pour éliminer toutes les molécules étrangères.

Sécrétion tubulaire.

La sécrétion tubulaire permet d'excréter les composés ionisés en dehors du corps. Différents transporteurs non-sélectifs sont impliqués dans cette étape. Ce mécanisme peut être saturé, du fait de la multiplicité de différents médicaments, impliquant diverses interactions médicamenteuses.

Réabsorption tubulaire.

La réabsorption tubulaire s'effectue de manière passive ou active selon la concentration des principes actifs. Elle concerne les molécules assez lipophiles pour pouvoir traverser les membranes des cellules tubulaires, et donc non-ionisées. Le pH et la diurèse urinaire sont les autres facteurs qui influencent cette voie d'excrétion.

B. Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques *in silico* des inhibiteurs prometteurs.

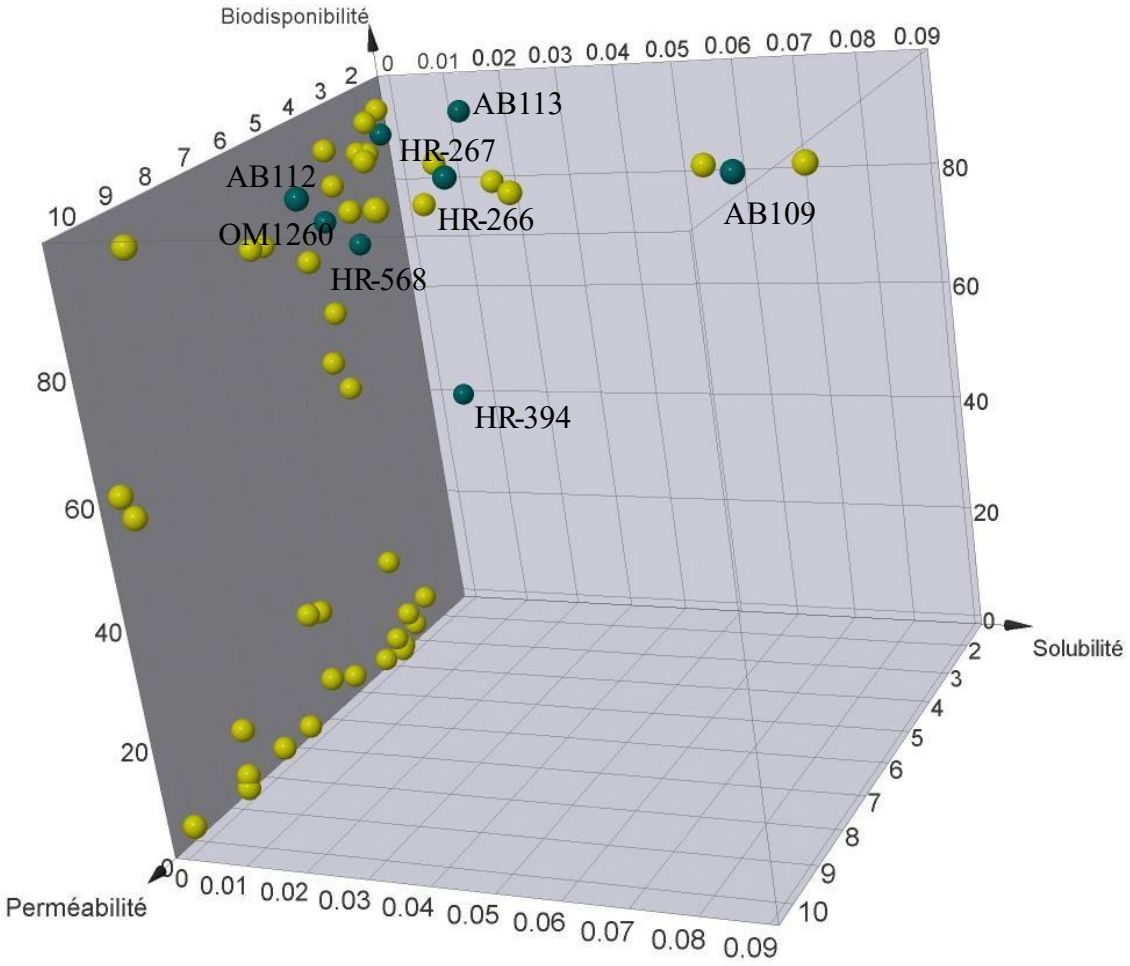
Comme présenté dans les **Chapitres III** et **IV**, lors de la sélection des pharmacophores pour moduler les différentes extrémités de nos composés, nous avons pris en compte les interactions possibles avec la capside par de la modélisation. Cependant, nous avons aussi tenu compte des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques dans le choix de nos pharmacomodulations. C'est pourquoi, afin d'avoir un spectre d'analyse complet des composés envisagés, nous avons systématiquement évalué leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques grâce au logiciel GastroPlus™ (version 9.9). Comme nous l'avons observé précédemment, nos composés ciblent une poche hydrophobe. Cependant, ils doivent être assez solubles pour assurer une bonne biodisponibilité en plus d'une forte activité. Un enjeu est donc d'évaluer les conditions les plus optimales afin d'avoir à la fois une activité antivirale et des propriétés favorables à l'absorption des composés.

Afin d'anticiper les données de métabolisme, nous avons réalisé la prédiction de métabolites possibles de nos différents composés les plus prometteurs grâce au logiciel ADMET_Predictor 12.0™. L'enjeu est, ici, de déterminer les potentielles modifications structurelles effectuées par les enzymes, une fois le composé absorbé.

1) Résultats et discussion.

Prédictions des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques par GastroPlus™.

Nous nous sommes intéressés à six paramètres liés à l'absorption : la masse molaire, la solubilité, le log P, la perméabilité, la fraction absorbée et la biodisponibilité. Les paramètres variaient fortement en fonction des structures des composés. Nous nous sommes concentrés sur la biodisponibilité des molécules synthétisées en fonction de leur solubilité et leur perméabilité, mais aussi leur fraction absorbée (avant passage hépatique), leur masse molaire et leur log P [**Graphique 2**, **Tableau 14**].



Graphique 2. Biodisponibilité (%) des composés évalués pour leur efficacité contre EV-A71, en fonction de leur solubilité (g/L) et leur perméabilité (cm/s × 10^{-4}). Ces paramètres *in silico* ont été calculés grâce au logiciel GastroPlus™. Les composés les plus prometteurs sont identifiables en vert foncé.

Tableau 14. Comparaison de 6 paramètres liés à l'absorption pour les composés actifs, évalués *in silico* grâce au logiciel GastroPlus™.

Molécule	Fraction absorbée	Biodisponibilité	Masse Molaire	Perméabilité	log P	Solubilité
AB113	99,99 %	94,79 %	374,5 g/mol	23,4 mm/s	3,64	18,1 mg/L
AB112	98,51 %	93,85 %	347,4 g/mol	69,9 mm/s	3,84	15,6 mg/L
AB109	99,99 %	91,05 %	338,4 g/mol	51,9 mm/s	3,37	74,9 mg/L
HR-266	99,68 %	92,02 %	322,4 g/mol	54,1 mm/s	3,68	31,0 mg/L
HR-568	75,89 %	73,97 %	394,5 g/mol	30,8 mm/s	5,19	0,8 mg/L
OM1260	83,23 %	80,95 %	394,5 g/mol	39,9 mm/s	5,28	0,7 mg/L
HR-394	42,38 %	40,14 %	400,5 g/mol	14,0 mm/s	2,86	5,5 mg/L
HR-267	99,15 %	91,08 %	400,5 g/mol	23,1 mm/s	3,44	3,3 mg/L
Quartile 1	6,99 %	6,57 %	372,2 g/mol	36,5 mm/s	3,74	0,1 mg/L
Moyenne	60,97 %	56,43 %	391,9 g/mol	51,2 mm/s	4,83	10,2 mg/L
Médiane	83,49 %	78,80 %	392,5 g/mol	45,0 mm/s	4,65	1,3 mg/L
Quartile 3	99,80 %	90,76 %	426,6 g/mol	60,6 mm/s	5,80	12,0 mg/L
Vapendavir	100%	92,41%	382,5 g/mol	67,6 mm/s	4,00	10,0 mg/L

Afin d'avoir une meilleure appréhension de nos données, nous avons aussi calculé la moyenne, la médiane, les quartiles 1 et 3 de nos composés tout en les comparant à notre molécule de référence le **Vapendavir**.

En examinant les différentes biodisponibilité, perméabilité et solubilité des composés synthétisés pour ce projet de thèse, certaines tendances peuvent être identifiées, dégageant des relations entre la structure des composés et leurs propriétés.

Ainsi, la plupart des composés de la série phényle ont une biodisponibilité prédite qui est proche de zéro, qui peut s'expliquer par la prédiction d'une très faible solubilité, là où les autres séries (pyridine et bicycles fusionnés) ont de meilleures solubilité et biodisponibilité. La seule molécule de la série phényle ayant une bonne biodisponibilité et une bonne solubilité prédite est **AB112** avec un pyrazole (très polaire) comme pharmacophore côté *toe-end*.

Les composés ayant une activité sur une ou deux lignées cellulaires (en vert foncé sur le **Graphique 2**) ont pour la plus grande majorité une grande biodisponibilité. Les trois composés les plus prometteurs (**AB113**, **OM1260**, **HR-568**) ont, par exemple, une biodisponibilité supérieure à 70% malgré une perméabilité inférieure à la moyenne. Cependant, alors qu'**AB113** possède des paramètres prédits proches du **vapendavir**, sa perméabilité prédite et son log P sont plus faibles. Le composé **AB112**, malgré sa plus faible activité, possède des propriétés proches du **vapendavir**. Les inhibiteurs à large spectre, **OM1260** et **HR568**, se situent dans le second quartile. La présence de

cinq hétérocycles aromatiques sans substitution polaire pour **OM1260** et **HR568** serait un paramètre moins favorable pour une absorption par voie orale.
Afin d'augmenter la solubilité de ces derniers sans diminuer leur activité, la formation d'un sel par réaction avec un acide (acide carbonique, chlorhydrique, lactique, phosphorique…) ou la synthèse de pro-drogues plus hydrophiles peuvent être envisagées. Elles seront évoquées dans la partie E.

Comparaison de la solubilité, la perméabilité et la biodisponibilité des composés les plus prometteurs.

Sans remettre en cause la fiabilité des résultats de GastroPlus™, et pour avoir d'autres sources de comparaison, nous avons décidé d'évaluer la solubilité, le log P ainsi que la biodisponibilité de nos composés, à l'aide d'outils s'appuyant sur d'autres modèles de prédiction. En effet, aucun modèle ne doit être pris en compte comme vérité absolue. En utilisant plusieurs logiciels, nous pourrons confirmer la robustesse des différents résultats ainsi que ceux les plus variables à déterminer expérimentalement en priorité.

Afin de comparer les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés, nous avons ensuite évalué avec deux autres modèles de prédiction, en regardant leur solubilité, leur log P et leur biodisponibilité [**Tableau 15**].

Tandis que les valeurs de log P ou de biodisponibilité sont cohérentes entre elles, les valeurs de solubilité entre les différents programmes utilisés sont très différentes et ne peuvent pas être comparées dans leur valeur absolue. *A contrario*, les tendances observées sont les mêmes, à savoir une prédiction plus élevée pour la solubilité d'**AB113** et un log P associé plus faible, par comparaison aux deux autres composés, **OM1260** et **HR-568** qui ont des paramètres proches quel que soit le logiciel utilisé.

Tableau 15. Comparaison de la solubilité, la perméabilité et la biodisponibilité des composés les plus prometteurs, évalués *in silico* grâce au logiciel GastroPlus™, au site internet SwissADME et au FAFDrugs4.1.

Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétique		GastroPlus™	SwissADME	FAFDrugs4.1	Moyenne
AB113	*Solubilité (mg/L)*	18,1	7,33	4,31	9,91
	log P	3,64	3,49	3,67	3,60
	Biodisponibilité (%)	95	/	Good	/
OM1260	*Solubilité (mg/L)*	0,698	0,302	1,13	0,71
	log P	5,28	4,75	5,43	5,15
	Biodisponibilité (%)	81	/	Good	/
HR-5-068	*Solubilité (mg/L)*	0,794	0,195	0,938	0,64
	log P	5,19	4,83	5,63	5,22
	Biodisponibilité (%)	74	/	Good	/

Métabolites potentiels de nos composés les plus prometteurs.

Les principales réactions de métabolisation prédites étaient l'oxydation de l'alcool benzylique d'**AB113** ou du linker, ainsi que des hétérocycles aromatiques présents dans les composés prometteurs [**Figure 35**].

L'oxydation du linker se fait par oxydation de la fonction thioéther en sulfoxyde ou l'addition d'un alcool secondaire, en mélange racémique, sur le carbone en α. De même, l'alcool d'**AB113** peut être oxydé en aldéhyde. Enfin, les hétérocycles aromatiques peuvent être oxydés respectivement en 1,2-dihydro-*3H*-1,2,4-triazol-3-one, 2-pyridinone et en isoquinolin-1(*2H*)one.

Comme précisé dans la partie A de ce chapitre, les réactions de métabolisation sont souvent des réactions d'oxydation, d'hydrolyse ou de conjugaison. Ici, les réactions prédites sont exclusivement des oxydations.

Les efficacités des principaux métabolites n'ont pas été évaluées sur les lignées cellulaires décrites précédemment, excepté le métabolite aldéhyde du composé **AB113**. Ce dernier a eu une perte d'activité, alors qu'**AB113** a un effet antiviral, avec une CE_{50} de plus de 40 µM.

La synthèse et l'évaluation de certains métabolites seront abordées dans le chapitre **Perspectives et Conclusion Générale**.

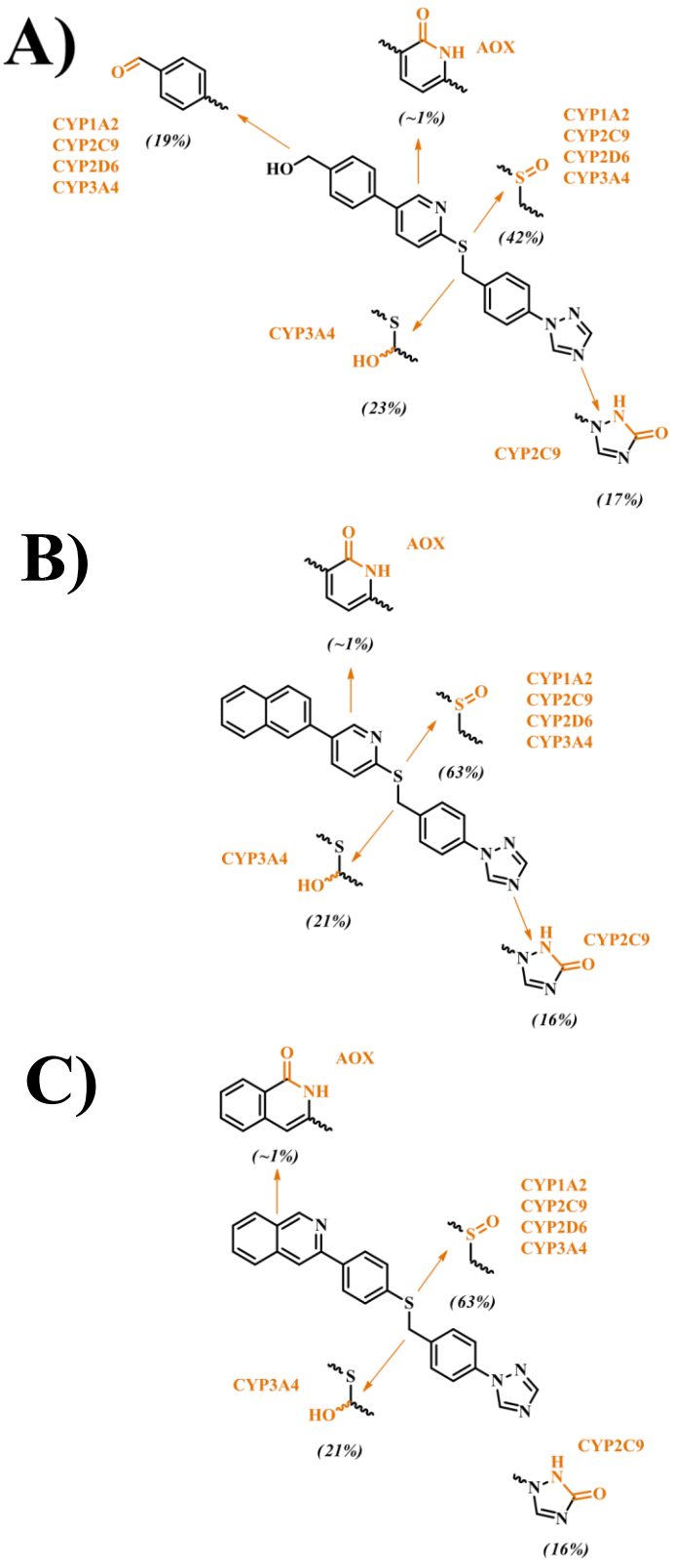


Figure 35. Structure des potentiels métabolites des 3 composés les plus prometteurs selon ADMET Predictor™. A) AB113. B) HR-568. C) OM1260.

2) Méthodes utilisées.

Prédiction des propriétés physico-chimiques et paramètres pharmacocinétiques.

Suite au choix des différents pharmacophores pour moduler les côtés *pore* et *toe-end* de nos composés, nous avons prédit avec GastroPlus™ (version 9.9) les propriétés physico-chimiques des molécules à synthétiser, ainsi que leurs paramètres pharmacocinétiques. Les paramètres étudiés sont ceux prédits pour la prise d'un comprimé unique contenant 100 mg de principe actif, avec 250 mL d'eau, pour un homme à jeun.

Comparaison des modèles de GastroPlus™, SwissADME et FAFDrugs 4.1.

Nous avons prédit, quand cela était possible, ces paramètres grâce au site SwissADME[†] et au logiciel en ligne FAFDrugs4.1.[‡] Les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques sont générés à partir des structures des composés à évaluer sous format .sdf comme pour GastroPlus™. Même si les modèles *in silico* de prédiction sont différents, cela permettra de voir les tendances selon différentes méthodes de calcul.

Prédictions de métabolites.

Enfin, grâce au logiciel ADMET_Predictor 12.0™, nous avons pu prédire les potentiels métabolites des composés les plus prometteurs identifiés dans le **Chapitre IV**.

[†] Swiss Institue of Bioinformatics. Lien. (consulté le 25 septembre 2024).

[‡] Ressource Parisienne de BioInformatique Structurale. Lien. (consulté le 25 septembre 2024).

C. Mesures *in vitro* de paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques.

Les différents paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques prédits dans la partie précédente permettent d'évaluer la possible drugabilité des composés que nous avons synthétisés. Cependant, les modèles informatiques doivent être vérifiés par des mesures *in vitro* ou *in vivo*. Afin d'affiner le modèle, par incrémentation des résultats expérimentaux, nous avons donc souhaité réaliser nos propres mesures *in vitro* de la perméabilité des cellules aux composés que nous avions synthétisés ainsi que leur solubilité. Dans un premier temps, nous avons concentré nos efforts sur la mise en place d'une méthode efficace pour ces différentes évaluations. Nous présenterons donc ici les différentes stratégies ayant mené au développement d'une technique assurant cohérence et exactitude des mesures pour nos composés. Ces corrections du modèle permettront par la suite d'avoir un algorithme robuste afin de générer par la suite des composés ayant des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés. La méthode pour atteindre cet objectif sera décrite dans la partie D.

1) Résultats et discussion.

Mesure de la perméabilité.

Le passage de la barrière intestinale peut être modélisé *in vitro* grâce aux cellules Caco-2. Cela permet rapidement de simuler le passage de candidats médicaments.

Cette expérimentation permettra d'émettre des hypothèses sur les méthodes et voies de passage de la barrière intestinale, et donc des mécanismes de transport. De plus, elle permettra de mesurer une perméabilité apparente (P_{app}).

Tests in vitro sur cellule Caco-2.

Afin d'évaluer la perméabilité *in vitro* du composé **AB113**, sept séries de tests ont été réalisées sur les cellules Caco-2. Si des tests préliminaires avaient été réalisés et analysés en spectrophotométrie UV, nous présenterons ici les résultats des essais de dosage par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV-DAD.

Lors de l'ajout du milieu contenant **AB113** dans l'insert, la solubilité du composé est évaluée visuellement. Les solutions mère ou intermédiaire sont troubles, ce qui révèle un manque de solubilité, d'où la nécessité d'agiter en vortex puis plonger dans un bain à ultrasons ces

concentrations. Les solutions mises en contact avec les cellules étaient, quant à elles, limpides à l'œil nu.

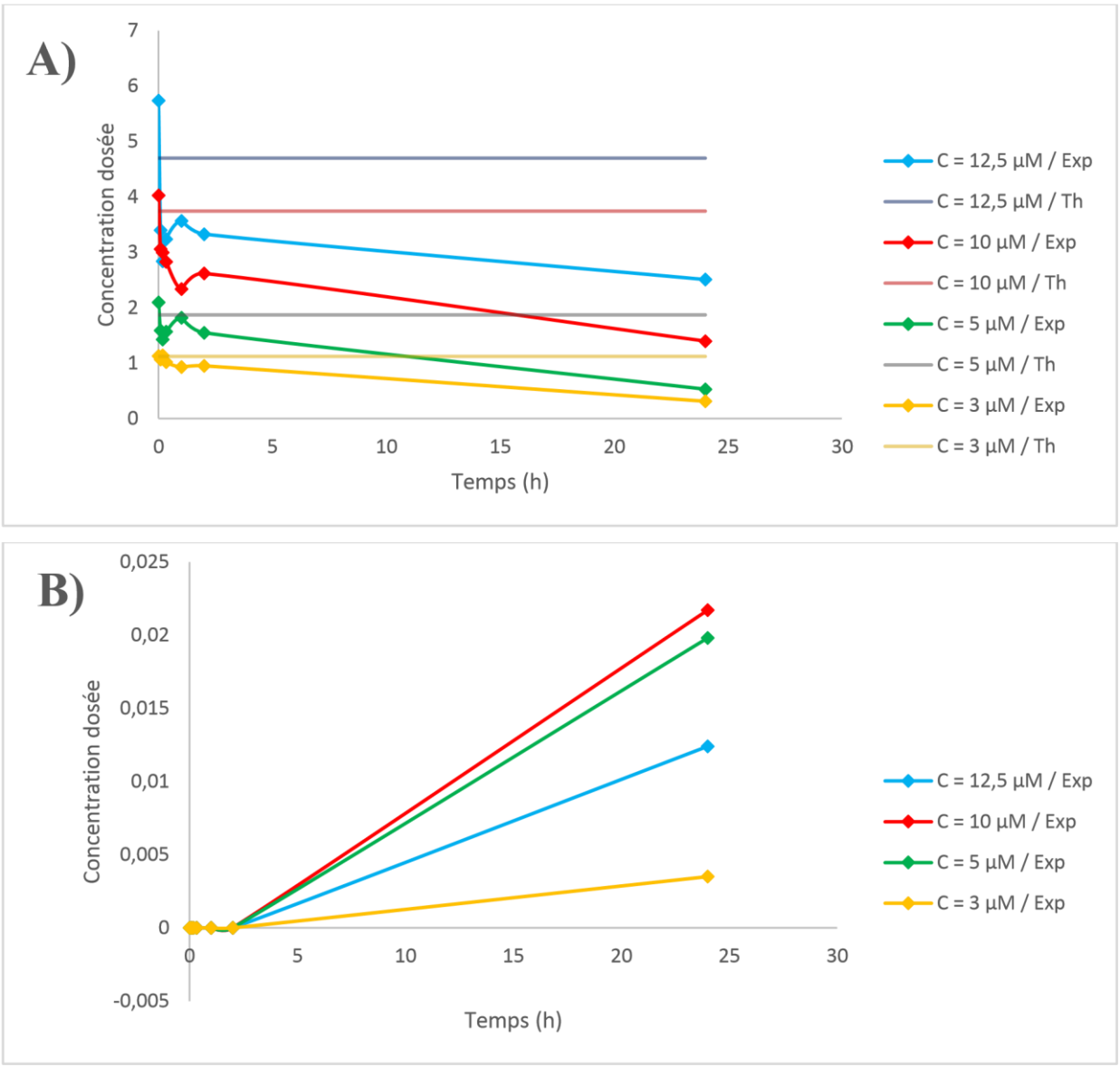
Afin de régler ces problématiques de solubilité, nous dosons systématiquement les concentrations de la dilution intermédiaire et celles des solutions filles, afin de connaître exactement la concentration insérée dans l'insert. A cause de la précipitation, elles sont toutes inférieures à celle prévue. Cependant, puisque nous les dosons, cet écart n'engendre pas de problème d'exactitude dans nos résultats.

Une autre problématique, visible aussi, a été l'observation de décollement de cellules de la membrane séparant les deux compartiments. Dans ce cas-là, les mesures associées n'ont pas été prises en compte.

Dosage par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV-DAD.

Les concentrations d'**AB113** ont été évaluées pour sept concentrations théoriques différentes (3, 5, 10, 12,5, 25, 50, 100 µM). Le dosage des solutions avant injection dans l'insert supérieur révèle d'autres concentrations effectives [**Graphique 3**]. Les dosages des différentes expériences ont été menés sur des intervalles de temps prévus : 5, 10, 20 min et 1, 2 et 24 heures. Dans un premier temps, nous avons réalisé plusieurs expériences grâce à un spectrophotomètre UV-Visible. Les concentrations mesurées étaient trop élevées par rapport à celles attendues, avec un chevauchement de spectres entre colorant du milieu, notre composé à évaluer ainsi que d'autres molécules du milieu en solution.

Nous avons donc par la suite utilisé la chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV-DAD. Les problématiques de chevauchement de spectre, entre colorant et espèce à étudier n'étaient plus présentes, grâce à des temps de rétention différents. De plus, la présence de témoins a permis d'améliorer l'identification du pic lié à **AB113** et les pics secondaires.



Graphique 3. Évolution des concentrations d'AB113 (de 3 µM à 12,5 µM) des différents compartiments selon leur position, à différentes concentrations initiales et en fonction du temps. A) Dans le puits (compartiment supérieur). B) Dans l'insert (compartiment inférieur).

Les variations observées durant les premières heures ne sont que minimes et ne sont pas à considérer comme significatives [**Graphique 3**]. En effet, la tendance à la diminution de la concentration d'**AB113** dans l'insert n'est confirmée qu'après 24h, même si certaines concentrations initiales montrent dès les premières heures une baisse d'absorbance non significative. La somme des concentrations dosées de l'insert et du puit n'est pas égale à la concentration de la solution mise à t = 0 au sein de l'insert. Plusieurs hypothèses peuvent justifier cela. Le composé peut ne pas être complètement soluble et précipiter dans le milieu, ce qui expliquerait la différence des

concentrations d'**AB113** initiale et additionnée. Une autre explication serait la rétention au sein des cellules Caco-2 de notre composé. Il y aurait donc une concentration moins élevée libre en solution que ce soit dans l'insert ou dans le puit. Enfin, une dernière possibilité serait une dégradation du fait de sa solubilisation en milieu aqueux ou par l'action du métabolisme de ces mêmes cellules sur notre composé. Cela est probable puisque pour les mesures faites à 24h, un nouveau pic avec un temps de rétention supérieur à celui d'**AB113** est apparu lors du passage en chromatographie liquide à haute performance.

Mesure de la solubilité.

Afin de pouvoir vérifier la solubilité de nos composés et de pouvoir expliquer ou réfuter la différence de concentration expliquée dans le paragraphe précédent, nous avons décidé de mettre un œuvre un protocole de mesure expérimentale de la solubilité de nos composés. Nous avons choisi de vérifier la solubilité d'**AB113**, étant l'inhibiteur prometteur avec la solubilité prédite la plus élevée. De plus, il a été prouvé dans la littérature que les sels ont une meilleure solubilité que leurs équivalents non chargés.[587] C'est pourquoi, nous étudierons conjointement le sel hydrochloré d'**AB113** (**composé 5**), afin de confirmer cette hypothèse pour nos substrats tétracycliques. Deux milieux ont été testés, lors de la mesure d'absorbance UV-visible de ces composés, à savoir, un milieu constitué d'eau distillée et un autre composé d'un tampon à pH 1-2.

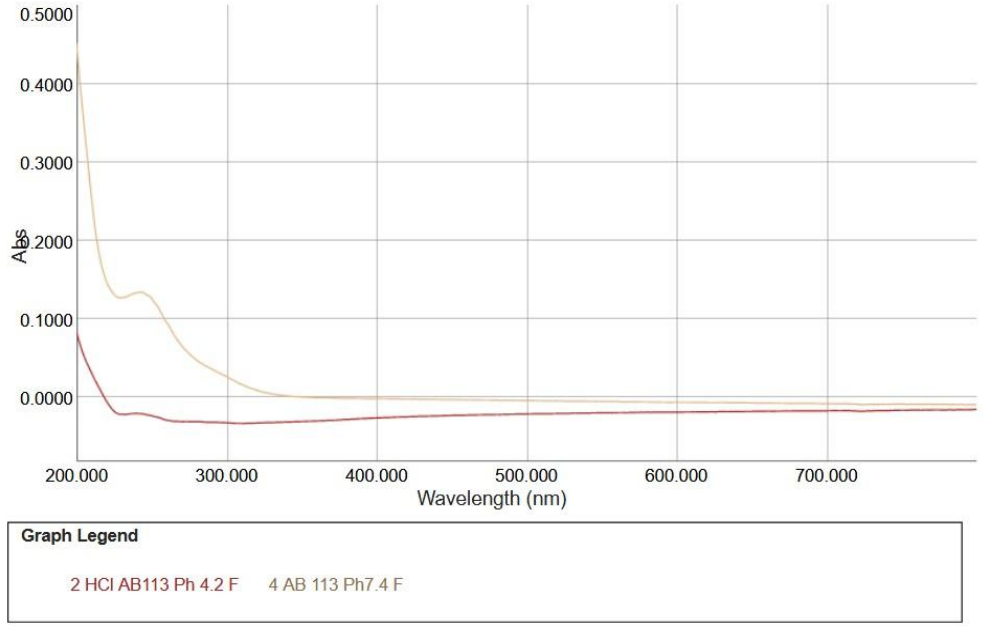
Les spectres d'absorbance, obtenus par simple dilution dans de l'eau, présentent un pic unique d'absorbance à 245 nm pour les deux composés [**Graphique 4A)**]. Au contraire, à pH 1-2, alors que le sel hydrochloré ne présente qu'un pic à la même longueur d'onde, le substrat neutre possède aussi un second pic vers 334 nm [**Graphique 4B)**]. Les absorbances associées sont présentées dans le **Tableau 16**.

Durant la filtration effectuée lors de la dilution, certaines molécules ont été retenues, ce qui implique une saturation du milieu aqueux par **AB113** et **AB113·HCl**. Nous ne pouvons donc pas calculer les coefficients d'extinction molaire de ces molécules dans les deux milieux.

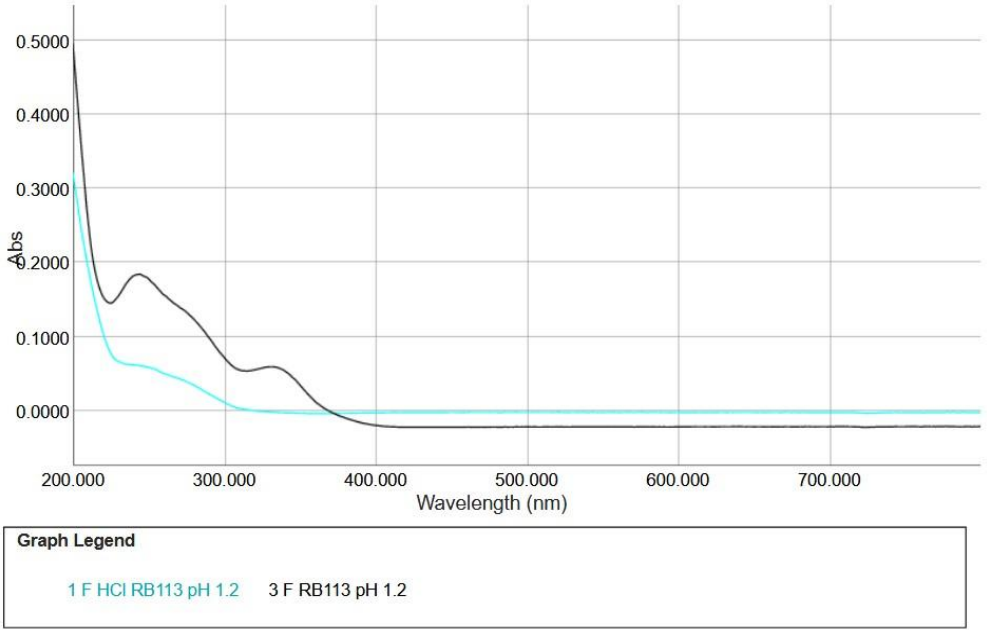
Les mesures effectuées à pH faible révèlent une plus grande absorbance avec l'apparition d'un pic secondaire à 334 nm pour **AB113**.

[587] Serajuddin, A.T. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **2007**, *59* (7), 603-616. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.010.

A)



B)



Graphique 4. Spectres à différents pH du composé AB113 et de son dérivé hydrochloré. A) Dilués dans l'eau : AB113 (en doré), AB113·HCl (en rouge). B) Dilués dans le tampon pH 1-2 : AB113 (en cyan), AB113·HCl (en noir).

Tableau 16. Absorbance mesurée pour les pics à 245 nm et 334 nm de chaque molécule.

Composé	Longueur d'onde	Absorbance (eau)	Absorbance (tampon pH 1-2)
AB113	245 nm	1,3	1,9
	334 nm	/	0,7
AB113·HCl	245nm	0,2	0,6

2) Méthodes.

Culture des cellules.

Les essais *in vitro* sont menés sur des cellules Caco-2. L'ensemencement de 60.000 cellules s'effectue dans une atmosphère humide, à 5% de dioxyde de carbone (CO_2), à 37 °C, dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) avec différents additifs (8,9% de sérum fœtal, 0,9% de pénicilline, 0,9 % de streptomycine et 0,1% de kanamycine). Le milieu de culture est changé deux à trois fois par semaine.

Préparation des solutions filles comportant le composé à étudier.

Une solution de composé à étudier à 50 mM dans le DMSO est préparée comme solution mère. Une dilution dans du milieu RPMI simple est réalisée pour avoir une concentration de 500 µM à 1% de DMSO (10 µL prélevés à la micropipette de solution mère dans une fiole jaugée de 10 mL). Afin de solubiliser au maximum la solution mère, elle est agitée en vortex puis plongée dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes à une fréquence ultrasonique de 37 kHz. Cette solution intermédiaire sert de deuxième solution mère pour obtenir les concentrations finales. Les dilutions finales (3 / 5 / 10 / 12,5 / 25 / 50 / 100 µM) sont faites afin d'obtenir un mélange de 0,2% de DMSO (au maximum) dans du milieu RPMI sans rouge de phénol à pH 6,5. Chacune des solutions filles est agitée en vortex puis plongée dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes à une fréquence ultrasonique de 37 kHz afin d'assurer la meilleure dilution du composé à étudier.

Simulation du passage de la barrière intestinale.

Afin de simuler le passage de la barrière intestinale, le milieu de culture est pipeté en dehors des différents compartiments. Il est remplacé par des milieux simulant le côté luminal (pôle apical, en haut nommé insert) et le côté vaisseau (pôle basolatéral, en bas nommé puits). L'insert et le puits contiennent du milieu RPMI sans rouge de phénol à des pH respectifs de 6,5 et 7,4. Le composé à étudier est dilué à une concentration connue, uniquement dans l'insert.

Après un temps défini (5, 10, 20 min et 1, 2, 24 heures), les milieux de l'insert et du puits de 1 mL sont prélevés pour être ensuite analysés.

Les milieux sont stockés à 8 °C avant dosage, étanchéifiés avec du parafilm.

Dosage par chromatographie liquide à haute performance.

Les dosages du composé étudié dans le milieu de culture ont été réalisés par une méthode de chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV-DAD au Biogénopole (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille) sur la chaine LC-1290 Bio (Agilent). La séparation est effectuée avec une colonne Acquity Prism HSS T3 (1,8µ × 2,1 mm × 100mm ; Waters) avec un gradient composé d'une phase aqueuse (eau Milli-Q® à 0.1%
d'acide formique) et organique (acétonitrile à 0.1% d'acide formique) à un débit de 0.4 mL/min. La détection est fixée à 274 nm.

La limite de quantification validée était de 0.1 µg/mL. La zone de linéarité était comprise entre 0.1 et 10 µg/mL dans le milieu de culture.

Une prise d'essai de 100 µL d'échantillon est mise en solution dans 100 µL d'eau Milli-Q® auquel est ajouté 20 µL d'étalon interne (méthyl-indinavir à 20 ng/µL). Les échantillons sont ensuite agités en vortex pendant 1 minute puis transférés dans des microvials et 20 µL de prise d'essai est injectée pour analyse. L'analyse concomitante d'échantillons contrôles dans le milieu de culture, non-chargés (blancs) et surchargés à différentes concentrations d'**AB113** a permis de vérifier la sélectivité de la méthode.

Calcul de la perméabilité apparente à partir des évaluations *in vitro*.

A partir du dosage des différentes concentrations contenues dans l'insert et le puit après un temps d'incubation donné, il est possible de calculer une perméabilité apparente P_{app} propre au composé dosé :[588]

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

avec $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ la quantité de composé au fil du temps, A l'aire de la surface occupée par les cellules Caco-2, et C_0 la concentration initiale introduite dans l'insert.

[588] Almeida, A.S.; Silva, B.; Remião, F.; Fernandes, C. *Int. J. Mol. Sci*. **2023**, 24 (3), 2680. DOI: 10.3390/ijms24032680.

Mesure de l'absorbance d'AB113 et de son sel hydrochloré.

Tout d'abord, une courbe d'étalonnage est réalisée afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire ε du composé à étudier, en restant dans une fenêtre de concentration respectant la loi de Beer-Lambert. Cette dernière relie l'absorbance A d'une solution avec sa concentration [X] selon la relation :

$$A = \varepsilon \times l \times [X]$$

avec l la longueur de la cuve utilisée par la mesure.

Les spectres sont réalisés avec une concentration donnée de notre composé dans différentes solutions. On considère que l'ensemble des solutions est saturé à cette concentration. Une première mesure s'effectue dans de l'eau distillée, à un pH de 7 pour **AB113** et de 4,2 pour sa version hydrochlorée. La seconde mesure s'effectue dans un tampon de pH 1-2.
Une masse précise de composé est mesurée puis diluée dans 10 mL de solution [**Tableau 17**].
Le pH est aussi mesuré. Le mélange est agité avec un barreau aimanté afin d'assurer la bonne solubilisation de notre composé. Un prélèvement de 5 mL de solution est ensuite réalisé avec des filtres de diamètre 0,45 µM. Chaque échantillon est centrifugé à une vitesse de 7.000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Enfin, une cuve en quartz de 1 cm est utilisée afin d'effectuer la mesure entre 200 et 800 nm à température ambiante dans un spectrophotomètre CARY 3500 (Agilent).

Tableau 17. Masses pesées et concentrations molaires pour les différentes solutions.

Composé	Masse (eau)	Concentration (eau)	Masse (pH 1-2)	Concentration (pH 1-2)
AB113	3,2 mg	0,86 mM	3,3 mg	0,88 mM
AB113·HCl	3,1 mg	0.76 mM	2,4 mg	0.59 mM

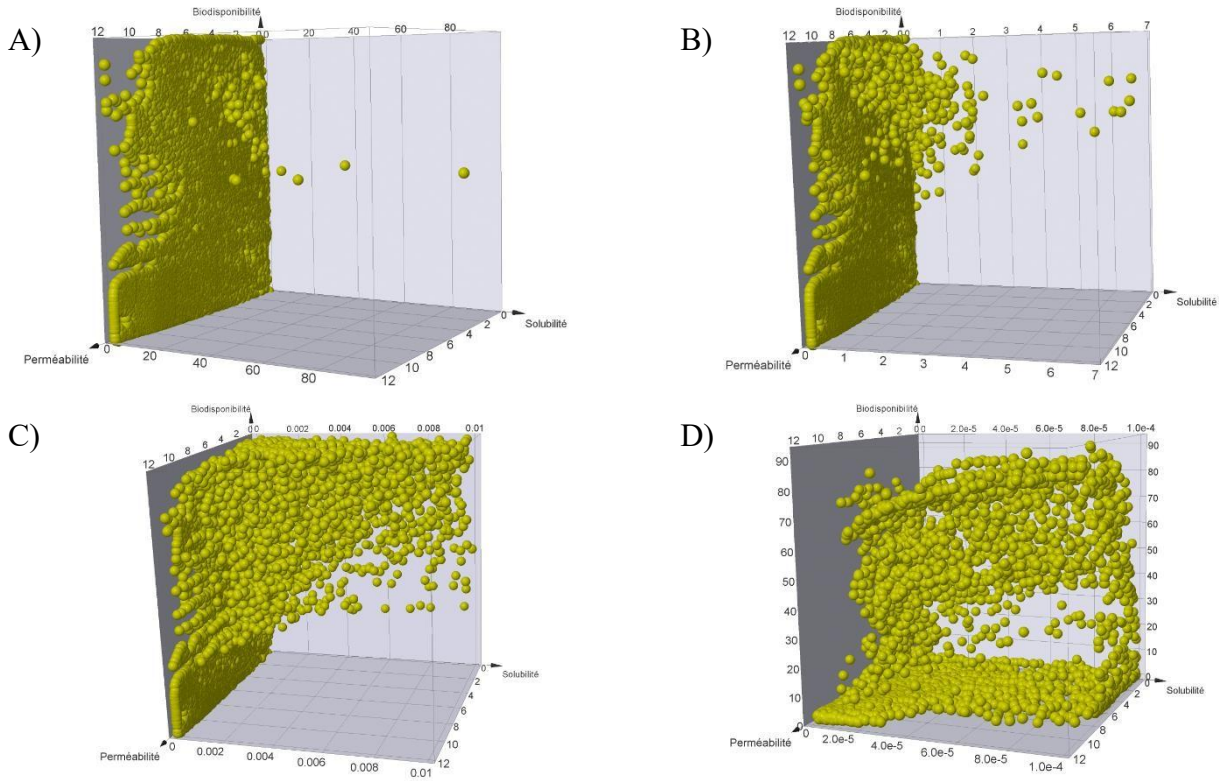
D. Génération *De Novo* de Composés aux Paramètres physicochimiques et Pharmacocinétiques Optimisés.

Dans cette section, nous aborderons la méthode que nous avons développée, afin de générer des composés antiviraux ayant des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés. La stratégie réflexive de cette optimisation a été présentée dans le **Chapitre III**, partie B, mais nous la détaillons de nouveau ici. Tout d'abord, nous avons créé une chimiothèque rassemblant plus de 18.000 molécules proches des composés que nous avons synthétisés. L'ensemble de ces composés est ensuite analysé grâce à GastroPlus™ (version 9.9), corrigée avec nos résultats *in vitro*, afin de prédire leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques. Ces données sont ensuite liées à chacune des structures présentes dans la chimiothèque afin de lister l'ensemble des molécules, en les divisant en trois catégories : les molécules ayant des paramètres très favorables, favorables ou défavorables. A partir de cette liste, nous avons extrait puis classé des fragments de six à onze atomes selon leur prévalence dans chacune des catégories susnommées. A partir de ce classement de fragments, plusieurs composés sont générés *de novo*, à l'aide d'une intelligence artificielle, en respectant certains critères. A partir de ces nouvelles molécules, nous choisissons celles les plus proches structurellement de nos inhibiteurs les plus efficaces, puis synthétisons ces molécules. Lors de tests biologiques, leur efficacité antivirale et leur cytotoxicité sont évaluées. A partir des résultats obtenus, une nouvelle boucle est réalisée en ajustant les paramètres afin d'associer activité antivirale et pharmacocinétique.

1) Résultats et discussion.

Rationalisation de la construction de la chimiothèque.

L'ensemble des 18.240 structures générées dans la chimiothèque informatique est détaillé en **Annexe** sous la forme de code SMILES. De même que dans la partie B, nous avons prédit la biodisponibilité, la perméabilité et la solubilité de l'ensemble de nos composés [**Graphique 5**].



Graphique 5. Biodisponibilité (%), perméabilité (cm/s × 10^{-4}) et solubilité (g/L) calculé par GastroPlus™ des composés de la chimiothèque. **Afin de détailler l'ensemble des tendances exprimées par la chimiothèque, nous présenterons une vue générale (A)), ainsi que des zooms sur les composés ayant une solubilité inférieure à 7 g/L (B)), ayant une solubilité inférieure à 0.01 g/L (C)), ayant une solubilité inférieure à 0.0001 g/L (D)).**

Bien que la génération de la chimiothèque ait été réalisée de manière séquentielle, il peut exister un biais de construction lié à la construction réalisée à la main et non de manière programmée. De plus, même si le nombre de 18.240 peut être un nombre significatif, le nombre de modulations est infini. Une étude statistique d'apparition de fragments pourrait permettre de rationaliser les groupements étant les plus présents et ceux à exprimer davantage.

En prenant les 10% des composés ayant les meilleurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques, l'effet de surnombre est compensé et ne discrimine plus les différents fragments selon le nombre d'occurrence totale dans la chimiothèque.

Analyse des propositions de composés aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés.

Les fragments les plus intéressants en termes de paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques identifiés possèdent un ou deux hétéroatomes [**Figure 36**]. A partir de ces fragments, différents composés ressemblants à **AB109** ont pu être générés [**Figure 37**].

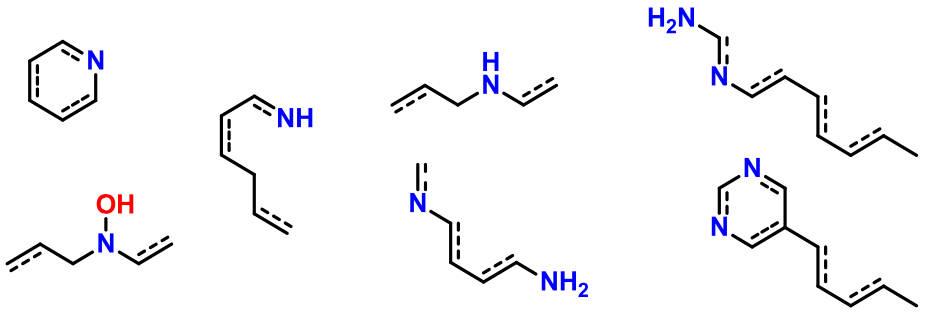


Figure 36. Fragments identifiés comme ayant des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques favorables.

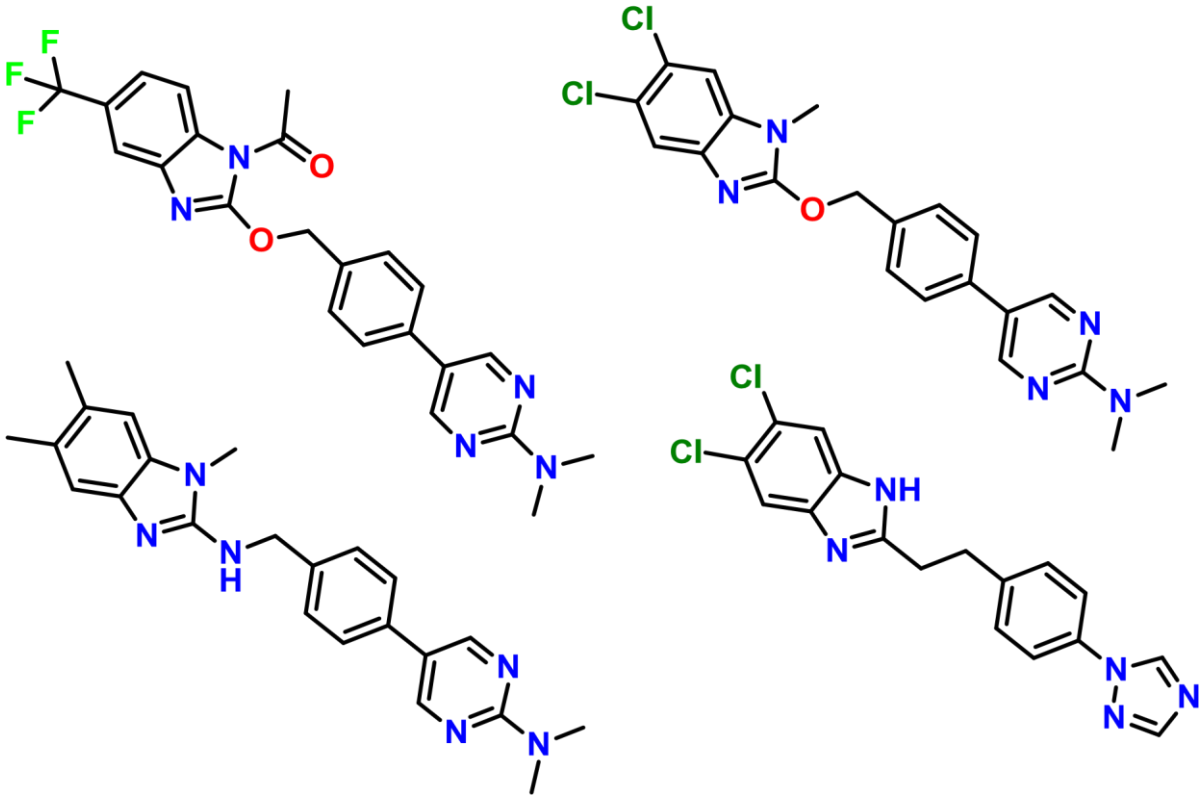


Figure 37. Structure de composés dont les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques sont optimisés.

Les molécules dont les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques seraient les plus optimisés ressemblent fortement à la série **AB109**. En effet, ce composé est l'un des inhibiteurs efficaces ayant une prédiction de paramètres (biodisponibilité, perméabilité et solubilité) des plus favorables [**Graphique 2**]. Il possède une solubilité *in silico* bien plus élevée que les autres composés actifs.

Tous les composés présentés sur la **Figure 37** comportent entre 5 et 7 hétéroatomes polaires avec principalement 3 azotes sur le pharmacophore côté *pore*, un imidazole comme bicycle fonctionnalisé par des substitutions ou un linker pouvant porter 1 à 2 atomes d'oxygène ou d'azote. Cependant, beaucoup de ces atomes ne sont présents que sous la forme d'accepteurs de liaisons hydrogène et uniquement 2 molécules ont la possibilité de former chacune 1 liaison hydrogène avec la présence d'un hydrogène acide.

2) Méthodes.

Génération d'une chimiothèque de référence.

Afin d'avoir une base de données conséquente, nous avons produit plusieurs séries de composés possédant des pharmacophores différents des deux côtés, *toe-end* et *pore* (18.240 composés au total).

Les modulations ont été réalisées de manière séquentielle, modifiant un atome l'un après l'autre, reprenant des groupes chimiques classiques (phényle, pyridine, bicycles, substitués par des fonctions d'un ou deux atomes).

Calcul des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques par
GastroPlus™.

De même que pour la section B, nous avons calculé les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de l'ensemble des composés de la chimiothèque sans modifier les valeurs par défaut de GastroPlus™. Ainsi la prédiction simule la prise d'un comprimé unique de 100 mg de principe actif, dilué dans 250 mL d'eau, pour un homme à jeun.

Génération *de novo* de composés aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés.

La génération *de novo* de composés aux paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques optimisés s'appuie sur une stratégie de design par fragment. Afin d'évaluer les différents composés de la chimiothèque, nous avons choisi de les classer selon leur biodisponibilité, leur perméabilité et leur solubilité.

Identification des fragments des molécules ayant les meilleurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques.

L'identification des fragments favorisant une bonne absorption se fait par le logiciel Knime v4.[*] Ainsi, en croisant les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques prédits avec les structures des composés associés, ces derniers sont classés selon trois catégories :

- Les composés ayant des paramètres pharmacocinétiques favorables (10% les mieux classés) ;
- Les composés ayant des paramètres pharmacocinétiques défavorables (10% les moins biens classés) ;
- Les composés ayant des paramètres pharmacocinétiques intermédiaires (80% restants).

Parmi ces composés, des fragments de 6 à 10 atomes ont été classés selon l'équation suivante :

$$PK = N_{fav} - N_{defav}$$

avec PK le nombre de points favorables identifiés, N_{fav} le nombre d'occurrence dans les composés considérés comme ayant des paramètres pharmacocinétiques favorables, et N_{defav} le nombre d'occurrence dans les composés considérés comme ayant des paramètres pharmacocinétiques défavorables.

Génération de nouveau composés à partir des fragments identifiés.

A partir de ce classement, de nouvelles molécules ont été générées par une approche *in silico* : l'algorithme Fast Assembly of (Deep) SMILES Fragments (FASMIFRA) a été utilisé pour générer de nouvelles molécules à partir des fragments majoritairement retrouvés dans les molécules à pharmacocinétique favorable.[589] Un million de molécules ont été générées, puis filtrées de manière à éliminer les doublons.

[*] KNIME. Lien. (consulté de Février 2022 à Mai 2024).

[589] Berenger, F.; Tsuda, K. *J. Cheminform*. **2021**, *13* (1), 88. DOI: 10.1186/s13321-021-00566-4.

E. Synthèse de sels et autres dérivés avec une meilleure solubilité.

Lors de la prédiction des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés, nous avons mis en évidence une solubilité inférieure à celle du vapendavir, le composé de référence de ce projet, pour la plupart de nos composés synthétisés. Comme évoqué précédemment, la solubilité de molécules chargées est identifiée par la littérature comme meilleure par rapport à celle de leur équivalent neutre. Par conséquent, nous avons synthétisé plusieurs sels hydrochlorés ou méthylé ainsi qu'un dérivé portant un ester de phosphate [**Figure 38** – **composés 5-12**] avec l'hypothèse qu'ils soient plus solubles que leur équivalent non chargé.[571] Nous avons choisi les inhibiteurs actifs mais aussi l'équivalent en série phényle **d'AB113** (**6e**) ayant une solubilité prédite très faible (de l'ordre de 10^{-4} mg/L). Leur méthode de synthèse est précisée en fin de section.

1) Résultats et discussion.

Les calculs de la solubilité des sels hydrochlorés n'a pas été possible avec FAFDrugs 4.1 ou GastroPlus 9.9™. SwissADME prédit une solubilité similaire pour chaque substrat sous forme ionique ou neutre. Au contraire, le dérivé portant un ammonium irréversible par méthylation d'un azote a une solubilité de l'ordre de 1.000 g/L, tandis que l'ester de phosphate possède une solubilité prédite cent fois inférieure à son substrat. L'équivalent phosphate retrouve quant à lui une solubilité supérieure au substrat initial. Nous considérons donc l'ester de phosphate comme pro-drogue, dont l'hydrolyse se fait au sein de la cellule.

Lors de la synthèse du dérivé portant l'ester de phosphate, plusieurs agents oxydants ont été utilisés. L'acide métachloroperbenzoïque oxyde sélectivement le thioéther alors que l'eau oxygénée a uniquement permis l'obtention du phosphore pentavalent, sans oxydation du soufre du linker. Les activités de l'ensemble de ces composés chargés positivement ou portant un ester de phosphate ont été évaluées sur les deux lignées cellulaires (MRC-5 et RD) contre l'EV-A71 [**Tableau 18**].

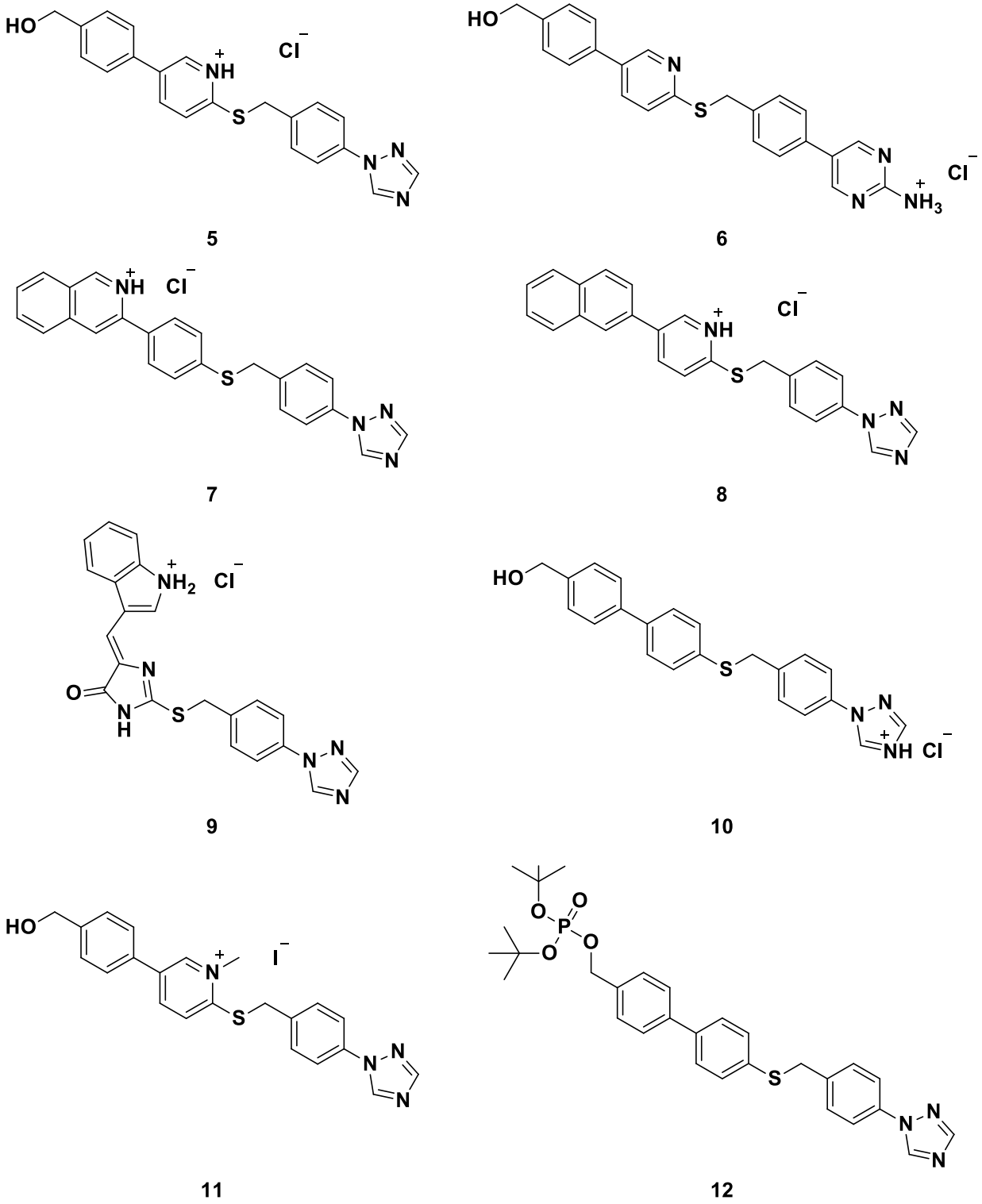


Figure 38. Structure des différents sels hydrochlorés, méthylé ou ester de phosphate synthétisés.

Tableau 18. Activité des différents sels hydrochlorés, méthylé ou ester de phosphate synthétisés contre EV-A71 sur les lignées cellulaires MRC-5 et RD.

Composés	Rhabdomyosarcoma		MRC-5	
	EC_{50} (µM)	CC_{50} (µM)	EC_{50} (µM)	CC_{50} (µM)
AB113 (6c)	1,66 ± 2,18	> 40	0,29 ± 2,35	28,53 ± 2,23
5	> 40	/		
11	2,07	12,77	2,41	12,09
HR-267	24,7	44,66	< 0,37	> 20
6	> 40	/		
OM1260	4,61	30,54	1,15	> 20
7	5,96	> 40		
HR-568	1,53	23,51	3,25	> 40
8	2,06	12,27		
HR-394	4,65	96,29	> 40	/
9	2,06	22,85		
6e	> 40	/	> 20	/
10	4,67	8,30	> 40	24,30
12	13,69	11,09	> 40	/

Nous pouvons diviser en trois catégories les résultats obtenus selon les solubilités des composés non chargés. Ainsi, un seuil est identifié dès qu'on atteint la solubilité prédite de 4 mg/L.

Les sels hydrochlorés des composés bicyliques actifs sur rhabdomyosarcome (**OM1260** – **composé 7** / **HR-394** – **composé 9** / **HR-568** – **composé 8**) ont la même activité que leurs substrats initiaux. Le composé **6e**, avec une solubilité prédite inférieure à 10^{-3} mg/L, n'a pas montré d'activité antivirale contrairement à son sel hydrochloré (**composé 10**). Les composés, initialement actifs, ayant une solubilité supérieure à 4 mg/L (**AB113** / **HR-267**), ont, quant à eux, des sels hydrochlorés qui n'ont plus d'effets antiviraux contre EV-A71 (**composés 5 et 6**). Le sel par méthylation de la pyridine d'**AB113** (**composé 11**) garde la même activité que ce dernier sur RD mais pas sur MRC-5, où il devient cytotoxique. Nous supposons donc que la présence d'un méthyle supplémentaire permet de garder le caractère hydrophobe de la molécule malgré l'augmentation de la solubilité du fait de la présence d'un ammonium.

Enfin, le dérivé d'ester de phosphate de **6e** (**composé 12**) est lui aussi actif uniquement sur RD et cytotoxique sur la lignée cellulaire MRC-5. Le composé **6e** n'est pas actif. Nous supposons que cela provient de sa faible solubilité prédite, et donc d'une précipitation dans le milieu lors des tests. Le fait que l'ester de phosphate, avec une solubilité prédite inférieure au substrat initial, soit actif, nous pouvons en déduire que la molécule est plus soluble que ce qu'affirme la prédiction. Deux hypothèses sont encore à vérifier, à savoir une sous-estimation de la solubilité au niveau du logiciel GastroPlus™ utilisé ou l'hydrolyse chimique ou enzymatique lors des tests biologique de l'ester de phosphate en phosphate, augmentant drastiquement sa solubilité *in situ*.

2) Méthodes de synthèse.

Les sels hydrochlorés ont été synthétisés à partir de leur substrats non chargés, solubilisés dans du dioxane anhydre, par ajout à température ambiante d'un équivalent d'une solution d'acide chlorhydrique, dissous à 4 M dans du dioxane anhydre par seringue Hamilton [**composés 59,11**]. Le dérivé méthylé **d'AB113** est obtenu par substitution nucléophile de ce dernier sur l'iodométhane dans une solution de diméthylformamide à température ambiante [**composé 10**].
Enfin, la synthèse du dérivé d'ester de phosphate [**composé 12**] est décrite sur la **Figure 39**.

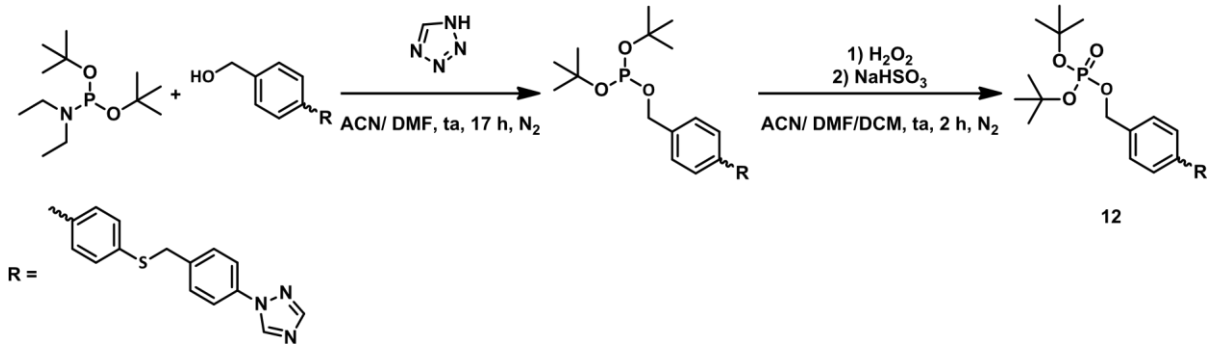


Figure 39. Stratégie de synthèse du dérivé d'ester de phosphate 12.

Perspectives.

Afin de conclure ces différentes évaluations, différents essais sont encore à faire. Nous les présenterons dans cette partie que ce soit pour la partie *in silico* et l'évaluation au plus près des cas cliniques observés, ou la partie *in vitro* afin de mettre en œuvre les différentes méthodes développés sur les composés les plus actifs récemment identifiés.

1) Particularités pharmacocinétiques de la population pédiatrique.

Même si l'ensemble des individus peuvent être contaminés par les Entérovirus, les infections sont plus sévères chez les nouveau-né·es et les enfants. Or, certaines différences du fonctionnement du tractus gastro-intestinal ont été identifiées entre ces populations et celle adulte, notamment l'évolution du pH, les mécanismes de vidange gastrique, le flux de bile et la quantité d'enzymes pancréatiques secrétées. [590] , [591] , [592] , [593] C'est pourquoi des études, modifiant les paramètres d'évaluation du logiciel GastroPlus™ peuvent être envisagées pour prendre en compte cette variabilité selon l'âge des patient·es à soigner.

2) Effet de l'alimentation sur l'absorption de médicaments.

De même, l'absorption des différents composés varient selon l'interaction possible avec les aliments dans le cas d'une prise de médicament conjointe. Différentes catégories d'alimentation sont à distinguer. Les régimes riches en graisses et en calories sont les meilleurs pour étudier les effets sur la prise de médicament car ce sont eux qui affectent le plus le système intestinal pour une plus longue durée, mais d'autres régimes plus spécifiques peuvent être évalués.[594] La sécrétion de bile,

---

[590] Avery, G.B.; Randolph, J.G.; Weaver, T. *Pediatrics*. **1966**, *37* (6), 1005-1007. DOI: 10.1542/peds.37.6.1005.

[591] Batchelor, H.K.; Marriott, J.F. *Br. J. Clin. Pharmacol*. **2015**, *79* (3), 395-404. DOI: 10.1111/bcp.12267.

[592] Tayman, C.; Rayyan, M.; Allegaert, K. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther*. **2011**, *16* (3), 170-184. DOI: 10.5863/15516776-16.3.170.

[593] McClean, P.; Weaver, L.T. *Arch. Dis. Child*. **1993**, *68* (1 Spec No), 62-65. DOI: 10.1136/adc.68.1_spec_no.62.

[594] Food and Drug Administration. *Guidance for industry: food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies*. Food and Drug Administration. Rockville, Maryland, U.S.A. **2002**. Lien.

l'exacerbation du transport lymphatique intestinal, l'inhibition des transporteurs épithéliaux d'efflux ou le retard de la vidange gastrique augmentent l'absorption générale.[595,596,597]

Cependant, de nombreux effets la réduisent, comme la complexation des principes actifs avec des fibres ou des métaux, l'augmentation de la viscosité du tractus gastrointestinal ou l'augmentation du flux sanguin splanchnique.[598,599,600] En cas de saturation ou d'apport de graisses trop fréquent, des diarrhées ou des vomissements peuvent se produire, réduisant l'absorption générale des composés. La présence de graisses augmente l'absorption des composés hydrophobes, quand celle de fibres l'inhibe.[601,602] Enfin, certains mécanismes provoquent des effets contraires, comme les variations de pH. [603] La présence de peptides alimentaires, ou de purines alimentaires pour les nucléotides / nucléosides, permet à la fois l'exacerbation de l'activité des transports associés mais aussi une concurrence afin de les utiliser. [604,605,606]

Tous ces paramètres peuvent être aussi modifiés au sein du logiciel GastroPlus™, et pourront être modifiés pour de futures modélisations.

---

[595] Moghimipour, E.; Ameri, A.; Handali, S. *Molecules*. **2015**, *20* (8), 14451-14473. DOI: 10.3390/molecules200814451.

[596] Custodio, J.M.; Wu, C.Y.; Benet, L.Z. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **2008**, *60* (6), 717-733. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.043.

[597] Smith, T.; Nicholson, R.A. *Vasc. Health Risk Manag*. **2007**, *3* (6), 833-844. PMID: 1820080.

[598] McLachlan, A.; Ramzan, I. *Aust. Prescr*. **2006** , *29* (2), 40-42. DOI: 10.18773/AUSTPRESCR.2006.026.

[599] Lee, L.J.; Hafkin, B.; Lee, I.D.; Hoh, J.; Dix, R. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1997**, *41* (10), 2196-2200. DOI: 10.1128/AAC.41.10.2196.

[600] Cvijić, S.; Parojčić, J.; Langguth, P. *Eur. J. Pharm. Sci*. **2014**, 61, 40-53. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.008.

[601] Zimmermann, T.; Yeates, R.A.; Laufen, H.; Pfaff, G.; Wildfeuer, A. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. **1994**, *46* (2), 147-150. DOI: 10.1007/BF00199879.

[602] Schöller-Gyüre, M.; Boffito, M.; Pozniak, A.L.; Leemans, R.; Kakuda, T.N.; Woodfall, B.; Vyncke, V.; Peeters, M.; Vandermeulen, K.; Hoetelmans, R.M. *Pharmacotherapy*. **2008**, *28* (10), 1215-1222. DOI: 10.1592/phco.28.10.1215.

[603] Dressman, J.B.; Berardi, R.R.; Dermentzoglou, L.C.; Russell, T.L.; Schmaltz, S.P.; Barnett, J.L.; Jarvenpaa, K.M. *Pharm. Res*. **1990**, *7* (7), 756-761. DOI: 10.1023/a:1015827908309.

[604] Robertson, D.R.; Higginson, I.; Macklin, B.S.; Renwick, A.G.; Waller, D.G.; George, C.F. *Br. J. Clin. Pharmacol*. **1991**, *31* (4), 413-417. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1991.tb05555.x.

[605] Gidal, B.E.; Maly, M.M.; Budde, J.; Lensmeyer, G.L.; Pitterle, M.E.; Jones, J.C. *Epilepsy Res*. **1996**, *23* (1), 71-76. DOI: 10.1016/0920-1211(95)00051-8.

[606] Li, L.; Koo, S.H.; Limenta, L.M.; Han, L.; Hashim, K.B.; Quek, H.H.; Lee, E.J. *J. Clin. Pharmacol*. **2009**, *49* (6), 661-667. DOI: 10.1177/0091270009335002.

3) Evaluation de la perméabilité des membranes à AB113.

Suite à la réalisation de tests préliminaires, nous souhaitons poursuivre les essais *in vitro* et valider les hypothèses de travail. En effet, nous avons constaté un écart entre la quantité d'**AB113** introduite initialement et celle mesurée après les différents temps d'incubation.

Pour vérifier l'hypothèse de la rétention de notre composé au sein des cellules Caco-2, nous pouvons procéder à une lyse cellulaire après le prélèvement des solutions contenues dans l'insert et le puits.

Une autre possibilité envisagée pour vérifier nos hypothèses est l'identification de la molécule inconnue observée lors du dosage par HPLC après 24h d'incubation. Si la quantité est trop faible pour être déterminée par les moyens classiques (spectroscopie RMN, spectrométrie de masse), des tests de dégradation forcée peuvent être envisagés.

Une fois que la méthodologie de mesure de la perméabilité des membranes à des composés organiques sera mise au point, il serait aussi intéressant d'évaluer celle propre aux inhibiteurs à large spectre récemment identifiés (**OM1260** et **HR-568**).

4) Evaluation de la solubilité d'AB113.

L'évaluation de la solubilité **d'AB113** et **AB113·HCl** en milieu aqueux devra être finalisée. A ce jour, nous avons déterminé leur spectre d'absorbance UV-Visible pour des solutions saturées. Désormais, il reste à faire une échelle de concentration afin de déterminer leur limite de solubilité.

De même que pour la perméabilité, une fois la mise en place de la méthode terminée, il serait intéressant de mesurer expérimentalement les solubilités d'**OM1260** et **HR-568**.

5) Combinaison de l'optimisation des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques, et celle de l'activité antivirale.

Un objectif à terme de ce projet de thèse est de combiner les deux stratégies d'optimisation afin de prendre en compte à la fois l'activité antivirale de nos composés et leurs paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques.

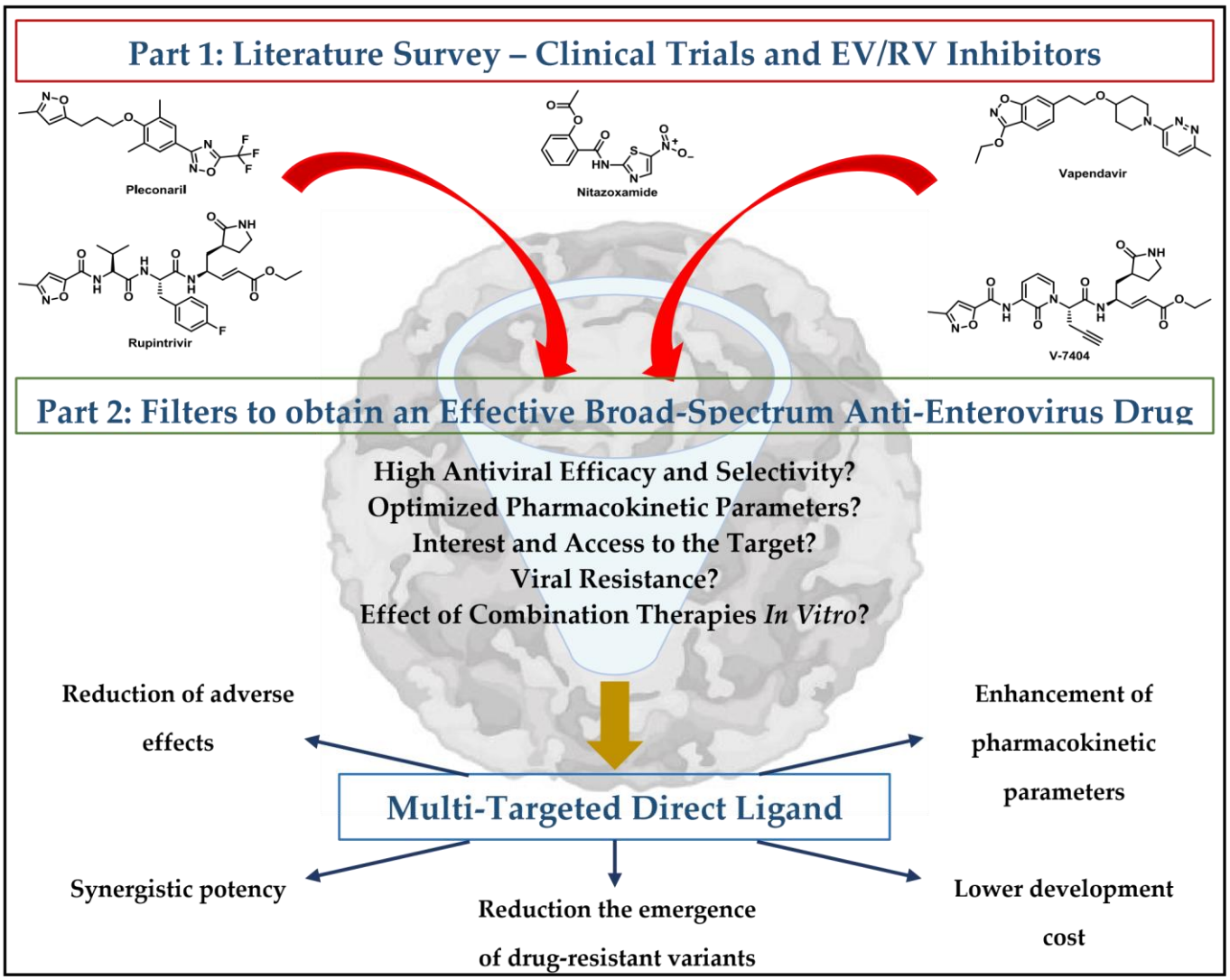
Chapitre VI : Passage d'une molécule monocible à un agent inhibant plusieurs protéines

Etude de traitements ciblant plusieurs protéines virales à la fois pour dépasser les inconvénients soulignés dans les essais cliniques passés.

Le **Chapitre VI** comporte une seule partie. Afin d'augmenter l'efficacité de nos composés prometteurs tout en optimisant leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques, nous avons proposé une réflexion sur le développement d'une molécule pléiotrope.
En effet, le ciblage de multiples protéines, qu'elles soient virales ou de l'hôte, promouvant l'infection à Entérovirus peut permettre une augmentation synergique de l'activité antivirale du ou des principes actifs, ainsi qu'une baisse du risque de développement de résistances dû à la pression antivirale et de meilleurs paramètres pharmacocinétiques.

Dans ce chapitre nous présenterons donc les différents composés ayant été évalués dans des essais cliniques afin d'identifier les composés avec des données d'activité antivirale et/ou de pharmacocinétique solides *in vivo*. Puis nous analyserons les différents tests *in vitro* récents de combinaison de plusieurs antiviraux agissant contre les Entérovirus afin de déterminer les paires de cibles les plus intéressantes à combiner. Enfin, nous discuterons de la possibilité de synthétiser un composé ciblant différentes cibles à la fois, en présentant les différentes possibilités de synthèse, leurs avantages et leurs contraintes.
Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Pharmaceuticals » en 2024.

"From the "One Molecule – One Target – One Disease" Concept towards Looking for Multi-target Therapeutics for Treating Non-polio Enterovirus (Npev) Infections." Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Vanelle, P.; Roche, M.
Pharmaceuticals. **2024,** *17* (9), 1218. DOI: 10.3390/ph17091218.


Part 1: Literature Survey – Clinical Trials and EV/RV Inhibitors
Pleconaril
Nitazoxamide
Vapendavir
Rupintrivir
V-7404
Part 2: Filters to obtain an Effective Broad-Spectrum Anti-Enterovirus Drug
High Antiviral Efficacy and Selectivity?
Optimized Pharmacokinetic Parameters?
Interest and Access to the Target?
Viral Resistance?
Effect of Combination Therapies In Vitro?
Reduction of adverse effects
Enhancement of pharmacokinetic parameters
Multi-Targeted Direct Ligand
Synergistic potency
Reduction the emergence of drug-resistant variants
Lower development cost

pharmaceuticals

MDPI

Review

From the "One-Molecule, One-Target, One-Disease" Concept towards Looking for Multi-Target Therapeutics for Treating Non-Polio Enterovirus (NPEV) Infections

Hugo Roux [1], Franck Touret [2], Pascal Rathelot [1], Patrice Vanelle [1,*] and Manon Roche [1,*]

[1] Aix-Marseille Université, CNRS, ICR UMR_7273, LPCR, Faculté de Pharmacie, 13005 Marseille, France; hugo.roux@univ-amu.fr (H.R.); pascal.rathelot@univ-amu.fr (P.R.)
[2] Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Université, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), 13005 Marseille, France; franck.touret@univ-amu.fr
* Correspondence: patrice.vanelle@univ-amu.fr (P.V.); manon.roche@univ-amu.fr (M.R.)

Abstract: Non-polio enteroviruses (NPEVs), namely coxsackieviruses (CV), echoviruses (E), enteroviruses (EV), and rhinoviruses (RV), are responsible for a wide variety of illnesses. Some infections can progress to life-threatening conditions in children or immunocompromised patients. To date, no treatments have been approved. Several molecules have been evaluated through clinical trials without success. To overcome these failures, the multi-target directed ligand (MTDL) strategy could be applied to tackle enterovirus infections. This work analyzes registered clinical trials involving antiviral drugs to highlight the best candidates and develops filters to apply to a selection for MTDL synthesis. We explicitly stated the methods used to answer the question: which solution can fight NPEVs effectively? We note the originality and relevance of this proposal in relation to the state of the art in the enterovirus-inhibitors field. Several combinations are possible to broaden the antiviral spectrum and potency. We discuss data related to the virus and data related to each LEAD compound identified so far. Overall, this study proposes a perspective on different strategies to overcome issues identified in clinical trials and evaluate the "MTDL" potential to improve the efficacy of drugs, broaden the antiviral targets, possibly reduce the adverse effects, drug design costs and limit the selection of drug-resistant virus variants.

Keywords: enterovirus; multi-target directed ligand; clinical trials; combination; drug design

check for updates

Citation: Roux, H.; Touret, F.; Rathelot, P.; Vanelle, P.; Roche, M. From the "One-Molecule, One-Target, One-Disease" Concept towards Looking for Multi-Target Therapeutics for Treating Non-Polio Enterovirus (NPEV) Infections. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 1218. https://doi.org/10.3390/ph17091218

Academic Editor: Fedora Grande

Received: 11 July 2024
Revised: 9 September 2024
Accepted: 11 September 2024
Published: 16 September 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

1.1. Pre-Proposal Context

Enteroviruses (EV) are a highly diverse genus of small, icosahedral viruses with single-stranded, positive-sense RNA genomes [1]. They cause a wide range of human diseases occurring most frequently in infants and young children, such as non-specific febrile illness, exanthemas, respiratory tract infections, and ocular infections. Although infections caused by non-polio enteroviruses (NPEV) are usually benign, they can be severe and have deleterious outcomes in some patients, particularly in children and immunocompromised patients.

The enterovirus genus presents seven human pathogen species (EV-A, EV-B, EV-C, EV-D and RV-A, RV-B, RV-C) divided into 11 subgroups: polioviruses (PV), coxsackieviruses groups (CVA, CVB), echoviruses (E), four enterovirus subgroups, named from A to D, and rhinovirus (RV) classified into RV-A, RV-B and RV-C subgroups. Whole enterovirus RNA strands are always composed of a coding region divided into three parts which are translated into polyproteins that are co-translationally and post-translationally cleaved by viral proteases to produce structural and non-structural proteins [2]. Viruses of the Enterovirus genus share several conserved protein motifs in the RNA-dependent RNA polymerase, capsid proteins, viral proteases, and other non-structural proteins.

The emergence of new viral types, such as enterovirus-A71 (EV-A71) and enterovirus-D68 (EV-D68), have been associated with more severe disease manifestations than previously described, including sepsis, myopericarditis, and central nervous system infections [3–5]. The worldwide prevalence and species distribution of enteroviruses varies among continents. For example, Enterovirus D68 is most prevalent in North America, while Enterovirus B is the predominant variant in Africa, Europe, and Southern Asia. However, there is a more variable distribution of variants among other continents, where a mixture of Enterovirus A71, Coxsackievirus A, and Enterovirus B are the most represented [6].

NPEVs can cause a wide range of health disorders with varying presentation and severity, most often in pediatric and immunocompromised patients. NPEV neonatal diseases are often related to nonspecific symptoms but can lead to severe or fatal clinical situations [7]. When considering epidemiological data, the most common pathogens with the highest incidence are due to EV-A, principally with hand, foot, and mouth disease (HFMD), whose etiologic agents are EV-A71, CVA6, CVA10, and CVA16. EV-A infections have been linked with other diseases. For example, EV-A71 or Echovirus E11 may be the causative agents of severe and life-threatening neurological symptoms—often involving long-term sequelae and cardiopulmonary complications [8]. Recently, EV-A71 has been reported to cause serious epidemics in Asia that are related to severe neurological complications like poliomyelitis [9]. Moreover, acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) was signaled during EV-A70 or CVA24 infections [10]. The second most represented enterovirus is EV-B, which includes Echoviruses E30, E6, E11, and Coxsackievirus B3 [6]. Severe EV-B infections have been linked mainly to acute flaccid paralysis (AFP). Meningitis or encephalitis can also be linked to EV-B infections, especially with Echovirus 30. Likewise, myocarditis is mainly induced by the CVB subgroup (from CVB1 to CVB6), and Echovirus 11 [11]. CVB1 can also cause severe infections in infants that may lead to sepsis [12]. Moreover, in 2023, at least 7 European countries experienced an outbreak of Echovirus 11, leading to serious conditions in newborns [12]. Eventually, EV-D species cause mainly pneumonia, bronchiolitis, or acute flaccid myelitis (AFM) [3]. For instance, EV-D comprises the re-emergent EV-D68, recently responsible for epidemics of respiratory diseases and polio-like paralysis AFM leading to death in some cases [13]. Interestingly, European countries have observed a re-emergence of EV-D68 post-COVID-19 lockdown [14]. Rhinoviruses have been neglected for decades because they were only related to the mild common cold with less virulence. Recently, they were recognized as critical causative agents of lower respiratory tract infections (LRTIs) and severe respiratory diseases [15–17].

1.2. The Need for Therapies

The large number of RV/EV strains and their antigenic diversity are significant obstacles in broad-spectrum vaccine development. Several clinical trials, evaluating the efficacy of small molecules, have been carried out in recent years, but there are no approved therapies targeting these viruses. Some of the reasons for these failures include viral resistance, single-targeted approaches, and lack of clinical efficacy, which pose significant obstacles in drug development [18,19]. Moreover, the importance of combination therapies involving different therapeutic mechanisms to control a disease is well-known in clinical practice. Indeed, the current treatment recommendations against hepatitis C virus (HCV) mainly involve four different combinations of Direct-Acting Antiviral Agents DAAs [20]. For instance, combinations of NS5A inhibitors and/or NS5B polymerase and/or NS3/4 polymerase inhibitors (Sofosbuvir/Velpatasvir, Glecaprevir/Pibrentasvir, Grazoprevir/Elbasvir, Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir) are recommended.

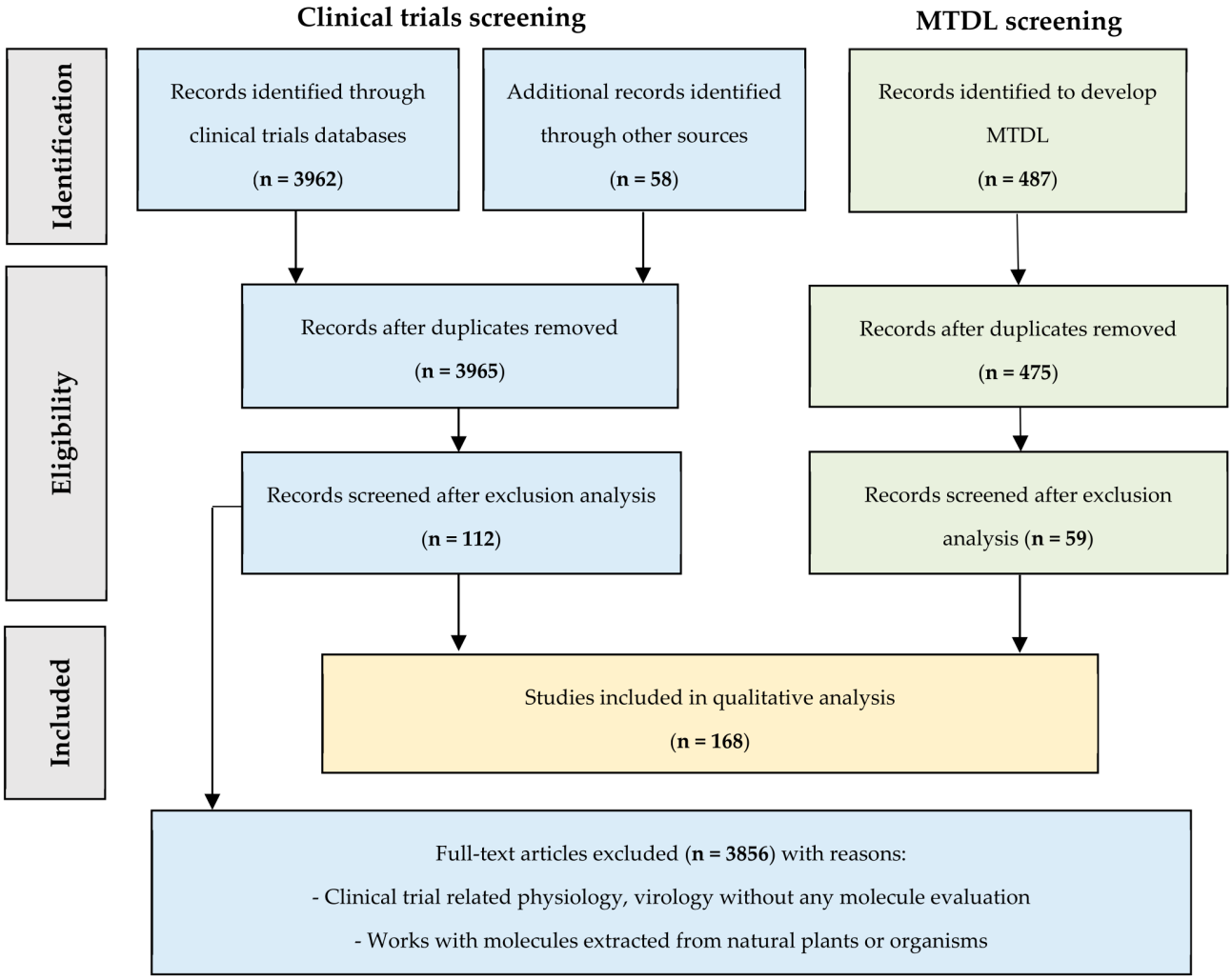
The treatment for HIV involves taking a combination of HIV drugs every day. Approved antiretroviral (ARV) HIV drugs are divided into eight drug classes based on how each drug interferes with the HIV life cycle. These eight classes are nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), fusion inhibitors, CCR5 antagonists, post-attachment inhibitors, integrase strand transfer inhibitors (INSTIs), and capsid inhibitors. Three or four classes

of drugs are currently used per day according to the patient's individual needs, the resistance profile of the virus, adverse effects, interaction with other drugs, and the previous treatment failures.

The main goal of this work is to identify promising compounds and to discuss multi-target directed ligand (MTDL) systems, from combination therapies to chimera design. The workflow is organized into two distinct parts. The first is a literature survey highlighting previous clinical trials involving NPEV inhibitors, and the second highlights selection criteria for potentially synthesized MTDL.

2. Results

A total of 3962 records were identified through the database (Clinical trials screening—3270 from CT, 25 from EudraCT, 167 from ICTRP, and 500 from PubMed). A total of 51 full clinical trials were included for analysis (55 duplicates removed and 3856 excluded). A total of 487 records were identified through PubMed (MTDL), and 59 articles were included for analysis (12 duplicates removed and 416 excluded). Fifty-eight references were added to describe the context, combinations, and biological details needed for the perspective. The results are presented in Scheme 1 [21].



Scheme 1. Results—Data collection [21].

Results are grouped according to antiviral drug targets in Tables 1–6.

Four main types of viral targets were highlighted: structural proteins (involved in cellular entry and uncoating to release RNA), non-structural proteins (polymerase or

proteases which are active during replication and translation of RNA), inhibiting viral proliferation by action on cell metabolism, and non-specified targets (unknown inhibitor mechanism of action) [22].

This section may be divided into subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation, and the experimental conclusions that can be drawn. Two types of clinical trials are described: first, the ones where the virus was experimentally inoculated. The second type is naturally occurring cases in humans.

Part 1: NPEV-inhibitors evaluated in clinical trials.

2.1. Structural Proteins

Virus entry is the first step in the viral replication cycle and offers opportunities to develop inhibitors targeting viral structural capsid proteins [22]. Therefore, several molecules have been developed to target capsid proteins of enteroviruses.

The most studied target is the hydrophobic pocket VP1 capsid protein constituted with two essential structures: "canyon" or "hydrophobic pocket" and "pocket factor". Canyon is the first identified druggable surface pocket. The hydrophobic pocket is characterized by an open side, allowing accessibility for inhibitors, and a closed side, the end of the pocket. There are different binding sites in the viral capsid. When molecules bind with the capsid canyon, they stabilize the viral capsid and prevent the virus recognition by its receptors [23]. Likewise, it blocks the viral entry and thus the uncoating to release RNA and VP4 inside the cell by a higher affinity for the drug than for the receptor. The following classical hydrophobic pocket capsid binders are presented in Figure 1. Associated clinical trial parameters are presented in Table 1.

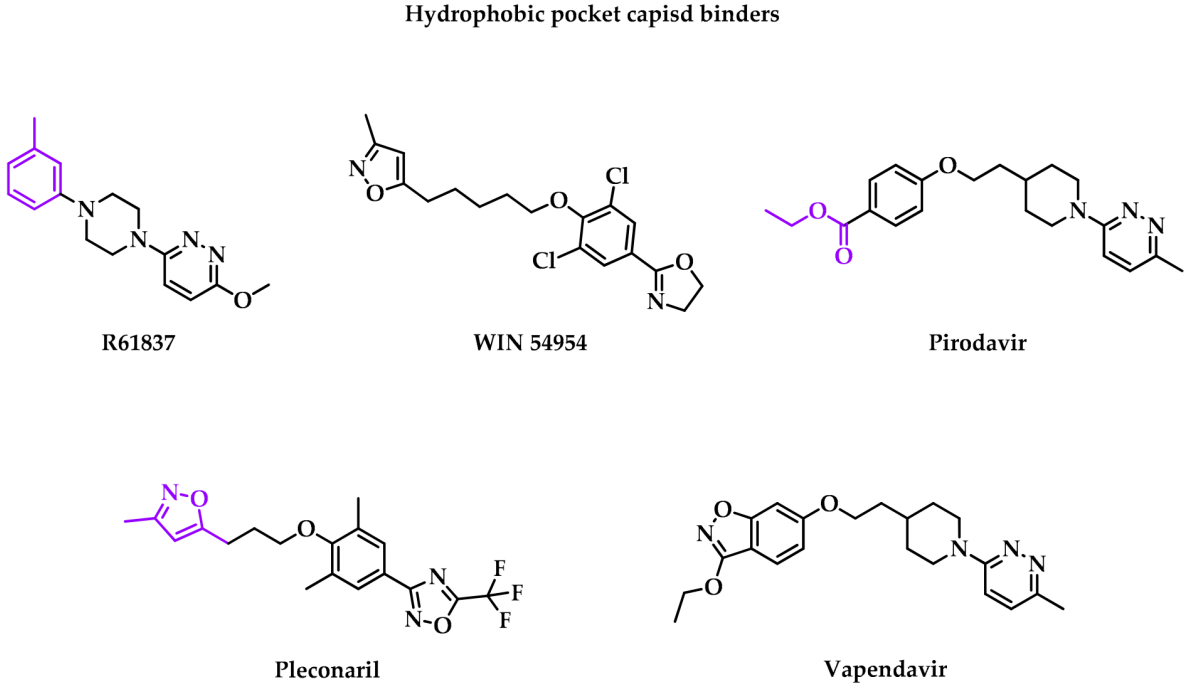


Figure 1. Structure of hydrophobic pocket capsid binders, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

Table 1. Summary of clinical assays for VP1 "classical" hydrophobic pocket binders.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
April 1989	DB PC phase II	RV-A9	Inoculation (−28 h)	R61837	Nasal spray	18–50 years old	[24]
February 1993	Rdm DB PC phase II	RV-A39	Inoculation (−42 h)	WIN 54954	Oral capsule	18–50 years old	[25]
April 1992	Rdm DB PC phase II	RV-A39	Naturally occurred (+24 h)	Pirodavir (R77,975)	Nasal spray	18–50 years old	[26]
February 1995	Rdm DB PC phase II	RV colds	Inoculation (−6/12 h)	Pirodavir (R77,975)	Nasal spray	18–65 years old	[27]
January 2000	Rdm DB PC phase II	CVA21	Inoculation (−14 h)	Pleconaril	Oral formulation	18–37 years old	[28]
15 January 2001	Phase II ‡	EV	Naturally occurred	Pleconaril	Suspension	2–50 years old	[29]
6 March 2002	Rdm DB PC phase II	EV Sepsis	Naturally occurred (+36 h)	Pleconaril	Oral solution/suspension	>15 days	[30]
September 2002	Clinical application	CVB	Naturally occurred (+48 h)	Pleconaril	/	<27 days	[31]
April 2003	Rdm DB PC phase II	Suspected EV meningitis	Naturally occurred (+10 days)	Pleconaril	/	<12 months	[32]
November 2005	Rdm DB PC phase III	RV common colds	Naturally occurred (+24 h)	Pleconaril	Oral tablets	>18 years old	[33]
July 2006	Rdm DB PC phase II	EV meningitis	Naturally occurred (+10 days)	Pleconaril	Oral formulation	>14 years old	[34]
31 October 2006	Rdm DB PC phase II	RV asthma & common cold	Naturally occurred	Pleconaril	Nasal spray	6–65 years old	[35]
28 May 2008	Rdm DB PC phase II	RV	Inoculation (+1/2 h)	Vapendavir	Oral capsules	NS	[36]
3 August 2010	Rdm DB PC phase II	RV	Naturally occurred	Vapendavir	/	18–70 years old	[37]
31 December 2014	Rdm DB PC phase II	RV	Naturally occurred	Vapendavir	Oral capsules	>18 years old	[38]
13 February 2015	Rdm DB PC phase II	Asthma	Naturally occurred (same day)	Vapendavir	/	18–75 years old	[39]
March 2016	Rdm DB PC phase II	EV suspected sepsis	Naturally occurred	Pleconaril	Liquid/suspension	<27 days	[40]
12 January 2017	Rdm DB PC phase II	RV Upper Respiratory	Naturally occurred (+3/5 days)	Vapendavir	Oral tablets	12–75 years old	[41]
10 November 2023	Rdm PC phase II	RV & EV COPD	Naturally occurred (+48 h)	Vapendavir	Oral tablets	40–75 years old	[33]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset. The positive delay means that the treatment began after virus challenge or symptoms onset. ‡ Initially, the clinical trials should be placebo-controlled, but no reliable control was possible because of the rarity of EV infections. NS = not specified.

- R61837

The first clinical trial studying capsid binder as an inhibitor of enterovirus was published in 1989 for a double-blind placebo-controlled phase 2 clinical trial with an evaluation of R61837 (Janssen Pharmaceutical Ltd.) on 105 volunteers between 18 and 50 years old to treat RV-A9 infections [24]. R61837 was prepared for the nasal route, after nasal virus inoculation. The treatment began either 4 or 28 h before the virus challenge. Each patient received a 25 or 36 mg total dose of R61837 daily for 6 days. This trial concluded that R61837 doesn't prevent RV-A9 infections but associated colds. A decrease in nasal secretion and an improvement in the clinical score were observed during the treatment but stopped when patients no longer received the drug. Patients had well-tolerated R61837. The trial conclusion was to increase the drug dose to observe higher efficacy against RV-A9.

- WIN 54954

The most famous capsid binder family is derived from drug candidates developed by Winthrop Company (WIN compounds). They possess three aromatic cores with one alkyl linker.

In 1990, a second randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was performed to evaluate the efficacy of WIN 54954 against RV-A39 infections [25]. WIN 54954 possessed an in vitro broad-spectrum activity with nanomolar potency against several RV and CV [42]. Two cohorts were recruited in Virginia and South Carolina in January and November 1990. A total of 69 volunteers between 18 and 50 years old were recruited. They were received by nasal route RV-A39. The treatment began 642 h before the virus challenge. WIN 54954 was administrated by oral capsules containing 100 or 400 mg of active ingredient for 6 days for a total dose of 1.20 or 2.40 g per day. The trials concluded that there is no significant efficacy in preventing RV-A39 colds. The main proposed limitations of this study were inadequate daily dose to have sufficient experimental power, lack of performance of measuring instruments, or development of drug resistance during the trial.

- Pirodavir

The same year, an R61837 derivative named Pirodavir (R77975) was evaluated for a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial against all RV colds [26]. Pirodavir is an antienteroviral with a nanomolar in vitro potency against a broad spectrum of rhinoviruses and several coxsackieviruses, echoviruses, and enteroviruses [43]. In the first trial, pirodavir was administrated by nasal route. Patients recruited for this study had been suffering from cold symptoms for less than 2 days, and ranged in age from 18 to 64 years. The median treatment time since the onset of illness is 24 h. Every day, patients used the nasal spray twice per nostril for 6 days. Each intranasal spray released 500 µg of drug or placebo diluted at a concentration of 5 g/L. Overall, they received 30 doses of pirodavir. The clinical trial concluded with a non-significant benefit to use the drug with efficacy and some mild adverse effects versus placebo. Indeed, there is a significantly lower frequency of virus isolation on day 3 ($p < 0.001$) and on day 5 ($p = 0.002$). However, the active cohort suffered from blood in mucus ($p < 0.01$), unpleasant taste, and nasal dryness ($p \leq 0.05$).

A second randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was published in 1992 to evaluate the efficacy of a nasal spray containing pirodavir against inoculated RV-A39 infections [27]. The treatment began 6 or 12 h before the virus challenge. Patients between 18 and 64 years old received two sprays for each nostril per day. They received a total of 2 mg of pirodavir per day. The trial concluded that there is no significant difference in seroconversion rate. However, there is a lower overall number of days of virus shedding on days 2 ($p < 0.001$), on day 3 ($p = 0.005$) and day 4 ($p = 0.04$) for the first study. During the second and third studies, there was no significant difference between the placebo and virus-shedding cohorts. Eventually, even if the drug seems to irritate the respiratory mucosa and cause nasal dryness, there is no serious adverse effect, as blood in the mucus case reported on the active cohort.

- Pleconaril

In 1996, two phase 2 clinical trials for the compound WIN 63843 (ViroPharma, Inc., Exton, PA, USA), also named pleconaril or VP 63843, were performed to evaluate its efficacy against CVA21 infections and EV infections, respectively [28,29]. Pleconaril is a broad-spectrum inhibitor with micro or nanomolar in vitro potency against coxsackieviruses and enteroviruses, except for CVB3 [44]. It was also used to cure echovirus-infected neonates [45]. Respectively, 33 and 38 adults were enrolled to receive a 400 mg total daily dose for 7 days, or 200 mg or 400 mg three times, by the oral route. The first study concluded that pleconaril reduces viral shedding in nasal secretion ($p < 0.001$), nasal mucus production ($p = 0.004$), and total respiratory illness symptom scores ($p = 0.013$) compared with placebo after a virus inoculation. The treatment began 14 h before the virus challenge. However, it also causes some adverse effects, like nausea, abdominal pain, dysmenorrhea, and an increase in the frequency of urine. For the second trial, suspected infected children in the active cohort received three doses of 5.0 mg/kg. No delay between inclusion and treatment is reported. Pleconaril was used as compassionate/last-line treatment. Because of the rarity of EV infections, it was challenging to design a placebo-controlled trial.

In 1999, three randomized, double-blind, placebo-controlled studies were performed to evaluate pleconaril efficacy against suspected EV meningitis or sepsis [32,34,40]. These studies respectively recruited 20 sepsis suspected patients under 12 months, 250 patients over 14 years old with a white blood cell number concentration superior to 10 mm^{-3}, and 61 sepsis suspected neonates (with 43 confirmed EV sepsis) patients. Pleconaril was administrated by liquid or suspended oral formulation with respective concentrations of 5 mg/kg/dose (three times a day), 200 or 400 mg (three times a day), and 8.5 mg/kg per day for 7 days. The onset of symptoms had to be, respectively, 36 h, 48 h and 10 days before administration of the first dose of study medication. Conclusions of studies on infants were encouraging with a virus culture which turned to negative quicker for the active cohort ($p = 0.08$) and a higher survival probability after the treatment ($p = 0.26$) and over 18 months ($p = 0.07$, $p = 0.23$ for validated enteroviruses infections neonates) even if the duration of hospitalization was similar ($p = 0.18$). No adverse effects were attributed to the treatment despite the drug's tendency to accumulate. The trial on neonates finished during the study due to the expiration of the study drug. The last study performed on children and adults is more mitigated about its conclusion. Indeed, there are some limitations, such as the low number of patients with validated EV meningitis and the difficulty of oral admission for patients with nausea. The headache resolution is quicker for the active cohort with moderate or severe nausea ($p = 0.009$) but not for very severe nausea ($p = 0.05$) or without nausea ($p = 0.15$). However, there is a light low treatment-related adverse effect ($p = 0.14$) or treatment-emergent adverse effect ($p = 0.71$). The analysis is exploratory, not for licensure, due to a failure to define the clinical benefit of the Food Drug Administration (FDA).

In 2000, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 of clinical trials was performed on 2096 patients to evaluate pleconaril efficacy against RT-PCR-detected RV common colds [33]. To be included in the study, cold symptoms had to have appeared within 24 h. Patients received 200 mg of oral tablets thrice daily for 5 days. By day 3, there is no culturable virus for pleconaril-treated patients ($p < 0.0001$). By day 6, the number of samples is significantly lower for the active cohort ($p = 0.07$). The study used wild-type viruses and resistant-induced viruses. Symptom resolution of the pleconaril cohort was quicker than the placebo one if they were exposed to the wild type ($p < 0.0001$) but not favorable with an exposition to the resistance strain. Some resistance issues can explain this result.

In the early 2000s, three studies were conducted to evaluate pleconaril efficacy against enteroviral sepsis, CVB infections, both in newborns, and the common cold due to rhinovirus infections in children and adults [30,31,35]. They are either randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 of clinical trials or clinical application studies. Respectively, 61 were suspected of being infected, sepsis detected in four, and 311 patients receiving viral inoculations were recruited to receive the drug (respectively 5 mg/kg three times

per day, 5 mg/kg per day, and 12 mg/dose twice daily) or placebo by the oral route for newborns and nasal route for children and adults. For these studies, few significant results were identified. Any result was associated or published after the end of the first trial. The onset of disease symptoms was ≤10 days prior to administration of the first medication dose. Even if it suggests a beneficial effect in combination with earlier treatment during the clinical application, no clear proof was identified that only pleconaril, as compassionate or last-line treatment, without reported delay between inclusion and treatment, decreases CVB symptoms. Finally, both drug and placebo cohorts had the same levels of RV PCR-positive colds ($p = 0.973$) in the third study, with a prophylactic use of pleconaril. As a result, no positive effect was identified in this case.

- Vapendavir

The last promising capsid binder, evaluated against enteroviruses, particularly rhinoviruses, was the compound BTA798 (Altesa Biosciences, Inc. & Biota Pharmaceuticals, Inc. & Vaxart), also named vapendavir [46]. In 2008, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial on 240 inoculated male patients to evaluate its efficacy against the common cold [36]. The prophylactic treatment was given to subjects on day 0, 1 or 2 h after the virus challenge. Vapendavir was only once administrated by the oral route with 25, 100, or 200 mg of the drug. The result of this study identified a dose-dependent decrease in the incidence of RV-A39 infections. However, most of these infections were asymptomatic, which does not enable an evaluation of the protection against upper respiratory tract illness. The drug was well-tolerated even if one patient was excluded from the study due to neutropenic sepsis, which can be caused by the drug. This study was prematurely ended.

In 2010, a second randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was conducted to evaluate the efficacy of vapendavir against rhinoviral infections [37]. Suspected infected patients were recruited among adults, ranging from 18 to 70 years. No delay between the patient's inclusion and treatment is reported in the accessible data. They receive twice daily a non-specified dose. The drug-treated cohort had lower cold symptoms and impact scores than the placebo cohort ($p = 0.020$).

In 2015, vapendavir was evaluated in two randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trials against asthma due to suspected RV infections [38,39]. For the first study, it was administered as oral capsules to 480 patients, including 24 patients over 65 years old. Each capsule contains 132 mg of the drug. Two cohorts were formed, receiving only once 264 (2 doses) or 528 mg (4 doses). These two cohorts had better clinical scores than placebo one ($p = 0.319$), individually and combined. Likewise, the 268 mg cohort had less moderate or severe asthma exacerbation ($p = 0.563$), as well as the 528 mg cohort ($p = 0.632$), or both combined ($p = 0.942$). For the second study, 455 patients aged 18 to 75 received 264 or 528 mg of drugs. The treatment began the same day as randomization. No results were associated or published after the end of the trials.

In 2017, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial evaluated the efficacy of vapendavir against detected upper respiratory tract RV infection [41]. 65 patients, ranging from 12 to 75 years, should be recruited. The interval from symptom onset to study treatment initiation should be preferably within 72 h but up to a 5-day window is possible. Vapendavir should be administered once as tablets containing 264 mg of drugs. Unfortunately, the trial was withdrawn due to a company decision.

Eventually, a randomized placebo-controlled phase 2 clinical trial was conducted to evaluate the effect of vapendavir against COPD associated with enterovirus and rhinovirus infections [47]. Vapendavir will be administered, as soon as possible after the onset of symptoms and documentation of RV infection, but no greater than 48 h after symptom onset, twice daily as tablets containing 1000 mg (four then two daily tablets to inoculated volunteers from 40 to 75 years, for 7 days).

2.2. Viral Non-Structural Protein

The viral capsid is the first accessible target from the viral replication cycle. However, other targets were identified during viral replication or translation. In addition to structural proteins, enteroviruses possess non-structural proteins critical to the replication cycle. Several inhibitors were evaluated in clinical trials, and their chemical structures are represented in Figure 2.

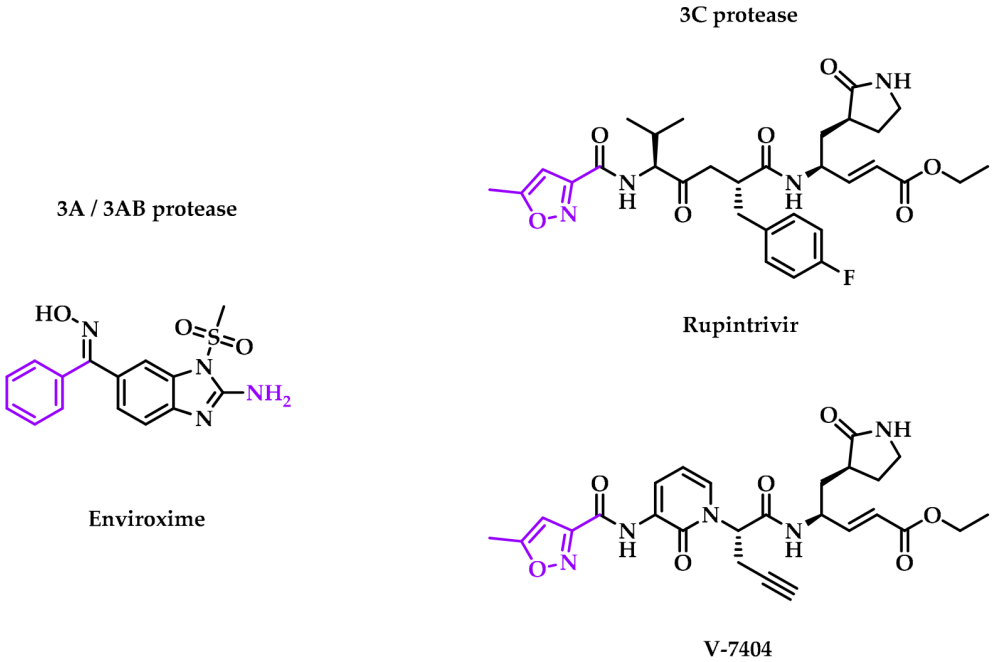


Figure 2. Structure of 3A/3AB and 3C inhibitors, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups and atoms in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

Table 2. Summary of clinical assays of non-structural protein inhibitors.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Target	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
20 July 1981	PC phase II	RV-A9	Inoculation (−24 h)	Enviroxime	3A/3AB protein	Nasal spray	18–50 years old	[48]
July 1982	Rdm DB PC phase II	RV-A39	Inoculation (−24 h)	Enviroxime	3A/3AB protein	Nasal spray/oral	18–36 years old	[49]
December 1982	Rdm DB PC phase II	RV	Inoculation (−24 h)	Enviroxime	3A/3AB protein	Nasal spray	NS	[50]
July 1983	DB PC phase II	RV-A9	Inoculation (−24 h)	Enviroxime	3A/3AB protein	Nasal spray	18–50 years old	[51]
January 1985	Rdm DB PC phase III	RV common cold	Inoculation (−44 h)	Enviroxime	3A/3AB protein	Nasal suspension	8–65 years old	[52]
February 2002	Rdm DB PC phase I	RV	/	Rupintrivir	3C protein	Nasal spray	18–50 years old	[53]
December 2003	Rdm DB PC phase II	RV-A39, RV-A21	Inoculation (−6/+24 h)	Rupintrivir	3C protein	Nasal spray	18–60 years old	[54]
July 2005	Phase I	RV	/	V-7404	3C protein	Oral formulation	18–55 years old	[55]
17 September 2021	Rdm DB PC phase I	EV	/	V-7404	3C protein	Oral solution	18–45 years old	[56]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset. The positive delay means that the treatment began after the virus challenge or symptoms onset. NS = not specified.

2.2.1. 3A/3AB Proteases

Enteroviral 3A protease was described as a promotor of binding between EV and the host cell phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KIII β) by its interacting with host factor ACBD3 [57]. Indeed, the replication of EV-A71 may depend on PI4KIII β even if the mechanism is not defined to date [58–60]. Thus, 3A protease seems to play a key role in replicating EV-A71 and EV-D68, but not for RV-A16. Enteroviral 3A protease comes from 3AB protease, which is cleaved by 3C protease [61]. The role of 3AB protease in EV replication is not well known. However, some RNA chaperone activity was identified for EV-A71 [62]. The protein recruits viral and host factors to form a replication complex important for viral replication. Both 3A protease and its precursor, 3AB protease, have membrane-binding properties.

- Enviroxime

Enviroxime (Lilly Research Laboratories, Indianapolis, IA, USA) is an inhibitor of EV and RV 3A /3AB protease [63]. It was one of the first anti-enteroviral compounds with a determined mechanism, which was studied in phase 2 clinical trials. In 1981, a placebo-controlled and a randomized, double-blind placebo-controlled study was published evaluating the efficacy against RV-A9 infections and RV-A39 infections, respectively [48,49]. Enviroxime was administrated by nasal route, as well as the inoculated virus. The treatment began 1 day before the virus challenge. 48 and 40 adults received 102 mg, four times daily for 6 days and one or three times daily for 8 days, respectively. The first study concluded that a decrease in mean daily nasal secretion weights was observed in the active cohort (p = 0.02). However, there is no significant difference in clinical score between cohorts (p = 0.28) or viral quantity in nasal washings (p = 0.16). A slightly substantial difference from the third day for rhinorrhea was observed. There is a negative correlation between quantitative indices of RV infections and drug quantity. Enviroxime was well tolerated except for one patient who presented nausea due to the active ingredient. The second study measured no significant protection against RV-A39 infections versus placebo.

In 1982, two randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 and phase 2 clinical trials were performed against natural RV common cold and general rhinovirus infection, respectively [50,51]. The two studies gathered 1020 patients with signs of infection and 99 inoculated patients to receive 42 mg (four then two doses per day) and 16 mg (a daily dose) weekly of enviroxime by nasal route. The treatment began 1 day before the virus challenge. The first study concludes that there is limited benefit due to the need for clear reproducibility of the administration or the little practical importance of delivering media. Unlike these first conclusions, most of the results of the second study were identified as negative for the drug administration.

Finally, a last double-blind placebo-controlled phase 2 clinical study evaluating enviroxime against inoculated RV-A9 infection was published in 1983 [52]. The treatment began 44 h before virus challenge. A total of 41 patients were recruited, ranging from 18 to 64 years, to receive 284 µg of drug per nostril, six times a day, for 5 days, as a nasal spray solution. The mean clinical score of enviroxime-treated patients was significantly lower than the placebo cohort on day 5 (p = 0.04). However, no differences were identified in nasal secretions in both cohorts.

2.2.2. 3C Protease

As described previously, 3C protease cleaves the viral polyprotein at eight sites, including those to release 3AB and 3A proteases [61]. Due to the role 3C protease plays in EV processing, it makes the protease an essential target against EV. Indeed, 3C-protease inhibitors tend to be more effective than enviroxime and pleconaril, which were more effective than vapendavir and pirodavir [64]. The 3C protease is a protease found in picornaviruses and performs several functions. In coxsackieviruses, 3C protease activates apoptosis via several caspases (caspase-3, caspase-8, and caspase-9) [65]. Moreover, in rhinoviruses, 3C protease targets OCT-1 transcription factor for proteolytic cleavage [65,66].

These aspects make this a target to be favored. Promising molecules have been evaluated in clinical trials since discovering the role of 3C protease inhibitors.

- Rupintrivir

The historic 3C inhibitor of enterovirus is rupintrivir (Agouron Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA), first synthesized in 1999 [67]. Three years later, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 clinical trial was published to evaluate the pharmacokinetic parameter of the RV inhibitor [53]. The drug was delivered to 36 male patients, ranging from 18 to 50 years, as a nasal spray solution containing 4 or 8 mg, one or six times per day, for 7 days. Rupintrivir was measured with low concentration (<0.52 ng/mL in plasma and <2% in nasal wash) at the end of treatment. Few metabolite concentrations were also observed. However, rupintrivir was identified as safe and well tolerated over time, with substantial drug detection for 9 h after administration.

In 2003, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was published to evaluate the efficacy of rupintrivir against RV-A39 and RV-A21 infections [54]. The virus was administered to patients as nasal drops. A dose was given 6 h prior to the viral challenge for the prophylaxis study and 24 h after for the treatment. A total of 8 mg of the drug was delivered two or five times a day for 7 days to 202 patients (83 males and 119 females), ranging in age from 18 to 60 years, as a nasal spray solution. The active cohort had lower mean total daily symptoms than the placebo cohort ($p = 0.014$) and a higher incidence reduction on viral culture ($p = 0.04$–2 doses per day group/$p = 0.03$–5 doses per day group). It also has a decrease in viral titers ($p < 0.05$) but no significant difference in cold cases. The mean cumulative nasal discharge was lower for drug-treated patients ($p = 0.05$–2 doses per day group/$p = 0.12$–5 doses per day group). Finally, no significant local nasal adverse effects were declared.

- V-7404

In 2005, a phase 1 clinical trial was published to evaluate the pharmacokinetic parameters of anti-rhinoviral V-7404 (Pfizer Global Research and Development, San Diego, CA, USA), a rupintrivir derivative, administered in one single dose orally for fasted or fed patients [55,68]. The oral route has more risk of adverse effects than the nasal route but can access other RV replication sites for diseases localized elsewhere than in the respiratory tract. A total of 14 male patients, ranging from 18 to 50 years, received 200, 500 (fasted or fed), 1000, or 2000 mg of drug. The study concluded that for 500 mg doses, the free maximum serum concentration (C_{max}) was superior to the compound's half maximal effective concentration (EC50), inhibiting 80% of RV serotypes.

In 2018, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 clinical trial was conducted to evaluate the V-7404 safety and pharmacokinetic parameters against EV infections [56]. For this study, 77 patients (33 males and 44 females) aged 18 to 45 years were recruited to receive an oral solution. Different weights (200, 500, 1000, and 2000 mg) were tested in one single dose or one or two doses per day for 2 weeks. V-7404 was well tolerated, even with multiple doses, and with acceptable safety. Only mild or moderate treatment-emerged adverse effects were observed. The drug was adsorbed in less than an hour, and its half-life took between 0.3 and 2.3 h. The plasma concentration of the drug was quickly under detection, which was the limit of measurement tools. This is why an exponential decrease in its plasma concentration was observed. Pharmacokinetic parameter quality increases with a dose-proportional factor. At last, fed patients have a longer time to reach maximum serum concentrations than fasted ones.

2.3. Targeting Human-Coded Protein Promoting Enterovirus Replication

Some molecules also target human enzymes, and human-coded proteins, which imply a reduction of viral charge and try to avoid any major side effects. They target cell metabolism functions that enteroviruses use to replicate. Inhibiting these steps needs to balance the viral activity reduction and the cell's vital task. Some compounds, represented in Figure 3, were evaluated in several clinical trials (Table 3).

Table 3. Summary of clinical assays of drugs targeting cell metabolism.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Target	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
January 1987	Rdm DB PC phase II	RV-A39	Inoculation (−1 day)	Atropine Methonitrate	Anticholinergic	Nasal spray	>18 years old	[69]
23 July 2020	Rdm DB PC phase III	EV, RV	Inoculation	CUR-N399	PI4KIII β	Oral capsule	>18 years old	[70]
September 2010	Rdm DB PC phase II	RV-A39	Inoculation (−3 h)	Oxymetazoline	α-Adrenoreceptor	Intranasal liquid	18–65 years old	[71]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset.

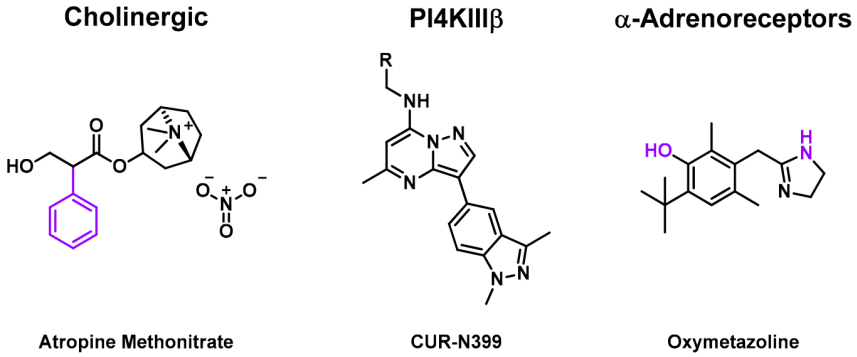


Figure 3. Structure of cholinergic, phosphatidylinositol 4-kinase beta (PI4KIII β), α-adrenoreceptor inhibitors, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups and atoms in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

2.3.1. Cholinergic Receptors

Cholinergic receptors play a significant role in signal transduction in the nervous system [72]. In 1987, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trials were published to evaluate the efficacy of atropine methonitrate (Vick's Research Center, Shelton, CT, USA), a known cholinergic antagonist, against RV-A39 infections in inoculated patients [69,73]. The treatment began 1 day before virus challenge. Even if the cholinergic mechanisms in common colds were not clearly defined, the study recruited 30 adults to receive in one time two injections of nasal spray solution per nostril containing 250 or 500 µg of the drug. Patients had to repeat the treatment four times per day for 5 days. No significant effects on nasal symptoms in the active cohort were observed, but nasal mucus production was reduced for 250 µg-treated patients with a four-daily prescription. However, for this concentration assay, the placebo weight of nasal mucus in the placebo cohort was higher than for other concentrations. At last, for high doses of drugs, some nasal adverse effects were detected.

2.3.2. Phosphatidylinositol 4-Kinase Beta (PI4KIII β)

As previously described, PI4KIII β plays a critical role in EV replication, including EV-A, EV-D and CVB [74]. EV binding with PI4KIII β leads to a change of a cellular in endomembranes to build replication organelles, which protect EV RNA during the genome replication. In 2021, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 clinical trial was begun to assess the efficacy of CUR-N399 (Curovir AB) against chronic obstructive pulmonary disease (COPD) due to inoculated enterovirus or rhinovirus infections [70]. The delay between treatment initiation and virus challenge was not reported. CUR-N399 is a PI4KIII β inhibitor, especially against EV-A71 infections [75]. Oral capsules were distributed to 74 adults having either a drug or placebo inside. Two types of study were decided. The first delivered one dose to patients containing 2.5, 7.5, 17.5, 35 or 50 mg. The other was a multiple-dose study. For 7 days, patients received 10, 25, or 50 mg per day. Currently, the results have not been published.

2.3.3. α-Adrenoceptor

α-Adrenoceptors are divided into two subtypes (α1-adrenoceptors and α2-adrenoceptors) with a large panel of effects on human cell behavior. Contrary to β-adrenoceptor, they interact globally for smooth muscle contraction, glycogenosis, adenylyl cyclase inhibition, intracellular cAMP reduction, neurotransmitter release, or central vasodilation reduction [76,77]. It was shown that oxymetazoline reduces in vitro expression of the intracellular adhesion molecule (ICAM) 1 receptor, which is the major receptor used by RV to enter human cells. In 2007, oxymetazoline, an α-adrenoceptor agonist, was used in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial against inoculated RV-A39 infections [71,78]. The treatment began 3 h after the virus challenge. It was used for many

years to relieve nasal congestion and obstruction during common colds. It was shown that oxymetazoline reduces in vitro expression of the intracellular adhesion molecule (ICAM) 1 receptor, which is the major receptor used by rhinoviruses to enter human cells [83]. The drug is administrated as an intranasal liquid solution containing 22.5 µg of drug diluted in 45 µL of citrate buffer three times a day for 5 days. A total of 94 patients (45 males and 49 females), ranging from 18 to 64 years, were recruited to assess the study. On the second day of treatment, a lower virus titer was observed in the active cohort ($p = 0.04$). No medication-caused severe adverse effects were identified except 2, one for the active cohort and one for the placebo.

2.4. Unknown or Other Mechanisms of Action

In addition, some inhibitors of enterovirus were developed without identification of the intended target or because they were like other pathogens (viruses, bacteria, etc.) and reduced symptoms from close diseases.

2.4.1. Anti-Rhinovirus

In the 1950s, some anti-rhinovirals were developed without identifying the viral part targeted and evaluated in clinical trials (Table 4) to assess their efficacy, as represented in Figure 4. Clinical trials were performed using nasally administered rhinoviruses.

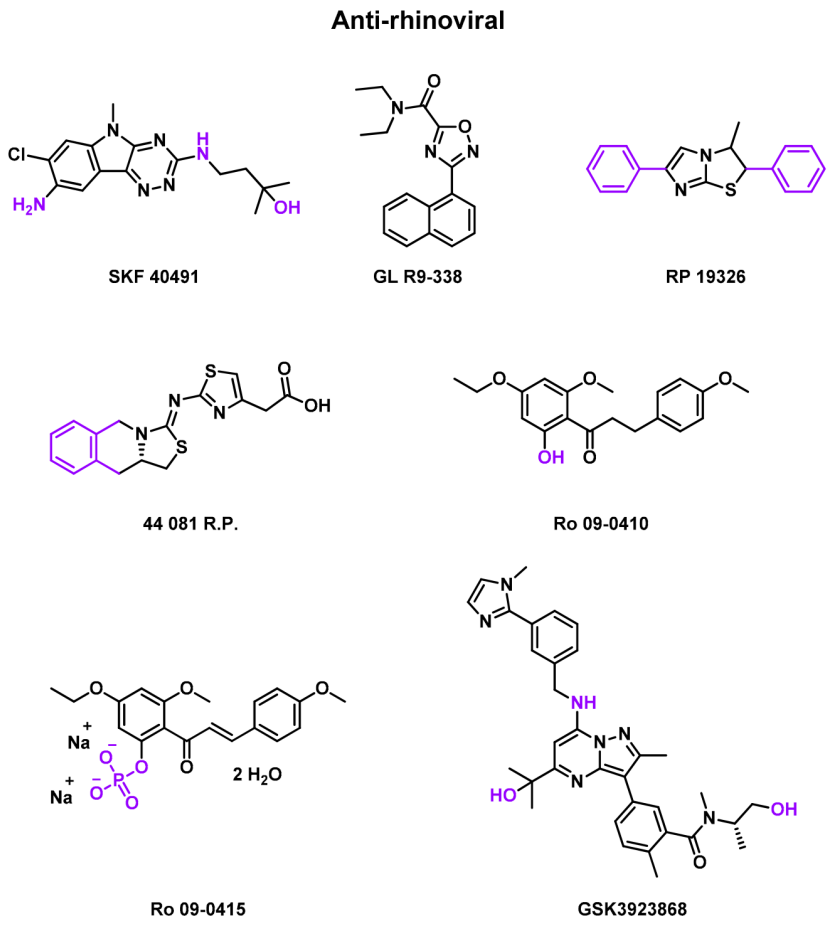


Figure 4. Structure of anti-rhinoviral compounds, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups and atoms in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

Table 4. Summary of clinical assays of drugs with unknown mechanism of action against Rhinoviruses.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
July 1976	Rdm DB PC phase II	RV-B3	Inoculation (−1 day)	SKF 40491, GL R9-338, RP 19326	Solution spray/suspension drop	18–50 years old	[79]
October 1984	Rdm DB PC phase II	RV-A9	Inoculation (−1 day)	Ro 09-0415	Oral capsule	18–50 years old	[80]
May 1985	Rdm PC phase II	RV-EL, RV-1B	Inoculation (−1 day)	44 081 R.P.	Nasal spray	18–50 years old	[81]
December 1987	DB PC phase II	RV-A2	Inoculation	Ro 09-0410	Nasal spray	>18 years old	[82]
July 1990	Phase II	RV-A2	Inoculation	Ro 09-0410	DMSO solution	18–50 years old	[83]
13 May 2022	Rdm DB PC phase I	Asthma with RV	Inoculation	GSK3923868	Inhalation powder	18–65 years old	[84]
26 May 2022	Rdm DB PC phase I	COPD with RV	Inoculation	GSK3923868	Inhalation powder	18–65 years old	[85]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset.

- Rhône Poulenc (RP) studies

Rhône Poulenc was one of the first laboratories to synthesize some anti-rhinoviral candidates evaluated in clinical trials. In 1976, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was published to evaluate the efficacy of SKF 40491 (Smith Kline and French Laboratories, Philadelphia, PA, USA), GL R9-338 (Glaxo Laboratories, Greenford, England), and RP 19326 (Rhône Poulenc, Vitry-sur-Seine, France) against RV infections [79]. The treatment began 1 day before the virus challenge. As a solution spray or a suspension drop, these compounds were delivered to 89 patients with one dose of 1, 6.8, and 15 mg per day respectively. Unfortunately, the in vivo half-time of these drugs was too short to observe striking clinical improvement.

Rhône Poulenc conducted another randomized placebo-controlled phase 2 clinical trial in 1987 to evaluate the effect of 44 081 R.P. (Rhône Poulenc, Vitry-sur-Seine, France) against inoculated RV-EL and RV-1B infections [81]. The treatment began 1 day before the virus challenge. A total of 58 patients were recruited to receive 300 µg of the drug or placebo six times daily for 6 days. Again, no significant efficacy was observed against RV infections.

- Roche (Ro) studies

Roche also performed three phase 2 clinical trials to measure the efficacy of one different compound each time against RV infections. In 1984, the first randomized, double-blind, placebo-controlled study was published to evaluate the effect of Ro 09-0415 (Nippon Roche KK, Kamakura, Japan) against inoculated RV-A9 infections [80]. The treatment began 15 h before the virus challenge. The drug was delivered as an oral capsule, containing 100 mg of the drug, twice daily, for 6 days, to a part of 57 patients. The study concluded with no significant prevention or decrease in the severity of the infection. This can be explained by the compound's too-low concentration reaching the nasal mucosa. Moreover, the treatment formulation seemed to be an irritant when used intranasally.

In 1987, a Ro 09-0410 (Nippon Roche KK, Kamakura, Japan & Roche Research Laboratory, WeLyn Garden City, United Kingdom) dephosphorylated Ro 09-0415 against RV-A2 infections report study was published [82]. Ro 09-0410 inhibits RV uncoating [86]. A total of 50 mg of the drug was sprayed in 0.05 mL of nasal solution, three times per nostril and three times daily, for 5 days. This double-blind placebo-controlled study recruited 50 adults. No prevention of viral infections was observed, but there was a tendency to lower the virus shedding and the antibody response and increase the nasal secretion ($0.01 < p < 0.05$).

Finally, in 1990, another phase 2 clinical trial was published, evaluating the effect of RV-A2-resistant at the same drug (Ro 09-0410) delivered this time in an oral solution [83]. 42 patients were recruited. The main goal of this study was to evaluate the effect of wild-type viruses versus resistant-induced viruses. Thus, no in vivo evaluation of the drug was performed.

- GlaxoSmithKline (GSK) studies

Finally, GlaxoSmithKline's laboratory is conducting two randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 clinical trials, which began in 2022, for its compound GSK-3923868 (GlaxoSmithKline Research & Development Limited, London, United Kingdom) against asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) during rhinovirus infections [84,85]. The treatment began after a viral challenge. Both studies recruited 68 patients, ranging from 18 to 64 years, divided into two cohorts, where the active cohort received the drug as an inhalation powder.

2.4.2. Broad Spectrum Antiviral

Numerous rhinovirus inhibitors were developed and studied in clinical trials. However, many other broad-spectrum antivirals have also been evaluated against EV infections (Table 5) and other upper respiratory tract infections caused by viruses. They are represented in Figure 5.

Table 5. Summary of clinical assays of broad-spectrum antiviral against Enteroviruses.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
March 1973	DB PC phase II	RV-A9, RV-A13	Inoculation (−1 day)	Isoprinosine	Oral tablet	18–50 years old	[87]
April 1974	DB PC phase II	RV-A32, RV-B44	Inoculation	Isoprinosine	Oral tablet	25–48 years old	[88]
March 1977	Rdm DB PC phase II	RV-A21	Inoculation	Isoprinosine	Oral tablet	>18 years old	[89]
18 July 2018	Rdm DB PC phase III	EV, RV	Naturally occurred (+40 h)	Nitazoxanide	Oral tablets	>12 years old	[90]
13 May 2020	Rdm DB PC phase III	EV, RV	Naturally occurred (+72 h)	Nitazoxanide	Oral tablets	>12 years old	[91]
May 1970	Rdm DB PC phase II	RV-A9	Inoculation (−1 day)	UK2054	Oral formulation	NS	[92]
December 1973	DB PC phase II	RV-A24	Inoculation (−1 day)	DIQA	Oral capsule	21–42 years old	[93]
14 January 2017	Rdm DB PC phase II	Upper respiratory	Naturally occurred	ARM-1	Oral spray	18–43 years old	[94]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset. The positive delay means that the treatment began after the virus challenge or symptoms onset. NS = not specified.

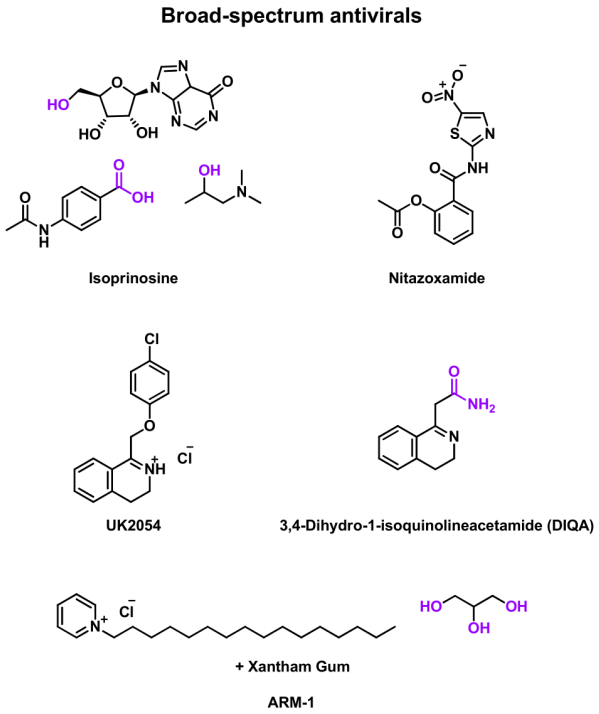


Figure 5. Structure of broad-spectrum antiviral compounds, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups and atoms in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

- Isoprinosine (Inosiplex®)

For instance, isoprinosine (Newport Pharmaceuticals, Newport Beach, CA, USA), a combination of inosine, acetamidobenzoic acid, and dimethylaminoisopropanol, has a broad spectrum against several viruses [95]. Three double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trials were published between 1973 and 1977 to evaluate the effect of isoprinosine delivered as an oral tablet against inoculated viruses. The treatment for all trials began 1 day before the virus challenge. The first study targeted RV-A9, and RV-A13 [87]. 55 patients were recruited. They received 6 g daily for 7 days. No significant differences were identified between placebo or drug treatment [96].

In 1974, another clinical trial focused on RV-B30 and RV-B44 infections [88]. A total of 37 males received 1.5 g of the drug or placebo four times. A slight clinical improvement was observed for drug-treated patients, but it was not significant enough to prove the drug's efficacy on these RV serotypes [96].

Finally, a third randomized study was published to evaluate the effect against RV-A21 [89]. A total of 39 patients were recruited to receive oral tablets. In the active cohort, patients received daily 4 g of the drug for 5 or 7 days. This time, significant reductions in clinical illness and viral shedding were observed [96]. Indeed, the active cohort had a lower mean symptom score ($p = 0.04$) or cumulative symptoms score ($p < 0.001$). However, no significant difference was identified in mean symptom durations ($0.05 < p < 0.1$).

Consequently, isoprinosine is active against RV-A21 and slightly effective against RV-B30 and RV-B44 but not against RV-A9 and RV-A13. No adverse effects caused by the drug were identified. Clinical trials with more patients in cohorts could clarify the efficacy of this drug against RV infections.

- Nitazoxanide

Another actor developed a compound series of broad-spectrum antivirals. In 2018, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 clinical trial was performed to evaluate the efficacy of nitazoxanide (Romark Laboratories L.C.) against EV and RV infections [90]. A total of 1756 suspected infected adults were recruited to receive 300 mg

of the drug twice daily for 5 days. The onset of illness was no more than 40 h before enrollment in the trial. Here, the onset of illness is defined as the first time at which the subject experienced rhinorrhea, cough, sore throat or nasal obstruction. The drug is administered by oral tablets. A slight improvement in infection management was observed in the active cohort. For instance, it takes a quicker time from the first dose to symptom response (p = 0.4009) or time to regain the ability to perform normal activities (p = 0.1923) than the placebo cohort. Likewise, less complications were observed for drug-treated patients (p = 0.2057). Eventually, they also had a lower proportion of positive for EV/RV RT-PCR for day 7 (p = 0.0132). In 2020, a second phase 3 clinical trial began under the same conditions as the previous study, adding a vitamin super B-complex administered to 800 suspected infected adults with either drug or placebo [91]. The onset of symptoms should be no more than 72 h before enrollment in the trial. In that case, the onset of symptoms is defined as the earlier of the first time at which the subject experienced subjective fever or any respiratory symptom (head, throat, nose, chest, or cough symptoms). Currently, this study is still recruiting patients. This clinical trial can be considered as a change of formulation in the first trial.

- Others

Some other laboratories submitted several antivirals to evaluate their efficacy against upper respiratory or RV infections. In 1963, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was performed to measure the effect of UK2054 (Messrs Pfizer Ltd., Shibuya City, Japan) against inoculated RV-A9 infections [92]. The treatment began 1 day before the virus challenge. 60 patients were divided into two equal cohorts. No antiviral activity was found in this trial.

In 1973, a double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was published to assess the effect of 3,4-dihydro-1-isoquinolineacetamide (DIQA) (Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, USA) against inoculated RV-A24 infection [93]. The treatment began 1 day before the virus challenge. Among 21 male volunteers, ranging in age from 21 to 42, 10 received 500 mg of the drug at one time in an oral capsule. No significant difference in cold reduction was observed even if the active cohort's symptoms were milder (rhinorrhea).

Finally, in 2013, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial was conducted to evaluate the efficacy of ARM-1 (ARMS Pharmaceutical LLC/Oasis Consumer Healthcare) in preventing upper respiratory, including rhinovirus infections [94]. ARM-1 is a formulation of cetylpyridinium chloride, mixed with glycerin and xanthan gum, already identified as an antiviral [97]. The study recruited 94 healthy patients (48 males and 46 females) aged 18 to 43 years to receive oral spray solutions. As a prophylactic treatment, no delay between symptom onset and treatment initiation was reported. This spray contained either a placebo or a drug. Patients sprayed three doses, three times daily, for 75 days. A lower detected upper respiratory infection (p = 0.41) and cough symptom (p = 0.012) were compared to the placebo cohort in the active cohort. Between days 5 and 9, drug-treated patients had a lower duration of non-fever symptoms (p = 0.019). The drug seemed to be safe and well-tolerated, with a reduction of symptoms and no drug-related adverse effects. However, some limitations were identified, such as the slight power of the drug in URI incidence and the lack of patients with symptoms. Future studies may be performed on multiple sites and seasons for more significant results.

2.4.3. Other Drug Repurposing

Eventually, some drug repurposing led to phase 2 clinical trials against RV infections. They are described in Table 6. In 1990, a randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of nedocromil sodium (Fisons pic, Pharmaceutical Division), an anti-asthmatic compound represented in Figure 6, against RV-A9 and RV-B14 infections was published [98,99]. The virus was nasally administered to human volunteers. The treatment began 1 day before the virus challenge. A total of 49 patients were recruited to receive a placebo or drug as a nasal spray solution. The active cohort was exposed to 1.3 mg of the drug in 0.13 mL per nostril, four times daily, for one week. The study concluded

with a lower nasal secretion for drug-treated patients ($p < 0.05$). Assays of drug tolerance identified no risk for nedocromil sodium with no significant local irritation. However, no difference was observed in the frequency of viral shedding efficacy with no activity in vitro.

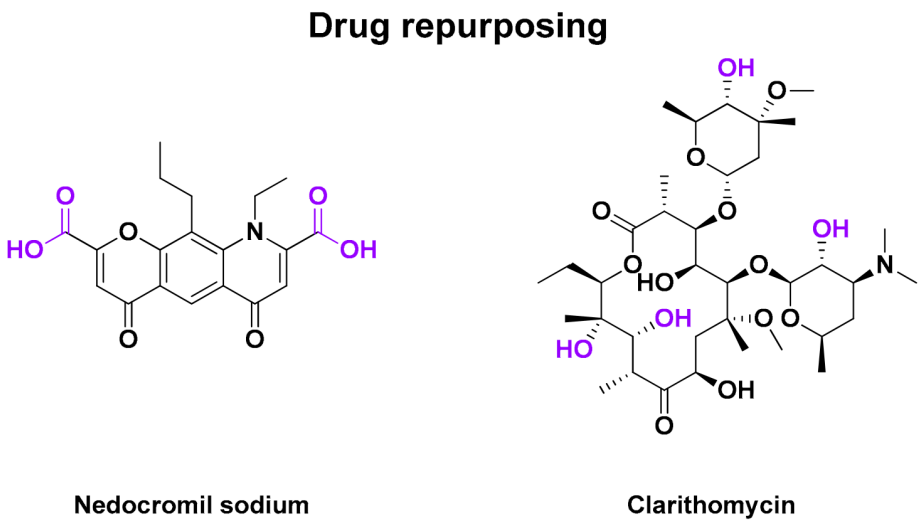


Figure 6. Structure of drug repurposing for antiviral compounds, which were evaluated in clinical trials. Chemical groups and atoms in purple are chemical functions that can lead to the fusion or the attachment of a linker to form an MTDL.

In 2000, a second drug repurposing led to a randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy of clarithromycin against RV-A16 infections [100]. Clarithomycin is an antibiotic for treating pulmonary diseases or skin and ORL infections [101]. Its structure is represented in Figure 6. The virus was inoculated into patients. The treatment began 1 day before the virus challenge. Treatment was delivered as two daily oral capsules, each containing 500 mg of the drug or 160/800 mg of control (trimethoprim-sulfamethoxazole), for 8 days. A total of 24 adults were recruited and divided into two cohorts. The drug-treated patients had no clinical effects compared to the control antibiotic cohort.

Table 6. Summary of clinical assays of other drugs against Enteroviruses.

Publication Date	Type of Study *	Virus/Disease	Type of Infection (Time to Treatment Interval) †	Drug	Type of Drug	Pharmaceutical Form	Patient Age	Ref.
January 1990	Rdm DB PC phase II	RV-A9, RV-B14	Inoculation (−1 day)	Nedocromil sodium	Mast cell stabilizer	Nasal spray	18–50 years old	[98]
15 April 2000	Rdm DB PC phase II	RV-A16	Inoculation (−1 day)	Clarithromycin	Antibiotic	Oral capsule	>18 years old	[100]

* Rdm = randomized; DB = double–blind; PC = placebo-controlled. † Negative delay means that the treatment began before the virus challenge or symptoms onset.

Part 2: Filters to obtain an effective broad-spectrum anti-enterovirus drug.

2.5. Candidates' Selection for MTDL Strategy

Several criteria must be evaluated to select candidates for MTDL design. One of the first is the number of enteroviruses inhibited by the compound. For instance, some capsid binders are not effective anymore against RV-C, due to modified conformation of the VP1 capsid protein compared to other EVs [102–104]. However, combining different compounds in an MTDL can be complementary to target all the enterovirus of interest. Another main criterion to consider is the inhibitor's potency against viruses, either in vitro or in vivo. This parameter is not sufficient to select candidates. Indeed, additive, antagonist, or synergistic effects must be considered between pharmacophores included in MTDL. These effects are evaluated in combination assays.

2.5.1. Combination of Two Compounds

The association of drugs can lead to an additive, an antagonist, or a synergistic effect of all drugs involved in vitro or in clinical practice. Additive effects can be produced by equivalent or overlapping actions (retinoic acid and trichostatin A) or independent actions (doxorubicin and trabectedin) [105]. A synergistic effect can be created with several interactions: anti-counteractive actions (cisplatin and topotecan) [106], complementary actions (celecoxib and emodin) [107] or facilitating actions (gentamycin and vancomycin) [108]. Eventually, some drug–drug interactions may modify the efficacy of a mono target by interacting with human pharmacodynamics with additive or antagonistic combinations [22].

To date, no combinations of drugs have been evaluated in clinical trials. This is why we have only considered in vitro assays. All results are presented in Table 7A–C, depending on the methodologies used.

A total of 44 combinations of enterovirus inhibitors were identified. They comprise two classes of inhibitors: direct-acting agents and compounds targeting human-coded protein promoting enterovirus replication.

Two capsid binders (pleconaril and compound **1**) were evaluated in a combination study [109]. Both have different targets in the capsid, and the authors described the synergistic effect of their combination.

Pleconaril also had a strong synergistic effect in combination with other compounds such as rupintrivir, a 3C protein inhibitor, and vemurafenib, an antiproliferative drug [110]. Combination of pleconaril with the 2C protein inhibitor, guanidine HCl, led to a synergistic effect, while pleconaril and oxoglaucine, an autophagy stimulator had an additive effect when combined. At last, the combination of pleconaril and MDL-860, a PI4KIII β inhibitor, had a synergistic effect against CVB3 and an additive one against CVB1 [111,112].

MDL-860 had different synergistic effects depending on the targeted type of virus. Indeed, against CVB1, combinations with either guanidine. HCl or oxoglaucine led to an additive effect, while against CVB3, respectively synergistic and strong synergistic effects were observed [111,112].

Arildone, another capsid binder, had strong synergistic combinations with PTU-23, a 37S and 20S (RF) RNA inhibitor, and HBB, an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitor [111,112]. On the contrary, arildone and enviroxime, a 3A inhibitor, led to an antagonistic effect when combined.

Disoxaril is also a capsid binder evaluated in several combination assays [111,112]. Combined with PTU-23 or HBB, it led to a strong synergistic effect too, while the combination of disoxaril and enviroxime possessed a synergistic effect.

This last compound, enviroxime, had a strong synergistic effect when combined with PTU-23, HBB, and S-7, which prevents viral uncoating [111–113]. Likewise, combinations with HBB and either PTU-23 or S-7 had a strong synergistic effect [111,112].

Furthermore, 3C protease inhibitors have also been evaluated in combination assays.

Rupintrivir, like pleconaril, possessed a strong synergistic effect combined with vemurafenib [110]. Likewise, rupintrivir and interferon-α seemed to lead to a strong synergistic

effect [114]. A combination of rupintrivir and cycloheximide, a 60 S subunit of eukaryotic ribosome inhibitor, led to a synergistic effect [110]. However, vemurafenib and cycloheximide were too cytotoxic to be considered a human application. Other compounds, like remdesivir (RdRp inhibitor), dalbavancin (cell well synthesis and anchoring mechanism inhibitor), or anisomycin (a ribosome protein inhibitor), had a lower synergistic effect combined with rupintrivir [110]. When emetine, an NF-κB inhibitor, and rupintrivir were combined, we observed an additive effect [110]. At last, combinations with digoxin (parasympathic system stimulator), homoharrigtonine (anticancer drug), halofuginone (anticancer drug), obatoclax (Bcl-2 inhibitor), or gemcitabine (nucleoside analog) led to antagonistic effect [110].

V-7404, another 3C protease inhibitor, similarly had a strong synergistic effect with capsid binders, pocapavir and vapendavir [115].

However, when we combined rupintrivir and suramin, a capsid inhibitor that binds with the vertex of the fivefold axis, only an additive effect was observed [116]. The combination of capsid binder targeting the hydrophobic pocket and 3C protease inhibitor led to a strong synergistic effect, regardless of the compounds used.

Some combination assays were performed including other compounds against enteroviruses.

Suramin has been evaluated in combination assays with other compounds [116]. Combined with favipiravir, an RdRp inhibitor, a strong synergistic effect was observed, while a combination with itraconazole, a 14α-demethylase inhibitor, led to an antagonistic effect. Both favipiravir and itraconazole, had a strong synergistic effect when they were combined with rupintrivir, but they had antagonistic effects between themselves [116]. Itraconazole was also combined with GW5074, a c-RAF inhibitor, and an antagonistic effect was observed [116].

BPROZ-194, a PI4KIII β inhibitor, also had a synergistic effect with vapendavir [117].

The early stage of enterovirus replication inhibitor YZ-LY-0 was combined with NITD008, an RdRp inhibitor, and GPP3, a capsid binder [118]. Their combinations respectively led to antagonistic and synergistic effects. The antagonistic effect appeared to be inversely proportional to the concentration of YZ-LY-0, while the synergistic effect did not appear to vary greatly with this concentration. Both NITD008 and GPP3 had a strong synergistic effect when they were combined with NK-1.8k [119].

Eventually, likewise, the synergistic effect of the gemcitabine and ribavirin combination seemed to be favored when the gemcitabine's concentration increased [120].

Table 7. (**A**) Synergistic effect of several inhibitors, measured by MacSynergy II synergistic effect [μM^2%] *. (**B**) Synergistic effect of several inhibitors, measured by SynergyFinder ZIP score *. (**C**) Synergistic effect of gemcitabine with several concentration of ribavirin, measured by CompuSyn combination index.

(A)

Synergistic Effect [μM^2;%] ‡	Virus	Pocapavir (V-073)	Vapendavir (BTA798)	Pleconaril	Disoxaril	Arildone	Enviroxime	HBB	MDL-860	NITD008	GPP3	Itraconazole	Favipiravir	Suramin	Ref.
AG-7404/V-7404	PV Sabin 1	580	463	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	[115]
	PV Sabin 2	459	245	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	PV Sabin 3	288	579	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
MDL-860	CVB1 Connecticut	/	/	22.5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	[111,112]
	CVB3 Woodruff	/	/	61.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Guanidine.HCl	CVB1 Connecticut	/	/	58.4	/	/	/	/	47.5	/	/	/	/	/	
	CVB3 Nancy	/	/	/	/	/	/	/	1.1	/	/	/	/	/	
	CVB3 Woodruff	/	/	56.2	/	/	/	/	83.9	/	/	/	/	/	
Oxoglaucine	CVB1 Connecticut	/	/	27.0	/	/	/	/	7.8	/	/	/	/	/	
	CVB3 Nancy	/	/	/	/	/	/	/	220.6	/	/	/	/	/	
	CVB3 Woodruff	/	/	18.6	/	/	/	/	151.0	/	/	/	/	/	
Enviroxime	CVB1 Connecticut	/	/	/	82	−39 [a]	/	253	/	/	/	/	/	/	
PTU-23	CVB1 Connecticut	/	/	/	314	519	373	275	/	/	/	/	/	/	
HBB	CVB1 Connecticut	/	/	/	689	852	253	/	/	/	/	/	/	/	
S-7	CVB1 Connecticut	/	/	/	/	/	399	368	/	/	/	/	/	/	
Compound 1	CVB4 Edwards	/	/	147	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	[109]
YZ-LY-0 0.125 μM	EV-A71	/	/	/	/	/	/	/	/	−400–−300	0–100	/	/	/	[118]
1 μM	SK-EV006	/	/	/	/	/	/	/	/	−100–0	0–100	/	/	/	
Rupintrivir	EV-A71 FY573	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	450.64	438.07	4.96	[116]
Favipiravir	EV-A71 FY573	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	−88.11	/	337.59	
Suramin	EV-A71 FY573	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	−246.23	337.59	/	
GW5074	EV-A71 FY573	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	−167.68	/	/	

Table 7. *Cont.*

(B)				
ZIP Synergy Score [−30/30] †	**Virus**	**Pleconaril**	**Rupintrivir**	**Ref.**
Rupintrivir	E1 Farouk (A549 cells)	18.0	/	[110]
	E1 Farouk (RPE cells)	18.9	/	
Vemurafenib	E1 Farouk (A549 cells)	13.6	15.6/16.00	
	E1 Farouk (RPE cells)	20.2	17.2	
Pleconaril	E1 Farouk (A549 cells)	18.0/18.3	18.0/18.3	
	E1 Farouk (RPE cells)	18.9	18.9	
Cycloheximide	E1 Farouk (A549 cells)	/	10.7	
Remdesivir	E1 Farouk (A549 cells)	/	8.23	
Dalbavancin	E1 Farouk (A549 cells)	/	8	
Anisomycin	E1 Farouk (A549 cells)	/	6.39	
Emetine	E1 Farouk (A549 cells)	/	4.1	
Digoxin	E1 Farouk (A549 cells)	/	−5.6	
Homoharringtonine	E1 Farouk (A549 cells)	/	−5.7	
Halofuginone	E1 Farouk (A549 cells)	/	−7.5	
Obatoclax	E1 Farouk (A549 cells)	/	−7.8	
Gemcitabine	E1 Farouk (A549 cells)	/	−8.7	

(C)						
Concentration of Ribavirin (μM)	**25**	**50**	**100**	**200**	**400**	**Ref.**
Combination Index with 0.4 μM of gemcitabine ° (CVB3 on Vero cells)	0.28	0.23	0.15	0.14	0.14	[120]

(A) * Compounds evaluated in clinical assays have their rows and columns shaded. ‡ Synergistic effect (SE) is calculated using the MacSynergy II software. It measures strong synergistic effect (if SE > 100 μM^2%), synergistic effect (if 50 μM^2% < SE < 100 μM^2%), additive effect (if 0 < SE < 50 μM^2%) and antagonistic effect (if SE < 0 μM^2%). [a] Combination of enviroxime and arildone led to an antagonism effect measured at −39 μM^2%. (B) * Compounds evaluated in clinical assays have their rows and columns shaded. † ZIP Score is calculated using SynergyFinder version 3 software. It measures strong synergistic effect (if ZIP Score > 15), synergistic effect (if 5 < ZIP Score < 15), additive effect (if −5 < ZIP Score < 5) and antagonistic effect (if ZIP Score < −5). (C) ° Combination Index (CI) is calculated using CompuSyn software (https://compusyn.software.informer.com/, accessed on 30 June 2024). It measures synergistic effect if it's inferior to 1 (CI < I), additive effect if equal to 1 (CI = 1), antagonist effect if superior to 1 (CI > 1).

2.5.2. Combination of Three Compounds

Some assays were performed by combining three compounds in vitro to improve the efficacy of compound combinations and avoid viral resistance.

Some triple consecutive alternating administration (CAA) combination assays were performed by the Galabov Bulgarian team, namely one drug per day in 3-day cycles. They combined disoxaril, guanidine hydrochloride, and oxoglaucine (DGO) against CVB1 and CVB3 [121–124]. Other CAA combination studies were led by the same team substituting disoxaril with pleconaril (PGO combination) or guanidine-hydrochloride by MDL-860 (PMO combination) against the same viruses [121–127]. These first assays were performed to decrease the resistance established with a combination of disoxaril and enviroxime [128]. In this type of experiment, order of administration seems essential: first, a capsid binder, then a 2C protease inhibitor, and finally, an active compound in the early stage of viral replication. Other orders of administration showed less or no inhibition of viral proliferation. Likewise, adding PTU-23 to make a 4-day cycle suppresses the antiviral potency. DGO combinations are more effective than PGO combinations. Substituting guanidine-hydrochloride (45 mg/kg) by MDL-860 (75 mg/kg) increases the anti-enteroviral effect. The concentration of MDL-860 should be compulsory to maintain the potency without developing toxicity due to higher doses. CAA combinations keep the potency of the most effective drugs among the three inhibitors. Moreover, combination with CAA should reduce the risk of resistance apparition but also increase drug sensitivity in comparison with every drug treatment used alone or administrated simultaneously. This is an exciting approach, but it remains to be seen whether it is effective and can be implemented in humans, where the time of diagnosis does not necessarily coincide with the onset of enteroviral infection.

Recently, a new study combined remdesivir (RNA-dependent-RNA-polymerase inhibitor), rupintrivir (3C protease), and pleconaril (capsid binder) with a higher in vitro efficacy than monotherapy or two-drug cocktail [129]. This combination was successfully evaluated on a broad spectrum of enterovirus, including five coxsackieviruses, three echoviruses, encephalomyocarditis virus, EV-A71, EV-D68, foot-and-mouth viruses, three polioviruses, and nine rhinoviruses. Moreover, this three-drug cocktail also delayed the emergence of antiviral drug resistance for any compound in the combination.

Even if clinical trials of capsid binders were stopped, the hydrophobic pocket inside the VP1 capsid canyon remains the easiest target with conserved domains between species (except for RV-C) [112–114]. However, non-structural proteins are also prime targets for the weak fluctuation of their constitution between species, even if double-membrane vesicles protect them.

An MTDL strategy is based on combination therapies, which result in a synergistic effect with only one compound, not a cocktail of drugs. According to the most recent combination therapies tested, capsid binders have a strong synergistic effect with 3C protease inhibitors and a moderate or weak effect with 3A protease inhibitors. PI4KIIIβ inhibitors also have an additive synergy with capsid binders.

2.5.3. Other Criteria

The degree of resistance can determine for the selection of candidates for broad-spectrum enterovirus inhibitors. For instance, pleconaril treatment confronts some drug resistance in some clinical trials, with a part of natural resistance [54,130]. Eventually, the selectivity of viral targets by inhibitors is also important to reduce drug-emergent adverse effects due to binding with unexpected human proteins.

2.6. Biological Parameters for MTDL Strategy

2.6.1. Enteroviruses of Interest

Determining which EVs should be included in the MTDL concept strategy requires analysis of pathogenesis, epidemiology and evolution, surveillance program, and already-market therapeutic options [131]. Considering all these points, we have selected non-polio

enteroviruses (NPEVs), including important human pathogens, such as coxsackieviruses, echoviruses, numbered enteroviruses, and rhinoviruses [22].

Infections related to these viruses have been described frequently over the last decade. We first noted clusters of infection, followed by a global emergence for EV species, specifically, EV-A-71 in the Asia-Pacific region and EV-D-68 in North America and Europe. Rhinoviruses (RV) epidemiologic studies classified these viruses as the most frequent infectious agents in humans worldwide [132–134].

Finally, considering more than one virus species in a large-scale program of medicinal chemistry is pertinent if these pathogens are detected in the same type of disease or isolated from the same clinical samples. Moreover, the drug candidate must exert a broad-spectrum activity, which, to our knowledge, is the case for several viruses of this genus.

2.6.2. Biological Access to the Target

Enteroviruses are obligatory intracellular parasites that need host cells to replicate. Externally accessible targets are mainly situated on the viral capsid. Likewise, capsid binders targeting hydrophobic pockets can interact with their target in the extracellular viral cycle sequence. Sometimes, the pocket is empty, like in HVR-B14, but mostly, is filled with a fatty acid or a fatty acid derivative (lipped fatty acid or sphingosine), and called a pocket factor [135].

For inhibitors targeting viral proteins or proteases, the first main barrier remains the cellular membrane after entering the cell before inhibiting viral replication. Moreover, it is known that ssRNA (+RNA) viruses remodel intracellular membranes to support viral replication. Enteroviruses make closed single-membrane tubules and then double-membrane vesicles to escape the surveillance of the cell's immune system [136–139].

Consequently, inhibitors targeting viral non-structural proteins may have more difficulty accessing their targets than inhibitors of viral structural proteins. However, any target will be privileged to meet our objective of proposing an MTDL candidate. Thus, the pharmacokinetic parameters of MTDL candidates are critical and may need refinement in the function of the target.

These limitations can be applied to one drug, drug cocktails, or MTDL treatments.

2.6.3. Conserved Residues of Targets—Antiviral Resistance

Some features within the capsid are highly conserved for most RV species. For example, the hydrophobic pocket sequence has a high degree of amino acid identity for both RV-A and RV-B species [140]. Most recently, this remaining identity has also been found in EV-A71 and all other types of the enterovirus genus [141]. These results are due to the proximity between the hydrophobic pocket and the VP1-VP3 interface. Amino acids near the interface between viral proteins are the most conserved from one serotype to another.

Differences between protein or protease coding sequences are rare for the rest of the viral genome, like in species EV-A [142]. Indeed, mutations of amino acids in these scaffolds should lead to irreversible changes in the recognition of viral substrates, even if some were detected after in vitro mutation assays [59,143–150].

One of the risks of using antivirals is the emergence of resistance, which results in reduced or loss of activity. This phenomenon has been observed for capsid-binding inhibitors after numerous in vitro expositions [5,19,143].

3. Discussion

As any anti-enteroviral was refused to be commercialized due to several clinical trials failing of evaluated compounds, can their lack of efficacy and adverse effects be addressed with multi-target directed ligands (MTDLs)?

We described 51 clinical trials included in the analysis according to our inclusion criteria.

The design of the studies is based either on a human subject virus challenge using ethically approved infection pathways, with a known treatment initiation time and virus type or on patients included and randomized after the description of clinical signs of

infection (the type is inherent to each trial). The treatment was usually administered the day or a few hours before the virus challenge; more rarely after inoculation. In the case of naturally-occurring infections, several cases were noted: either the treatment time is as short as possible (24 or 48 h after the first symptoms), or it is a last-line treatment with no delay given the context of care (compassionate use). The time for initiation of treatment is sometimes absent. The fact of not having details on the time between the appearance of the first symptoms and the initiation of treatment is problematic. In fact, in acute infections, the effects of antiviral therapies strongly depend on the early administration of the antiviral treatment. In the case of enteroviruses that have a fast replication time, a short time for the initiation is decisive. Hence, the results of trials need to be evaluated based on the time of therapy from the earliest symptoms/signs of infection. We must take this information into account when prioritizing compounds to include in an MTDL approach.

Moreover, in the case of naturally occurring infections, the effectiveness of the treatment is evaluated on the circulating virus. This element can give more weight to the results of these clinical trials considering the difference that can be observed between the assessments in the experimental conditions and the studies in real-life conditions.

With the aim of discussing the MTDL concept, we presented the efficacy data of in vitro multitherapy. Here, a few class associations have been described as synergistic. We noted that not all compounds in the same class achieved the same result in association with another compound.

3.1. Multi-Target Directed Ligand (MTDL) Definition

MTDLs combine pharmacophores from different inhibitors to treat multifactorial diseases, here, targeting several enterovirus (EV) proteins with one compound. They are drugs containing two or more pharmacophores structurally overlapping or separated by a spacer in a single molecule. The linked molecules comprised an enzyme-cleavable linker binding the active inhibitors, with minimal alteration to their initial structure. Their design can include the fusion of compounds that happens when one chemical group is identified in two drugs, which are fused by this group to obtain one only compound, while merging has the same concept, not focusing on chemical structure but pharmacophores' interactions. These concepts are illustrated in Figure 7.

To ensure that affinity with the various targets is preserved, in silico evaluation is required. Fused or merged MTDL must be supported with de novo and crystallographic data while compounds bound by a labile linker can be designed with an experimental approach only as they are released with their initial form. In the design-in approach, the fusion or merge must preserve interactions of inhibitors with each target. It enables us to determine whether scaffold hopping is workable and whether substituents are feasible. Design-out begins with a compound acting simultaneously on all targets, which is not our case here.

Fusion of several chemical functions or merging of numerous pharmacophores requires adapting synthesis pathways for inhibitors. In this case, the maintenance of the affinity of the new compound for each considered target is challenging. The use of a labile linker allows compounds to be released in vivo and could limit the loss of affinity for the respective targets. Here, the key parameter is the release of each compound. Enzymatic cleavable binding agents are well known, including their structure [Figure 8] and degradation rate [151]. New linkers have recently been developed to perform simultaneous versions, while traditional ones run them sequentially.

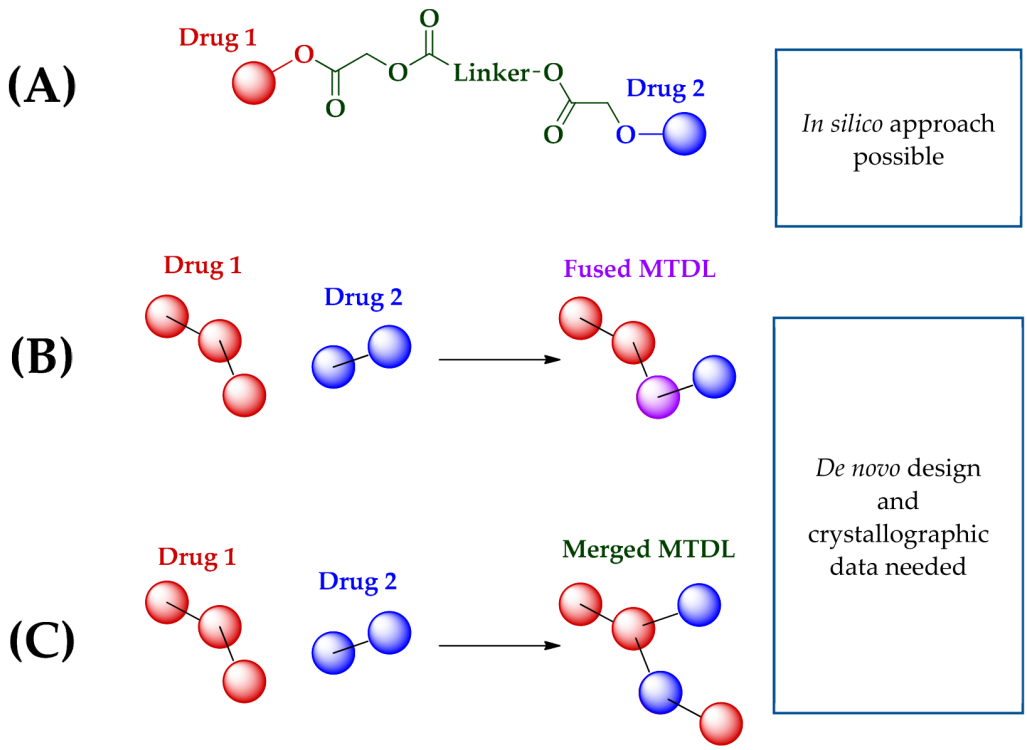


Figure 7. Illustration of concept or MTDL. Multitarget-directed ligands (MTDLs) can be classified as "linked" (**A**) or "fused" (**B**) or "merged" (**C**) based on the degree of overlap of the pharmacophores.

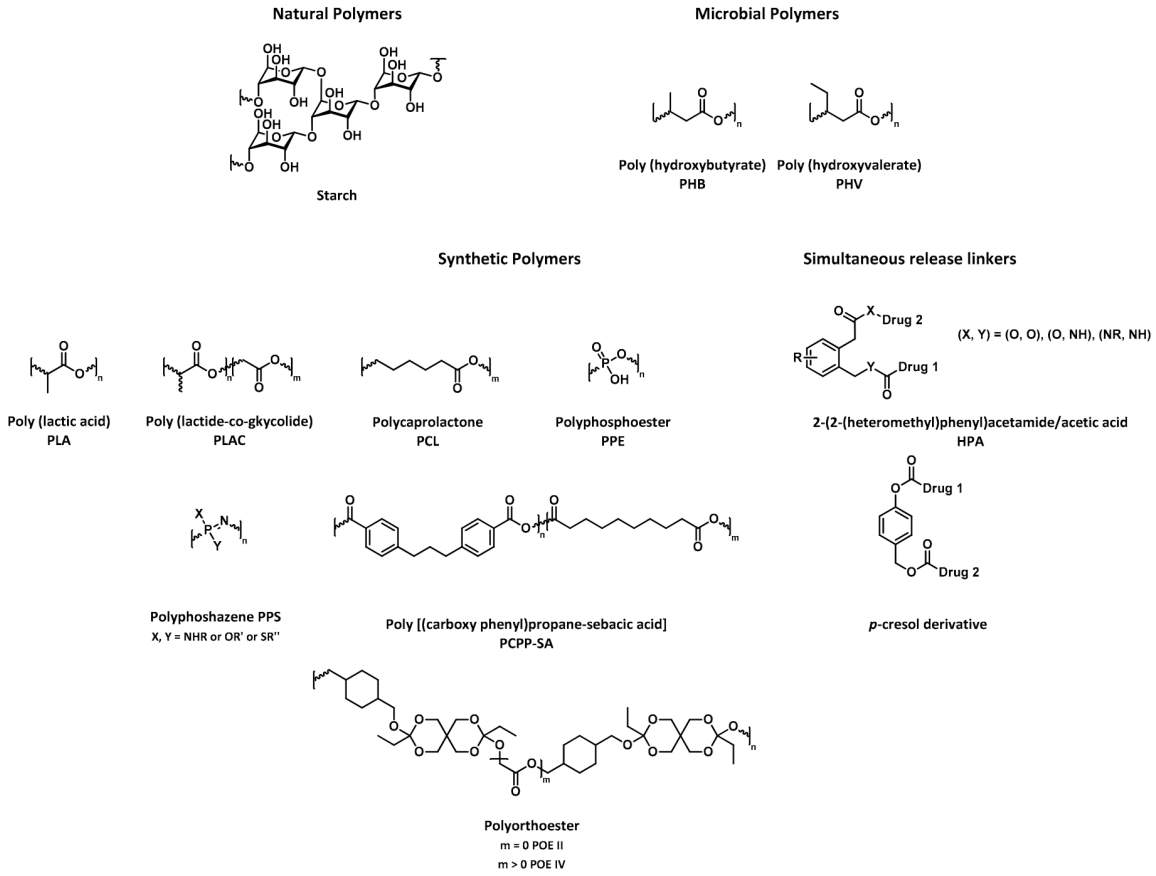


Figure 8. Enzyme degradable linkers.

3.2. MTLD Challenges and Alternatives

The major challenge of MTDLs is to overcome the lack of efficacy of compounds, evaluated in clinical trials. They must also maintain the pharmacokinetic parameters of initial inhibitors and enhance their selectivity. Moreover, long treatment with MTDL doesn't have to lead to drug-induced resistance.

In addition, there are other alternatives to small organic molecules. Indeed, some biological entry inhibitors have had their efficacy assessed in vitro and in vivo assays. For instance, therapeutic antibodies have been developed and validated in preclinical models [152,153]. However, they may be too specific for a reference virus type and ineffective for other viral strains from the same type [154]. Peptides and membrane receptors were also used against enteroviruses [155,156]. However, their development dates to the 2000s, with no further progress thereafter.

3.3. Benefit–Risk Balance of MTDL

Thus, the efficacy of the drug can be multiplied as an MTDL rather than a single molecule. Indeed, MTDL mimics drug combinations, including additive or synergistic effects. With well-associated combinations, synergy can increase benefit–risk balance and favor the success of clinical trial studies. Research on this topic spans various disease applications, including Alzheimer's [157,158], cancer, and infectious diseases. Understanding drug resistance in cancer supports the development of MTDLs, coupled with clinical experience, which has revealed a multi-target strategy to enhance anticancer activity [159]. This approach holds significant potential in fighting infectious diseases [160–166]. In virology, multi-target compounds have been developed for pulmonary diseases targeting F508del-CFTR and PI4KIIIβ [167]. This approach is fascinating as it simultaneously inhibits viral replication and reduces the intensity of symptoms [168]. Virtual screening was recently performed in SARS-CoV-2, CVB1, CVB3, and E1 treatment research with the goal of designing multi-target compounds [102,118,169]. Many projects described above were designated for in silico evaluation of the interest of linked, merged, or fused compounds to produce an effective compound library [170,171].

Several combinations can increase the potency of enterovirus inhibitors to achieve a broad-spectrum effect against non-polio enteroviruses (NPEVs) or enhance antiviral potency. A broad-spectrum approach is interesting because most NPEVs have similar mild clinical manifestations with different complications. Having a single compound for every NPEV eliminates the need for virus identification, leading to more effective patient management. This advantage is crucial for the patient, as therapy initiation can be prompt without the time-consuming process of viral typing, which requires specialized equipment. Fusing, merging, or linking several inhibitors in one MTDL leads to a need for a balance between the affinity of the MTDL with its different targets and its pharmacokinetic parameters.

The single-chemical approach utilized by MTDLs can reduce adverse effects and enhance pharmacokinetic/pharmacodynamics parameters compared to combinations of individual single-target drugs [157,158]. However, MTDLs based on a linker to bind selected candidates can have a high molecular weight. Formulation or transport studies must be performed to evaluate the bioavailability of synthesized new MTDLs. Macromolecules, polymers, or pharmacokinetic enhancers can be added to improve the passage through the intestine barrier.

This approach may also lead to a more effective treatment, having additive or synergistic effects by targeting several viral proteins. Compounds, before linking, fusion, or merging must have synergistic effects between them. Some bindings can be modified for fused or merged MTDLs. Indeed, including partial structure or pharmacophore of initial inhibitor in one compound could lead to adverse interactions or steric hindrance with the targeted viral proteins. These effects could decrease the absolute efficacy of MTDL without considering synergistic effects. Thus, MTDL should modify only the structure without affecting the binding mode of the initial inhibitor. MTDLs, gathering several initial inhibitors, generally have a higher molecule weight that implies a better specificity to target considered viral

proteins. MTDLs try to maintain the same binding mode with the target but do not have the same interactions with unintentional cell metabolism steps. Consequently, it automatically decreases the adverse effects linked with these steps [157,158].

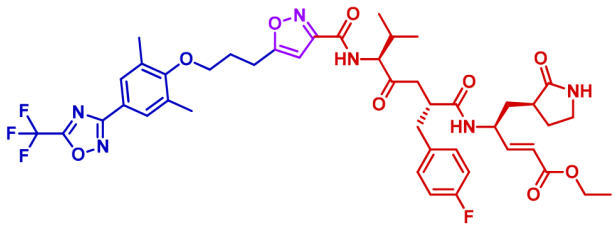
Moreover, the MTDL strategy delayed the emergence of drug-related resistance. Viruses can develop lower sensitivity due to multiple contacts with the drug in monotherapy or lower doses of inhibitors in combinations [146]. Having one merged or fused compound targeting several parts of the virus, the plurality of targets, enables delaying the onset of resistance due to acquired mutations, as well as maintaining higher concentrations deleting drug–drug interactions present in classic combinations. Even with enzyme-cleavable linked drugs, MTDL release can be controlled to avoid these issues.

MTDL design is also easier to conduct than combinations due to fewer parameters to evaluate, even in comparison with single-target drug development [157,158]. Thus, MTDL design should have reduced cost development with superior antiviral activity.

Eventually, MTDL pharmacokinetic parameters are easier to manage than a combination strategy [157,158]. Different initial drugs gathered in MTDL do not need the same bioavailability, pharmacokinetics, or metabolism to form an MTDL. Contrary to MTDL, combination therapy must apply this criterion to be effective, with the same pharmaceutical form and pharmacodynamics, and avoid drug–drug interactions.

3.4. MTDL Proposal

In our presentation of inhibitor structures, we identified chemical groups that can be used to fuse or link several compounds to form MTDLs. This recognition of certain chemical functions remains partial and only claims to encompass some of the possibilities offered by these molecules. It is necessary to have carried out in silico studies and design de novo to avoid speculative combinations and "no druggable" compounds. For example, according to our results, a combination of capsid binder and 3C protease inhibitors seems to be strongly promising. Pleconaril and rupintrivir or V-7404 have broad-spectrum activity. All these inhibitors present an isoxazole. However, fusion by this chemical group leads to heavy compounds (molecular weight > 800 Da) [Figure 9].



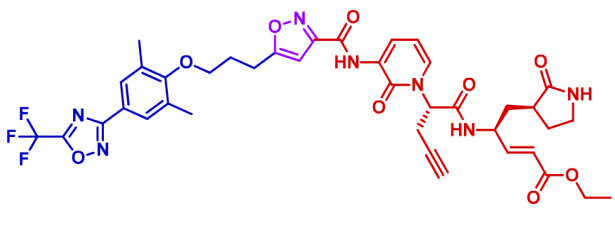


Figure 9. Proposals of MTDL combining pleconaril (in blue) and rupintrivir or V-7404 (in red). Common isoxazole in presented in purple.

4. Materials and Methods

We chose to limit this study to NPEV, excluding poliovirus inhibitors. The commercially available poliomyelitis virus vaccine is effective in preventing PV infection whereas there is no vaccine for all types of NPEV (except for EV-A71 in China). In this review, we summarize recent insights from NPEV research considering in vivo efficacy data described in clinical data.

4.1. Literature Survey

The literature survey was conducted using the website Clinicaltrials.gov (CT), the European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials Database (EudraCT), the International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP), and PubMed. The data collection period occurred in June 2024. The search parameters included every clinical trial written in English. The keywords used for study inclusion were enterovirus (namely, "Coxsackievirus", "Echovirus", "Enterovirus", "Enterovirus Infections", or "Rhinovirus). The exclusion criteria were clinical trials on vaccines, devices, or biological drugs. For the combination part, the literature survey was conducted on PubMed only, using keywords "combination" and "Enterovirus".

The type and name of the inhibitor, its chemical structure, studied type of EV infection or disease, concentration, doses, and pharmaceutical form for drug delivery, parameters of cohorts (age, gender), and conclusions of studies were used for reporting.

The Prisma flowchart has been adapted to classify the data and identify studies for our analysis. The details of the items are presented with the main results of our research in the results section, Scheme 1 [21].

4.2. MTDL Candidate Proposal

The two data types used to discuss an MTDL strategy were compound parameters (broad-spectrum activity, target selectivity, effect during in vitro combination, identified mechanism of action) and virus characteristics (interest in virus, viral resistance, target's interest, and knowledge of the target).

We discuss the interest of each association and analyze molecule properties to propose an optimized MTDL with higher potency and the most favorable PK/PD parameters.

MTDLs are commonly designed according to three categories. The least invasive method is to link several inhibitors, which have been studied in combination therapy. Another pathway consists of fusing similar structures in two compounds to synthesize only one compound. Finally, some inhibitors with the same pharmacophoric elements can be merged into one inhibitor. To optimize MTDL, initial compounds must have similar activity and PK/PD or physicochemical parameters to keep the same Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (ADME) profile and have similar levels of doses to be administered.

5. Conclusions

In this study, we reviewed clinical trials that evaluated inhibitors of enterovirus and classified them according to their target. Viral structural protein inhibitors only target VP1 capsid protein. 3A/3AB and 3C proteases are viral non-structural proteins. Several human proteins (cholinergic receptors, phosphatidylinositol 4-kinase β PI4KB or α-adrenoreceptors) were studied as potential anti-enteroviral targets as well as some broad-spectrum antiviral, anti-rhinovirus inhibitors without defined mechanism of actions, and other class of drugs (anti-asthmatic and antibiotics). Non-structural proteins have a low mutation rate and are conserved between each enterovirus serotype. However, synthesizing double-membrane vesicles, protecting viral genetic material during translation or replication, makes them more challenging to access. On the other hand, capsid seems more straightforward to access. Moreover, the capsid hydrophobic pocket also has a conserved sequence, except for RV-C serotypes. According to combination assays described in the literature, targets to select to have the best efficacy are capsid VP1, 3C protease, and a host target, like PI4KIIIβ. However, even if enterovirus inhibitors were well studied, none were

commercialized due to a lack of benefit in the efficacy–risk–cost balance. This perspective proposes MTDL as a solution to overcome these obstacles. They enable enhanced efficacy with additive or synergistic effects. Likewise, it allows the reduction of opportunities for resistance to appear and limits drug-emerged adverse effects. Moreover, with fewer parameters to evaluate, MTDL assays are more accessible to develop rather than cocktail combination clinical trials. However, using linked, fused, or merged MTDL, the pharmacokinetic parameters and binding modifications must be considered to obtain an optimized broad-spectrum enterovirus inhibitor.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and H.R.; formal analysis, H.R.; investigation, H.R.; data curation, M.R. and H.R.; writing—original draft preparation, H.R.; writing—review and editing, H.R, M.R, F.T., P.R. and P.V.; supervision, M.R. and P.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Ecole doctorale 250 grant.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Peigue-Lafeuille, H. Picornaviridae. In *Traité de Virologie Médicale*, 1st ed.; Estem Edition, Ed.; SFM: Paris, France, 2003; pp. 389–405.
2. Palmer, P.; Lebon, P. Entérovirus. In *Les Virus Transmissibles de la Mère à L'enfant*, 1st ed.; Médecine Sciences Edition, Ed.; La Librairie Médicale, Scientifique & Technique: Arcueil, France, 1999; pp. 305–318.
3. Pons-Salort, M.; Parker, E.P.; Grassly, N.C. The Epidemiology of non-polio enteroviruses: Recent advances and outstanding questions. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2015**, *28*, 479–487. [CrossRef] [PubMed]
4. Cassidy, H.; Poelman, R.; Knoester, M.; Van Leer-Buter, C.C.; Niesters, H.G.M. Enterovirus D68—The New polio? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2677. [CrossRef] [PubMed]
5. Morens, D.M.; Folkers, G.K.; Fauci, A.S. Acute flaccid myelitis: Something old and something new. *mBio* **2019**, *10*, 10–1128. [CrossRef] [PubMed]
6. Brown, D.M.; Zhang, Y.; Scheuermann, R.H. Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1856. [CrossRef]
7. Haston, J.C.; Dixon, T.C. Nonpolio enterovirus infections in neonates. *Pediatr. Ann.* **2015**, *44*, e103–e107. [CrossRef]
8. Sun, L.; Tijsma, A.; Mirabelli, C.; Baggen, J.; Wahedi, M.; Franco, D.; De Palma, A.; Leyssen, P.; Verbeken, E.; van Kuppeveld, F.J.M.; et al. Intra-Host emergence of an enterovirus A71 variant with enhanced PSGL1 usage and neurovirulence. *Emerg. Microbes. Infect.* **2019**, *8*, 1076–1085. [CrossRef]
9. Chong, P.; Liu, C.C.; Chow, Y.H.; Chou, A.H.; Klein, M. Review of enterovirus 71 vaccines. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 797–803. [CrossRef]
10. Higgins, P.G. Enteroviral conjunctivitis and its neurological complications. *Arch. Virol.* **1982**, *73*, 91–101. [CrossRef]
11. Lugo, D.; Krogstad, P. Enteroviruses in the early 21st century: New manifestations and challenges. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, *28*, 107–113. [CrossRef]
12. Disease Outbreak News (7th of June 2023) from World Health Organization Site. Available online: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON474 (accessed on 4 July 2024).
13. Messacar, K.; Abzug, M.J.; Dominguez, S.R. The Emergence of enterovirus-D68. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 105–119. [CrossRef]
14. Benschop, K.S.; Albert, J.; Anton, A.; Andrés, C.; Aranzamendi, M.; Armannsdóttir, B.; Bailly, J.L.; Baldanti, F.; Baldvinsdóttir, G.E.; Beard, S.; et al. Re-Emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19 lockdown, September 2021. *Euro. Surveill.* **2021**, *26*, 2100998. [CrossRef] [PubMed]
15. To, K.K.W.; Yip, C.C.Y.; Yuen, K.Y. Rhinovirus—From Bench to bedside. *J. Formos. Med. Assoc.* **2017**, *116*, 496–504. [CrossRef] [PubMed]
16. Ljubin-Sternak, S.; Meštrović, T.; Ivković-Jureković, I.; Kolarić, B.; Slović, A.; Forčić, D.; Tot, T.; Mijač, M.; Vraneš, J. The Emerging role of rhinoviruses in lower respiratory tract infections in children—Clinical and molecular epidemiological study from Croatia, 2017–2019. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2737. [CrossRef] [PubMed]
17. Mirabelli, C.; Scheers, E.; Neyts, J. Novel therapeutic approaches to simultaneously target rhinovirus infection and asthma/COPD pathogenesis. *F1000Research* **2017**, *6*, 1860. [CrossRef] [PubMed]
18. Grozdanov, P.; Joffret, M.L.; Stoyanova, A.; Polston, P.; Achouri, E.; Nikolova, I.; Delpeyroux, F.; Galabov, A.S. Genome analysis of coxsackievirus B1 isolates during the consecutive alternating administration course of triple antiviral combination in newborn mice. *Antivir. Chem. Chemother.* **2020**, *28*, 2040206620906061. [CrossRef]

19. Lanko, K.; Shi, C.; Patil, S.; Delang, L.; Matthijnssens, J.; Mirabelli, C.; Neyts, J. Assessing in vitro resistance development in enterovirus A71 in the context of combination antiviral treatment. *ACS. Infect. Dis.* **2021**, *7*, 2801–2806. [CrossRef]
20. Shyr, Z.A.; Cheng, Y.S.; Lo, D.C.; Zheng, W. Drug combination therapy for emerging viral diseases. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 2367–2376. [CrossRef]
21. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71. [CrossRef]
22. Baggen, J.; Thibaut, H.J.; Strating, J.R.P.M.; van Kuppeveld, F.J.M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 391. [CrossRef]
23. Anasir, M.I.; Zarif, F.; Poh, C.L. Antivirals blocking entry of enteroviruses and therapeutic potential. *J. Biomed. Sci.* **2021**, *28*, 10. [CrossRef]
24. Al-Nakib, W.; Higgins, P.G.; Barrow, G.I.; Tyrrell, D.A.; Andries, K.; Vanden Bussche, G.; Taylor, N.; Janssen, P.A. Suppression of colds in human volunteers challenged with rhinovirus by a new synthetic drug (R61837). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 522–525. [CrossRef] [PubMed]
25. Turner, R.B.; Dutko, F.J.; Goldstein, N.H.; Lockwood, G.; Hayden, F.G. Efficacy of oral WIN 54954 for prophylaxis of experimental rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 297–300. [CrossRef]
26. Hayden, F.G.; Hipskind, G.J.; Woerner, D.H.; Eisen, G.F.; Janssens, M.; Janssen, P.A.; Andries, K. Intranasal pirodavir (R77,975) treatment of rhinovirus colds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 290–294. [CrossRef] [PubMed]
27. Hayden, F.G.; Andries, K.; Janssen, P.A. Safety and efficacy of intranasal pirodavir (R77975) in experimental rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 727–732. [CrossRef] [PubMed]
28. Schiff, G.M.; Sherwood, J.R. Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A21 respiratory infection. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 20–26. [CrossRef]
29. Rotbart, H.A.; Webster, A.D.; Pleconaril Treatment Registry Group. Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32*, 228–235. [CrossRef]
30. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Pleconaril Enteroviral Sepsis Syndrome. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Virologic Efficacy Trial of Pleconaril in the Treatment of Neonates with Enteroviral Sepsis Syndrome. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://clinicaltrials.gov/study/NCT00031512 (accessed on 4 July 2024).
31. Bauer, S.; Gottesman, G.; Sirota, L.; Litmanovitz, I.; Ashkenazi, S.; Levi, I. Severe coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril. *Eur. J. Pediatr.* **2002**, *161*, 491–493. [CrossRef]
32. Abzug, M.J.; Cloud, G.; Bradley, J.; Sánchez, P.J.; Romero, J.; Powell, D.; Lepow, M.; Mani, C.; Capparelli, E.V.; Blount, S.; et al. Double blind placebo-controlled trial of pleconaril in infants with enterovirus meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2003**, *22*, 335–341. [CrossRef]
33. Pevear, D.C.; Hayden, F.G.; Demenczuk, T.M.; Barone, L.R.; McKinlay, M.A.; Collett, M.S. Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4492–4499. [CrossRef]
34. Desmond, R.A.; Accortt, N.A.; Talley, L.; Villano, S.A.; Soong, S.J.; Whitley, R.J. Enteroviral meningitis: Natural history and outcome of pleconaril therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2409–2414. [CrossRef]
35. Merck Sharp & Dohme LLC. Effects of Pleconaril Nasal Spray on Common Cold Symptoms and Asthma Exacerbations Following Rhinovirus Exposure (Study P04295). A Placebo-Controlled Study of the Effects of Pleconaril Nasal Spray on Common Cold Symptoms and Asthma Exacerbations Following Rhinovirus Exposure. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00394914 (accessed on 4 July 2024).
36. Biota Scientific Management Pty Ltd. A Phase II, Double-Blind Placebo-Controlled Study to Determine the Prophylactic Efficacy of Oral BTA798 in an Experimental Rhinovirus Challenge Model. EU Clinical Trials Register. Available online: https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=eudract_number:2008-001714-24 (accessed on 4 July 2024).
37. Biota Scientific Management Pty Ltd. A Phase 2 Study of BTA798 in Asthmatic Adults with Symptomatic Human Rhinovirus Infection (RHINO). A Phase 2 Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of BTA798 in Asthmatic Adults with Symptomatic Human Rhinovirus Infection. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01175226 (accessed on 4 July 2024).
38. Biota Pharmaceuticals, Inc. A Phase 2, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Dose-Ranging Study of Vapendavir in Moderate to Severe Asthmatic Adults with Symptomatic Human Rhinovirus Infection. EU Clinical Trials Register. Available online: https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=eudract_number:2014-001785-95 (accessed on 4 July 2024).
39. Biota Pharmaceuticals, Inc. A Phase 2, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Dose-Ranging Study of Vapendavir in Moderate to Severe Asthmatic Adults with Symptomatic Human Rhinovirus Infection. World Health Organisation, International Clinical Trias Registery Platform. Available online: https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=NCT02367313 (accessed on 4 July 2024).

40. Abzug, M.J.; Michaels, M.G.; Wald, E.; Jacobs, R.F.; Romero, J.R.; Sánchez, P.J.; Wilson, G.; Krogstad, P.; Storch, G.A.; Lawrence, R.; et al. A Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pleconaril for the treatment of neonates with enterovirus sepsis. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.* **2016**, *5*, 53–62. [CrossRef] [PubMed]
41. Vaxart, H. A Study of Vapendavir Treatment of Hematopoietic Stem Cell Transplant Subjects with Symptomatic Rhinovirus Infection. A Phase 2, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Vapendavir Treatment of Hematopoietic Stem Cell Transplant Subjects with Symptomatic Rhinovirus Infection. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03024177 (accessed on 4 July 2024).
42. Woods, M.G.; Diana, G.D.; Rogge, M.C.; Otto, M.J.; Dutko, F.J.; McKinlay, M.A. In vitro and in vivo activities of WIN 54954, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 2069–2074. [CrossRef] [PubMed]
43. Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; van Eemeren, K.; Stokbroekx, R.; Janssen, P.A. In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 100–107. [CrossRef] [PubMed]
44. Pevear, D.C.; Tull, T.M.; Seipel, M.E.; Groarke, J.M. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2109–2115. [CrossRef] [PubMed]
45. Aradottir, E.; Alonso, E.M.; Shulman, S.T. Severe neonatal enteroviral hepatitis treated with pleconaril. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2001**, *20*, 457–459. [CrossRef]
46. Watson, K.G.; Brown, R.N.; Cameron, R.; Chalmers, D.K.; Hamilton, S.; Jin, B.; Krippner, G.Y.; Luttick, A.; McConnell, D.B.; Reece, P.A.; et al. An orally bioavailable oxime ether capsid binder with potent activity against human rhinovirus. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3181–3184. [CrossRef]
47. Altesa Biosciences, Inc. RCT of Vapendavir in Patients with COPD and Human Rhinovirus/Enterovirus Upper Respiratory Infection. A Trial in Participants with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) to Evaluate the Impact of Vapendavir on the Development of Lower Respiratory Tract Symptoms Following Rhinovirus Challenge. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. 2017. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT06149494 (accessed on 4 July 2024).
48. Phillpotts, R.J.; Jones, R.W.; Delong, D.C.; Reed, S.E.; Wallace, J.; Tyrrell, D.A. The activity of enviroxime against rhinovirus infection in man. *Lancet* **1981**, *1*, 1342–1344. [CrossRef]
49. Hayden, F.G.; Gwaltney, J.M., Jr. Prophylactic activity of intranasal enviroxime against experimentally induced rhinovirus type 39 infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 892–897. [CrossRef]
50. Miller, F.D.; Monto, A.S.; DeLong, D.C.; Exelby, A.; Bryan, E.R.; Srivastava, S. Controlled trial of enviroxime against natural rhinovirus infections in a community. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 102–106. [CrossRef]
51. Levandowski, R.A.; Pachucki, C.T.; Rubenis, M.; Jackson, G.G. Topical enviroxime against rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22*, 1004–1007. [CrossRef]
52. Phillpotts, R.J.; Wallace, J.; Tyrrell, D.A.; Tagart, V.B. Therapeutic activity of enviroxime against rhinovirus infection in volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *23*, 671–675. [CrossRef] [PubMed]
53. Hsyu, P.H.; Pithavala, Y.K.; Gersten, M.; Penning, C.A.; Kerr, B.M. Pharmacokinetics and safety of an antirhinoviral agent, ruprintrivir, in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 392–397. [CrossRef] [PubMed]
54. Hayden, F.G.; Turner, R.B.; Gwaltney, J.M.; Chi-Burris, K.; Gersten, M.; Hsyu, P.; Patick, A.K.; Smith, G.J., 3rd; Zalman, L.S. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of ruprintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3907–3916. [CrossRef] [PubMed]
55. Patick, A.K.; Brothers, M.A.; Maldonado, F.; Binford, S.; Maldonado, O.; Fuhrman, S.; Petersen, A.; Smith, G.J., 3rd; Zalman, L.S.; Burns-Naas, L.A.; et al. In vitro antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2267–2275. [CrossRef] [PubMed]
56. Kankam, M.K.; Burns, J.M.; Collett, M.S.; Corrado, M.L.; Hincks, J.R. A Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of single and multiple oral doses of V-7404 in healthy adult volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, 10–1128. [CrossRef] [PubMed]
57. Xiao, X.; Lei, X.; Zhang, Z.; Ma, Y.; Qi, J.; Wu, C.; Xiao, Y.; Li, L.; He, B.; Wang, J. Enterovirus 3A facilitates viral replication by promoting phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ-ACBD3 Interaction. *J. Virol.* **2017**, *91*, 10–1128. [CrossRef]
58. Hsu, N.Y.; Ilnytska, O.; Belov, G.; Santiana, M.; Chen, Y.H.; Takvorian, P.M.; Pau, C.; van der Schaar, H.; Kaushik-Basu, N.; Balla, T.; et al. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **2010**, *141*, 799–811. [CrossRef]
59. Arita, M.; Kojima, H.; Nagano, T.; Okabe, T.; Wakita, T.; Shimizu, H. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2364–2372. [CrossRef]
60. Qin, Y.; Lin, L.; Chen, Y.; Wu, S.; Si, X.; Wu, H.; Zhai, X.; Wang, Y.; Tong, L.; Pan, B.; et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. *Acta. Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 284–294. [CrossRef]
61. Lu, G.; Qi, J.; Chen, Z.; Xu, X.; Gao, F.; Lin, D.; Qian, W.; Liu, H.; Jiang, H.; Yan, J. Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 3C Proteases: Binding to Rupintrivir and Their Substrates and Anti-Hand, Foot, and Mouth Disease Virus Drug Design. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10319–10331. [CrossRef]

62. Tang, F.; Xia, H.; Wang, P.; Yang, J.; Zhao, T.; Zhang, Q.; Hu, Y.; Zhou, X. The identification and characterization of nucleic acid chaperone activity of human enterovirus 71 nonstructural protein 3AB. *Virology* **2014**, *464–465*, 353–364. [CrossRef] [PubMed]
63. Enviroxime PubChem Page. Available online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/enviroxime (accessed on 4 July 2024).
64. Sun, L.; Meijer, A.; Froeyen, M.; Zhang, L.; Thibaut, H.J.; Baggen, J.; George, S.; Vernachio, J.; van Kuppeveld, F.J.M.; Leyssen, P.; et al. Antiviral activity of broad-spectrum and enterovirus-specific inhibitors against clinical isolates of enterovirus D68. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 7782–7785. [CrossRef] [PubMed]
65. Chau, D.H.; Yuan, J.; Zhang, H.; Cheung, P.; Lim, T.; Liu, Z.; Sall, A.; Yang, D. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* **2007**, *12*, 513–524. [CrossRef] [PubMed]
66. Amineva, S.P.; Aminev, A.G.; Palmenberg, A.C.; Gern, J.E. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD′ localize to the nuclei of infected cells. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85 Pt 10*, 2969–2979. [CrossRef]
67. Dragovich, P.S.; Prins, T.J.; Zhou, R.; Webber, S.E.; Marakovits, J.T.; Fuhrman, S.A.; Patick, A.K.; Matthews, D.A.; Lee, C.A.; Ford, C.E.; et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 4. Incorporation of P1 lactam moieties as L-glutamine replacements. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1213–1224. [CrossRef]
68. Dragovich, P.S.; Prins, T.J.; Zhou, R.; Johnson, T.O.; Hua, Y.; Luu, H.T.; Sakata, S.K.; Brown, E.L.; Maldonado, F.C.; Tuntland, T.; et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 8. Pharmacological optimization of orally bioavailable 2-pyridone-containing peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4572–4585. [CrossRef]
69. Gaffey, M.J.; Gwaltney, J.M., Jr.; Dressler, W.E.; Sorrentino, J.V.; Hayden, F.G. Intranasally administered atropine methonitrate treatment of experimental rhinovirus colds. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1987**, *135*, 241–244.
70. Curovir, A.B. A Randomised, Double-Blind, Single-Centre, Placebo-Controlled, First-in-Human Clinical Trial Evaluating the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of CUR-N399 in Healthy Volunteers. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05016687 (accessed on 4 July 2024).
71. Winther, B.; Buchert, D.; Turner, R.B.; Hendley, J.O.; Tschaikin, M. Decreased rhinovirus shedding after intranasal oxymetazoline application in adults with induced colds compared with intranasal saline. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2010**, *24*, 374–377. [CrossRef]
72. Carlson, A.B.; Kraus, G.P. Physiology, Cholinergic Receptors. In *StatPearls*, 1st ed.; StatPearls Publishing: Saint Petersburg, FL, USA, 2024.
73. Pierce, R.J.; Allen, C.J.; Campbell, A.H. A comparative study of atropine methonitrate, salbutamol, and their combination in airways obstruction. *Thorax* **1979**, *34*, 45–50. [CrossRef]
74. Melia, C.E.; van der Schaar, H.M.; Lyoo, H.; Limpens, R.W.A.L.; Feng, Q.; Wahedi, M.; Overheul, G.J.; van Rij, R.P.; Snijder, E.J.; Koster, A.J.; et al. Escaping Host Factor PI4KB Inhibition: Enterovirus Genomic RNA Replication in the Absence of Replication Organelles. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 587–599. [CrossRef]
75. Cheong, D.H.J.; Yogarajah, T.; Wong, Y.H.; Arbrandt, G.; Westman, J.; Chu, J.J.H. CUR-N399, a PI4KB inhibitor, for the treatment of Enterovirus A71 infection. *Antivir. Res.* **2023**, *218*, 105713. [CrossRef] [PubMed]
76. Biazi, G.R.; Frasson, I.G.; Miksza, D.R.; de Morais, H.; de Fatima Silva, F.; Bertolini, G.L.; de Souza, H.M. Decreased hepatic response to glucagon, adrenergic agonists, and cAMP in glycogenolysis, gluconeogenesis, and glycolysis in tumor-bearing rats. *J. Cell Biochem.* **2018**, *119*, 7300–7309. [CrossRef] [PubMed]
77. Durkee, C.A.; Covelo, A.; Lines, J.; Kofuji, P.; Aguilar, J.; Araque, A. $G_{i/o}$ protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia* **2019**, *67*, 1076–1093. [CrossRef]
78. Haenisch, B.; Walstab, J.; Herberhold, S.; Bootz, F.; Tschaikin, M.; Ramseger, R.; Bönisch, H. Alpha-adrenoceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2010**, *24*, 729–739. [CrossRef]
79. Reed, S.E.; Craig, J.W.; Tyrrell, D.A. Four compounds active against rhinovirus: Comparison in vitro and in volunteers. *J. Infect. Dis.* **1976**, *133* (Suppl. S2), A128–A1235. [CrossRef] [PubMed]
80. Phillpotts, R.J.; Higgins, P.G.; Willman, J.S.; Tyrrell, D.A.; Lenox-Smith, I. Evaluation of the antirhinovirus chalcone Ro 09-0415 given orally to volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, *14*, 403–409. [CrossRef]
81. Zerial, A.; Werner, G.H.; Phillpotts, R.J.; Willmann, J.S.; Higgins, P.G.; Tyrrell, D.A. Studies on 44 081 R.P., a new antirhinovirus compound, in cell cultures and in volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 846–850. [CrossRef]
82. Al-Nakib, W.; Higgins, P.G.; Barrow, I.; Tyrrell, D.A.; Lenox-Smith, I.; Ishitsuka, H. Intranasal chalcone, Ro 09-0410, as prophylaxis against rhinovirus infection in human volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* **1987**, *20*, 887–892. [CrossRef]
83. Yasin, S.R.; Al-Nakib, W.; Tyrrell, D.A. Pathogenicity for humans of human rhinovirus type 2 mutants resistant to or dependent on chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 963–966. [CrossRef]
84. GlaxoSmithKline Research & Development Limited. A Randomised, Double-Blind, Placebo Controlled, Repeat Dose Phase 1b Study to Assess the Efficacy, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled GSK3923868 during Experimental Human Rhinovirus Infection in Participants with Mild Asthma. World Health Organisation, International Clinical Trias Registery Platform. Available online: https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=ISRCTN15115094 (accessed on 4 July 2024).

85. GlaxoSmithKline. A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Repeat Dose Phase 1b Study to Assess the Efficacy, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled GSK3923868 during Experimental Human Rhinovirus Infection in Participants with Mild Asthma. World Health Organisation, International Clinical Trias Registery Platform. Available online: https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=NCT05398198 (accessed on 4 July 2024).
86. Ishitsuka, H.; Ninomiya, Y.T.; Ohsawa, C.; Fujiu, M.; Suhara, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22*, 617–621. [CrossRef]
87. Soto, A.J.; Hall, T.S.; Reed, S.E. Trial of the antiviral action of isoprinosine against rhinovirus infection of volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *3*, 332–334. [CrossRef] [PubMed]
88. Pachuta, D.M.; Togo, Y.; Hornick, R.B.; Schwartz, A.R.; Tominaga, S. Evaluation of isoprinosine in experimental human rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 403–408. [CrossRef] [PubMed]
89. Waldman, R.H.; Gangulyj, R. Therapeutic efficacy of inosiplex (Isoprinosine) in rhinovirus infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1977**, *284*, 153–160. [CrossRef] [PubMed]
90. Romark Laboratories, L.C. A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Nitazoxanide in the Treatment of Colds Due to Enterovirus/Rhinovirus Infection. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03605862 (accessed on 4 July 2024).
91. Romark Laboratories, L.C. Phase 3, A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate Efficacy and Safety of Nitazoxanide in the Treatment of Colds Due to Enterovirus/Rhinovirus Infection. National Library of Medecine, National Center for Biotechnology Information. Available online: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04489381 (accessed on 4 July 2024).
92. Reed, S.E.; Bynoe, M.L. The antiviral activity of isoquinoline drugs for rhinoviruses in vitro and in vivo. *J. Med. Microbiol.* **1970**, *3*, 346–352. [CrossRef]
93. Togo, Y.; Schwartz, A.R.; Hornick, R.B. Antiviral effect of 3, 4-dihydro-1-isoquinolineacetamide hydrochloride in experimental human rhinovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 612–616. [CrossRef]
94. Mukherjee, P.K.; Esper, F.; Buchheit, K.; Arters, K.; Adkins, I.; Ghannoum, M.A.; Salata, R.A. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to assess the safety and effectiveness of a novel dual-action oral topical formulation against upper respiratory infections. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 74. [CrossRef]
95. Chang, T.W.; Weinstein, L. Antiviral activity of isoprinosine in vitro and in vivo. *Am. J. Med. Sci.* **1973**, *265*, 143–146. [CrossRef]
96. Chang, T.W.; Heel, R.C. Ribavirin and inosiplex: A review of their present status in viral diseases. *Drugs* **1981**, *22*, 111–128. [CrossRef]
97. Cetylpyridinuium Chloride Page in Adis Insight Website. Available online: https://adisinsight.springer.com/drugs/800048807 (accessed on 4 July 2024).
98. Barrow, G.I.; Higgins, P.G.; Al-Nakib, W.; Smith, A.P.; Wenham, R.B.; Tyrrell, D.A. The effect of intranasal nedocromil sodium on viral upper respiratory tract infections in human volunteers. *Clin. Exp. Allergy* **1990**, *20*, 45–51. [CrossRef]
99. Gazdik, F.; Jahnova, E.; Horvathova, M.; Pijak, M.R.; Gazdikova, K. Antiasthmatic effects of nedocromil sodium. *Bratisl. Lek. Listy* **2003**, *104*, 222–226.
100. Abisheganaden, J.A.; Avila, P.C.; Kishiyama, J.L.; Liu, J.; Yagi, S.; Schnurr, D.; Boushey, H.A. Effect of clarithromycin on experimental rhinovirus-16 colds: A randomized, double-blind, controlled trial. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 453–459. [CrossRef]
101. Clarithromycin page in United Kingdom National Health Service. Available online: https://www.nhs.uk/medicines/clarithromycin/about-clarithromycin/ (accessed on 4 July 2024).
102. Hao, W.; Bernard, K.; Patel, N.; Ulbrandt, N.; Feng, H.; Svabek, C.; Wilson, S.; Stracener, C.; Wang, K.; Suzich, J.; et al. Infection and propagation of human rhinovirus C in human airway epithelial cells. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13524–13532. [CrossRef] [PubMed]
103. Basta, H.A.; Sgro, J.Y.; Palmenberg, A.C. Modeling of the human rhinovirus C capsid suggests a novel topography with insights on receptor preference and immunogenicity. *Virology* **2014**, *448*, 176–184. [CrossRef] [PubMed]
104. Wang, J.; Hu, Y.; Zheng, M. Enterovirus A71 Antivirals: Past, Present, and Future. *Acta. Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 1542–1566. [CrossRef] [PubMed]
105. Jia, J.; Zhu, F.; Ma, X.; Cao, Z.W.; Li, Y.X.; Chen, Y.Z. Mechanisms of drug combinations: Interaction and network perspectives. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 11–128. [CrossRef]
106. Van Waardenburg, R.C.; de Jong, L.A.; van Eijndhoven, M.A.; Verseyden, C.; Pluim, D.; Jansen, L.E.; Bjornsti, M.-A.; Schellens, J.H.M. Platinated DNA adducts enhance poisoning of DNA topoisomerase I by camptothecin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *29*, 54502–54509. [CrossRef]
107. Lai, G.H.; Zhang, Z.; Sirica, A.E. Celecoxib acts in a cyloooxygenase-2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth in vitro through a mechanism involving enhanced akt inactivation and increased activation of caspase-9 and -3. *Mol. Cancer. Ther.* **2003**, *2*, 262–271.
108. Cottagnoud, P.; Cottagnoud, M.; Täuber, M.G. Vancomycin acts systematically with gentamicin against penicillin-resistant pneumococci by increasing the intracellular penetration of gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 144–147. [CrossRef]
109. Ma, Y.; Abdelnabi, R.; Delang, L.; Froeyen, M.; Luyten, W.; Neyts, J.; Mirabelli, C. New class of early-stage enterovirus inhibitors with a novel mechanism of action. *Antivir. Res.* **2017**, *147*, 67–74. [CrossRef]
110. Ianevski, A.; Zusinaite, E.; Tenson, T.; Oksenych, V.; Wang, W.; Afset, J.E.; Bjørås, M.; Kainov, D.E. Novel synergistic anti-enteroviral drug combinations. *Viruses* **2022**, *14*, 1866. [CrossRef]

111. Stoyanova, A.; Galabov, A.S. Effects of double combinations of enterovirus replication inhibitors against coxsackie B viruses. *Acta. Virol.* **2021**, *65*, 411–419. [CrossRef]
112. Nikolaeva-Glomb, L.; Galabov, A.S. Synergistic combinations against the replication in vitro of coxsackievirus B1. *Antivir. Res.* **2004**, *62*, 9–19. [CrossRef] [PubMed]
113. Lonberg-Holm, K.; Gosser, L.B.; Kauer, J.C. Early alteration of poliovirus in infected cells and its specific inhibition. *J. Gen. Virol.* **1975**, *27*, 329–342. [CrossRef] [PubMed]
114. Hung, H.C.; Wang, H.C.; Shih, S.R.; Teng, I.F.; Tseng, C.P.; Hsu, J.T. Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1784–1790. [CrossRef] [PubMed]
115. Rhoden, E.; Liu, H.M.; Wang-Chern, S.W.; Oberste, M.S. Anti-poliovirus potency of protease inhibitor AG-7404, and assessment of in vitro potency in combination with antiviral capsid inhibitor compounds. *Antiviral. Res.* **2013**, *98*, 186–191. [CrossRef] [PubMed]
116. Wang, Y.; Li, G.; Yuan, S.; Gao, Q.; Lan, K.; Altmeyer, R.; Zou, G. In Vitro assessment of combinations of enterovirus inhibitors against enterovirus 71. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 5357–5367. [CrossRef] [PubMed]
117. Tan, Y.W.; Yam, W.K.; Kooi, R.J.W.; Westman, J.; Arbrandt, G.; Chu, J.J.H. Novel capsid binder and PI4KIIIbeta inhibitors for EV-A71 replication inhibition. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9719. [CrossRef] [PubMed]
118. Yang, Q.; Jie, Q.; Shaw, N.; Li, L.; Rao, Z.; Yin, Z.; Lou, Z. Studies on inhibition of proliferation of enterovirus-71 by compound YZ-LY-0. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, *11*, 1337–1347. [CrossRef]
119. Wang, Y.; Yang, B.; Zhai, Y.; Sun, Y.; Rao, Z. Peptidyl aldehyde NK-1.8k suppresses enterovirus 71 and enterovirus 68 infection by targeting protease 3C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 2636–2646. [CrossRef]
120. Kang, H.; Kim, C.; Kim, D.E.; Song, J.H.; Choi, M.; Choi, K.; Kang, M.; Lee, K.; Kim, H.S.; Shin, J.S.; et al. Synergistic antiviral activity of gemcitabine and ribavirin against enteroviruses. *Antivir. Res.* **2015**, *124*, 6. [CrossRef]
121. Vassileva-Pencheva, R.; Galabov, A.S. Avoiding drug-resistance development by novel approach of combining anti-enteroviral substances against coxsackievirus B1 infection in mice. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 366–372. [CrossRef] [PubMed]
122. Vassileva-Pencheva, R.; Galabov, A.S. Effectiveness of the consecutive alternating administration course of a triple antiviral combination in coxsackievirus B3 infections in mice. *Drug. Res.* **2016**, *66*, 639–643. [CrossRef] [PubMed]
123. Stoyanova, A.; Nikolova, I.; Pürstinger, G.; Dobrikov, G.; Dimitrov, V.; Philipov, S.; Galabov, A.S. Anti-enteroviral triple combination of viral replication inhibitors: Activity against coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antivir. Chem. Chemother.* **2015**, *24*, 136–147. [CrossRef] [PubMed]
124. Galabov, A.S.; Nikolova, I.; Vassileva-Pencheva, R.; Stoyanova, A. Antiviral Combination Approach as a Perspective to Combat Enterovirus Infections. *Prilozi (Makedon. Akad. Nauk. Umet. Odd. Med. Nauki.)* **2015**, *36*, 91–99. [CrossRef]
125. Stoyanova, A.; Nikolova, I.; Galabov, A.S. Effect of consecutive altenarting administration (CAA) of triple anti-enteroviral combination on coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antivir. Res.* **2015**, *121*, 138–144. [CrossRef]
126. Stoyanova, A.; Galabov, A.S. Effect of consecutive alternating administration of a triple combination of anti-enteroviral compounds in mice infected with coxsackievirus B3. *Pathog. Dis.* **2020**, *78*, ftaa065. [CrossRef]
127. Stoyanova, A.; Galabov, A.S. Consecutive alternating administration as an effective anti-coxsackievirus B3 in vivo treatment scheme. *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 1869–1875. [CrossRef]
128. Nikolaeva, L.; Galabov, A.S. Antiviral effect of combination of enviroxime and disoxaril on coxsackievirus B1 Infection. *Acta. Virol.* **2000**, *44*, 73–78.
129. Ianevski, A.; Frøysa, I.T.; Lysvand, H.; Calitz, C.; Smura, T.; Schjelderup Nilsen, H.J.; Høyer, E.; Afset, J.E.; Sridhar, A.; Wolthers, K.C.; et al. The combination of pleconaril, rupintrivir, and remdesivir efficiently inhibits enterovirus infections in vitro, delaying the development of drug-resistant virus variants. *Antivir. Res.* **2024**, *224*, 105842. [CrossRef]
130. Hayden, F.G.; Herrington, D.T.; Coats, T.L.; Kim, K.; Cooper, E.C.; Villano, S.A.; Liu, S.; Hudson, S.; Pevear, D.C.; Collett, M.; et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: Results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1523–1532. [CrossRef]
131. Abdelnabi, R.; Baggen, J.; Mirabelli, C.; Neyts, J. Antiviral strategies against (non-polio) picornaviruses. In *New Drug Development for Known and Emerging Viruses*, 1st ed.; Wiley-VCH GmbH.: Hoboken, NJ, USA, 2022.
132. Chang, Y.K.; Chen, K.H.; Chen, K.T. Hand, foot and mouth disease and herpangina caused by enterovirus A71 infections: A Review of enterovirus A71 molecular epidemiology, pathogenesis, and current vaccine development. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **2018**, *60*, e70. [CrossRef] [PubMed]
133. Holm-Hansen, C.C.; Midgley, S.E.; Fischer, T.K. Global emergence of enterovirus D68: A Systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e64–e75. [CrossRef] [PubMed]
134. Royston, L.; Tapparel, C. Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: Not as simple as ABC. *Viruses* **2016**, *8*, 16. [CrossRef] [PubMed]
135. Egorova, A.; Ekins, S.; Schmidtke, M.; Makarov, V. Back to the future: Advances in development of broad-spectrum capsid-binding inhibitors of enteroviruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 606–622. [CrossRef] [PubMed]
136. Limpens, R.W.; van der Schaar, H.M.; Kumar, D.; Koster, A.J.; Snijder, E.J.; van Kuppeveld, F.J.; Bárcena, M. The Transformation of enterovirus replication structures: A Three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *mBio* **2011**, *2*, 10–1128. [CrossRef]
137. Wolff, G.; Melia, C.E.; Snijder, E.J.; Bárcena, M. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 1022–1033. [CrossRef]

138. Lennemann, N.J.; Evans, A.S.; Coyne, C.B. Imaging-based reporter systems to define CV-B-induced membrane remodeling in living cells. *Viruses* **2020**, *12*, 1074. [CrossRef]
139. Belov, G.A.; Sztul, E. Rewiring of cellular membrane homeostasis by picornaviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 9478–9489. [CrossRef]
140. Ledford, R.M.; Patel, N.R.; Demenczuk, T.M.; Watanyar, A.; Herbetz, T.; Collet, M.S.; Pevear, D.C. VP1 Sequencing of all human rhinovirus serotypes: Insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. *J. Virol.* **2004**, *78*, 3663–3674. [CrossRef]
141. Huang, Y.L.; Lin, T.M.; Wang, S.Y.; Wang, J.R. The Role of conserved arginine and proline residues in enterovirus VP1 protein. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2022**, *55*, 590–597. [CrossRef]
142. Oberste, M.S.; Peñaranda, S.; Maher, K.; Pallansch, M.A. Complete genome sequences of all members of the species human enterovirus A. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85 Pt 6*, 1597–1607. [CrossRef] [PubMed]
143. Feil, S.C.; Hamilton, S.; Krippner, G.Y.; Lin, B.; Luttick, A.; McConnell, D.B.; Nearn, R.; Parker, M.W.; Ryan, J.; Stanislawski, P.C.; et al. An Orally available 3-ethoxybenzisoxazole capsid binder with clinical activity against human rhinovirus. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 303–307. [CrossRef] [PubMed]
144. Deng, C.L.; Yeo, H.; Ye, H.Q.; Liu, S.Q.; Shang, B.D.; Gong, P.; Alonso, S.; Shi, P.Y.; Zhang, B. Inhibition of enterovirus 71 by adenosine analog NITD008. *J. Virol.* **2014**, *88*, 11915–11923. [CrossRef] [PubMed]
145. Wang, Y.; Cao, L.; Zhai, Y.; Ma, J.; Nie, Q.; Li, T.; Yin, Z.; Sun, Y.; Shang, L. Inhibition of enterovirus 71 replication by an α-hydroxy-nitrile derivative NK-1.9k. *Antivir. Res.* **2017**, *141*, 91–100. [CrossRef] [PubMed]
146. Wang, S.H.; Wang, K.; Zhao, K.; Hua, S.C.; Du, J. The Structure, function, and mechanisms of action of enterovirus non-structural protein 2C. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 615965. [CrossRef]
147. Visser, L.J.; Langereis, M.A.; Rabouw, H.H.; Wahedi, M.; Muntjewerff, E.M.; de Groot, R.J.; van Kuppeveld, F.J.M. Essential role of enterovirus 2A protease in counteracting stress granule formation and the induction of type I interferon. *J. Virol.* **2019**, *93*, 10–1128. [CrossRef]
148. Li, P.; Wu, S.; Xiao, T.; Li, Y.; Su, Z.; Wei, W.; Hao, F.; Hu, G.; Lin, F.; Chen, X.; et al. Design, synthesis, and evaluation of a novel macrocyclic anti-EV71 agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115551. [CrossRef]
149. Deutschmann-Olek, K.M.; Yue, W.W.; Bezerra, G.A.; Skern, T. Defining substrate selection by rhinoviral 2A proteinase through its crystal structure with the inhibitor zVAM.fmk. *Virology* **2021**, *562*, 128–141. [CrossRef]
150. El Kazzi, P.; Yaacoub, C.; Fajloun, Z.; Vanelle, P.; Decoly, E.; Coutard, B.; Barral, K. 2C Protein of enterovirus: Key protein of viral replication and antiviral target. *Virologie* **2023**, *27*, 35–49. [CrossRef]
151. Doppalapudi, S.; Jain, A.; Khan, W.; Domb, A.J. Biodegradable Polymers—An Overview. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 427–435. [CrossRef]
152. Chang, G.H.; Luo, Y.J.; Wu, X.Y.; Si, B.Y.; Lin, L.; Zhu, Q.Y. Monoclonal antibody induced with inactived EV71-Hn2 virus protects mice against lethal EV71-Hn2 virus infection. *Virol. J.* **2010**, *7*, 106. [CrossRef] [PubMed]
153. Zhang, C.; Xu, C.; Dai, W.; Wang, Y.; Liu, Z.; Zhang, X.; Wang, X.; Wang, H.; Gong, S.; Cong, Y.; et al. Functional and structural characterization of a two-MAb cocktail for delayed treatment of enterovirus D68 infections. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2904. [CrossRef] [PubMed]
154. Van Loon, A.M.; Cleator, G.C.; Ras, A. External quality assessment of enterovirus detection and typing. European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Bull. World Health Organ.* **1999**, *77*, 217–223. [PubMed]
155. Tan, C.W.; Chan, Y.F.; Sim, K.M.; Tan, E.L.; Poh, C.L. Inhibition of enterovirus 71 (EV-71) infections by a novel antiviral peptide derived from EV-71 capsid protein VP1. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34589. [CrossRef] [PubMed]
156. Pourianfar, H.R.; Poh, C.L.; Fecondo, J.; Grollo, L. In vitro evaluation of the antiviral activity of heparan sulfate mimetic compounds against Enterovirus 71. *Virus Res.* **2012**, *169*, 22–29. [CrossRef]
157. Zhou, J.; Jiang, X.; He, S.; Jiang, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Sun, H. Rational design of multitarget-directed ligands: Strategies and emerging paradigms. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881–8914. [CrossRef]
158. Li, X.; Li, X.; Liu, F.; Li, S.; Shi, D. Rational multitargeted drug design strategy from the perspective of a medecinal chemist. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 10581–10605. [CrossRef]
159. Chaves, S.; Resta, S.; Santos, M.A. Design, synthesis, and in vitro evaluation of hydroxybenzimidazole-donepezil analogues as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* **2020**, *25*, 985. [CrossRef]
160. Abdolmaleki, A.; Ghasemi, J.B. Dual-acting of hybrid compounds—A New dawn in the discovery of multi-target drugs: Lead generation approaches. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1096–1114. [CrossRef]
161. Csermely, P.; Agoston, V.; Pongor, S. The Efficacy of multi-target drugs: The Network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 178–182. [CrossRef]
162. Puls, L.N.; Eadens, M.; Messersmith, W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* **2011**, *16*, 566–578. [CrossRef]
163. Boran, A.D.; Iyengar, R. Systems approaches to polypharmacology and drug discovery. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2010**, *13*, 297–309. [PubMed]
164. Ikram, N.; Mirza, M.U.; Vanmeert, M.; Froeyen, M.; Salo-Ahen, O.M.H.; Tahir, M.; Qazi, A.; Ahmad, S. Inhibition of oncogenic kinases: An in vitro validated computational approach identified potential multi-target anticancer compounds. *Biomolecules* **2019**, *9*, 124. [CrossRef] [PubMed]

165. Kumar, N.; Gupta, S.; Chand Yadav, T.; Pruthi, V.; Kumar Varadwaj, P.; Goel, N. Extrapolation of phenolic compounds as multi-target agents against cancer and inflammation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, 2355–2369. [CrossRef] [PubMed]
166. Sunil, D.; Kamath, P.R. Multi-target directed indole based hybrid molecules in cancer therapy: An Up-to-date evidence-based review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 959–985. [CrossRef] [PubMed]
167. Sbaraglini, M.L.; Talevi, A. Hybrid compounds as anti-infective agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1080–1095. [CrossRef]
168. Naik, B.; Gupta, N.; Ojha, R.; Singh, S.; Prajapati, V.K.; Prusty, D. High throughput virtual screening reveals SARS-CoV-2 multi-target binding natural compounds to lead instant therapy for COVID-19 treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *160*, 1–17. [CrossRef]
169. Tassini, S.; Sun, L.; Lanko, K.; Crespan, E.; Langron, E.; Falchi, F.; Kissova, M.; Armijos-Rivera, J.I.; Delang, L.; Mirabelli, C.; et al. Discovery of multi-target agents active as broad-spectrum antivirals and correctors of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) for associated pulmonary diseases. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1400–1416. [CrossRef]
170. Ambure, P.; Bhat, J.; Puzyn, T.; Roy, K. Identifying natural compounds as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease: An in Silico approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, 1282–1306. [CrossRef]
171. Scotti, L.; Mendonca Junior, F.J.; Ishiki, H.M.; Ribeiro, F.F.; Singla, R.K.; Barbosa Filho, J.M.; Da Silva, M.S.; Scotti, M.T. Docking studies for multi-target drugs. *Curr. Drug. Targets* **2017**, *18*, 592–604. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Conclusion.

Le manque d'activité, notamment lors des évaluations sur des volontaires, sont les principales raisons d'échec des essais cliniques des différents composés présentés. Afin d'augmenter leur efficacité, différentes solutions de mélanges ont été envisagées.

La plupart des combinaisons entre un « *capsid binder* » et une molécule ciblant des protéines virales non-structurales ont permis l'identification d'effet synergique. De même, certains couples d'inhibiteurs de protéines virales des parties P2 et P3 de la polyprotéine ont eu le même effet. Une combinaison d'un « *capsid binder* », d'un inhibiteur de protéines virales non-structurales et d'un agent régulant l'expression d'une protéine de l'hôte promouvant l'infection virale a été efficace sur modèle animal. Une vérification sur modèle humain peut être envisagée afin de confirmer les différents bénéfices observés.

Enfin, la possibilité de synthèse de composés uniques ciblant plusieurs molécules à la fois (MTDL) peut être envisagée. La masse moléculaire conséquente des inhibiteurs des Entérovirus ayant atteint les stades les plus avancées est le plus grand problème à dépasser dans le développement d'inhibiteurs liés. Les formules de MTDL utilisant un linker, préférentiellement labile, parait donc une solution difficile à mettre en place. La sélectivité et la continuité des interactions avec les différentes protéines ciblées sont les critères majeurs à prendre en compte pour la conception de molécules pléiotropes par fusion. Il faudrait donc, obligatoirement, avoir un appui informatique pour effectuer cette stratégie.

L'application à un « *capsid binder* » nécessite une certaine structure longiligne hydrophobe afin de toujours pouvoir à la fois interagir avec la capside et remplir la poche ciblée tout en évitant une possible gêne stérique avec ses parois.

Perspectives et Conclusion générale

Perspectives.

Malgré notre avancée en termes d'élargissement du spectre antiviral, il reste à optimiser différents critères tels que l'efficacité de nos composés. Pour cela, deux voies sont envisagées. Une première section décrira les méthodologies existantes à approfondir ou nouvelles à développer afin de continuer la pharmacomodulation de nos composés à la recherche de meilleures activités et données pharmacocinétiques.
Une seconde section sera consacrée aux différents tests biologiques à effectuer afin de mieux connaître les différents mécanismes d'action de nos composés, ainsi que leur spectre d'action.

1) Pharmacomodulations envisagées.

Pharmacomodulation du linker.

Des études préliminaires de la modulation du linker ont déjà été menées sur les dérivés du **LPCRW_0005** [**Figure 40**]. Ces pharmacomodulations sont envisagées afin d'augmenter leurs interactions avec la capside et donc leur activité. Plusieurs explications sont possibles afin de comprendre la perte d'activité liée au changement de linker.
La première est la gêne stérique engendrée par des fonctions introduites volumineuses (acide carboxylique, méthyloxindole, benzyle, méthylsulfonyle) ou un changement de mode de liaison et la perte de linéarité pour la molécule (époxyde). L'introduction d'une double liaison carbone-carbone rigidifiant la structure déclenche aussi la perte d'activité. Enfin, la substitution de l'alcool secondaire ou son déplacement semble supprimer la liaison hydrogène identifié avec la tyrosine Y128 des RV-B14, et donc a pour conséquence le manque d'efficacité contre ces virus.

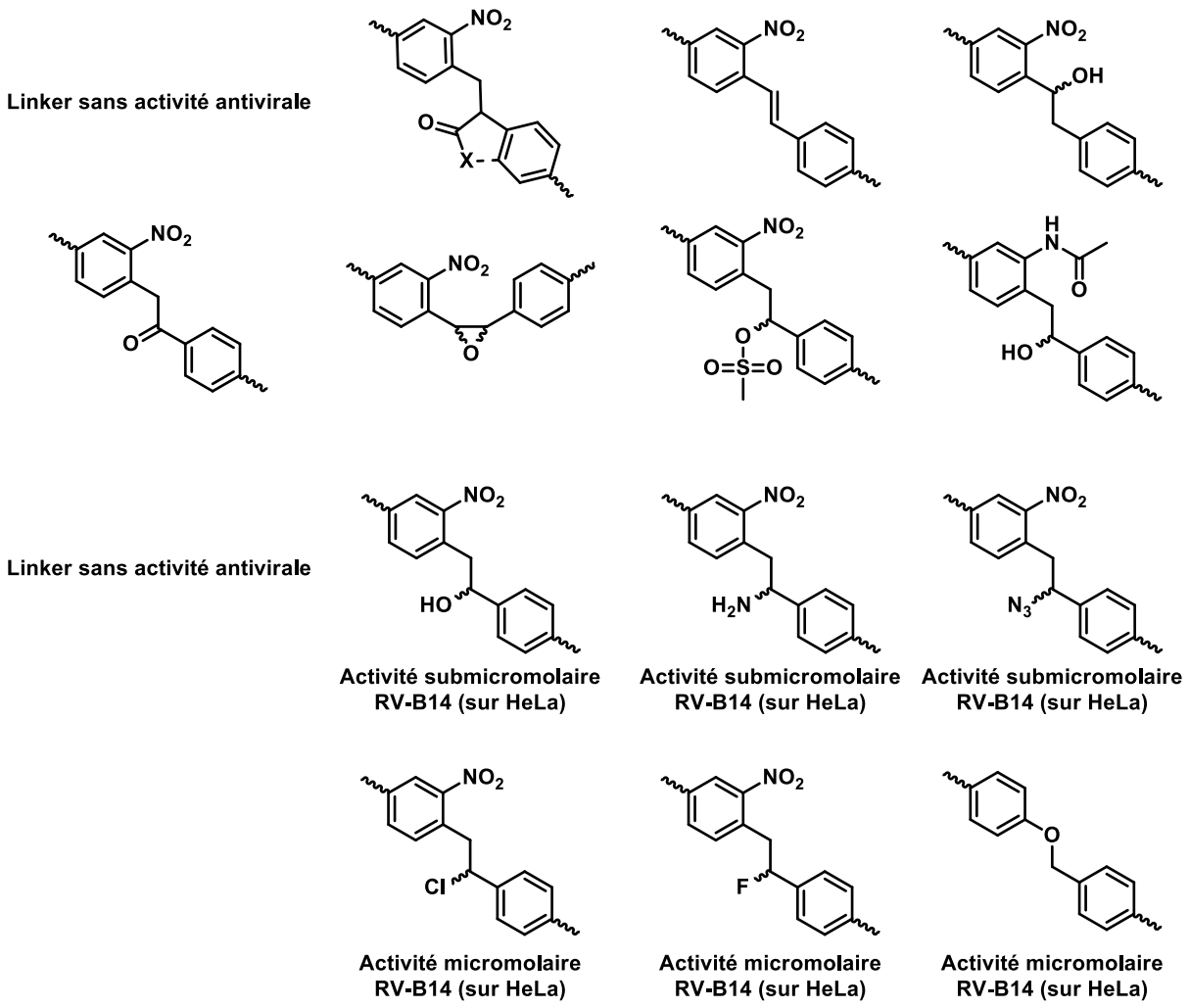


Figure 40. Linkers déjà testés avec l'ordre de grandeur de leur activité virale contre RVB14, évaluée sur la lignée cellulaire HeLa.

Les linkers possédant un alcool ou une amine primaire semblent avoir une activité conditionnée par la présence de cette tyrosine. La fonction azoture semble être dépendante de la fonctionnalisation du côté *pore*, avec une activité moindre. De même, l'introduction d'halogènes à la place de l'alcool ne semble pas gêner la mode de liaison tout en empêchant la formation de la liaison hydrogène susnommée. Enfin, l'introduction d'un éther a déjà été discutée dans le **Chapitre III**, comme opportunité d'élargir le spectre d'action aux entérovirus.

Les différents cycles aromatiques ont déjà fait l'objet de variations. C'est pourquoi, des substitutions de la fonction thioéther sont à considérer [**Figure 41**]. Tout d'abord, nous pouvons substituer le thioéther par une amine (secondaire ou tertiaire) ou une chaine carbonée, afin de modifier la polarité du linker [**composés 13-18**]. L'oxydation du soufre au sein du linker en sulfoxyde (discuté dans la section suivante) ou en sulfone est aussi intéressant afin de réintroduire des fonctions polaires sur le linker [**composés 19-20**]. Nous envisageons aussi la formation de nouveau d'une double liaison carbone-carbone afin de réduire le nombre de conformations possibles, en espérant augmenter la sélectivité de nos composés [**composés 2122**]. Contrairement aux molécules précédemment testées, le cycle B ne porterait pas de fonction nitro, ce qui pourrait suffire pour ne pas générer une gêne stérique trop importante. Récemment, des composés quadricycliques ont été synthétisés avec une activité de l'ordre du micromolaire contre CVA9 possédant un linker amide.[607] Cette fonction chimique permet aussi de rigidifier la structure, par son effet mésomère [**Figure 41 – composés 23-24**, **Figure 42**]. La fonction thioéther est aussi un isostère des amides. Nous pourrions donc l'introduire afin de garder la présence d'un atome de soufre au sein du linker [**composés 25-26**].

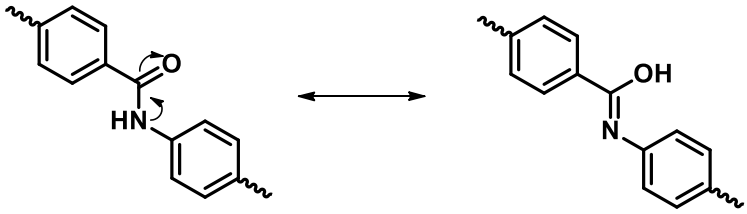
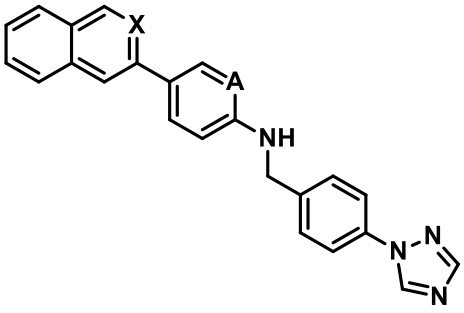
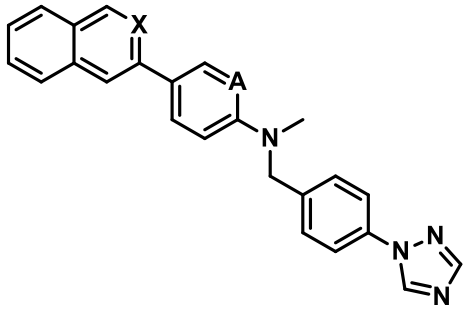


Figure 42. Effet mésomère et conjugaison des systèmes aromatiques par la fonction amide.

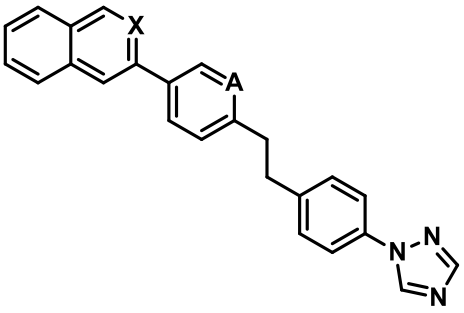
[607] Laajala, M.; Kalander, K.; Consalvi, S.; Amamuddy, O.S.; Bishop, Ö.T.; Biava, M.; Poce, G.; Marjomäki, V. Antiviral Mechanisms of N-Phenyl Benzamides on Coxsackie Virus A9. *Pharmaceutics*. **2023**, *15* (3), 1028. DOI: 10.3390/pharmaceutics15031028.



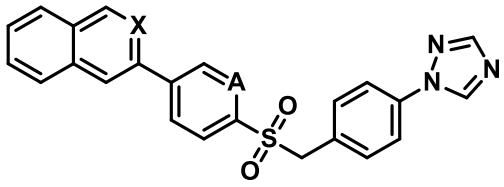
13 (A,X) = (N,CH)
14 (A,X) = (CH,N)



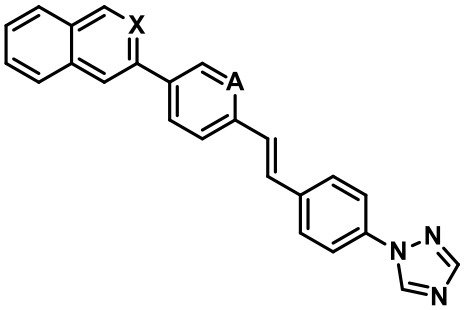
15 (A,X) = (N,CH)
16 (A,X) = (CH,N)



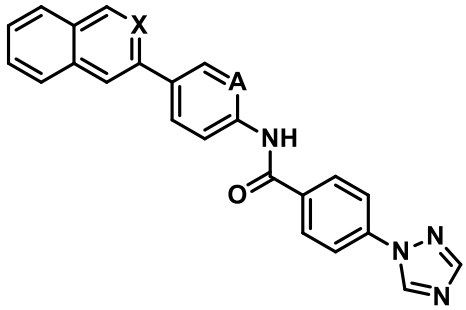
17 (A,X) = (N,CH)
18 (A,X) = (CH,N)



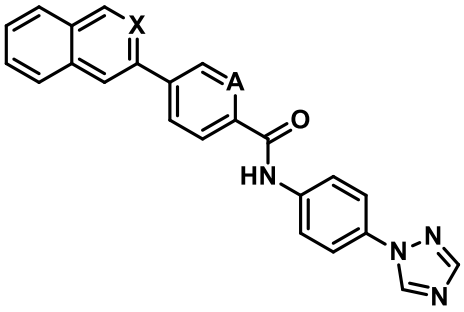
19 (A,X) = (N,CH)
20 (A,X) = (CH,N)



21 (A,X) = (N,CH)
22 (A,X) = (CH,N)



23 (A,X) = (N,CH)
24 (A,X) = (CH,N)



25 (A,X) = (N,CH)
26 (A,X) = (CH,N)

Figure 41. Modulations du linker avec ou sans hétéroatome à considérer.

La stratégie de synthèse afin de moduler le linker s'inspire du Processus A décrit dans le **Chapitre IV**. La formation d'un linker amine est aussi obtenue par la réaction de substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) d'une amine sur le chlorure de benzyle fonctionnalisé du côté *pore* comme dans la stratégie initiale [**Figure 43** – réaction ***(a)***].[608] Cependant, afin d'augmenter la nucléophilie de l'amine, cette dernière réagit tout d'abord avec de l'hydrure de sodium afin de former l'ion amidure. En parallèle, le dérivé iodure de benzyle est synthétisé par la substitution du chlore par un ion iodure afin d'augmenter l'électrophilie du carbone lié à l'halogène. Les deux réactifs activés sont ensuite mélangés afin que la réaction voulue soit complète. L'amine secondaire peut être par la suite méthylée par S_N2 [réaction ***(b)***].[609]

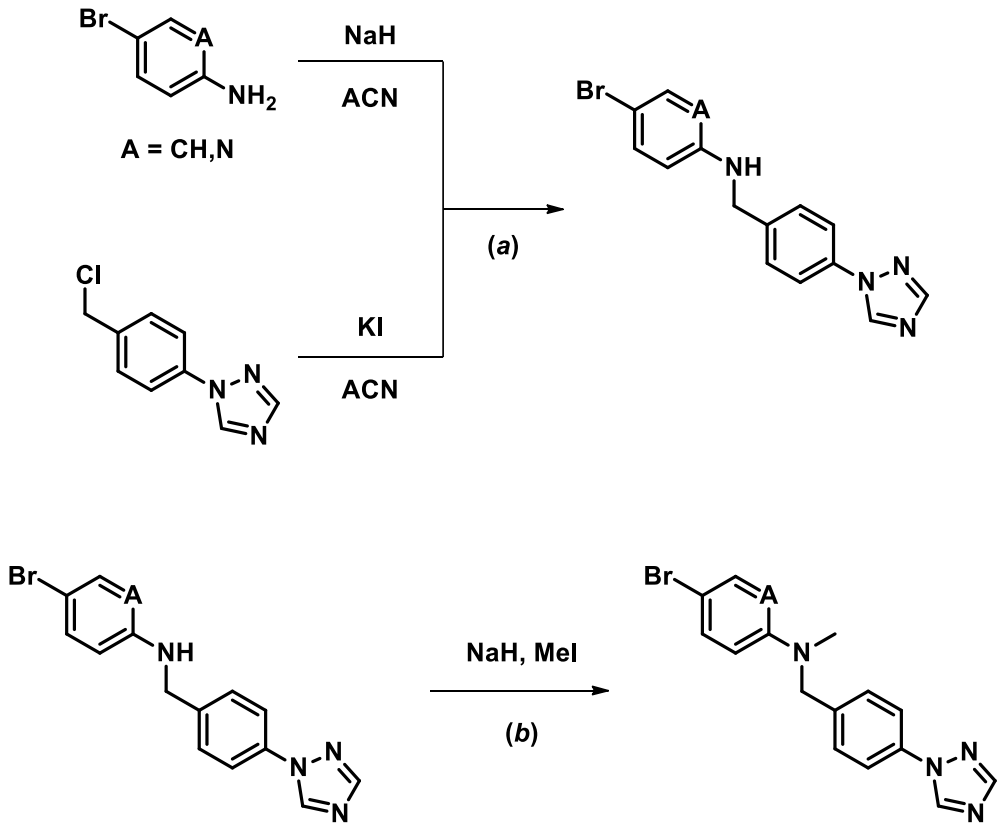


Figure 43. Stratégie de synthèse des linkers ayant une amine secondaire ou tertiaire.

[608] Yu, M.; Long, Y.; Yang, Y.; Li, M.; Teo, T.; Noll, B.; Philip, S.; Wang, S. *Eur. J. Med. Chem*. **2021**, *218*, 133391. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113391.

[609] Saito, A.; Oda, S.; Fukaya, H.; Hanzawa, Y. *J. Org. Chem*. **2009**, *74* (4), 1517-1524. DOI: 10.1021/jo8022523.

Afin d'obtenir les autres types de linker, la SN2 doit être remplacée par d'autres réaction. La réduction de dérivés halogénés par le tétrakis (diméthylamino)éthylène (TDAE) peut permettre la formation de carbanion ou de sulfinate [**Figure 44** – réactions **(*a*)** et **(*c*)**]. Ces nucléophiles n'auront qu'à substituer le chlore du dérivé fonctionnalisé du côté *pore* pour synthétiser les linkers souhaités [réaction **(*b*)** et **(*d*)**].

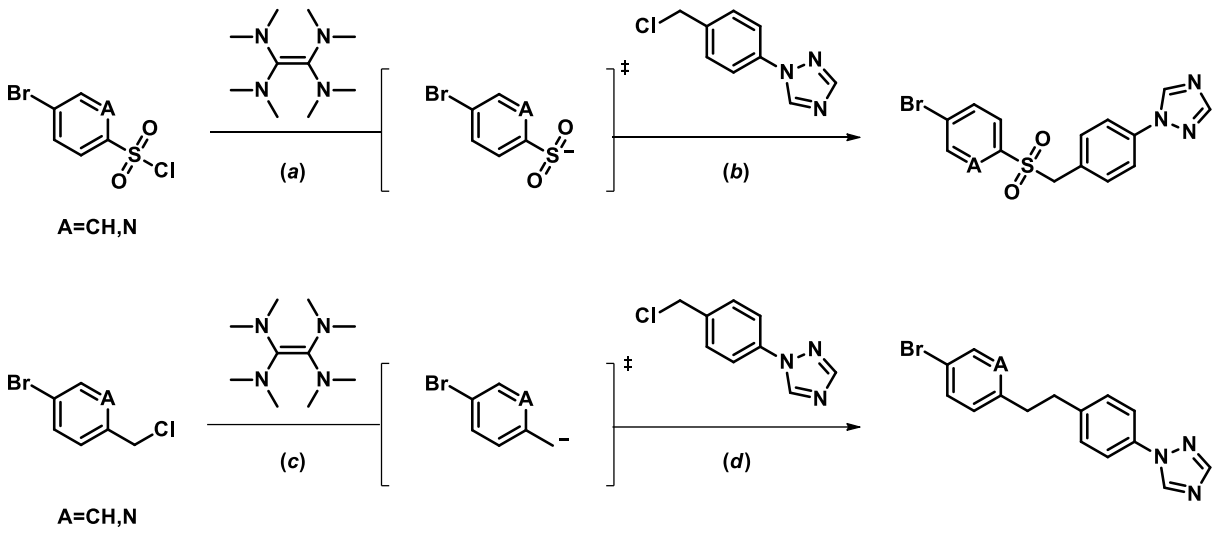


Figure 44. Stratégie de synthèse des linkers méthylsulfone et éthane.

La synthèse d'une double liaison carbone-carbone est envisagée grâce à une réaction de Wittig [**Figure 45**].[610] Une première étape permet l'obtention d'un ylure de phosphore en faisant réagir un dérivé bromé avec de la triphénylphosphine [réaction ***(a)***]. Dans une seconde étape, l'ylure réagit avec le dérivé aldéhyde fonctionnalisé du côté *pore* pour synthétiser la double liaison carbone-carbone souhaitée [réaction ***(b)***]. Sans contrôle stéréochimique, il est possible d'obtenir les deux énantiomères (*Z*) et (*E*), même si cette dernière est favorisée.

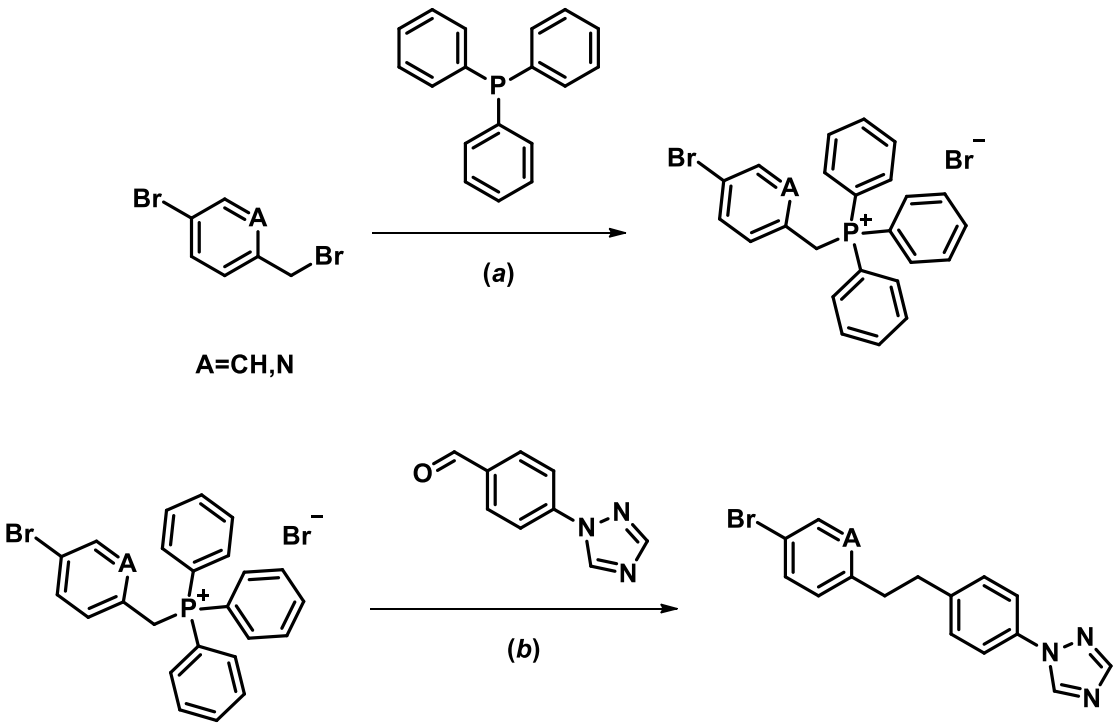


Figure 45. Stratégie de synthèse du linker éthène (double liaison carbone-carbone).

[610] Roman, B.I.; De Coen, L.M.; Mortier, S.T.F.C. de Ryck, T.; Vanhoecke, B.W.A.; Katritzky, A.R.; Bracke, M.E.; Stevens, C.V. *Bioorg. Med. Chem*. **2013**, *21* (17), 5054-5063. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.06.048.

L'introduction de la fonction amide au sein du linker se fait grâce à un agent de couplage de liaison peptidique. Des essais avec des agents chlorants ont déjà été initiés sans pour autant obtenir le produit souhaité. Afin de n'utiliser que trois réactifs, nous utiliserons l'**hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N*,*N*-diméthyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin3-yloxy)méthaniminium** (**HATU**) [**Figure 46 A**].[611] Le mécanisme est décrit sur la **Figure 46 B**]. Une première étape d'addition-élimination de l'acide carboxylique sur la guanidine permet la formation d'un acide carbamimidoyl carboxylique. Le nitroxyde libéré vient cliver cette fonction chimique instable pour former un ester. L'amine, ajoutée à ce moment, vient s'additionner pour former ensuite le produit attendu par une élimination. De même, la formation de thioester à partir d'un acide carboxylique et d'un thiol s'effectue avec le même principe, excepté le fait que ce soit le thiol directement qui vient cliver la fonction acide carbamimidoyl carboxylique [**Figure 47**].[612]

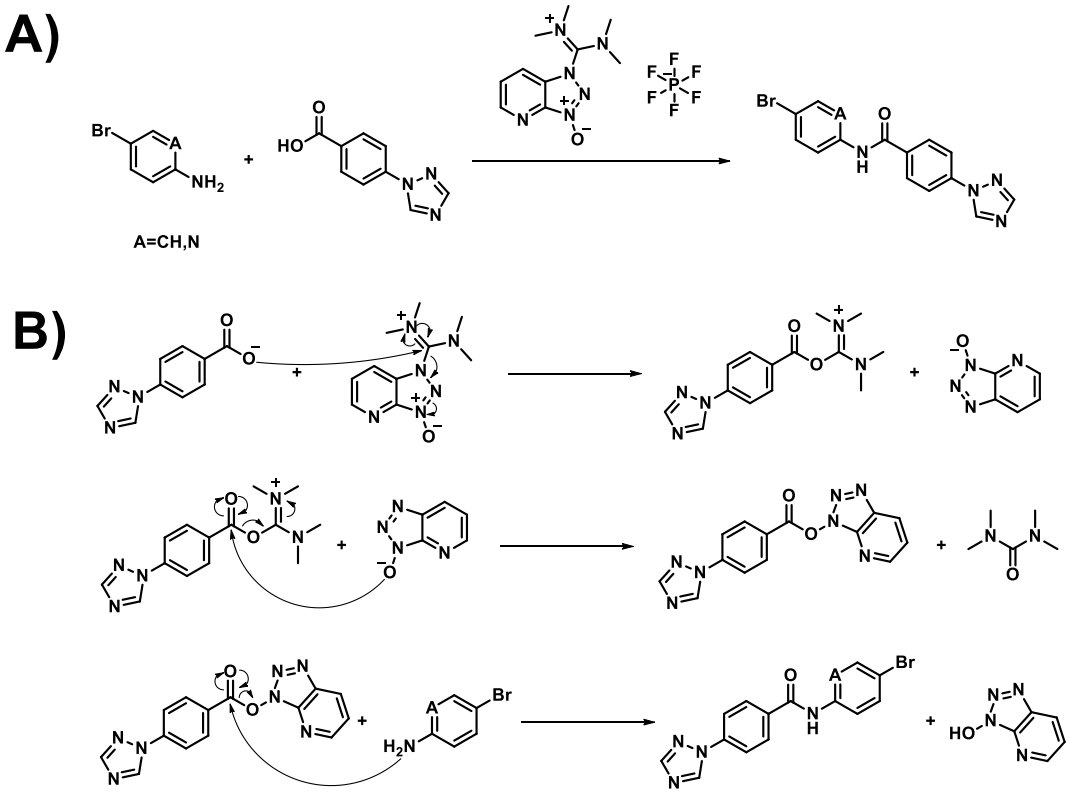


Figure 46. Stratégie de synthèse du linker amide. A) Réaction générale. B) Mécanisme réactionnel.

[611] Nam, M-H.; Park, M.; Park, H.; Kim, Y.; Yoon, S.; Sawant, V.S.; Choi, J.W.; Park, J-H.; Park, K.D.; Min, S.J.; Lee, C.J.; Choo, H. *ACS Chem. Neurosci*. **2017**, *8*, 7, 1519-1529. DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00050.

[612] Choi, S.; Connelly, S.; Reixach, N.; Wilson, I.A.; Kelly, J.W. *Nat. Chem. Biol*. **2010**, *6*, 133–139. DOI: 10.1038/nchembio.281.

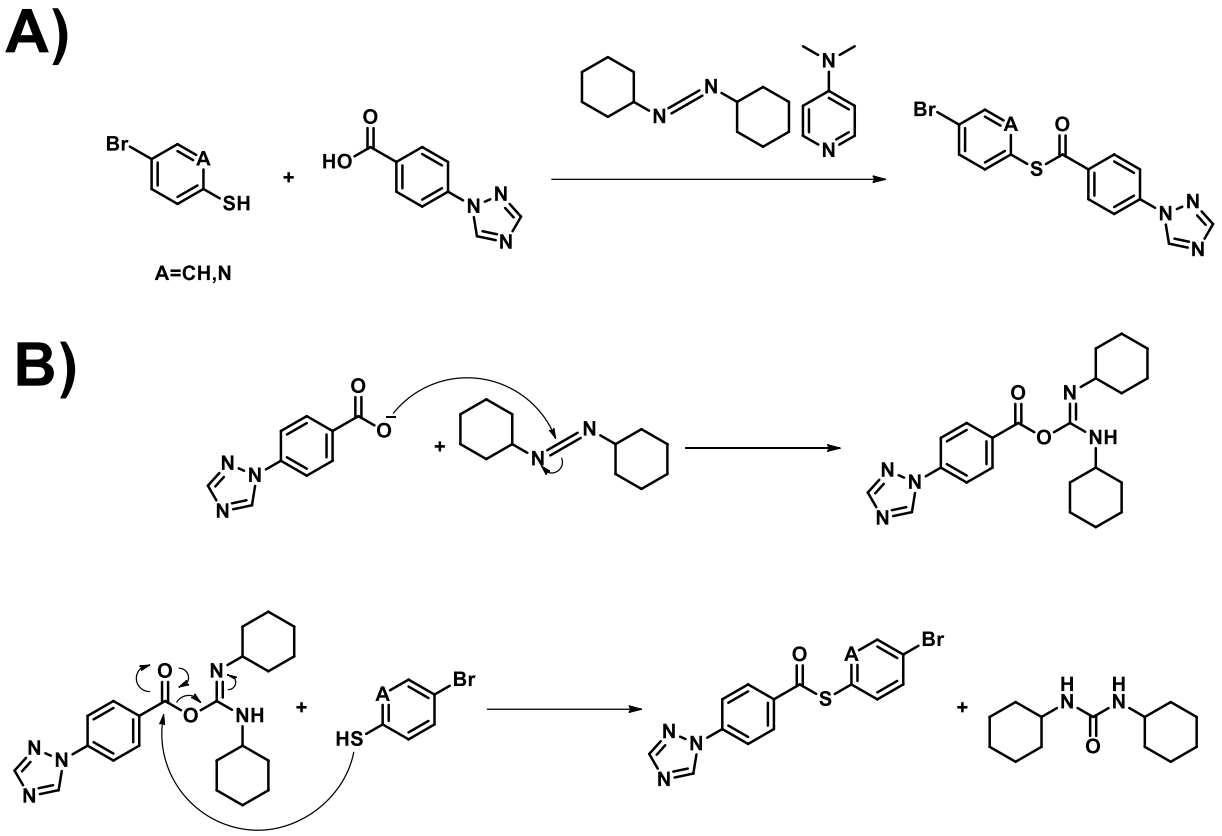


Figure 47. Stratégie de synthèse du linker thioester. **A) Réaction générale. B) Mécanisme réactionnel.**

Une autre perspective est la formation d'un bicycle fusionné, du côté *toe-end*, à la place du cycle B de notre molécule, avec aussi la possibilité de cycliser le linker [**Figure 48**]. Dans ce cas, il y a aussi une conjugaison totale des cycles aromatiques de nos composés [**composés 27-40**]. En comparaison aux cyclisations du linker déjà effectuées du côté *pore*, celles du côté *toe-end* devraient apporter moins de gêne stérique, tout en permettant de verrouiller une conformation spécifique. En effet, ici, uniquement un atome est ajouté au lieu de deux précédemment.

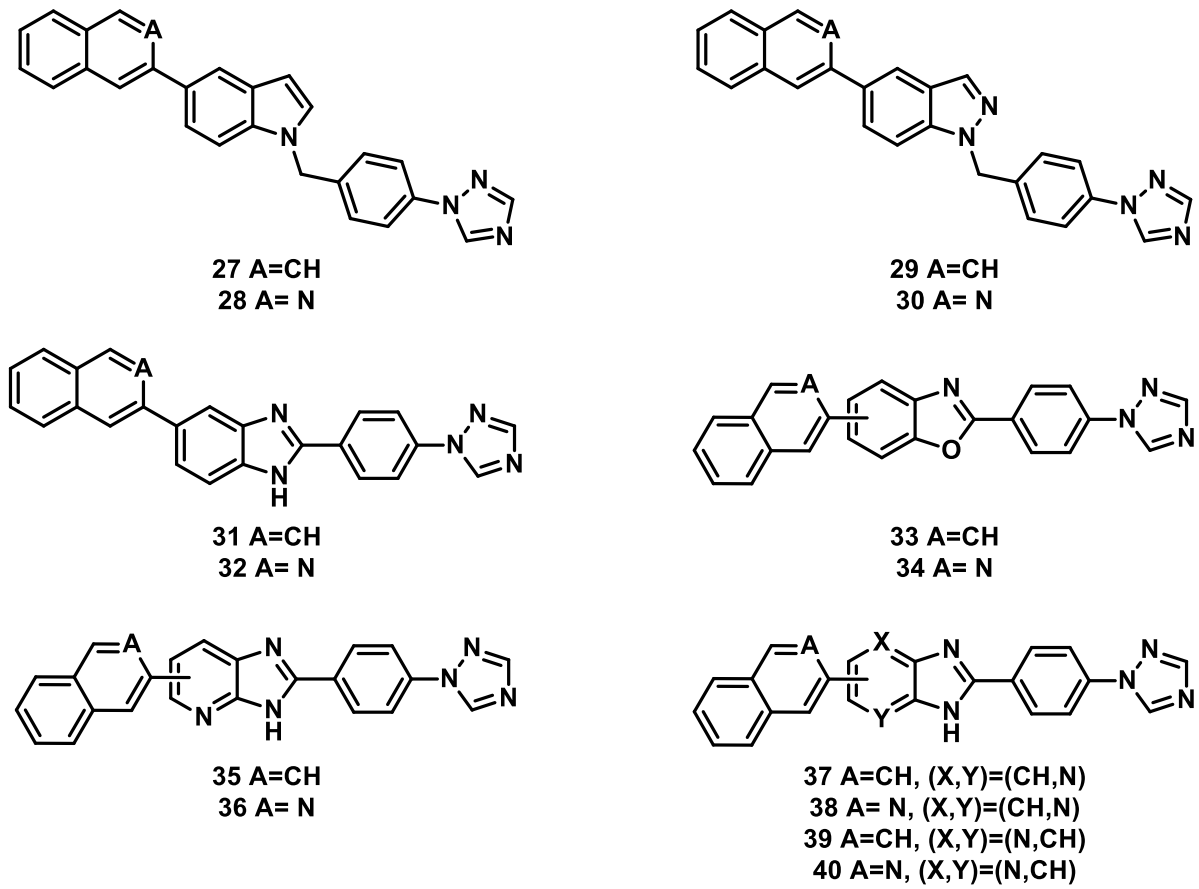


Figure 48. Pharmacomodulations du cycle aromatique B par différents cycles fusionnés, avec la possibilité de cyclisation du linker.

Toutes les stratégies de synthèse de ces composés s'appuient sur le Processus A, présenté dans le **Chapitre IV**. Les **composés 27** à **30** ont la particularité d'avoir comme produit intermédiaire un dérivé d'acide boronique [**Figure 49**].[613,614] L'intermédiare des **composés 27** et **28** a déjà été obtenu avec un rendement de 96%.

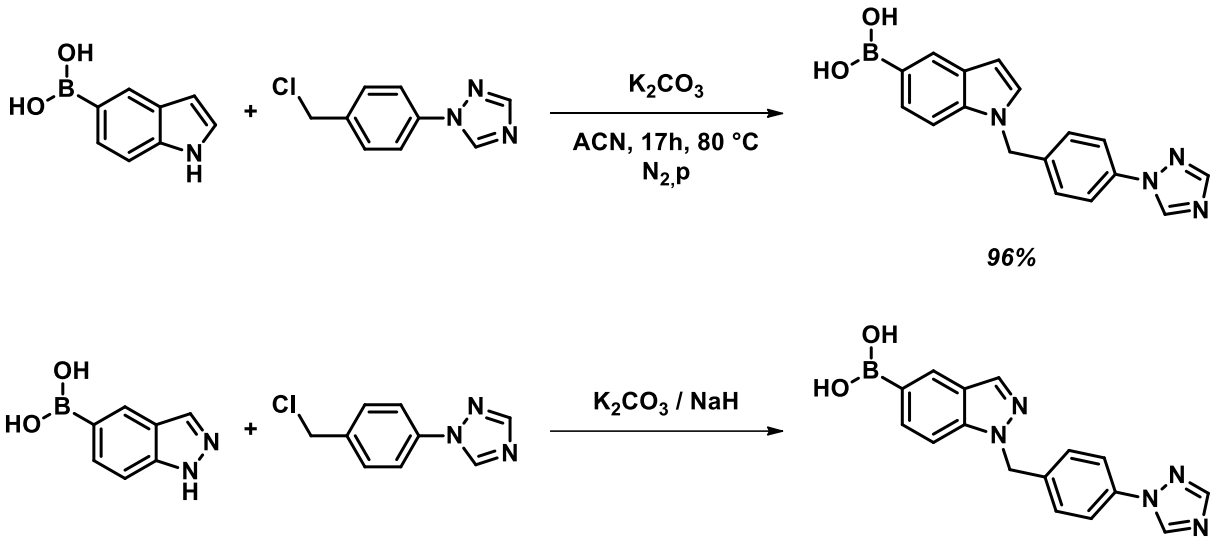


Figure 49. Synthèse de l'intermédiaire boronique pour obtenir le composé 27.

[613] Dubey, P.; Babu, B.; Narayana, M.V. *Indian J. Heterocycl. Chem*. **2006**, *15*, 205-208. Lien.

[614] Bulygina, L.A.; Khrushcheva, N.S.; Klemenkova, Z.S.; Lyssenko, K.A.; Peregudov, A.S.; Sokolov, V.I. *J. Organomet. Chem*. **2018**, *867*, 391-397. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2018.03.025.

La cyclisation du linker, nécessaire pour la synthèse des autres composés, semble avoir été peu étudié dans la littérature. Cependant, certaines conditions de réactions ont été identifiées avec des substrats analogues [**Figure 50**].[615,616,617,618,619] La plupart de ces réactions ne nécessitent pas de réactif particulier pour la synthèse d'imidazopyridine ou d'oxazolopyridine [réactions **(*c*)**, **(*d*)** et **(*e*)**]. Cependant la synthèse de benzimidazole nécessite une base forte [réaction **(*b*)**]. Enfin, afin d'obtenir un benzoxazole, la triphénylphosphine permet l'obtention d'un bon groupe partant afin que le phénol puisse s'additionner et relâcher un oxyde de triphénylphosphine [réaction **(*a*)**].

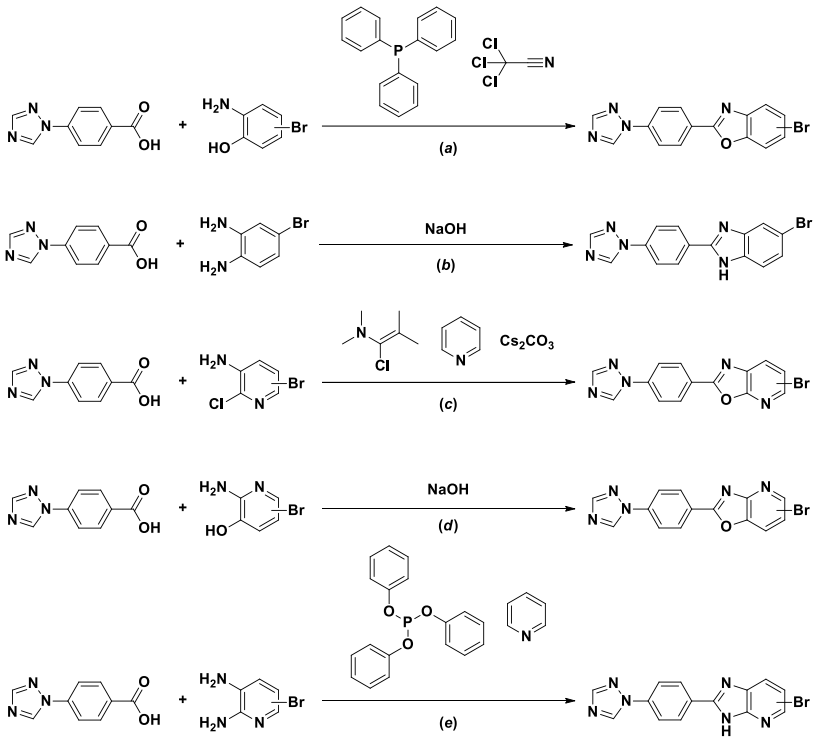


Figure 50. Réactions de cyclisation du linker envisagées.

---

[615] Wang, Y.; Sarris, K.; Sauer, D.R.; Djuric, S.W. *Tetrahedron Lett*. **2006**, *47*, 28, 4823-4826. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.05.052.

[616] Fu, X.; Guo, D.; Yan, Y.; Marselo, T.; Zhang, M.; Zhang, Z.; Li, S.; Huang J. Synthesis 2022; 54(20): 4481-4494. DOI: 10.1055/a-1883-1357.

[617] Harrison, S.T.; Mulhearn, J.; Wolkenberg, S.E. Miller, P.J. O'Malley, S.S. Zeng, Z.; Williams, Jr., D.L. Hostetler, E.D.; Sanabria-Bohórquez, S.; Gammage, L. Fan, H.; Sur, C.; Culberson, J.C.; Hargreaves, R.J.; Cook, J.J.; Hartman, G.D.; Barrow, J.C. *ACS Med. Chem. Lett*. **2011**, *2*, 7, 498–502. DOI: 10.1021/ml200018n.

[618] Karatas, E.; Foto, E.; Ertan-Bolelli, T.; Yalcin-Ozkat, G.; Yilmaz, S.; Ataei, S.; Zilifdar, F.; Yildiz, I. *Bioorg. Chem*. **2021**, *112*, 104913. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104913.

[619] Lin, S-Y.; Isome, Y.; Stewart, E.; Liu, J-F.; Yohannes, D.; Yu, L. *Tetrahedron Lett*. **2006**, *47* (17), 2883-2886. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.02.127.

Oxydation simulant les métabolites possibles.

Comme précisé dans le **Chapitre V**, des prédictions de métabolisation de nos composés les plus prometteurs ont été identifiées. De plus, une des hypothèses de travail des tests *in vitro* de la perméabilité du composé **AB113** est l'apparition d'un métabolite après 24h d'incubation. Afin de confirmer cette possibilité, nous pouvons donc synthétiser des métabolites prédits, afin d'identifier ce pic inconnu et évaluer leur activité antivirale. En effet, il est intéressant de synthétiser et d'évaluer les métabolites potentiels afin d'évaluer leurs paramètres biologiques car, outre la perte d'activité, ils peuvent induire une toxicité [**Figure 51**]. Comme la majorité des métabolites, ils possèdent des fonctions chimiques plus polaires. Ainsi, les hétérocycles peuvent être oxydés afin d'obtenir une pyridinone, une isoquinolinone ou une 1,2,4-triazol-3one [**composés 41-44**]. De même, le linker thioéther peut être oxydé lors de la métabolisation, formant soit un sulfoxyde, soit un thiohémiacétal [**composés 45-48**]. Leurs voies de synthèse reprennent les différents procédés présentés dans le **Chapitre IV** ou les prolongent.

Les oxydations de la pyridine, de l'isoquinoline ou du 1,2,4-triazole des composés **OM1260** et **HR-568** [**composés 41-44**] sont introduites par l'achat des réactifs correspondants [**Figure 52**]. Dans le premier cas, nous nous appuyons sur le processus B / propre à la fonctionnalisation du côté *pore* avec des pyrimidines. Une première étape permet l'obtention d'un synthon possédant le naphtalène côté *toe-end*. Ici, deux stratégies peuvent être développées, à savoir une thionation du groupement portant les cycles C et D fonctionnalisés [réaction **(*a*)** ou **(*d*)**] ou une synthèse appliquant de manière exacte la stratégie déjà développée en remplaçant le couplage de Suzuki-Miyaura finale par un couplage de Buchwald-Hartwig [réaction **(*g*)**].[620 , 621 , 622 , 623] Les introductions de l'isoquinolinone ou de la 1,2,4-triazol-3-one, quant à elles, appliquent le processus A à la lettre. La seule précaution est de préserver l'acide boronique obtenu comme produit de la réaction **(*i*)** ou la sélectivité du couplage de Buchwald-Hartwig lors des réactions (***g***) ou (***k***).

---

[620] Buchwald, S.L.; Nielsen, R.B. *J. Am. Chem. Soc*. **1988**, *110*, 10, 3171–3175. DOI: 10.1021/ja00218a027.

[621] Hewitt, R.J.; Ong, M.J.H.; Lim, Y.W.; Burkett, B.A. *Eur. J. Org. Chem*. **2015**, *30*, 6687-6700. DOI: 10.1002/ejoc.201500909.

[622] Alper, H.; Sibtain, F. *J. Organomet. Chem*. **1985**, *285* (1-3), 225-229. DOI: 10.1016/0022-328x(85)87370-8.

[623] Zhu, L.; Guo, P.; Li, G.; Lan, J.; Xie, R.; You, J. *J. Org. Chem*. **2007**, *72* (22), 8535-8538. DOI: 10.1021/jo0712289.

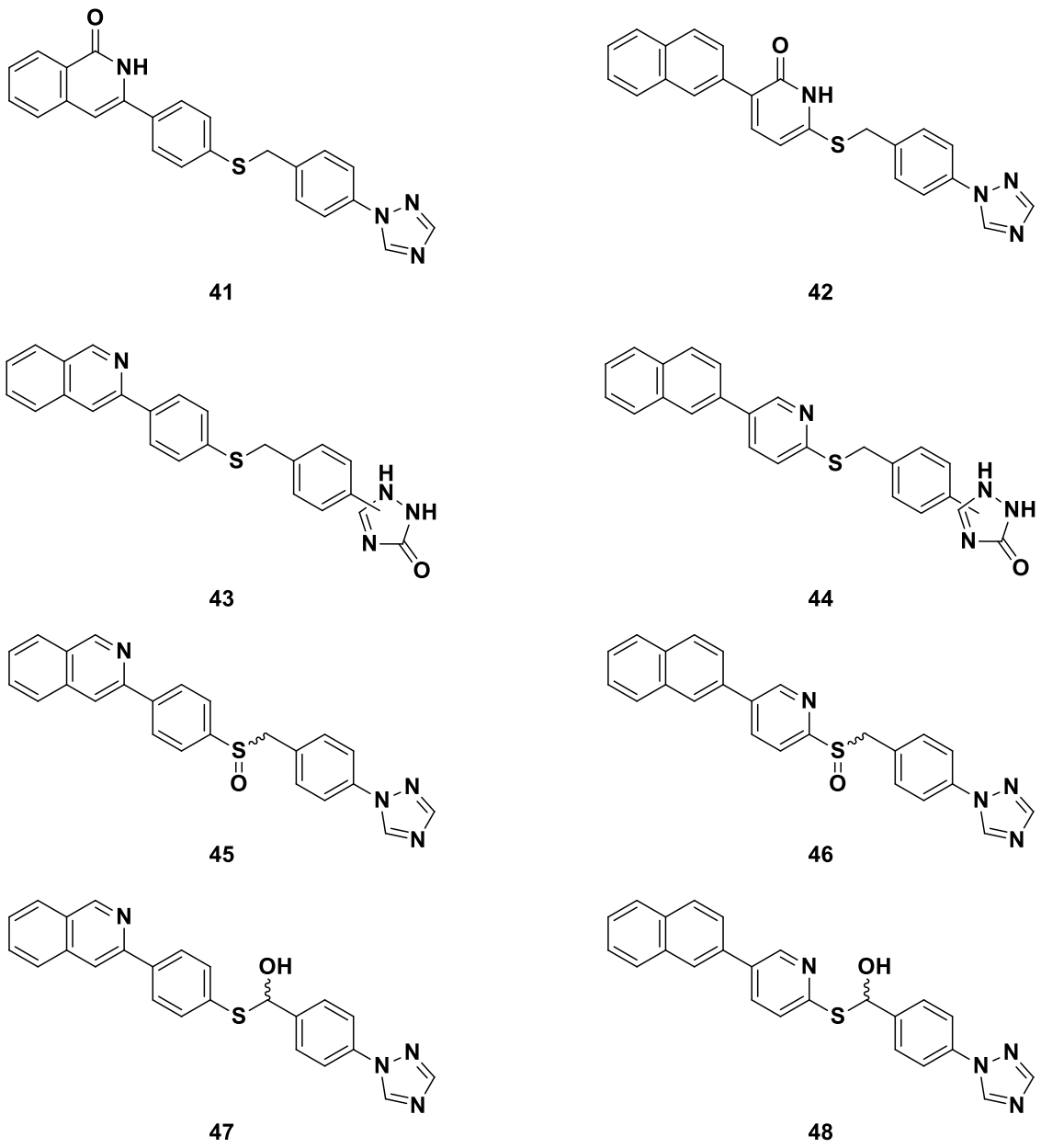


Figure 51. Structure des métabolites des composés OM1260 et HR-568 prédites par ADMET_Predictor™.

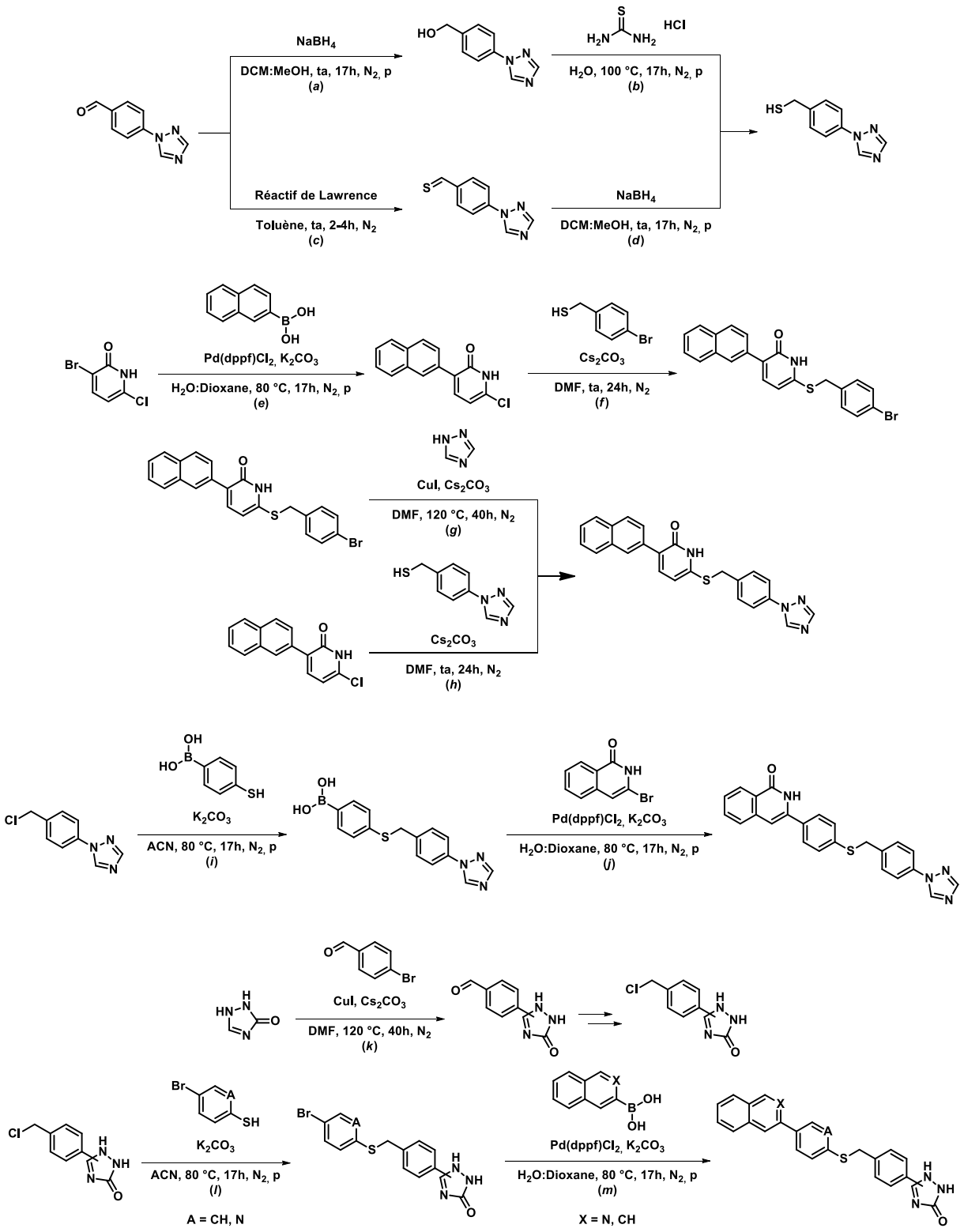


Figure 52. Stratégie de synthèse des métabolites des composés OM1260 et HR-568 possédant une pyridinone, une isoquinolinone ou une 1,2,4-triazol-3-one.

L'oxydation du linker peut se faire soit directement à partir d'**OM1260** et **HR-568** soit lors de la synthèse du linker selon le processus A [**Figure 51 – composés 45-48, Figure 53**]. Comme précisé dans le **Chapitre V**, des sulfoxydes ont déjà été obtenus par oxydation du thioéther par l'acide métachloroperbenzoïque. Cependant cette oxydation n'est pas sélective et nous obtiendrons donc un mélange racémique d'énantiomère (*R*) et (*S*) [réaction **(*n*)**]. Pour la synthèse de la fonction thiohémiacétal, une voie de synthèse impliquant un thiolate de lithium et un aldhéyde peut être utilisée [réaction **(o_2)**].[624,625]

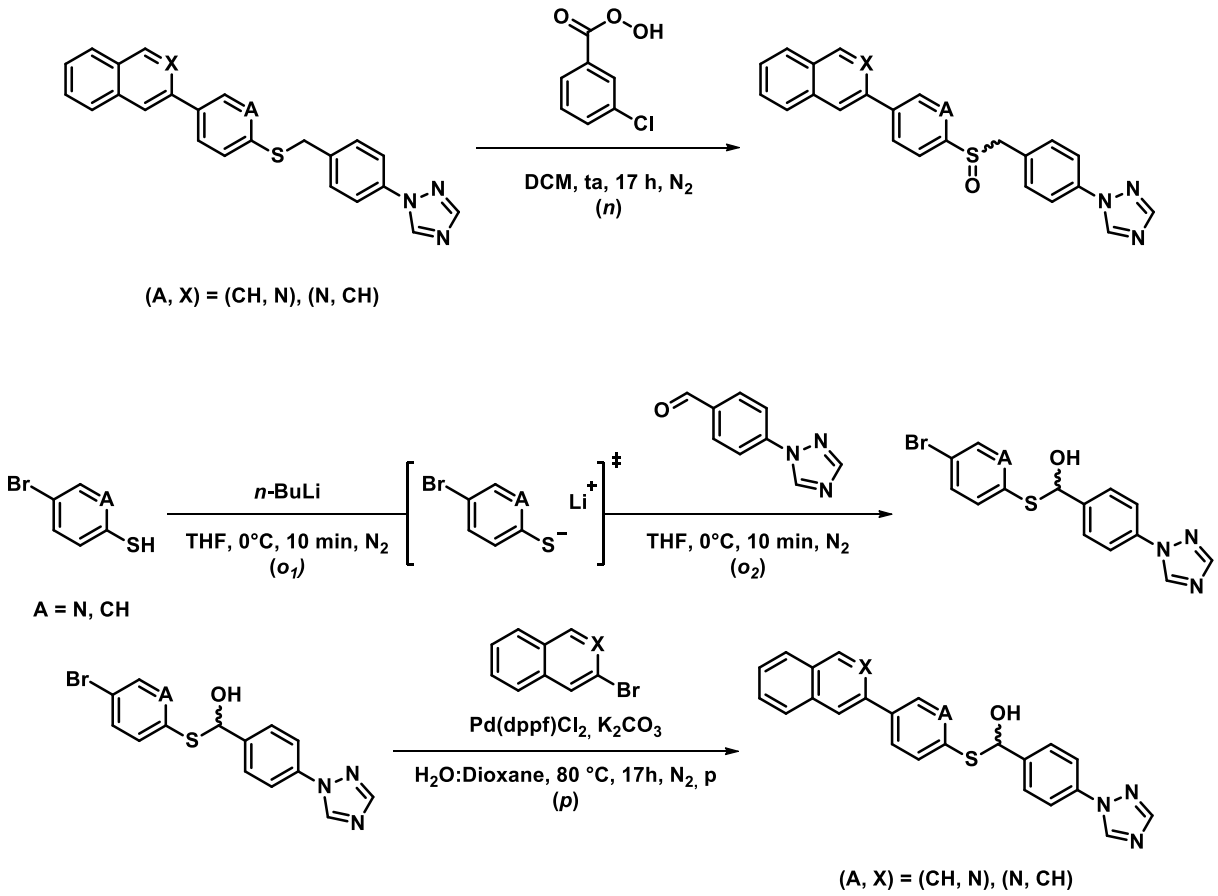


Figure 53. Stratégie de synthèse des métabolites des composés OM1260 et HR-568 possédant un linker oxydé.

---

[624] Kuniyasu, H.; Yamashita, F.; Hirai, T.; Ye, J-H.; Fujiwara, S-I.; Kambe, N. *Organometallics*. **2006**, *25* (3), 566-570. DOI: 10.1021/om050340z.

[625] Bury, A.; Joag, S.D.; Stirling, C.J.M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*. **1986**, 124-125. DOI: 10.1039/C39860000124.

2) Expériences biologiques complémentaires à considérer.

Évaluation de l'efficacité contre d'autres types de virus.

Nos composés **OM1260** et **HR-568** ont présenté une activité contre les virus EV-A71, E30 et CVA24, représentant respectivement les espèces EV-A, EV-B et EV-C. Cependant, afin de vérifier leur activité à large spectre, des tests complémentaires peuvent être effectués contre d'autres types de virus de ces espèces, notamment les virus les plus prévalents dans le monde ou en France : [248]

- CVA6, CVA10, CVA16 (pour l'espèce EV-A);
- E9, E11, E18 et CVB5 (pour l'espèce EV-B).

En outre, nos composés inhibant ces 3 espèces n'ont pas été évalués contre la quatrième espèce d'entérovirus (EV-D). L'EV-D68 est notamment en expansion depuis 2014 avec une réémergence dès 2022.[248] De plus, de nouveaux foyers de poliovirus, appartenant à l'espèce EV-C, sont récemment apparus dans le monde. En accord avec la demande exprimée dans la littérature, des évaluations contre les poliovirus pourraient être menés afin de vérifier le large spectre. Enfin, alors que la structure est très similaire aux composés **LPCRW_005**, **81** et **134**, une vérification est sûrement nécessaire afin de s'assurer d'être toujours actif contre les rhinovirus (RV-A, RV-B).

Etudes mécanistiques.

L'évaluation par des études cinétiques du mécanisme d'action a apporté la possibilité d'inhibition de la phase précoce de la réplication virale évoquée au **Chapitre IV**. Afin de confirmer cela, il serait intéressant d'effectuer la co-cristallisation de nos composés (**OM1260** ou **HR-568**) avec la cible. Ainsi, les interactions avec la cible pourraient être validées par une analyse du cristal grâce à la diffraction des rayons X.

De plus, des tests de résistance aux antiviraux seraient aussi intéressants à effectuer afin d'évaluer la réaction à la pression antivirale induite par nos composés les plus prometteurs.

Enfin, pour répondre et poursuivre sur l'idée évoquée dans le **Chapitre VI**, l'efficacité de combinaisons, de nos composés avec des inhibiteurs d'autres protéines virales ou de l'hôte, peut être évaluée afin de déterminer quel couple est le plus actif et quelle est la combinaison à privilégier dans le cas où la synthèse de molécules pléiotropes serait envisagée.

Conclusion Générale.

Ce projet de thèse a été mené dans l'objectif premier de développer un inhibiteur des Entérovirus à large spectre, afin de répondre au besoin croissant de réponse contre ces virus dont la prévalence augmente considérablement. La clinique associée à ces infections est très variée, avec des formes sévères pouvant atteindre le système nerveux, cardiaque ou respiratoire par exemple. Par ailleurs, aucun traitement curatif n'a été développé à ce jour pour lutter contre les infections provenant de divers types de virus appartenant à ce genre.
C'est pourquoi, nous avons, à partir des inhibiteurs des rhinovirus développés au sein de l'Equipe de Pharmaco-Chimie Radicalaire de l'Institut de Chimie Radicalaire, envisagé d'autres scaffolds à large spectre centrés sur une fonction thioéther.

Afin de mener une étude pilote, nous avons choisi les EV-A71, virus importants tant par leur prévalence que par la gravité de leurs infections dans les formes les plus sévères. Puis dans un second temps, pour développer un inhibiteur à large spectre, nous nous sommes intéressé·es à d'autres espèces d'Entérovirus à savoir l'EV-B et l'EV-C à travers des évaluations biologiques sur l'E30 et le CVA24.

Les travaux de pharmacomodulation ont conclu à la nécessité d'un hétérocycle azoté du côté *pore* et d'un cycle aromatique, préférentiellement fusionné, avec une fonction polaire du côté *toe-end*.
Le composé **AB113** a présenté la meilleure activité contre l'EV-A71 mais n'a pas été efficace contre E30 et CVA24. L'introduction de bicycles du côte *toe-end* semble avoir permis une meilleure interaction avec le fond de la poche hydrophobe. De plus, portant ce type de pharmacophore, **OM1260** et **HR-568** ont été actifs contre l'ensemble de ces virus de l'ordre du micromolaire. Ils peuvent donc être considérés comme des inhibiteurs à large spectre.

D'autre part, une hypothèse pour expliquer les différences d'activité pour des structures proches est le manque ou l'excès de solubilité de nos composés. Pour valider cette possibilité, nous avons donc mené une étude des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos composés. Ils ont été systématiquement prédits afin de choisir les modulations les plus favorables au développement futur d'un potentiel médicament à prendre par voie orale.

Afin de valider les prédictions, différentes mesures *in vitro* ont été envisagées. La méthode de mesure de la perméabilité des membranes à nos composés a été mise au point. Nous avons pu observer un passage de nos composés à travers une membrane de cellules Caco-2, simulant la barrière intestinale. Cependant, certaines hypothèses de travail restent à être vérifiées. L'étude de la solubilité de nos composés est à poursuivre avec la planification de nouvelles mesures du spectre d'absorbance d'**AB113** à différentes concentrations.
En parallèle, la génération de composés *de novo* ayant des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques optimisés est à actualiser avec les nouveaux résultats d'efficacité antivirale. Un couplage entre ces composés et le docking au sein de la poche hydrophobe est envisagé afin de lier les relations entre la structure des molécules, leurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques ainsi que leur activité antivirale.

Enfin, dans une perspective d'augmentation de l'efficacité de nos composés contre les Entérovirus, la combinaison de nos inhibiteurs les plus prometteurs avec d'autres ciblant des protéines, virales ou de l'hôte, différentes a été envisagée. De même, la conception de molécules pléiotropes par liaison, temporaire ou définitive, ainsi que par superposition de structure de ces composés est aussi à considérer avec l'aide d'outils informatiques.

Annexes

Références des images des algues, champignons et plantes d’où l’on peut extraire des inhibiteurs d’Entérovirus.

A) Illustration d'*Houttuynia cordata* (Herbe à Poivre) issue de la banque d'image publique IStockPhoto. Lien.

B) a) Illustration de Talc issue de la banque d'image *British & Exotic Mineralogy* reprenant les dessins du compendium de J. Sowerby réalisé entre (1802-1817). Lien. b) Brongniart, A.; Decaisse, J.; de Candolle, A.; Fischer, F.E.L.; de Saint-Hilaire, A.; van Houtte, L.; Lemaire C.; Miquel, G.; Planchon, J.E.; Rhichard, A.; Scheidweiler; de Vriese. *Scutellaria Macrantha*. ***Flore des serres et des jardins de l'Europe – Volume 5***. Louis van Houtte, éditeur, Gand, Belgique. **1849**. 428 Illustration. Lien. c) Illustration d'*Artemisia capillaris* (Armoise capillaire) issue de la banque d'image publique PNGEgg. Lien. d) Pabst, G.; Müller, W.; Schmidt, C.F. ***Köhler's Medizinal-Pflanzen***. Franz Eugen Köhler Eds. Gera, Allemagne. **1889**. DOI: 10.5962/bhl.title.623. e) von Siebold, P.F.; Zuccarini, J.G. ***Flora Japonica, Sectio Prima (Tafelband)***. **1826**. Lien. f) Aquarelle de *Mentha piperita* (Menthe poivrée), peinte par Pauline Brochard, illustratirce. Lien. g) Illustration de *Belamcanda Chinensis* (Iris tigrée) issue du site de vente de plantes Rayon de serre. Lien. h) Thunberg, C.P. Uvularia cirrhosa. *Plantarum Japonicarum – Decas Secunda.*. ***Icones plantarum Japonicarum ; Ic. pl. jap ; quas in insulis Japonicis annis 1775 et 1776 collegit et descripsit***. Litteris Johann. Fred. Edman Eds. **1794-1805**. 35. Lien. i) Affiche représentant un *Akebia Quinata* (Akébie à cinq feuilles) vendue par Bibliopolist Art. Lien. j) Illustration de *Syringa persica* (Lilas persan) issue du la banque d'image publique FreePik. Lien. k) Illustration de *Elettaria cardamomum* (Cardamome) issue de la banque d'image publique FreePik. Lien.

C) Shanbhag, V.K.L. *Oncobiology and Targets*. **2017**, *4*. DOI: 10.18639/ONBT.2017.04.456966.

D) Illustration de *Laggera pterondonta* issue du site Zhiwutong [en chinois]. Lien.

E) Illustration de *Melissa officinalis* (Mélisse officinale) issue de la banque d'image publique Pinterest. Lien.

F) Illustration de *Crassocephalum crepidioides* (Crassocéphale fausse crépide) issue de la base de données WIKTROP – Identification et Connaissanvce des Adventices Tropicales et Méditerranéennes. Lien.

G) Curtis, W.; Hooker, J.D.: Hooker, W.J.; Prain, D.; Stapf, O.; Bentham-Moxon Trust, Kew Royal Botanic Gardens, Royal Horticultural Society (Great Britain), Stanley Smith Horticultural Trust London. ***Curtis's Botanical Magazine***. Volume 87. Academic press. **1861**. ISSN:1355-4905.

H) Illustration de *Griola frondosa* (Polypore en touffe) issue de la banque d'image publique Shutterstock. Lien.

I) Gain, L.; Charcot, J. ***La flore algologique des regions antarctiques et subantarctiques***. Masson & cie. Paris, France. **1912**. DOI: 10.5962/bhl.title.60196.

J) Kjellman, F.R. *Bihang til Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar*. **1897**, *23* (4), 1-34. Plate 1: figs 4-5. Lien.

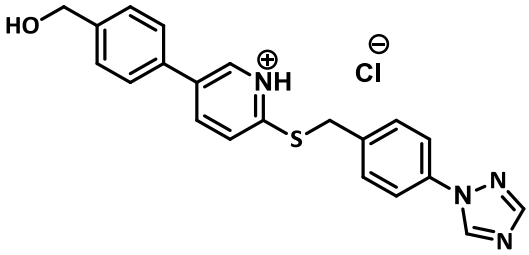
K) a) Garbary, D.J.; Tompkins, E.; White, K.; Corey, P. *Algae*. **2011**, *26* (1), 61-71. DOI:10.4490/algae.2011.26.1.061 b) Illustration d'Euchema spp issue du site internet de l'Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agricultre. Lien. c) Crouan, P.L. ; Crouan, H.M. *Alguier des frères Crouan*. **1852**. Lien. d) Ding, L.; Ma, Y.; Huang, B.; Chen, S. *BioMed. Research International*. **2013**, *10*, 594308. DOI: 10.1155/2013/594308.

L) Coupin, H. *Phæophyceæ*. ***Album général des diatomées marines, d'eau douce ou fossiles***. Henri Coupin, éditeur. Paris, France. **1868**. Planche 129. Lien.

RMN des composés synthétisés

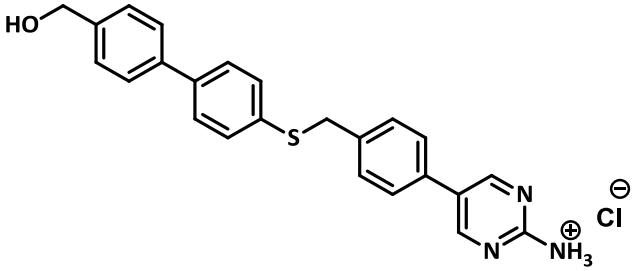
Sels hydrochlorés, méthylé ou ester de phosphate

2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-(4-(hydroxymethyl)phenyl)pyridin-1-ium chloride – composé 5



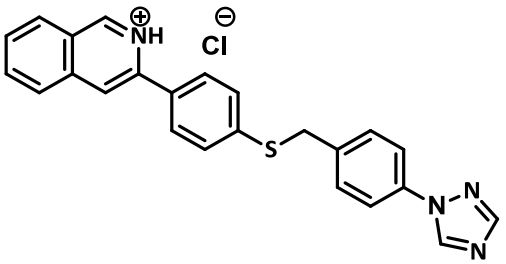
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.74 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.90 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 7.62 (dt, *J* = 8.4, 2.3 Hz,, 2H), 7.52 (dd, *J* = 8.3, 6.3 Hz, 2H), 7.44 (dd, *J* = 8.3, 6.3 Hz, 2H), 7.35 (d+d, *J* = 7.9, 7.5 Hz, 3H), 4.48 (s, 2H), 4.44 (s, 2H).

1-(4-(((4'-(hydroxymethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)thio)methyl)phenyl)-1H-1,2,4-triazol-4-ium chloride – composé 6



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.25 (s, 1H), 8.81 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 7.80 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.68 (dt, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H), 7.63 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.42 (d+dd, *J* = 8.3, 8.3, 1.0 Hz, 3H), 4.54 (s, 2H).

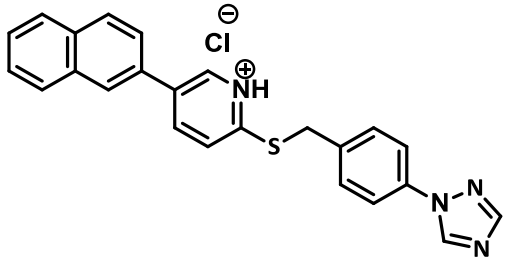
3-(4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)phenyl)isoquinolin-2-ium chloride – composé 7



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.41 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 2H), 7.93 (dt, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H), 7.90 (dd, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 1H), 7.87 (dt, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H), 7.79 (td, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 1H), 7.67 (dt, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 2H), 7.60 (dt, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H).

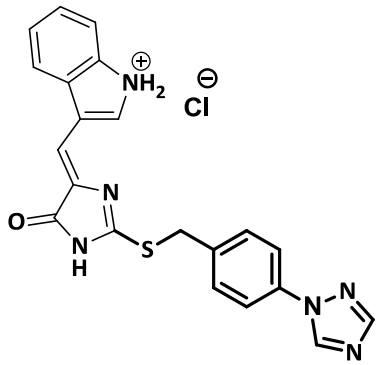
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.86, 148.53, 142.75, 137.77, 137.17, 136.16, 135.21, 134.18, 132.71, 131.12, 130.62, 129.21, 129.11, 128.36, 128.22, 128.14, 127.32, 119.93, 35.97.

3-(4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)phenyl)isoquinolin-2-ium chloride– composé 8



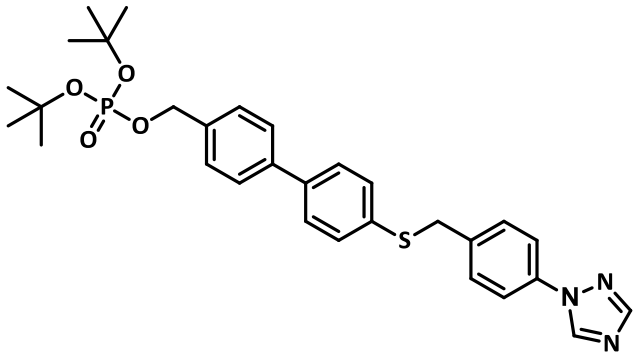
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H), 8.97 (dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 7.81 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H), 7.65 (dt, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.48 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H).

(Z)-3-((2-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-5-oxo-1H-imidazol-4(5H)-ylidene)methyl)-1H-indol-1-ium chloride – composé 9



^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.84 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 11.51 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.67 (dt, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.41 (dt, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.14 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 1.4 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 8.3, 7.1, 1.4 Hz, 2H), 4.61 (s, 1H).

(4'-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzyl)thio)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl di-tert-butyl phosphate – composé 12



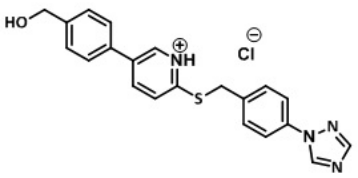
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.26 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.80 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 2H), 7.68 (dt, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 2H), 7.63 (dt, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H), 7.57 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 8.6, 8.4 Hz, 3H), 4.96 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 1.42 (s, 18H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 152.86, 139.44, 137.89, 137.71, 136.43, 136.13, 135.69, 130.59, 129.36, 128.73, 127.59, 126.85, 119.89, 36.30, 29.94 (d, *J* = 4.4 Hz).

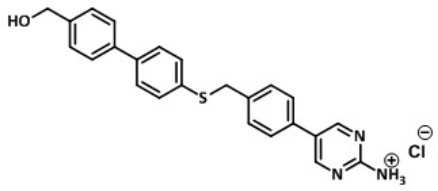
^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ -9.96.

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ -9.97 (t, *J* = 7.3 Hz).

Composé 5 (400 Hz)



Composé 6 (400 Hz)

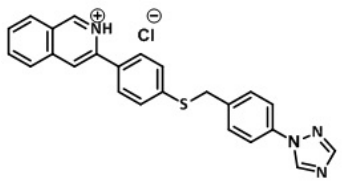


9.2470 8.8043 8.8018 8.7981 8.7956 8.2145 7.9685 7.9622 7.9476 7.9413 7.8110 7.8047 7.7994 7.7881 7.7831 7.7769 7.6856 7.6800 7.6753 7.6644 7.6594 7.6540 7.6387 7.6325 7.6272 7.6162 7.6109 7.6043 7.4290 7.4199 7.4177 7.4080 7.3993 7.3968 4.5401 4.5351

1.00 1.00 1.00 1.00 2.00 2.00 3.00 2.01

f1 (ppm)

Composé 7 (400 Hz)

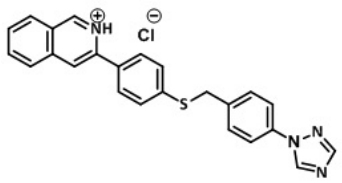


9.3512 9.3456 9.2618 8.8548 8.8492 8.2190 8.1278 8.1246 8.1078 8.1040 7.8883 7.8821 7.8765 7.8708 7.8658 7.8608 7.8539 7.8496 7.8364 7.8321 7.8258 7.8189 7.8139 7.8027 7.7977 7.7914 7.7420 7.7252 7.7208 7.7052 7.7020 7.6201 7.6133 7.6076 7.5976 7.5920 7.5851 7.5601 7.5539 7.5482 7.5376 7.5326 7.5264 4.4224

1.00 1.00 1.00 1.00 2.00 2.00 1.00 2.00 1.00 2.00 2.00

f1 (ppm)

Composé 7 (101 Hz)

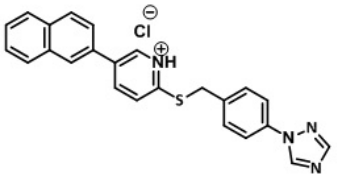


152.8515
148.5252
142.7399
137.7635
137.1641
136.1529
135.1995
134.1739
132.7005
131.1188
130.6132
129.2048
129.1037
128.3525
128.2153
128.1359
127.3125
119.9238

35.9616

f1 (ppm)

Composé 8 (400 Hz)



9.2520 8.9722 8.9697 8.9659 8.9634 8.3017 8.2961 8.2170 8.1379 8.1317 8.1170 8.1107 8.0441 8.0223 8.0079 8.0016 7.9929 7.9838 7.9707 7.9607 7.9526 7.9463 7.9038 7.8988 7.8822 7.8775 7.8166 7.8113 7.8000 7.7950 7.7888 7.6609 7.6547 7.6494 7.6384 7.6331 7.6268 7.5828 7.5703 7.5659 7.5606 7.5537 7.5465 7.5415 7.5371 7.5243 7.4859 7.4837 7.4649 7.4624 4.5657

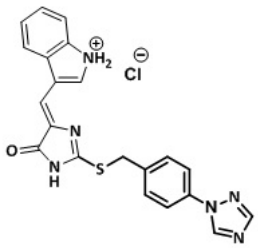
1.40×10^13
1.30×10^13
1.20×10^13
1.10×10^13
1.00×10^13
9.00×10^12
8.00×10^12
7.00×10^12
6.00×10^12
5.00×10^12
4.00×10^12
3.00×10^12
2.00×10^12
1.00×10^12
0.00
-1.00×10^12

1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 2.00 2.00 2.00 1.00 2.00

11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0

f1 (ppm)

Composé 9
(400 Hz)

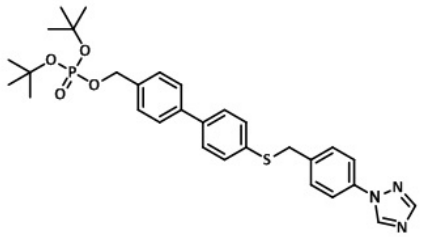


11.9010
11.8963
11.5687
9.2488
8.4501
8.4429
8.2141
8.1388
8.1194
7.8512
7.8447
7.8397
7.8284
7.8231
7.8172
7.7449
7.7387
7.7331
7.7221
7.7171
7.7106
7.4799
7.4633
7.4605
7.2173
7.2139
7.2082
7.2036
7.1995
7.1967
7.1936
7.1839
7.1798
7.1760
7.1560
7.1529
7.1345
7.1188
7.1157
4.6673

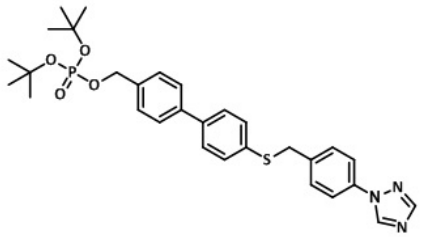
1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 2.01 2.00 1.00 1.00 2.00 2.02

f1 (ppm)

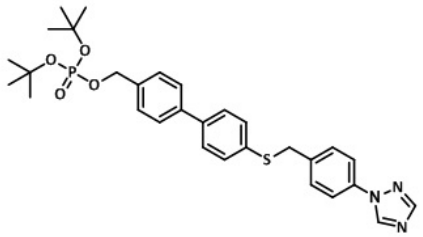
Composé 12 (400 Hz)



Composé 12 (101 Hz)



Composé 12 (162 Hz)



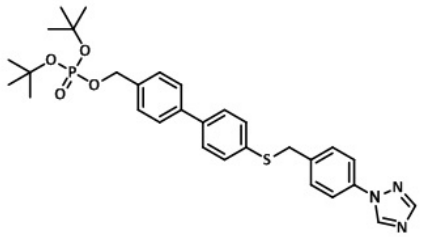
-9.9627

1.00×10^10
9.00×10^9
8.00×10^9
7.00×10^9
6.00×10^9
5.00×10^9
4.00×10^9
3.00×10^9
2.00×10^9
1.00×10^9
0.00
-1.00×10^9

140 120 100 80 60 40 20 0 -20 -40 -60 -80 -100 -120 -140 -160 -180 -200 -220 -240

f1 (ppm)

Composé 12 (162 Hz)



-9.9255
-9.9627
-10.0123

8.0×10^9
7.0×10^9
6.0×10^9
5.0×10^9
4.0×10^9
3.0×10^9
2.0×10^9
1.0×10^9
0.0
-1.0×10^9

140 120 100 80 60 40 20 0 -20 -40 -60 -80 -100 -120 -140 -160 -180 -200 -220 -240

f1 (ppm)

Codes SMILES de la Chimiothèque

Veuillez me contacter pour obtenir la Chimiothèque complète

hugo.roux@univ-amu.fr

hugo.roux@centrale-med.fr