

Laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques
UMR 7257 - CNRS - Aix-Marseille Université
Ecole doctorale des sciences chimiques - ED250

Thèse de doctorat
Spécialité : sciences chimiques

pour obtenir le grade de :
Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Développement de molécules antivirales contre les Arénavirus

Présentée par
Clémence MONDIELLI

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2018 devant le jury composé de :

Mme Odile DECHY-CABARET	Maître de conférence hors classe Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques, Toulouse	Rapportrice
M. Marcel HIBERT	Professeur de classe exceptionnelle Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme Olga IRANZO	Chargée de recherche CNRS Aix-Marseille Université	Examinatrice
M. Philippe COTELLE	Professeur des universités Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille	Examineur
M. Xavier MORELLI	Directeur de recherche CNRS Aix-Marseille Université	Examineur
Mme Karine ALVAREZ	Chargée de recherche CNRS Aix-Marseille Université	Directrice de thèse

A Grany,

« Graver pas à pas son Everest à soi, et le faire de telle sorte que chaque pas soit un peu d'éternité ».

Muriel Barbery, *L'élégance du hérisson*.

Remerciements

Je remercie tous les membres de ce jury de thèse qui ont accepté d'évaluer ce travail. Dr. Odile Dechy-cabaret, vous avez suivi mon parcours depuis l'école de chimie et vous avez suscité mon intérêt pour la chimie médicinale. C'est un honneur pour moi que vous acceptiez de relire ce travail. Pr. Marcel Hibert, votre parcours est un exemple pour moi, et vous me faites l'honneur de rapporter ce manuscrit. En souvenir d'Aussois, merci pour votre sensibilité et votre humanité. Mes remerciements s'adressent également au Dr. Olga Iranzo, au Pr. Philippe Cotelle, et au Dr. Xavier Morelli, qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, le Dr. Karine Alvarez, pour son encadrement tout au long de ces trois années. Merci pour ta pédagogie, tes conseils et ta bienveillance. Je suis grâce à nos moments « maintenance, mécanique, et fluide » experte en réparation d'appareils !

Je tiens à remercier le Dr. Yves Bourne, directeur du laboratoire AFMB, de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche. De plus, ce travail de longue haleine a nécessité l'aide et la collaboration de plusieurs personnes sans qui rien n'aurait pu aboutir. Aussi, je remercie le Dr. Sergio Hernandez, Mme Thi-Hong-van Nguyen, le Dr. Rajender Kumar, le Dr. François Ferron, le Dr. Carine Baraguey, le Dr. Cybel Garcia, et le Dr. Gilles Querat. Je remercie le Dr. Pierre Soule et le Dr. Cyril Castel de la société Nanotemper, pour leur extrême disponibilité pour solutionner les problèmes rencontrés en biophysique. Merci pour votre contribution à tous.

Je tiens également à remercier mes stagiaires. Chiara, tu n'es restée que deux mois, et pourtant, une belle amitié est née. Omer et Eoin, la team « flemme » de l'équipe, vous étiez toujours là dans la joie et la bonne humeur, et vous m'avez aidé à surmonter certains aléas.

Je remercie tous les membres du laboratoire qui ont grandement contribué à égayer mon quotidien ou à m'aider à comprendre les méandres de la biologie structurale.

Béatrice, merci pour ton aide précieuse, ton expertise sans faille, et pour toutes nos discussions débriefing du matin.

Yoan, finalement tu m'as accompagné jusqu'au bout et même si ce n'était pas forcément facile pour toi, je suis contente de t'avoir eu à mes côtés tout du long. Merci pour ton extrême gentillesse, ton aide et ton accompagnement, pour le bricolage lors de mes débuts en LCMS, et pour nos discussions et potins quotidiens ! Tu vas maintenant pouvoir commencer une nouvelle étape, et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Coralie, Sarah, Fabien, pour votre bonne humeur durant les pauses déjeuner. Merci à toi Pascal pour ta bienveillance, ton éclairage et tes conseils sur l'avenir.

REMERCIEMENTS

En trois ans, beaucoup de personnes sont arrivées, mais beaucoup d'autres ont quitté l'AFMB et ont fait partie de mon quotidien : Jérémy, Julie, petite Julie, Marie-Julie et Laurie, avec qui nous nous évadions au Belvédère à midi. Sans vous, le laboratoire n'a pas la même saveur ! Mon cher Polo, ravi d'avoir rencontré une personne aussi vivante et chaleureuse que toi. Quoi qu'il advienne tu as toujours la pêche et le sourire.

Je remercie Mme Corinne Esquiva, gestionnaire de l'école doctorale, pour son dynamisme et son implication auprès des doctorants, toujours au top !

Alexandre, nous sommes entrés en thèse ensemble et j'en ressors avec une belle amitié, qui je le sais perdurera.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier Quentin, mon meilleur ami. Quel chemin parcouru depuis le lycée ! Nous nous sommes construit ensemble, et c'est en partie grâce à toi que j'en suis arrivée là. Je suis fière de nous.

Mon Florian, ça y est, nous avons franchi ensemble ce parcours semé d'embûches. Merci pour ces moments de réconfort. Une nouvelle vie commence avec toi. Je l'attends avec une grande impatience...

Pour terminer, je tiens à remercier mes chers parents qui ont su m'inculquer les valeurs la vie, le sens du travail, et de la rigueur. Vous avez su me donner toutes les clés pour en arriver jusque-là.

Un immense merci à tous.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFMB	Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques
APTS	Acide paratoluènesulfonique,
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsb	Acide ribonucléique simple brin
ARNsi	Acide ribonucléique interférent
APs	Polymères d'ADN amphipathiques
ATP	Adénosine triphosphate
BHK-21	Baby hamster kidney cell 21
BLI	Bio-layer interferometry
BOC	tert-Butoxycarbone
BSA	Bovine serum albumin
BSL	Biosafety Level
BuLi	n-butyllithium
CAP	Coiffe
CC ₅₀	Concentration cytotoxique médiane
CCHF	Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase
CHAPV	Virus chapare
CHPV	Virus chandipura
CMK	(Dec)-RRLL-chlorométhylcétone
DAH	Dicéto-acide hydroxamique
DBOAP	3',5'-Dibenzyloxyacetophenone
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCA	Dicéto-acide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCCA	Dicéto-carboxamide
DCE	Dicéto-ester
DCI	1,1'-Carbonyldiimidazole
DCM	Dichlorométhane
DHP	Dihydropyrane
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DME	Diméthoxyéthane
DMEM	Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPBA	Acide 2-hydroxy-4-oxo-4-phénylbut-2-énoïque
DSF	Fluorimétrie différentielle à balayage
DTT	Dithiothréitol
EC50	Concentration effective médiane
EDCI	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FBS	Fœtal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration

LISTE DES ABREVIATIONS

FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GFP	Green Fluorescent protein
GLuc	Gaussia Luciferase
GPC	Glycoprotéine d'enveloppe
GTOV	Virus Guaranito
HAZV	Virus Hazara
HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HID	N-hydroxyisoquinoline-1,3-diones
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IN	Intégrase
iPrOH	Isopropanol
IRBA	Institut de recherche biomédicale des armées
IRD	Institut de recherche pour le développement
ITC	Titration calorimétrique isotherme
JUNV	Virus Junin
LACV	Virus La Crosse
LASV	Virus Lassa
LCMS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LiHMDS	bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
MACV	Virus Machupo
MOI	Multiplicity of infection
MOPV	Virus Mopeia
MST	Thermophorèse à micro-échelle
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMM	N-méthylmorpholine
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NP	Nucléoprotéine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PDB	Protein Data Bank
POP	Polyphénols
PMO	Oligonucléotides morpholinos
PPMO	Peptide conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers
PRR	Pattern Recognition Receptors
RIG-1	Retinoic acid Inducible Gene
RLRs	RIG-I like receptors
RpRd	ARN polymérase ARN dépendante
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RVFV	Virus de la vallée du Rift
SABV	Virus Sabia
SAR	Relations structure-activité
SARS	Syndrôme respiratoire aigu sévère
SI	Indice de sélectivité

LISTE DES ABREVIATIONS

SN ₂	Substitution nucléophile d'ordre 2
S1P	Cellular Subtilisin kexin isozyme1(SKI-1)/site1 Protease
SPR	Résonance plasmon de surface
SSP	Signal Single Peptide
ST	Transfert de brin
TA	Température ambiante
TAHV	Virus Tahyna
TCID50	Tissue culture Infective Dose
TCRV	Virus Tacaribe
TFA	Acide trifluoroacétique
TfR1	Récepteur de la transferrine 1
THF	Tétrahydrofurane
T _m	Température de dénaturation
TMS	Trimethylsilyle
TSA	Thermal Shift Assay
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101
Tyro3	Protéine réceptrice de la tyrosine kinase 3
vRNPs	Complexes ribonucléoprotéïniques viraux
VESPR	Valence Shell Electron Pair Repulsion
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

Table des matières

CHAPITRE 1 – CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU PROJET	17
I. LA FAMILLE DES <i>ARENAVIRIDAE</i>	19
1. <i>Généralités</i>	19
a. Origine et découverte.....	19
b. Classification.....	20
c. Maladies impliquées.....	21
d. Répartition mondiale.....	22
e. Organisation du génome.....	24
f. Cycle réplcatif.....	25
2. <i>Les traitements disponibles en cas d'infection par un Aronavirus</i>	27
3. <i>Les stratégies thérapeutiques à l'étude</i>	28
a. Inhibiteurs d'entrée.....	28
b. Inhibiteurs de la réplication.....	30
c. Inhibiteurs des modifications post-traductionnelles.....	33
d. Inhibiteurs ciblant l'assemblage et le bourgeonnement du virus.....	33
II. LES NUCLEASES D'ARENAVIRUS	39
1. <i>Exonucléase de la nucléoprotéine NP, responsable de l'échappement à l'immunité innée</i>	39
a. Fonction.....	39
b. Structure.....	40
2. <i>Endonucléase de la protéine L, responsable du vol de la coiffe de l'hôte pour la réplication</i>	42
a. Fonction : le mécanisme de vol de coiffe.....	42
b. Structure.....	43
3. <i>Un mécanisme commun : le mécanisme à deux ions métalliques catalytiques</i>	45
4. <i>Des cibles thérapeutiques potentielles</i>	46
III. LA CHELATION DU MAGNESIUM OU DU MANGANESE COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE	50
1. <i>Les médicaments chélateurs de métaux commercialisés aujourd'hui</i>	50
2. <i>Les composés chélateurs de Mg et Mn</i>	51
a. Le manganèse et le magnésium, co-facteurs d'enzymes virales.....	51
b. Les composés chélateurs de Mg ou Mn.....	52
IV. LES DICETO-ACIDES EN CHIMIE MEDICINALE.....	56
1. <i>Inhibiteurs de l'intégrase du VIH</i>	57
2. <i>Inhibiteurs de l'endonucléase du virus de la grippe</i>	60
a. Activité antivirale.....	60
b. Données structurales.....	61
V. TRAVAUX PRELIMINAIRES REALISES AU LABORATOIRE	63
1. <i>Endonucléase du LCMV</i>	63
a. Criblage par DSF.....	63
b. Evaluation par thermophorèse à micro-échelle (MST)	64
c. Activité in vitro et efficacité en mini-génome.....	64
d. Structures cristallographiques.....	65
2. <i>Exonucléase du MOPV</i>	66
a. Structure cristallographique.....	66
b. Criblage in silico d'une chimiothèque.....	66
OBJECTIFS DE RECHERCHE	69
CHAPITRE 2 – CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES COMPOSÉS CIBLES	73
PARTIE 1 – LES DICETO-ACIDES.....	75
I. LE COMPOSÉ 35 ET LES DICETO-ACIDES	75
1. <i>Synthèse historique du composé 35</i>	75
2. <i>Synthèse chimique des DCAs</i>	78
a. Les dicéto-acides : structure et propriétés.....	78
b. La condensation de Claisen, étape clé de la synthèse des DCAs.....	80
II. ORIGINE DES COMPOSÉS CIBLES ET RESULTATS PRELIMINAIRES	84

1.	<i>Endonucléase du LCMV : relations structure-activité déterminées pour la 1^{ère} génération de DCAs</i>	84
a.	Evaluation des DCAs par thermophorèse à micro-échelle (MST)	84
b.	Activité in vitro et efficacité en mini-génome.....	85
2.	<i>Exploitation des structures cristallographiques</i>	87
a.	Structure des composés 58 et 35 en complexe avec l'endonucléase du LCMV.....	87
b.	Exonucléase du MOPV : holoenzyme.....	89
3.	<i>Design de nouveaux composés</i>	90
III.	RESULTATS : OPTIMISATION DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES DCAS A PARTIR DE SYNTHONS MODELES DE TYPE PHENYLE-DCA.....	94
1.	<i>Obtention des synthons méthyle cétones 158 à 161</i>	94
2.	<i>Optimisation de la réaction de Claisen</i>	95
a.	Influence du contre-ion métallique de la base sur la condensation de Claisen.....	96
b.	Influence de l'oxalate utilisé sur la condensation de Claisen.	97
3.	<i>Optimisation de l'hydrolyse du DCE</i>	99
IV.	RESULTATS : SYNTHÈSE DES DERIVES DU COMPOSE 35	102
1.	<i>Voie classique</i>	102
a.	Synthèse de la méthyle cétone 115 : synthon clé pour introduire la diversité structurale.....	102
b.	Synthèse des méthyles cétones substituées 116, 182-191, 193-199, et 204.....	107
c.	Condensation de Claisen sur les méthyle cétones 182-191, 193-199, et 204 : synthèse des DCEs.....	112
d.	Hydrolyse des DCEs : synthèse des DCAs analogues du composé 35.....	114
2.	<i>Voie raccourcie</i>	115
3.	<i>Voie pyruvate</i>	118
	PARTIE 2 - COMPOSES BIOISOSTERIQUES ET ANALOGUES DES DICETO-ACIDES ET	122
1.	<i>Les bioisostères</i>	122
a.	Définition.....	122
b.	Résultats : synthèse.....	124
2.	<i>Dicéto-acides hydroxamiques et dicéto-carboxamides</i>	128
a.	Bibliographie.....	129
b.	Résultats : synthèse.....	132
	PARTIE 3 - CARACTERISATION PAR RMN DES DCAS DE 2 ^{NDE} GENERATION.....	140
1.	<i>Analyse des spectres RMN des composés finaux : problèmes rencontrés . Erreur ! Le signet n'est pas défini.</i>	
a.	Les phénomènes d'échanges en RMN.....	140
b.	Origine des phénomènes d'échanges observés sur les DCAs de 2 ^{nde} génération.....	141
c.	Solutions mises en œuvre.....	142
d.	Résultats.....	143
	CHAPITRE 3 - EVALUATION BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIQUE DES DCAS DE 2 ^{NDE} GENERATION ET DES BIOISOSTERES DU COMPOSE 35	150
I.	EVALUATION BIOLOGIQUE DES DCAS ET ANALOGUES DE 2 ^{NDE} GENERATION CONTRE L'ENDONUCLEASE DU LCMV 153	
1.	<i>Fluorimétrie différentielle à balayage (DSF)</i>	153
a.	Principe de la technique.....	153
b.	Résultats : évaluation des ligands synthétisés sur l'endonucléase du LCMV.....	155
2.	<i>Thermophorèse à micro-échelle (MST)</i>	159
a.	Principe de la technique.....	159
b.	Résultats : évaluation de l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour les ligands.....	161
3.	<i>Activité inhibitrice de l'endonucléase du LCMV</i>	168
a.	Principe du test.....	168
b.	Résultats.....	169
II.	EVALUATION BIOLOGIQUE DES DCAS ET ANALOGUES DE 2 ^{NDE} GENERATION CONTRE L'EXONUCLEASE DE MOPV170	
1.	<i>Fluorimétrie différentielle à balayage (DSF)</i>	170
2.	<i>Thermophorèse à micro-échelle (MST)</i>	173
3.	<i>Activité inhibitrice de l'exonucléase du Mopeia</i>	174
a.	Principe du test.....	174
b.	Résultats.....	174

TABLE DES MATIERES

III.	EVALUATION EN MINI-GENOME <i>IN CELLULA</i> DES DCAS ET ANALOGUES DE 2 ^{NDE} GENERATION.....	177
1.	<i>Viabilité cellulaire des composés en cellules BHK-21</i>	177
2.	<i>Principe du mini-génome</i>	178
3.	<i>Résultats</i>	179
IV.	ETUDE DE STABILITE ET DE VIABILITE CELLULAIRE	187
V.	EVALUATION DE QUELQUES DCAS DE 2 ^{NDE} GENERATION CONTRE LE VIRUS DE JUNIN	189
1.	<i>Principe du test</i>	189
2.	<i>Résultats</i>	189
VI.	EXTENSION AU <i>BUNYAVIRALES</i>	190
1.	<i>Les Bunyavirales</i>	190
2.	<i>Evaluation de 14 DCAs de 2^{nde} génération en cellules infectées par des Bunyavirales</i>	191
a.	Principe du test.....	191
b.	Résultats.....	191
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	194
	PARTIE EXPERIMENTALE	212

Introduction générale

Les maladies émergentes sont l'ensemble des maladies nouvellement découvertes ou apparaissant dans une région du monde. Plus particulièrement, les virus émergents pathogènes humains constituent aujourd'hui l'un des enjeux majeurs de la recherche biomédicale. Ces virus d'évolution nouvelle, proviennent souvent de virus déjà existants ayant subi des modifications génétiques, ou sont le résultat de perturbations de l'écosystème, de contacts entre réservoir, animal et être humain, conduisant à l'apparition de virus adaptés à l'homme. La modification des facteurs climatiques et l'accroissement des flux migratoires entraînent le développement de ces maladies. Leur caractère inédit représente une menace permanente pour la population mondiale puisque par définition, aucun diagnostic ni traitement n'existe au moment de leur identification. Depuis 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place un système de surveillance des maladies émergentes.

Prenons le virus Zika qui, découvert en 1947, n'infectait que des cas isolés. Responsable entre autres, de microcéphalies chez les nouveaux nés, il est devenu une réelle menace cette dernière décennie puisqu'il s'est répandu de manière fulgurante à travers le monde et qu'aucun traitement n'est encore disponible à ce jour. Cet exemple souligne l'importance de la conduite de recherches sur ces virus ; peu importe leur impact dans le monde à l'instant t afin d'être armés thérapeutiquement le jour où l'un d'entre eux se propagera rapidement.

Le rôle de la recherche médicale et des pouvoirs publics est donc de trouver des outils de détection et de prévention de ces nouvelles maladies, des solutions thérapeutiques efficaces et des politiques de santé publique durables et volontaristes. Par ailleurs, le contexte géopolitique mondial incertain et anxigène sous-tend l'utilisation de ces virus comme potentielle arme biologique, étant donné qu'il y a très peu de moyens pour les anéantir. Il est donc doublement temps de mettre en œuvre des moyens scientifiques pour sauver des vies, diminuer les risques sanitaires, et avoir des moyens de défense en cas de guerre biologique.

Ce projet de thèse, s'inscrit dans ce contexte à travers la conception d'antiviraux ciblant les Arenavirus, hautement pathogènes et trop peu étudiés.

Chapitre 1. Contexte scientifique du projet

Chapitre 1 – Contexte scientifique du projet

I. La famille des *Arenaviridae*

1. Généralités

a. Origine et découverte

En 1933, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) a été découvert par Armstrong & Lillie¹. Il s'agit du premier Arenavirus découvert lors de l'épidémie d'encéphalite de Saint-Louis, aux Etats-Unis. Ce nom provient du latin *arena* qui veut dire « sableux » car ces virus sont caractérisés par une granulation sableuse observée sur les particules virales en microscopie électronique. Ces virus sont transmis par les rongeurs (ou les chauves-souris dans le cas de l'espèce Tacaribe, TCRV) par l'intermédiaire des voies respiratoires ou par contact avec des déjections.

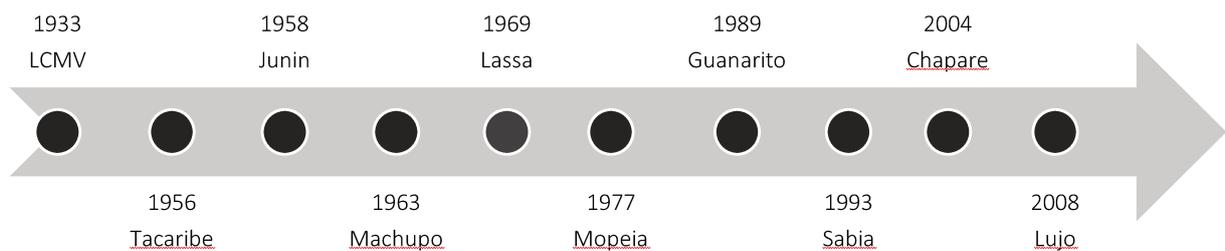


Figure 1. Chronologie de la découverte des différents Arenavirus.

Au fil des années, plusieurs Arenavirus ont été isolés, principalement en Amérique du sud et en Afrique (Figure 1). En 1958, le virus Junin (JUNV) provoquant la fièvre hémorragique d'Argentine fait son apparition, c'est le premier Arenavirus du nouveau monde à provoquer une fièvre hémorragique virale. Le virus Lassa (LASV) est découvert en 1969 au Nigéria et est alors le premier Arenavirus déclenchant des fièvres hémorragiques virales dans l'ancien monde. C'est en 1974 que les particularités biologiques et physico-chimiques de ces virus sont établies et définies. Certains d'entre eux sont hautement infectieux et provoquent de graves pathologies. Ils font depuis plusieurs décennies l'objet de recherche. Le LCMV est l'Arenavirus prototype et donc le plus étudié. En effet, il est présent à l'échelle mondiale grâce à son vecteur de transmission, la souris commune *Mus Musculus*. Il est également facilement manipulable en laboratoire de confinement de niveau 2 (BSL-2) alors que le virus Lassa nécessite un

¹ C. Armstrong and R. D. Lillie, *Public Health Reports (1896-1970)*, 1934, 49, 1019–1027.

CHAPITRE 1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU PROJET

niveau 4. Le virus Mopeia (MOPV), découvert en 1977², est non pathogène pour l'homme mais possède 75% d'identité en acides aminés avec le virus Lassa, ce qui en fait également un outil expérimental précieux.

b. Classification

Trois genres d'Arenavirus sont à distinguer : les *Mammarenavirus* infectant les mammifères, les *Reptarenavirus* infectant les reptiles, et un troisième genre récemment validé par le comité international de la taxonomie des virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), les *Hartmanivirus* comportant un virus isolé chez le boa constricteur en Finlande³.

La mise à jour de 2018 a permis de dresser la liste de toutes les espèces d'Arenavirus classées par genre⁴ (Tableau 1).

Genre	Espèce	Virus
Hartmanivirus	<i>Haartman hartmanivirus</i>	Virus Haartman Institute snake (HISV)
Mammarenavirus	<i>Allpahuayo mammarenavirus</i>	Virus Allpahuayo (ALLV)
	<i>Argentinian mammarenavirus</i>	Virus Junín (JUNV)
	<i>Bear Canyon mammarenavirus</i>	Virus Bear Canyon (BCNV)
	<i>Brazilian mammarenavirus</i>	Virus Sabiá (SBAV)
	<i>Chapare mammarenavirus</i>	Virus Chapare (CHAPV)
	<i>Gairo mammarenavirus</i>	Virus Gairo (GAIV)
	<i>Guanarito mammarenavirus</i>	Virus Guanarito (GTOV)
	<i>Ippy mammarenavirus</i>	Virus Ippy (IPPYV)
	<i>Lassa mammarenavirus</i>	Virus Lassa (LASV)
	<i>Latino mammarenavirus</i>	Virus Latino (LATV)
	<i>Loei River mammarenavirus</i>	Virus Loei River (LORV)
	<i>Lujo mammarenavirus</i>	Virus Lujo (LUJV)
	<i>Luna mammarenavirus</i>	Virus Luna (LUAV)
		Virus Luli (LULV)
	<i>Lunk mammarenavirus</i>	Virus Lunk (LNKV)
	<i>Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus</i>	Virus Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)
	<i>Machupo mammarenavirus</i>	Virus Machupo (MACV)
	<i>Mariental mammarenavirus</i>	Virus Mariental (MRLV)
<i>Merino Walk mammarenavirus</i>	Virus Merino Walk (MRWV)	

² H. Wulff, B. M. McIntosh, D. B. Hamner and K. M. Johnson, *Bull World Health Organ.*, **1977**, **55**, 441–444.

³ J. Hepojoki, P. Salmenperä, T. Sironen, U. Hetzel, Y. Korzyukov, A. Kipar and O. Vapalahti, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 8657–8660.

⁴ P. Maes, S. V. Alkhovsky, Y. Bào, M. Beer, M. Birkhead, T. Briese, M. J. Buchmeier, C. H. Calisher, R. N. Charrel, I. R. Choi, C. S. Clegg, J. C. de la Torre, E. Delwart, J. L. DeRisi, P. L. D. Bello, F. D. Serio, M. Digiaro, V. V. Dolja, C. Drosten, T. Z. Druciarek, J. Du, H. Ebihara, T. Elbeaino, R. C. Gergerich, A. N. Gillis, J.-P. J. Gonzalez, A.-L. Haenni, J. Hepojoki, U. Hetzel, T. HỒ, N. Hóng, R. K. Jain, P. J. van Vuren, Q. Jin, M. G. Jonson, S. Junglen, K. E. Keller, A. Kemp, A. Kipar, N. O. Kondov, E. V. Koonin, R. Kormelink, Y. Korzyukov, M. Krupovic, A. J. Lambert, A. G. Laney, M. LeBreton, I. S. Lukashevich, M. Marklewitz, W. Markotter, G. P. Martelli, R. R. Martin, N. Mielke-Ehret, H.-P. Mühlbach, B. Navarro, T. F. F. Ng, M. R. T. Nunes, G. Palacios, J. T. Pawęska, C. J. Peters, A. Plyusnin, S. R. Radoshitzky, V. Romanowski, P. Salmenperä, M. S. Salvato, H. Sanfaçon, T. Sasaya, C. Schmaljohn, B. S. Schneider, Y. Shirako, S. Siddell, T. A. Sironen, M. D. Stenglein, N. Storm, H. Sudini, R. B. Tesh, I. E. Tzanetakis, M. Uppala, O. Vapalahti, N. Vasilakis, P. J. Walker, G. Wáng, L. Wáng, Y. Wáng, T. Wèi, M. R. Wiley, Y. I. Wolf, N. D. Wolfe, Z. Wú, W. Xú, L. Yang, Z. Yāng, S.-D. Yeh, Y.-Z. Zhāng, Y. Zhèng, X. Zhou, C. Zhū, F. Zirkel and J. H. Kuhn, *Arch Virol.*, **2018**, 1–16.

	<i>Mobala mammarenavirus</i>	Virus Mobala (MOBV)
	<i>Mopeia mammarenavirus</i>	Virus Mopeia (MPOV)
		Virus Morogoro (MORV)
	<i>Okahandja mammarenavirus</i>	Virus Okahandja (OKAV)
	<i>Oliveros mammarenavirus</i>	Virus Oliveros (OLVV)
	<i>Paraguayan mammarenavirus</i>	Virus Paraná (PRAV)
	<i>Cali mammarenavirus</i>	Virus Pichindé (PICHV)
	<i>Piritital mammarenavirus</i>	Virus Piritital (PIRV)
	<i>Ryukyu mammarenavirus</i>	Virus Ryukyu (RYKV)
	<i>Serra do Navio mammarenavirus</i>	Virus Amapari (AMAV)
	<i>Solwezi mammarenavirus</i>	Virus Solwezi (SOLV)
	<i>Souris mammarenavirus</i>	Virus Souris (SOUV)
	<i>Tacaribe mammarenavirus</i>	Virus Tacaribe (TCRV)
	<i>Tamiami mammarenavirus</i>	Virus Tamiami (TMMV)
	<i>Wenzhou mammarenavirus</i>	Virus Wēnzhōu (WENV)
	<i>Whitewater Arroyo mammarenavirus</i>	Virus Big Brushy Tank (BBRTV)
		Virus Catarina (CTNV)
		Virus Skinner Tank (SKTV)
		Virus Tonto Creek (TTCV)
		Virus Whitewater Arroyo (WWAV)
	<i>California reptarenavirus</i>	Virus CAS (CASV)
	<i>Giessen reptarenavirus</i>	Virus University of Giessen 1 (UGV-1)
		Virus University of Giessen 2 (UGV-2)
		Virus University of Giessen 3 (UGV-3)
Reptarenavirus	<i>Golden reptarenavirus</i>	Virus Golden Gate (GOGV)
	<i>Ordinary reptarenavirus</i>	Virus Tavallinen suomalainen mies 2 (TSMV-2)
	<i>Rotterdam reptarenavirus</i>	Virus ROUT (ROUTV)
		Virus University of Helsinki 1 (UHV-1)

Tableau 1. Taxonomie ICTV 2018 de la famille des *Arenaviridae*.

Parmi les *Mammarenavirus*, une distinction se fait entre les Arenavirus du nouveau et de l'ancien monde selon leurs propriétés antigéniques et leur distribution géographique. A ce jour, on dénombre 14 espèces d'Arenavirus de l'ancien monde et 25 espèces d'Arenavirus du nouveau monde⁵. Les Arenavirus du nouveau monde sont divisés en trois classes A, B et C. La classe B regroupe tous les Arenavirus provoquant des fièvres hémorragiques. En moyenne, un nouvel Arenavirus est découvert tous les 3,5 ans.

c. Maladies impliquées

Parmi toutes les espèces d'Arenavirus recensées, environ 9 sont responsables de pathologies humaines allant de méningites bénignes à des fièvres hémorragiques mortelles.

⁵ Old world/New world Arenaviruses [en ligne]. Center for Disease Control and Prevention. Disponible sur : < <https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/arenaviruses.html>> (consulté en 12.2017)

Les pathologies touchant le système nerveux central sont principalement reliées aux Arenavirus de l'ancien monde, tandis que les syndromes hémorragiques sont plus communs chez ceux du nouveau monde⁶. Le LCMV provoque des méningites aseptiques ou des méningo-encéphalites. Les infections congénitales par le LCMV peuvent conduire à la mort du fœtus ou provoquer des malformations conduisant à des défaillances visuelles ou neurologiques. 35% des cas de LCMV congénitaux sont mortels. Plus récemment, le LCMV a également été impliqué dans des cas de transplantation d'organes chez les receveurs⁷. En 2015, 14 cas d'infection lors de transplantations d'organes ont été reportées, parmi lesquelles 11 ont conduit au décès du patient.

La plupart des Arenavirus du nouveau monde de classe B provoquent de graves fièvres hémorragiques. Plusieurs cas de maladies ont été reportés dus aux virus Lujo (LUJV, Afrique du sud), Junin (JUNV, Argentine), Machupo (MACV, Bolivie) et Chapare (CHAPV, Bolivie), Guanarito (GTOV, Vénézuëla), et Sabia (SABV, Brésil). Cependant, la fièvre de Lassa semble la plus virulente avec un taux de mortalité avoisinant les 30% et pouvant aller jusqu'à 80% chez les femmes enceintes.

Symptômes et diagnostic

Généralement, les signes cliniques rencontrés chez les patients infectés par un Arenavirus sont très peu spécifiques (fièvres, vomissements, nausées, douleurs abdominales, céphalées, myalgies arthralgies, asthénie). Il s'agit de symptômes similaires à d'autres pathologies telles que le paludisme ou la dysenterie, très fréquentes dans les zones du globe concernées par les Arenavirus. Cette difficulté à diagnostiquer les différentes maladies provoquées par ces virus a pour conséquence la prise de traitements antiviraux à large spectre à des stades avancés de la maladie ce qui les rend souvent inefficaces.

Transmission

L'homme est l'hôte accidentel des Arenavirus. La transmission s'opère par inhalation d'aérosols contenant des sécrétions ou des excréments de rongeurs infectés mais aussi à travers un frottement cutané. Le virus Lassa, se transmet d'homme à homme (transmission sexuelle, transmission lors de l'allaitement). La maladie est souvent saisonnière selon les périodes de reproduction des réservoirs hôtes.

d. Répartition mondiale

Les Arenavirus sont présents sur toute la planète, chaque espèce ayant son terrain géographique. Ceux de l'ancien monde sont principalement répartis en Afrique du sud comme LASV, tandis que ceux du

⁶ J. Shao, Y. Liang and H. Ly, *Pathogens*, **2015**, **4**, 283–306.

⁷ N. Singh, M. E. Levi and the AST Infectious Diseases Community of Practice, *Am. J. Transplant.*, **2013**, **13**, 361–371.

nouveau monde tels que le MACV ou le JUNV, sont surtout présents en Amérique du sud (Figure 2). Le LCMV est le seul Arenavirus ayant une répartition mondiale.

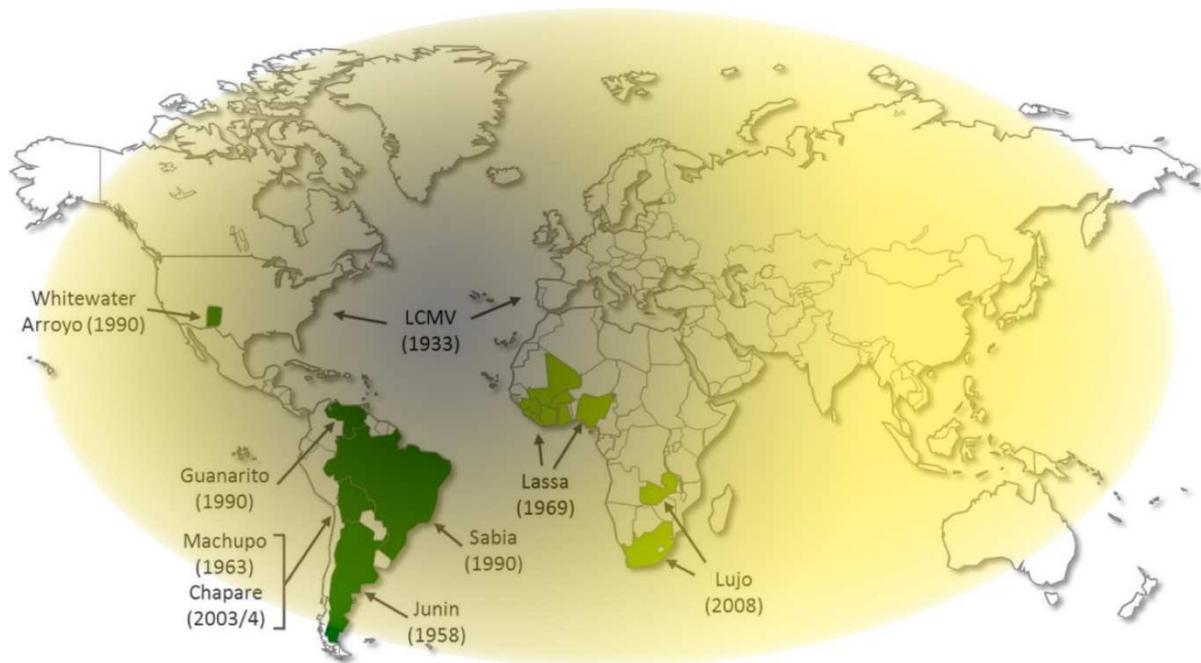


Figure 2. Distribution géographique des Arenavirus (adapté de Fehling et al.⁸). En vert clair : Arenavirus de l'ancien monde. En vert foncé : Arenavirus du nouveau monde. LCMV : distribution géographique mondiale.

Actuellement, la fièvre de Lassa est la fièvre hémorragique la plus virulente et la plus fréquemment importée dans les pays du nord. Elle est endémique en Afrique de l'ouest du Sénégal jusqu'au Cameroun et est apparue ces dernières années au Mali. On dénombre chaque année 300 000 personnes infectées par le virus Lassa en Afrique de l'ouest dont 6000⁹ d'entre elles décèdent.

Sur le continent sud-américain, on estime que 5 millions de personnes sont exposées à une infection par le JUNV ce qui constitue une réelle menace de santé publique¹⁰. Sa distribution géographique est passée de 15 000 km² lors de sa découverte en 1958 à 150 000 km² dans les années 2000. Les agriculteurs sont en première ligne puisqu'ils travaillent dans les zones de prédilection de vie des rongeurs. D'autres Arenavirus du nouveau monde sont très pathogènes comme le MACV, le SABV, le GTOV, ou le virus Chandipura (CHPV).

L'OMS recense régulièrement de nouveaux cas d'infection signifiant le caractère alarmant de la propagation de ces virus, et l'apparition de nouvelles zones endémiques en parti du au changement des flux migratoires¹¹. En 2016, la recrudescence du virus Lassa a été observée au Bénin, 28 personnes sont

⁸ S. K. Fehling, F. Lennartz, T. Strecker, *Viruses*, **2012**, *4*, 2973–3011.

⁹ S. Olschläger, L. Flatz, *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003212.

¹⁰ R. M. Gómez, C. Jaquenod de Giusti, M. M. Sanchez Vallduvi, J. Frik, M. F. Ferrer and M. Schattner, *Microbes Infect.*, **2011**, *13*, 303–311.

¹¹ Lassa Fever - Nigeria. Disease outbreak news [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.who.int/csr/don/27-may-2016-lassa-fever-nigeria/en/>> (consulté en 06.2017)

décédées sur un total de 54 hospitalisations. Entre Janvier et Mars 2018, le Nigéria a connu sa plus grande recrudescence du virus¹². Sur 365 cas d'infections répertoriés, 81 personnes sont décédées.

L'impact sur la santé humaine des Arenavirus a été évalué dans une étude datant de 2009¹³ dans un contexte de réchauffement climatique et ses conséquences en termes de prolifération des rongeurs. Les résultats montrent que 50 millions de personnes pourraient être exposées d'ici 2020 dans la région entre l'Accra et le delta du Niger. Ceci impliquera donc l'importation de patients infectés dans des régions du monde n'ayant jamais appréhendé la présence de ces virus. Par ailleurs, dans le contexte géopolitique de ces dernières dizaines d'années, les Arenavirus ont été inclus dans la liste des six micro-organismes représentant la plus grande menace comme arme biologique pour la santé publique, déterminée en 1999 par le Center for Disease Control and Prevention (CDC). En effet, la plupart des Arenavirus sont classés dans la liste des agents pathogènes de catégorie A et niveau de sûreté biologique 4 (BSL-4) aux Etats-Unis et en Europe. Pourtant, ils ne font pas forcément l'objet prioritaire d'étude, puisqu'à ce jour aucun traitement efficace n'est commercialisé malgré l'ancienneté de cette famille de virus. Il est donc urgent d'agir, de comprendre la biologie de ces virus afin de pouvoir fournir des solutions thérapeutiques efficaces et durables.

e. Organisation du génome

Les Arenavirus sont des virus à ARN négatif simple brin bi-segmentés de classe V (classification de Baltimore, nécessité d'une RpRd structurale) fragmentés (Figure 3).

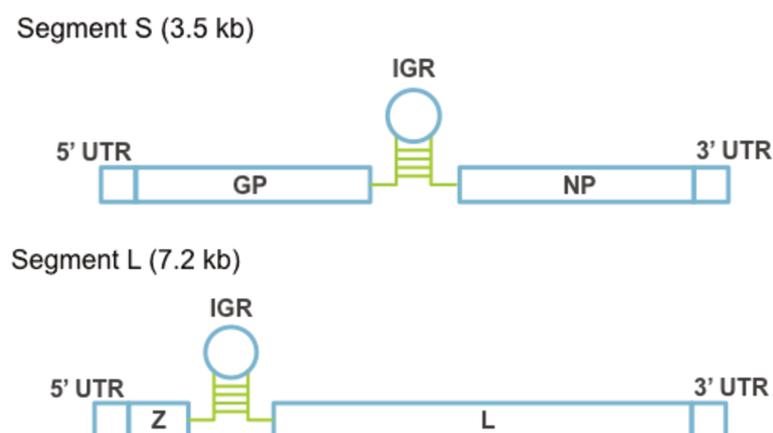


Figure 3. Organisation du génome des Arenavirus.

Le segment L (Large, 7.2 kb) code pour la protéine de matrice Z (~11 kDa), impliquée dans la réplication virale et le bourgeonnement, et la protéine L (~200 kDa) qui est l'ARN polymérase ARN dépendante et qui nous intéresse lors de ce projet. Le segment S (Short, 3.4 kb) code pour la glycoprotéine GPC

¹² Lassa Fever - Nigeria. Disease outbreak news [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.who.int/csr/don/23-march-2018-lassa-fever-nigeria/en/-nigeria/en/>> (consulté en 07.2018)

¹³ J. C. Clegg, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, 15, 504–509.

(précurseur des glycoprotéines de surfaces, ~75 kDa) qui donnera après clivage post-translational, GP1 (40-46 kDa), GP2 (35 kDa) et SSP (*Stable Signal Peptide*), et la nucléoprotéine NP (~63 kDa). Chaque segment utilise une stratégie de transcription des génomes ambisens.

Les segments d'ARN génomiques sont assemblés en complexes ribonucléoprotéiniques viraux (vRNPs) avec des copies de la nucléocapside et une copie de la polymérase L par segment.

f. Cycle réplcatif

Le cycle de vie des Arenavirus est réduit au cytoplasme de la cellule (Figure 4). La structure du virion a été déterminée par Auperin *et al.*¹⁴ en 1982.

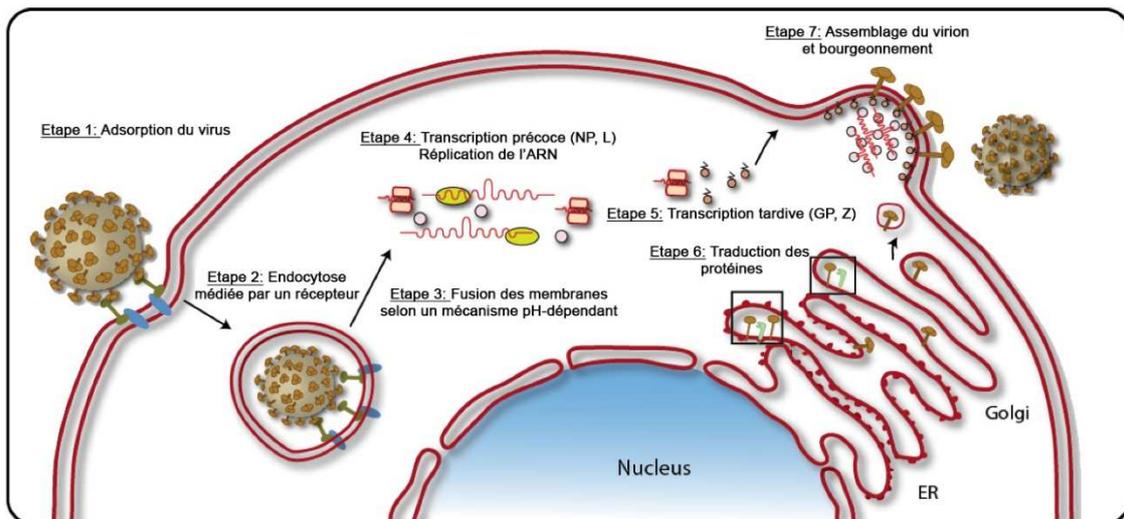


Figure 4. Cycle de vie d'un Arenavirus (Adapté de Burri *et al.* 2012¹⁵).

La première étape du cycle de vie, est l'adsorption ou fixation du virus à la surface de la cellule hôte (Figure 4, Etape 1). La fixation des virions nécessite l'interaction entre un ligand viral et un récepteur cellulaire. Dans le cas des Arenavirus, cette étape a lieu entre la glycoprotéine GP1 et différents types de récepteurs cellulaires. Les Arenavirus de l'ancien et ceux du nouveau monde de classe C se fixent majoritairement à l' α -dystroglycane, récepteur de l'adhérence cellulaire présent à la surface des cellules dans une large variété de tissus¹⁶. Toutefois, des récepteurs alternatifs ont été répertoriés dans le cas du virus Lassa (Axl, Tyro3, DC-SIGN, et LSECtin). Les Arenavirus du nouveau monde de classe B, se fixent au récepteur de la transferrine 1, TfR1 (dimère situé à la surface des cellules permettant l'endocytose de la transferrine). A ce jour, il a été supposé que les Arenavirus du nouveau monde de classe A se fixaient de la même manière, mais aucune étude n'a clairement établi ce fait.

¹⁴ D. D. Auperin, R. W. Compans, D. H. L. Bishop, *Virology*, **1982**, *121*, 200–203.

¹⁵ D. J. Burri, D. J. R. Palma, S. Kunz, A. Pasquato, *Viruses*, **2012**, *4*, 2162-2181.

¹⁶ W. Cao, M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell, M. B. Oldstone, *Science*, **1998**, *282*, 2079–2081.

Une fois liés au récepteur, les virus sont incorporés dans la cellule par un mécanisme d'endocytose qui les conduit dans l'endosome (Figure 4, Etape 2). Il y a ensuite fusion de la vésicule avec l'endosome conduisant à une acidification et à la fusion de l'enveloppe, libérant la nucléocapside dans le cytoplasme (Figure 4, Etape 3). Les complexes viraux ribonucléoprotéïques (vRNPs) sont alors relargués, la phase productive pouvant alors s'initier.

Les Arenavirus produisent trois types d'ARN : l'ARN génomique, l'ARN anti-génomique et l'ARN messenger viral. Puisque leur stratégie de transcription des génomes est ambisens, les gènes codant pour la nucléoprotéine NP et la polymérase L sont transcrits directement à partir des ARN génomiques (Figure 4, Etape 4), tandis que la glycoprotéine GP et la protéine de matrice Z sont transcrits tardivement à partir de l'anti-génome (Figure 4, Etape 5). Une fois les étapes de transcription effectuées, la traduction des protéines peut s'opérer (Figure 4, Etape 6). La protéine L contient la RpRd qui peut être divisée en trois ou quatre domaines selon différentes analyses. Le domaine C-terminal serait potentiellement impliqué dans la synthèse d'ARNm viral, mais le mécanisme reste à ce jour à élucider. Le domaine N-terminal de la protéine L possède, lui, une activité endonucléase qui a été démontrée comme étant essentielle à la transcription¹⁷ et qui fait l'objet de ce projet de thèse. La RpRd utilise des ARN oligonucléotidiques coiffés dérobés aux ARN messagers cellulaires comme initiateurs de la synthèse des ARNm viraux. Ces coiffes sont obtenues grâce à un mécanisme de vol de coiffe impliquant l'activité endonucléase que nous aborderons ultérieurement. La nucléoprotéine NP possède en son domaine C-terminal une activité exonucléase lui permettant de protéger la machinerie virale du déclenchement du système immunitaire. La nucléoprotéine NP et la protéine L sont nécessaires et suffisantes pour effectuer la transcription et la réplication.

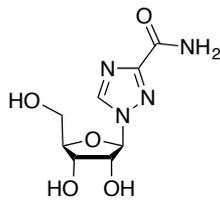
La protéine de matrice Z dirige ensuite le processus d'assemblage des pseudo particules virales (Figure 4, Etape 7). Elle possède des domaines PTAP et PPPY cruciaux pour cette étape. A travers son interaction avec la nucléoprotéine NP, elle est responsable du recrutement de complexes vRNPs au niveau du site de bourgeonnement et de leur enveloppement ultérieur en particules virales. Les glycoprotéines virales sont ensuite incorporées aux particules virales grâce à l'interaction entre GP et Z.

La connaissance du cycle de vie des Arenavirus est cruciale pour pouvoir développer des solutions thérapeutiques. Depuis seulement quelques dizaines d'années, des stratégies ciblant diverses étapes du cycle viral sont en cours de recherche. Toutefois, l'effort de recherche fait sur ces virus reste insuffisant.

¹⁷ B. Morin, B. Coutard, M. Lelke, F. Ferron, R. Kerber, S. Jamal, A. Frangeul, C. Baronti, R. Charrel, X. de Lamballerie, C. Vonrhein, J. Lescar, G. Bricogne, S. Günther, B. Canard, *PLoS Pathog.*, **2010**, **6**, e1001038.

2. Les traitements disponibles en cas d'infection par un Arenavirus

A ce jour, aucun vaccin n'est commercialisé à l'échelle mondiale, et seul un traitement antiviral à large spectre avec l'administration de Ribavirine **1** (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) est connu pour lutter contre ces virus (Figure 5). La Ribavirine est un analogue de nucléoside. Bien que son administration ait montré une certaine efficacité contre la fièvre de Lassa, réduisant ainsi la mortalité, le traitement doit être pris à un stade précoce pour fonctionner et administré par voie intraveineuse, ce qui, dans les pays défavorisés, reste difficilement applicable¹⁸.



1

Figure 5. Structure chimique de la Ribavirine **1**.

De plus, son utilisation est controversée car elle engendre différents effets secondaires (Kilgore *et al.*¹⁹, McKee *et al.*²⁰, Mistry *et al.*²¹). Des problèmes de toxicité, d'anémie, d'interférence avec d'autres médicaments, effets psychiatriques ou encore digestifs ont été reportés. Des recherches concernant sa vectorisation sont en cours et permettraient d'augmenter sa biodisponibilité²².

En 2006, le vaccin Candid-1 développé par l'institut national des maladies virales humaines (*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas*) a été approuvé en Argentine pour lutter contre le virus Junin, endémique dans cette région. Il pourrait également apporter une protection contre le virus Machupo²³. Le personnel de laboratoire travaillant en contact avec le virus Junin a pour consigne d'utiliser ce vaccin pour empêcher toute transmission²⁴. Des candidats vaccins sont également à l'étude pour la fièvre de Lassa, notamment par la société Géovax qui développe GEO-LM01 qui a prouvé son efficacité de 100% chez la souris lors d'essais pré-cliniques²⁵.

¹⁸ J. B. McCormick, I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott, R. Belmont-Williams, *N. Engl. J. Med.*, **1986**, **314**, 20–26.

¹⁹ P. E. Kilgore, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, J. N. Mills, M. R. Villagra, M. J. Montenegro, M. A. Costales, L. C. Paredes, C. J. Peters, *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, **24**, 718–722.

²⁰ K. T. McKee, J. W. Huggins, C. J. Trahan, B. G. Mahlandt, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, **32**, 1304–1309.

²¹ N. Mistry, J. Shaper, R. I. Crawford, *Can. J. Gastroenterol.*, **2009**, **23**, 677–683.

²² N. Grancher, F. Kedzierewicz, V. Venard, A. Marsura, C. Finance, A. Le Faou, *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.*, **2005**, **51**, 149–157.

²³ T. Koma, M. Patterson, C. Huang, A. V. Seregin, P. D. Maharaj, M. Miller, J. N. Smith, A. G. Walker, S. Hallam and S. Paessler, *J. Virol.*, **2016**, **90**, 1290–1297.

²⁴ R. Phillip Pittman and A. Stanley Plotkin. *Biodefense and Special Pathogen Vaccines - Vaccines (Sixth Edition)*, **2013**

²⁵ GeoVax Reports Promising Results for Lassa Fever Vaccine [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.geovax.com/news/entry/2017/07/10/geovax-reports-promising-results-for-lassa-fever-vaccine.html>> (consulté en 07.2018).

Pour résumer, il y a donc un cruel manque de solutions thérapeutiques parmi les médicaments commercialisés, notamment en termes d'antiviraux. La virulence et le caractère contagieux de ces virus doivent en faire une priorité d'étude, et l'urgence impose d'agir si l'on souhaite éviter un problème de santé publique. Des solutions pourraient émerger au regard des différentes stratégies thérapeutiques en cours de recherche.

3. Les stratégies thérapeutiques à l'étude

a. Inhibiteurs d'entrée

L'entrée du virus dans la cellule hôte constitue la première étape de l'infection et est donc une cible de choix pour développer des stratégies antivirales.

Parmi les essais envisagés, des polymères d'ADN amphipathiques (APs) ont permis d'inhiber l'interaction entre la glycoprotéine GP du LCMV et son récepteur majoritaire l' α -dystroglycane, permettant de bloquer l'entrée du virus au niveau de l'étape 1 et 2 du cycle de vie (cf Figure 4)²⁶. Ces structures exercent leur effet antiviral à travers des mécanismes gouvernés par la longueur de la chaîne polymérique et son hydrophobicité.

Une autre approche a été abordée pour bloquer l'entrée du virus, notamment celle d'empêcher la fusion de la glycoprotéine d'enveloppe²⁷, étape 3 du cycle de vie (cf Figure 4).

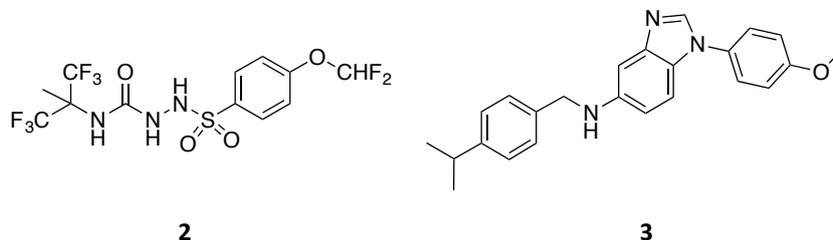


Figure 6. Structure des composés 2 et 3.

Les composés 2 et 3 ont été identifiés par criblage à haut-débit contre TCRV (Figure 6). Ces composés bloquent spécifiquement la fusion de la membrane pH dépendante de TCRV mais également celle de JUNV, MACV et GTOV. Ils ciblent l'interaction entre GP2 et SSP^{28,29}. En effet, cette interaction est requise pour assurer la fonction de fusion de la membrane de GP2. SSP permet de maintenir la conformation nécessaire à la pré-fusion de la GP et facilite la réponse de GP2 au milieu acide de l'endosome. Le

²⁶ A. M. Lee, J. M. Rojek, A. Gundersen, U. Ströher, J.-M. Juteau, A. Vaillant and S. Kunz, *Virology*, **2008**, **372**, 107–117.

²⁷ A. M. Lee, J. M. Rojek, C. F. Spiropoulou, A. T. Gundersen, W. Jin, A. Shaginian, J. York, J. H. Nunberg, D. L. Boger, M. B. A. Oldstone and S. Kunz, *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, **283**, 18734–18742.

²⁸ T. Bolken, S. Laquerre, Y. Zhang, T. Bailey, D. Pevear, S. Kickner, L. Sperzel, K. Jones, T. Warren and S. Amandalund, *Antiviral Res.* **2006**, **69**, 86–97.

²⁹ J. York, D. Dai, S. M. Amberg and J. H. Nunberg, *J. Virol.*, **2008**, **82**, 10932–10939.

composé **3** a été évalué *in vivo* chez LASV sur un modèle de cochon guinéen et a permis de réduire de manière significative la prolifération de la maladie³⁰.

Les composés **4** et **5** issus d'un criblage à haut débit ont montré des IC₅₀ autour de 1 µM²⁷ sur un virus recombinant contenant la glycoprotéine de LASV. En recherchant leur cible thérapeutique, il a été démontré qu'ils bloquent également la fusion de la membrane avec des IC₅₀ comprises entre 0.20 et 0.35 µM.

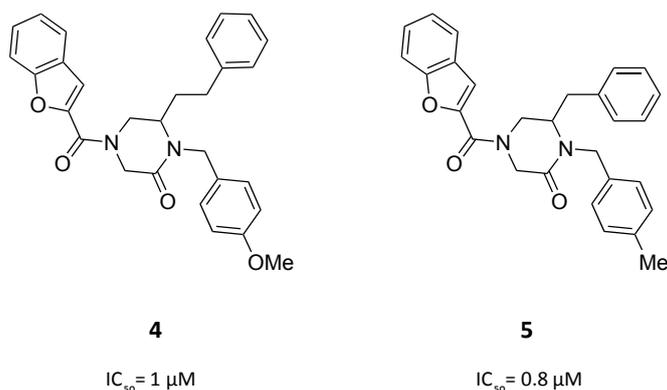


Figure 7. Structures chimiques des composés **4** et **5** (mélange racémique).

Testés contre LASV, JUNV, et MACV en BSL-4, les résultats furent confirmés. En 2009, le dédoublement racémique du composé **5** a mis en évidence que l'énantiomère (-)-**5** (IC₅₀ = 0.2 µM) était 15 fois plus actif que le (+)-**5** (IC₅₀ = 3 µM) et 4 fois plus actif que le mélange racémique³¹.

Concernant les Arenavirus du nouveau monde, des anticorps ont été construits afin de cibler le récepteur TfR1. L'anticorps ch128.1 bloque l'entrée des virus en se liant au domaine apical du récepteur hTfR1 au niveau du site de liaison du virus et empêche donc la liaison de GP1³².

Plus récemment en 2015, un criblage à haut débit basé sur un test en mini-génome sur JUNV a permis d'identifier trois molécules ciblant également l'entrée du virus³³ (Figure 8).

³⁰ K. A. Cashman, M. A. Smith, N. A. Twenhafel, R. A. Larson, K. F. Jones, R. D. Allen, D. Dai, J. Chinsangaram, T. C. Bolken, D. E. Hruby, S. M. Amberg, L. E. Hensley and M. C. Guttieri, *Antiviral Res.*, **2011**, **90**, 70–79.

³¹ L. R. Whitby, A. M. Lee, S. Kunz, M. B. A. Oldstone and D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, **19**, 3771–3774.

³² G. Helguera, S. Jemielity, J. Abraham, S. M. Cordo, M. G. Martinez, J. A. Rodríguez, C. Bregni, J. J. Wang, M. Farzan, M. L. Penichet, N. A. Candurra and H. Choe, *J. Virol.*, **2012**, **86**, 4024–4028.

³³ J. Y. Rathbun, M. E. Droniou, R. Damoiseaux, K. G. Haworth, J. E. Henley, C. M. Exline, H. Choe and P. M. Cannon, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 8428–8443.

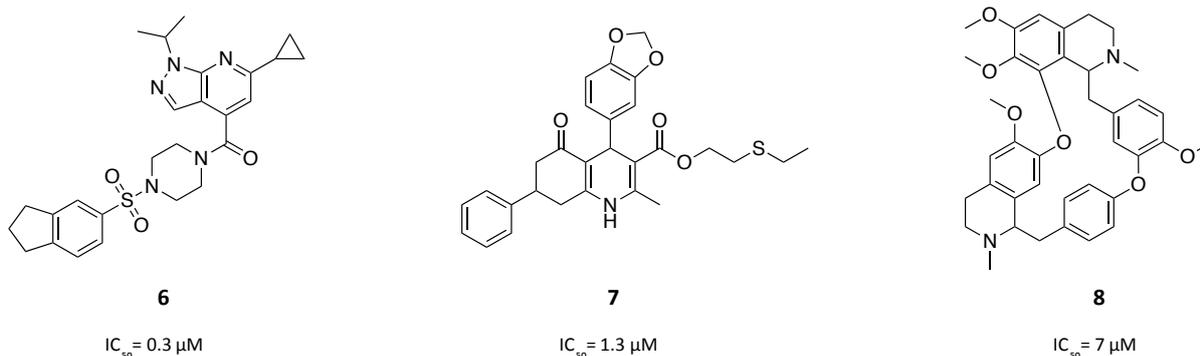


Figure 8. Structure des composés **6**, **7** et **8** identifiés par Rathbun et al.

Les composés **6**, **7** et **8** (Figure 8) présentent des IC₅₀ respectives de 0,3, 1,3 et 7,0 μM contre un JUNV modifié construit par génétique inverse possédant des gènes rapporteurs. Toutefois, ils s'avèrent relativement toxiques.

Enfin, en 2018, un criblage d'une chimiothèque de molécules approuvées par la FDA a été réalisé sur 1018 composés pour évaluer leur capacité à inhiber un virus Lassa modifié (LASV GPC pseudotype vesicular stomatitis virus (VSV))³⁴.

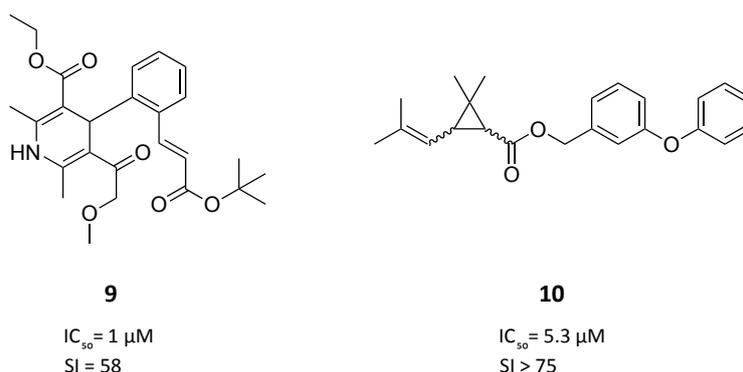


Figure 9. Structures chimiques et activités antivirales des composés **9** et **10**.

Deux têtes de série ont présenté une inhibition, les composés **9** (Lacidipine) et **10** (Phénothrine) avec des IC₅₀ respectives de 2,5 μM et 5,3 μM (Figure 7). Le composé **9** inhibe la fusion de la membrane en ciblant l'interaction entre GP2 et SSP.

b. Inhibiteurs de la réplication

Comme présenté précédemment, la Ribavirine **1** est le seul médicament commercialisé ciblant la réplication virale des Arenavirus, étape 4 du cycle de vie (cf Figure 4). Toutefois, quelques autres molécules sont à l'étude, notamment le composé **11** (Favipiravir, T-705) un inhibiteur à large spectre

³⁴ P. Wang, Y. Liu, G. Zhang, S. Wang, J. Guo, J. Cao, X. Jia, L. Zhang, G. Xiao and W. Wang, *J. Virol.*, **2018**, **92**, e00954-18.

des virus à ARN^{35,36} (Figure 10). Cette molécule a montré une activité antivirale en culture de cellules infectées par des Arenavirus du nouveau monde³⁷. Une étude conduite chez l'animal a montré une activité antivirale contre une infection par LASV chez le cochon guinéen³⁸ et chez la souris³⁹. Une fois dans la cellule, les enzymes cellulaires transforment le composé **11** en sa version nucléotidique triphosphate, et ce métabolite est capable d'inhiber la synthèse d'ARN viral³⁶.

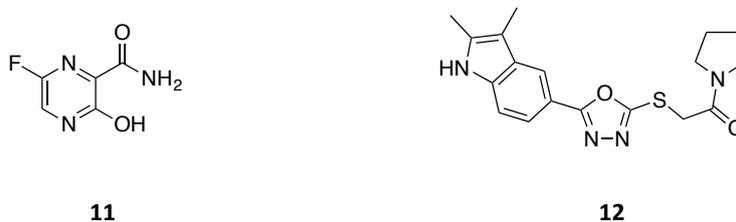


Figure 10. Structures chimiques des composés **11** et **12**, inhibiteurs de la réplication des Arenavirus.

En 2014, Ortiz-Riano *et al.*⁴⁰ répertorient un antiviral à large spectre actif contre les virus à ARN et à ADN, le composé **12** (Figure 10). Il inhibe la réplication et la transcription de l'ARN, en interagissant avec la dihydroorotate déshydrogénase. Il a montré un fort effet antiviral *in cellula* sur différentes lignées cellulaires (BHK-21, Vero et A549). Sur des cellules A549, le composé **12** possède une IC₅₀ de 0.1 µM et un indice de sélectivité de 600 contre le LCMV.

L'inhibition de la réplication de JUNV par des ARN interférents (ARNsi) spécifiques de la protéine Z a été étudiée⁴¹. Ce sont des ARNdb pouvant se lier spécifiquement à l'ARN messager cytoplasmique, induire leur clivage et ainsi empêcher l'expression de ces gènes en protéines virales. Ici, quatre ARN interférents ciblant spécifiquement la protéine Z ont été construits. Parmi eux, certains sont capables de considérablement réduire la production virale (jusqu'à 82% de réduction pour Z₁-ARNsi contre la souche IV₄₄₅₄). Cependant, ces ARN interférents sont tellement spécifiques qu'ils peuvent devenir inactifs sur d'autres souches de JUNV ou TCRV. En effet, dans le même contexte la réduction de la production virale n'est que de 40% pour Z₁-ARNsi contre la souche de JUNV XJCI3.

En 2008, une série d'acridones N-substituées a été testée contre JUNV⁴².

³⁵ Y. Furuta, B. B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D. F. Smee and D. L. Barnard, *Antiviral Res.*, **2013**, **100**, 446–454.

³⁶ Y. Furuta, K. Takahashi, K. Shiraki, K. Sakamoto, D. F. Smee, D. L. Barnard, B. B. Gowen, J. G. Julander and J. D. Morrey, *Antiviral Res.*, **2009**, **82**, 95–102.

³⁷ B. B. Gowen, T. L. Juelich, E. J. Sefing, T. Brasel, J. K. Smith, L. Zhang, B. Tigabu, T. E. Hill, T. Yun, C. Pietzsch, Y. Furuta and A. N. Freiberg, *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2013**, **7**, e2614.

³⁸ D. Safronetz, K. Rosenke, J. B. Westover, C. Martellaro, A. Okumura, Y. Furuta, J. Geisbert, G. Saturday, T. Komeno, T. W. Geisbert, H. Feldmann and B. B. Gowen, *Sci. Rep.*, **2015**, **5**, 14775.

³⁹ L. Oestereich, T. Rieger, A. Lüdtkke, P. Ruibal, S. Wurr, E. Pallasch, S. Bockholt, S. Krasemann, C. Muñoz-Fontela and S. Günther, *J. Infect. Dis.*, **2016**, **213**, 934–938.

⁴⁰ E. Ortiz-Riaño, N. Ngo, S. Devito, D. Eggink, J. Munger, M. L. Shaw, J. C. de la Torre and L. Martínez-Sobrido, *J. Virol.*, **2014**, **88**, 878–889.

⁴¹ M. C. Artuso, P. C. Ellenberg, L. A. Scolaro, E. B. Damonte and C. C. García, *Antiviral Res.*, **2009**, **84**, 31–37.

⁴² C. S. Sepúlveda, M. L. Fascio, M. B. Mazzucco, M. L. D. Palacios, R. F. Pellón, C. C. García, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte, *Antivir. Chem. and Chemother.*, **2008**, **19**, 41–47.

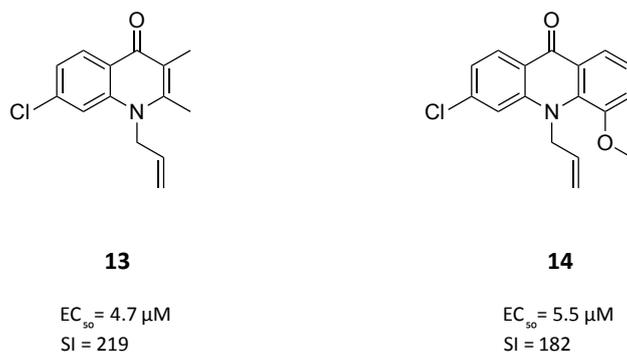


Figure 11. Structures chimiques et activités antivirales des acridones **13** et **14** contre JUNV.

Les composés **13** et **14** ont montré le meilleur effet inhibiteur contre JUNV avec des EC₅₀ autour de 5 μM et de bons indices de sélectivité. Leur effet entraîne l'interruption de la multiplication virale durant le processus d'infection, mais la cible n'est pas encore clairement identifiée. En 2012, Sepulveda *et al.* démontrent que le composé **14** n'a pas d'impact sur l'adsorption et l'internalisation des virions mais que le processus de synthèse d'ARN viral est fortement inhibé⁴³.

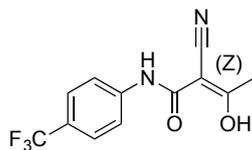
Enfin, des peptides conjugués à des oligonucléotides morpholinos (*Peptide conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers*, PPMOs) ont également montré leur efficacité à ralentir la réplication *in cellula* et *in vivo*. Les oligonucléotides morpholinos (PMOs) sont des oligonucléotides monocaténares liés par des phosphorodiamidates non chargés au lieu des groupements phosphates. Un peptide riche en arginine leur a été rajouté pour augmenter la pénétration cellulaire. Ils se fixent aux séquences complémentaires du génome des Arenavirus en 5' par appariement de base. Il s'agit d'une stratégie antisens permettant d'inhiber l'expression du gène de la réplication à travers un encombrement stérique⁴⁴. Les PPMOs construits ont montré leur capacité à inhiber l'expression de protéine virale, à réduire le titre viral *in cellula* chez le LCMV passant de 10⁵ sans PPMO à 10 PFU/mL en présence de PPMO. Bien que les PPMOs aient montré leur efficacité à courts termes, ils deviennent toxiques pour les cellules après une incubation prolongée (96h) à 50 μM. Enfin, sur une souris infectée par le LCMV à laquelle a été administré 9 mg/kg/jour de PPMO, le titre viral a été réduit par 10 au niveau du foie.

En 2017, le repositionnement du composé **15** (Tériflunomide), commercialisé contre certaines maladies auto-immunes et la polyarthrite rhumatoïde a été étudié contre JUNV⁴⁵.

⁴³ C. S. Sepúlveda, C. C. García, M. L. Fascio, N. B. D'Accorso, M. L. Docampo Palacios, R. F. Pellón and E. B. Damonte, *Antiviral Res.*, **2012**, *93*, 16–22.

⁴⁴ B. W. Neuman, L. H. Bederka, D. A. Stein, J. P. C. Ting, H. M. Moulton and M. J. Buchmeier, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 4631–4638.

⁴⁵ C. S. Sepúlveda, C. C. García and E. B. Damonte, *J. Med. Virol.*, **2017**, *90*, 819–827.



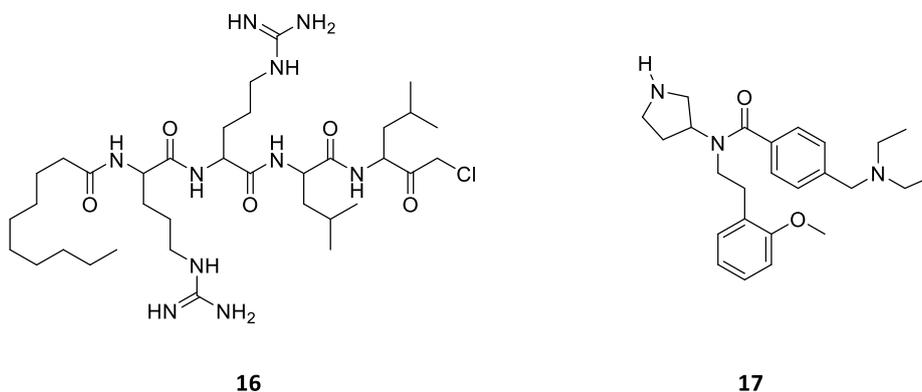
15

Figure 12. Structure chimique du composé **15**.

Il s'agit du métabolite du médicament Léflunomide. Sur des cellules infectées par JUNV (Vero et A549), il s'est montré actif avec des EC₅₀ de 16.6 µM (Vero) et 20.3 µM (A549). Il semble cibler la synthèse d'ARN.

c. Inhibiteurs des modifications post-traductionnelles

Lors des modifications post-traductionnelles ayant lieu à l'étape 5 du cycle de vie (cf Figure 4), la protéine GPC des Arenavirus est divisée après traduction en la protéine d'attachement GP1, la protéine transmembranaire de fusion GP2 et en SSP. Cette étape a lieu grâce à la protéine S1P (*cellular Subtilisin kexin isozyme1(SKI-1)/site1 Protease*) et elle est cruciale pour former des particules virales⁴⁶. Plusieurs molécules ont montré une inhibition de S1P (Figure 13).



16

17

Figure 13. Structures chimiques des composés **16** et **17**, inhibiteurs des modifications post-traductionnelles.

Le peptide **16** (CMK (Decanoyl (dec)-RRLL-chlorométhylcétone) est un inhibiteur de S1P capable d'empêcher la propagation de cellule à cellule chez le LCMV mais il a montré une certaine toxicité cellulaire. Un autre inhibiteur de S1P est le composé **17** un aminopyrrolidineamide. Il a montré une activité antivirale contre le LCMV et LASV *in cellula*⁴⁷.

d. Inhibiteurs ciblant l'assemblage et le bourgeonnement du virus

L'assemblage et le bourgeonnement des Arenavirus sont dirigés par la protéine Z qui contient des motifs d'acides aminés PPPY (LCMV), ou PPPY et PTAP (LASV), nécessaires au relargage des particules virales

⁴⁶ J. M. Rojek, G. Pasqual, A. B. Sanchez, N.-T. Nguyen, J.-C. de la Torre and S. Kunz, *J. Virol.*, **2010**, **84**, 573–584.

⁴⁷ S. Urata, N. Yun, A. Pasquato, S. Paessler, S. Kunz and J. C. de la Torre, *J. Virol.*, **2011**, **85**, 795–803.

post-infection⁵¹. Le composé **22**, acide gras à chaîne plus courte, habituellement utilisé pour le traitement de maladies neurodégénératives, diminue la multiplication des particules virales infectieuses de LCMV en bloquant leur relargage⁵². Il possède une IC₅₀ de 58 µM dans des cellules BHK-21 infectées par le LCMV.

En 2000, un criblage de 15 antiviraux connu pour leur activité contre la protéine NCp7 de HIV-1, possédant des motifs en doigt de zinc, a permis d'identifier deux familles chimiques ayant un effet sur JUNV et TCRV : les composés diazoïques et les composés disulfides⁵³.

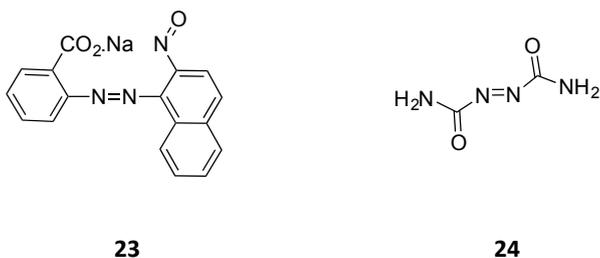


Figure 16. Structures chimiques des composés diazoïques **23** et **24** utilisés contre JUNV et TCRV.

Les composés diazoïques **23** et **24** se sont révélés actifs dans un test de réduction de la production virale chez JUNV et TCRV⁵⁴. Le composé **23** possède une activité antivirale contre TCRV et JUNV et présente des EC₅₀ respectives de 26.2 µM et 6.5 µM (Figure 16). Il a été montré qu'il agissait au stade tardif de la maturation empêchant un assemblage correct des particules virales. Le composé **24** n'a pas présenté d'activité antivirale, mais un effet virucide contre JUNV et TCRV, il est capable d'inactiver le virus en l'absence de cellules avec des IC₅₀ de l'ordre de 5 µM.

Parmi les composés disulfides, le composé **25** présente une EC₅₀ de 9.3 µM contre JUNV. Différents tests ont permis de déceler son mode d'action. L'adsorption et l'internalisation des virions dans la cellule ne sont pas modifiées en présence de ce composé, mais les virions ne sont pas capables de synthétiser les protéines virales⁵⁵.

⁵¹ S. M. Cordo, N. A. Candurra and E. B. Damonte, *Microbes infect.*, **1999**, **1**, 609–614.

⁵² Á. Vázquez-Calvo, M. A. Martín-Acebes, J.-C. Sáiz, N. Ngo, F. Sobrino and J. C. de la Torre, *Antiviral Res.*, **2013**, **99**, 172–179.

⁵³ C. C. García, N. Candurra and E. B. Damonte, *Antivir. Chem. Chemother.*, **2000**, **11**, 231–237.

⁵⁴ C. C. García, N. A. Candurra and E. B. Damonte, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2003**, **21**, 319–324.

⁵⁵ C. C. García, N. A. Candurra and E. B. Damonte, *Antiviral Res.*, **2002**, **55**, 437–446.

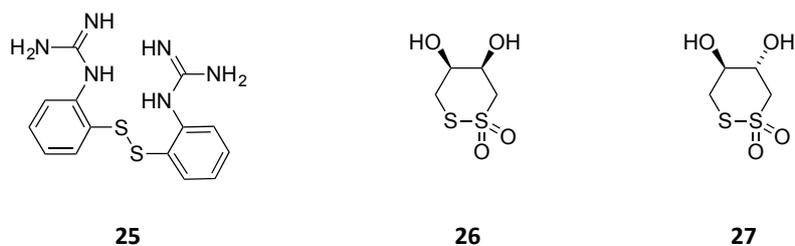


Figure 17. Structures chimiques des composés disulfides **25**, **26**, et **27**.

En 2006, 3 disulfides des précédentes études ont été sélectionnés, dont le composé **25**, pour être testés sur le LCMV (Figure 17). L'absence de réplication virale et de l'expression des protéines virales en présence de ces composés a été également observée. Il a été déduit de plusieurs expériences que l'interaction entre ces composés et la protéine Z entraînerait l'éjection du Zn (II) structural de la protéine Z, la perte de sa structure native et ainsi la multimérisation de la protéine dépliée⁵⁶.

Des thiosemicarbazones ont montré leur sélectivité de JUNV présentant des EC₅₀ comprises entre 3.4 et 12.5 µM notamment les composés **28** et **29**⁵⁷. Il semblerait que ces composés affectent la maturation des virions.

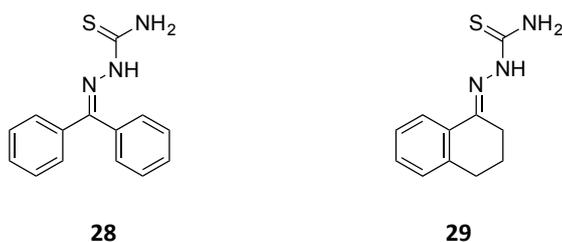


Figure 18. Structure chimique des thiosemicarbazones **28** et **29**.

En 2011, des motifs 3,5-disubstituted-Imidazo[2,1-b]thiazoles carbohydrates ont été synthétisés et évalués contre JUNV⁵⁸.

⁵⁶ C. C. Garcia, *J. Gen. Virol.*, **2006**, **87**, 1217–1228.

⁵⁷ C. C. García, B. N. Brousse, M. J. Carlucci, A. G. Moglioni, M. M. Alho, G. Y. Moltrasio, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte, *Antivir. Chem. Chemother.*, **2003**, **14**, 99–105.

⁵⁸ J. S. Barradas, M. I. Errea, N. B. D'Accorso, C. S. Sepúlveda and E. B. Damonte, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, **46**, 259–264.

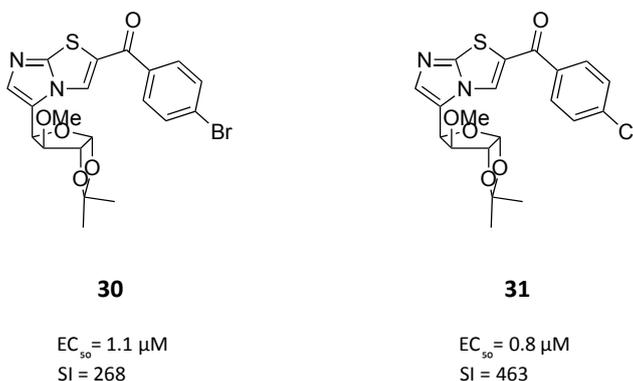


Figure 19. Structures chimiques des composés **30** et **31** avec leurs activités antivirales respectives sur cellules Vero.

Les molécules **30** et **31** ont présenté les meilleures activités antivirales ($1.1 \mu\text{M}$ et $0.8 \mu\text{M}$) avec d'excellents indices de sélectivité. Le composé **30** a été ensuite testé sur des cellules humaines A549 et présente une EC_{50} de $2.8 \mu\text{M}$ et une CC_{50} de $274 \mu\text{M}$. L'effet antiviral a lieu uniquement pendant la multiplication intracellulaire de JUNV.

Une étude datant de 2016 a mis en évidence la capacité du 25-hydroxycholesterol à inhiber la glycosylation de la glycoprotéine de LASV, que ce soit par traitement ou par surexpression de cette molécule par l'enzyme cholestérol 25-hydroxylase (CH25H)⁵⁹. Ce phénomène bloque la maturation des liaisons N-glycanes de GP1 et GP2. La production de particules virales infectieuses est alors réduite.

Un criblage de 220 composés de type Kronkhe pyridine a permis d'identifier le composé **32** avec une activité antivirale contre le LCMV ($EC_{50} = 0.37 \mu\text{M}$, $SI = 110$)⁶⁰.

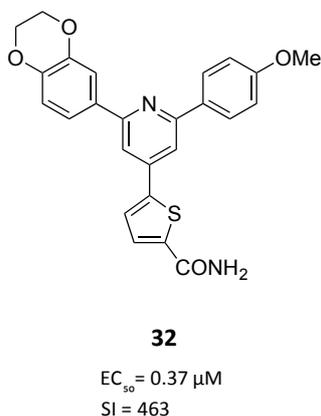


Figure 20. Structure chimique du composé **32**.

⁵⁹ P. Shrivastava-Ranjan, É. Bergeron, A. K. Chakrabarti, C. G. Albariño, M. Flint, S. T. Nichol and C. F. Spiropoulou, *mBio*, **2016**, **7**, e01808-16.

⁶⁰ P. O. Miranda, B. Cubitt, N. T. Jacob, K. D. Janda and J. C. de la Torre, *ACS Infect. Dis.*, **2018**, **4**, 815–824.

Ce composé semble avoir deux modes d'action. Il interfère avec l'activité du complexe RNP, et bloque le bourgeonnement des particules virales dirigé par la protéine Z. Il a démontré également son inhibition chez TCRV et JUNV.

Welch *et al.* développent en 2016 un test en mini-génome pour cribler des composés contre LASV permettant de travailler dans un environnement BSL-2⁶¹.

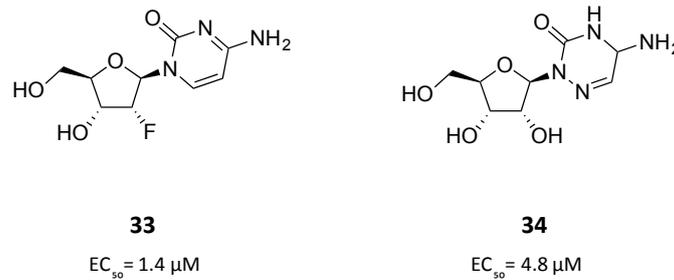


Figure 21. Structures chimiques et activité antivirale contre LASV des composés **33** et **34**.

Deux analogues nucléosidiques (composés **33** et **34**) sont identifiés comme potentiels inhibiteurs avec des EC₅₀ de 1.4 μM et 4.8 μM (Figure 21) ils agissent spécifiquement sur les protéines virales, bien que leur cible directe ne soit pas clairement identifiée.

Les recherches présentées ci-dessus sont les seules à ce jour conduites pour développer des solutions thérapeutiques aux infections par les Arenavirus. Très rares sont les molécules possédant des activités sous-micromolaire. Par ailleurs, il y a très peu de relations structure-activité qui sont menées afin d'optimiser des têtes de séries, si bien qu'aucun des composés décrits ci-dessus n'est aujourd'hui commercialisé. Ce constat souligne l'importance d'accroître les recherches de nouvelles cibles thérapeutiques et leurs de inhibiteurs associés.

Ce projet de thèse se propose d'envisager les nucléases d'Arenavirus, enzymes clés de la réplication virale, comme nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, les virus développent différentes stratégies pour déjouer les mécanismes de défense de l'organisme afin de se multiplier et de se propager. Ces nucléases virales permettent d'échapper à la réponse immunitaire ou simplement aident à déguiser ou masquer certaines protéines virales pour que la cellule hôte ne les repère pas, et que la machinerie virale s'opère correctement. Elles ont donc des fonctions cruciales qui, une fois bloquées, ne leur permettront plus de déjouer les mécanismes de défense de l'organisme et de mener à bien la multiplication virale.

⁶¹ S. R. Welch, L. W. Guerrero, A. K. Chakrabarti, L. K. McMullan, M. Flint, G. R. Bluemling, G. R. Painter, S. T. Nichol, C. F. Spiropoulou and C. G. Albariño, *Antiviral Res.*, **2016**, **136**, 9–18.

II. Les nucléases d'Arenavirus

Les nucléases sont des enzymes capables de cliver des liaisons phosphodiester internucléosidiques des acides nucléiques. Leurs substrats peuvent être de l'ADN ou de l'ARN. Il existe plusieurs catégories de nucléases. Celle dont l'activité est de couper les acides nucléiques au milieu (endo) ou à l'extérieur de la séquence (exo) est au centre de ce projet. On parle alors d'endo- ou d'exonucléases. L'endonucléase des Arenavirus coupe des ARNs dans le sens 5'-3' tandis que l'exonucléase des Arenavirus clive des ARNs dans le sens 3'-5'. Ci-après, nous aborderons leur fonction et leur environnement structural.

1. Exonucléase de la nucléoprotéine NP, responsable de l'échappement à l'immunité innée

a. Fonction

L'exonucléase des Arenavirus est responsable de l'échappement à l'immunité innée. Avant de situer à quel niveau elle agit, il convient de rappeler quelques notions sur la capacité du système immunitaire à repérer des hôtes étrangers.

Lors de la réplication virale, des ARNs sont produits par les polymérases virales soit en tant qu'intermédiaires de la réplication du génome (virus à ARN), soit en tant que produit résiduel (virus à ADN). Ainsi, ils constituent des marqueurs importants de l'infection virale. Une fois générés dans la cellule, ils sont repérés par les protéines de la réponse immunitaire innée.

Ces protéines sont rassemblées sous le nom de *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Parmi elles, les *RIG-I like receptors* (RLRs) sont des protéines cytoplasmiques qui reconnaissent les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) générés par le virus dans le cytoplasme de la cellule⁶². Elles détectent dans notre cas la présence d'ARN viral. Elles ont la capacité d'activer une cascade de signalisation menant à la production de molécules pro-inflammatoires (interféron α/β). L'une d'entre elles, RIG-I (*Retinoic acid Inducible Gene*) reconnaît sélectivement des ARNs possédant une extrémité 5' triphosphate, et peut ainsi envoyer un signal « d'infection virale ».

Il a été démontré que ce mécanisme de défense était supprimé lors d'une infection par LASV, JUNV, MACV, et LCMV, l'exonucléase pouvant jouer un rôle dans cette inhibition⁶³. En effet, l'exonucléase a pour fonction de cliver les ARNs cytoplasmiques pour les empêcher d'être reconnus par les PRRs, responsables du déclenchement de la réponse immunitaire^{64,65}. De plus, elle est strictement spécifique

⁶² M. U. Gack, *J Virol*, **2014**, **88**, 5213–5216.

⁶³ L. Martínez-Sobrido, P. Giannakas, B. Cubitt, A. García-Sastre and J. C. de la Torre, *J. Virol.*, **2007**, **81**, 12696–12703.

⁶⁴ K. M. Hastie, C. R. Kimberlin, M. A. Zandonatti, I. J. MacRae and E. O. Saphire, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, **108**, 2396–2401.

⁶⁵ X. Jiang, Q. Huang, W. Wang, H. Dong, H. Ly, Y. Liang and C. Dong, *J. Biol. Chem.*, **2013**, **288**, 16949–16959.

des ARNdb, contrairement à d'autres types d'exonucléase, et implique des ions métalliques divalents pour son mécanisme de clivage.

Ce mode d'action est unique et ouvre la voie au développement d'antiviraux. En effet, l'inhibition de l'activité exonucléase permettrait de maintenir des ARNdb viraux dans le cytoplasme, déclenchant ainsi la réponse immunitaire.

b. Structure

La nucléoprotéine des Arenavirus est divisée en deux domaines^{66,67}. Le domaine N-terminal joue un rôle dans la formation des complexes réplicatifs à travers une nécessaire association homotypique ou oligomérisation de la NP^{68,69}, tandis que le domaine C-terminal possède une architecture caractéristique de la famille des 3'-5' exonucléases au motif DEDDy/h. En 2011, Hastie *et al.*⁷⁰ ont résolu la structure du domaine C-terminal de la nucléoprotéine du LASV, permettant de mettre en évidence cette activité exonucléase.

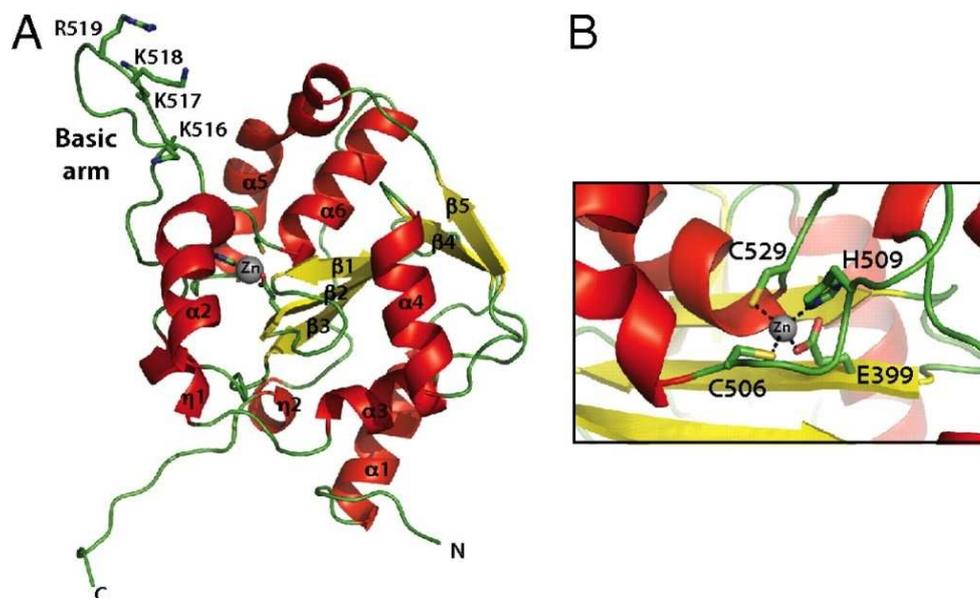


Figure 22. Structure du domaine C-terminal de la nucléoprotéine de LASV (PDB code : 3Q7B). (A) Représentation globale du domaine. Le bras basique est formé des AA LYS516, LYS517, LYS518 et ARG519. (B) Zoom sur le co-facteur Zinc coordonné par les AA GLU399, HIS506, CYS509 et CYS529.

Le domaine comporte 243 acides aminés organisés en 5 feuillets β dont un antiparallèle, et six hélices α connectées par une série de boucles (Figure 22). Parmi elles, on note une longue boucle reliant les

⁶⁶ L. Brunotte, R. Kerber, W. Shang, F. Hauer, M. Hass, M. Gabriel, M. Lelke, C. Busch, H. Stark, D. I. Svergun, C. Betzel, M. Perbandt and S. Günther, *J. Biol. Chem.*, **2011**, **286**, 38748–38756.

⁶⁷ X. Qi, S. Lan, W. Wang, L. M. Schelde, H. Dong, G. D. Wallat, H. Ly, Y. Liang and C. Dong, *Nature*, **2010**, **468**, 779–783.

⁶⁸ J. M. Levingston Macleod, A. D'Antuono, M. E. Loureiro, J. C. Casabona, G. A. Gomez and N. Lopez, *J. Virol.*, **2011**, **85**, 2012–2023.

⁶⁹ E. Ortiz-Riaño, B. Y. H. Cheng, J. C. de la Torre and L. Martínez-Sobrido, *J. Virol.*, **2012**, **86**, 3307–3317.

⁷⁰ K. M. Hastie, T. Liu, S. Li, L. B. King, N. Ngo, M. A. Zandonatti, V. L. Woods, J. C. de la Torre and E. O. Saphire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2011**, **108**, 19365–19370.

deux hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ et formant un bras basique d'un côté. Un atome de zinc est coordonné par les acides aminés GLU399, CYS506, HIS509 et CYS529. Les vingt premiers résidus sont désordonnés et sont maintenus grâce à un lien flexible entre le domaine C terminal et le domaine N terminal de la nucléoprotéine. L'exonucléase possède un site catalytique au niveau de la cavité chargée négativement formée par les AA, ASP389, GLU391, ASP466, ASP533 et HIS528 pouvant accueillir les ions métalliques divalents (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) nécessaires à l'activité de l'enzyme. A l'entrée de cette cavité se positionne un bras chargé positivement formé par la boucle reliant les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$. Une seconde structure en présence de manganèse a été ensuite obtenue par co-cristallisation (Figure 23).

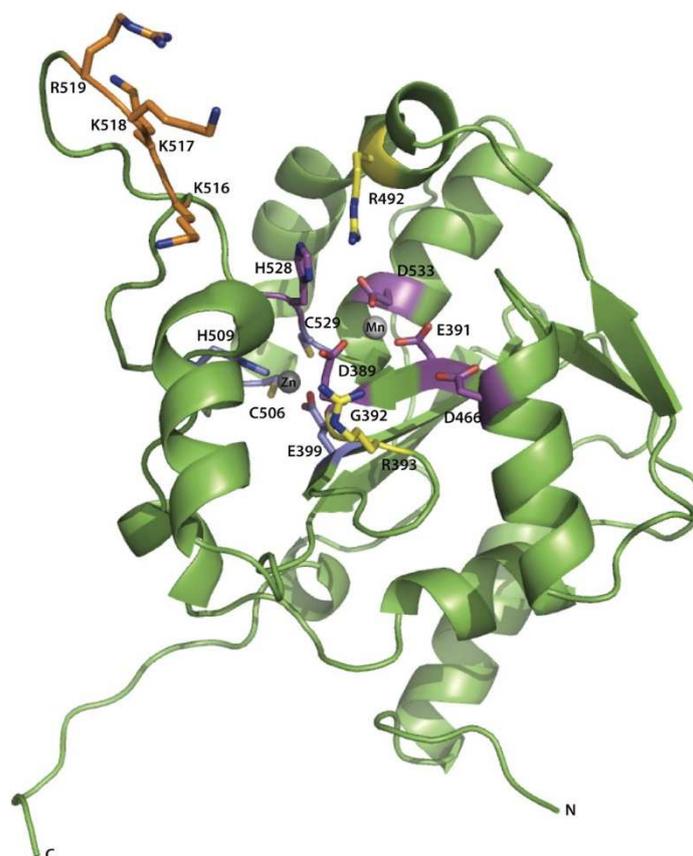


Figure 23. Structure du domaine C-terminal de la nucléoprotéine de LASV en complexe avec un ion Mn^{2+} (Code PDB : 3Q7C). Les AA correspondant au motif DEDDh sont en magenta.

Ce complexe met en évidence la présence d'un seul ion Mn^{2+} dans le site actif, coordonné par les acides aminés ASP389, GLU391 et ASP533. Aucun autre ion n'est observé au regard de la densité électronique, suggérant la coordination d'un deuxième ion uniquement en présence du substrat ARN. En effet, ce phénomène a déjà été observé chez d'autres nucléases (RNase D, Exol ou encore *E. coli* DNA pol I).

2. Endonucléase de la protéine L, responsable du vol de la coiffe de l'hôte pour la réplication

a. Fonction : le mécanisme de vol de coiffe

L'endonucléase des Arenavirus tout comme celle du virus de la grippe et des *Bunyavirales*, réalise l'étape de vol de coiffe lors de la première étape de transcription.

Dans l'organisme, les mécanismes de coiffage des ARN jouent des rôles extrêmement importants pour la traduction des protéines et également pour l'immunité innée, à tel point que les virus ont dû évoluer pour détourner la machinerie cellulaire, et produire leurs propres ARN viraux coiffés, indispensables pour contourner les mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire et mener à bien la réplication. La plupart des mécanismes de coiffage ont lieu dans le noyau. Les virus, se répliquant dans le cytoplasme, ont dû inventer d'autres moyens pour coiffer leurs ARN, notamment le vol de la coiffe d'ARN messenger de la cellule hôte, c'est l'étape de « cap-snatching » en anglais. Ce phénomène a été largement décrit pour le virus de la grippe par Dias *et al.*⁷¹ et Guilligay *et al.*⁷² et semble être commun à plusieurs virus à ARN négatifs (virus de l'ordre *Bunyavirales* et famille *Arenaviridae*). Il a été décrit chez les Hantavirus⁷³, LASV⁷⁴, le virus La Crosse (LACV)⁷⁵, le virus de la fièvre hémorragique Crimée Congo⁷⁶, le LCMV¹⁷. Les ARN messagers cellulaires possèdent tous une coiffe (CAP, 7-méthylguanosine) à leur extrémité 5'. Cette coiffe permet aux ribosomes de se positionner sur l'ARN messenger. L'ARN génomique viral étant négatif, il doit être transcrit en ARN positif par une transcriptase virale qui ne peut débiter la transcription qu'à partir d'une amorce. Cette amorce correspond à l'extrémité 5' d'un ARN messenger cellulaire comprenant la coiffe. C'est ici que l'endonucléase des Arenavirus va intervenir pour dérober la coiffe en 5' d'un ARN messenger cellulaire (Figure 24).

⁷¹ A. Dias, D. Bouvier, T. Crépin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack, R. W. H. Ruigrok, *Nature*, **2009**, **458**, 914–918.

⁷² D. Guilligay, F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R. W. H. Ruigrok, J. Ortin, D. J. Hart, S. Cusack, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008**, **15**, 500–506.

⁷³ E. Cheng, M. A. Mir, *J. Virol.* **2012**, **86**, 10173–10185.

⁷⁴ G. D. Wallat, Q. Huang, W. Wang, H. Dong, H. Ly, Y. Liang, C. Dong, *PLOS one*, **2014**, **9**, e87577.

⁷⁵ J. Reguera, F. Weber, S. Cusack, *PLoS Pathog.*, **2010**, **6**, e1001101.

⁷⁶ S. Devignot, E. Bergeron, S. Nichol, A. Mirazimi, F. Weber, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 5957–5967.

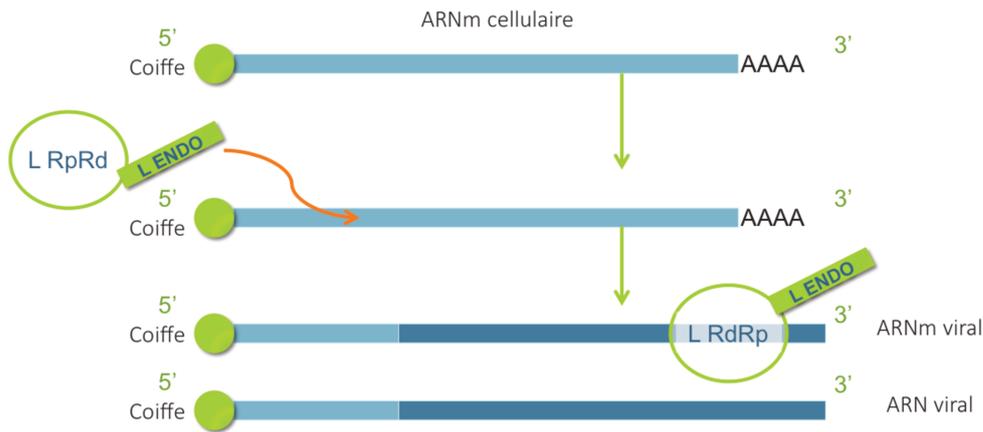


Figure 24. Mécanisme de vol de coiffe des ARN messagers cellulaires initiant la première étape de transcription.

Cette étape passe d'abord par une reconnaissance des ARN messagers cellulaires coiffés à l'aide d'un domaine de la protéine L de liaison à la coiffe. Ensuite, l'endonucléase va cliver les 5 premiers nucléotides en 5' pour dérober la coiffe de l'ARN messager de la cellule hôte et ainsi l'utiliser pour synthétiser un ARN positif et pouvoir obtenir son propre ARN messager viral pour poursuivre la réplication⁷⁷. Le vol de cette coiffe est essentiel pour initier la transcription mais également pour empêcher l'ARN messager viral d'être dégradé par les 5' et 3' exonucléases cellulaires.

b. Structure

En 2010, le domaine N-terminal L1 de la protéine L du LCMV a été identifié biochimiquement et structuralement comme étant une endonucléase. Cette enzyme constituée de 196 acides aminés (23.6 kDa) est une endonucléase de restriction de type II caractérisée par le motif PD...(D/E)XK. La partie principale est constituée de quatre feuillets β entourés de sept hélices α (Figure 25).

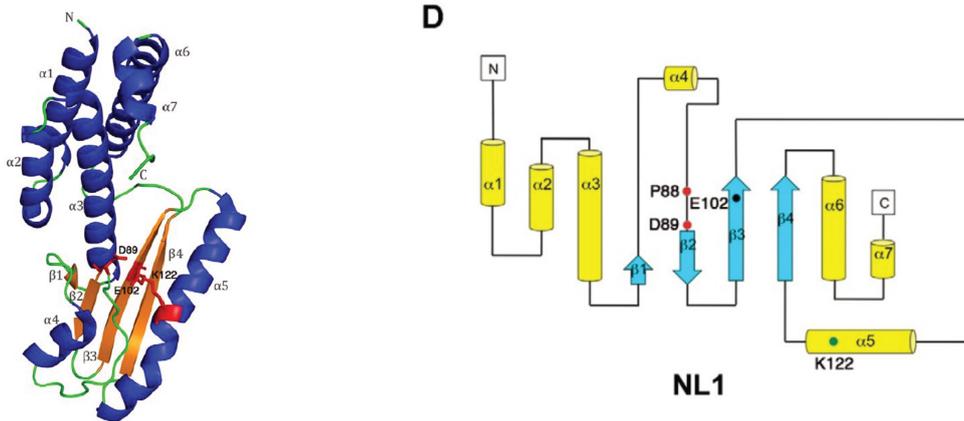


Figure 25. Structure cristallographique de l'endonucléase du LCMV (gauche). Droite : structure schématique de l'endonucléase du LCMV.

⁷⁷ S. J. Plotch, M. Bouloy, I. Ulmanen, R. M. Krug, *Cell*, 1981, 23, 847–858.

Ces quatre feuillets β forment une cavité chargée négativement créant ainsi un site de liaison pour des cations divalents. La structure initiale de 2010 ne comportait pas ces cations dans le site actif. Plus récemment, Saez-Ayala *et al.*⁷⁸ ont résolu la structure avec les ions catalytiques et d'autres structures avec des ligands, confirmant ainsi les hypothèses de 2010. En effet, les deux ions Mg^{2+} sont coordonnés à l'ASP88 et à travers un réseau de molécules d'eau à GLU101 et LYS114.

Dans la structure cristallographique de l'endonucléase du LCMV, le centre catalytique est situé au niveau de l'ASP88. Cet acide aminé est crucial pour le clivage de l'ARN puisqu'il a été montré lors d'essais de polarisation de fluorescence que le mutant ASP88A possède une bien plus faible affinité pour l'ARN que l'enzyme sauvage ($K_D > 100 \mu M$ contre $30 \mu M$)⁷⁹. Il semblerait que ce résidu coordine les deux ions métalliques et contribue à l'agencement final des tous les partenaires de la réaction catalytique. Cette réaction semble également être assistée par des résidus identifiés comme clés dans la liaison à l'ARN, à savoir GLU50, GLU101, ASP118, LYS114 et LYS121.

Une homologie entre le domaine endonucléase du LCMV et celui du virus de la grippe existe. En effet, la superposition des deux structures montre un repliement similaire mais l'endonucléase du LCMV n'a pas de cinquième feuillet β contrairement à celle de la grippe. Par ailleurs, l'endonucléase du LCMV possède un site actif plus ouvert que celui de la grippe. Plus récemment, Reguera *et al.* ont démontré des similitudes avec d'autres endonucléases de virus à ARN négatif⁸⁰. Toutefois, c'est au niveau du site actif qu'il subsiste de majeures différences structurales.

⁷⁸ M. Saez-Ayala, E. Laban Yekwa, M. Carcelli, B. Canard, K. Alvarez and F. Ferron, *IUCrJ*, **2018**, *5*, 223-235

⁷⁹ M. Saez-Ayala, E. Laban Yekwa, C. Mondielli, L. Roux, F. Bailly, P. Cotellet, D. Rogolino, B. Canard, S. Emonet, F. Ferron and K. Alvarez. *Antiviral Res.*, **2018**, in review.

⁸⁰ J. Reguera, P. Gerlach, M. Rosenthal, S. Gaudon, F. Coscia, S. Günther, S. Cusack, *PLOS Pathog.*, **2016**, *12*, e1005636.

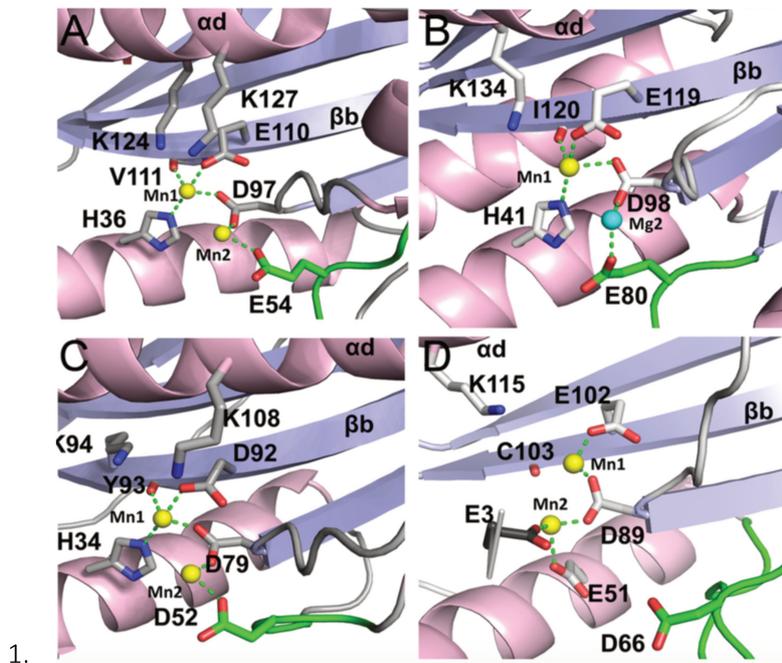


Figure 26. Sites actifs des endonucléases des virus Hantaan (A), Grippe (B), La Crosse (C), Lassa (D).

A travers des alignements de séquences entre les virus Lassa (LASV), La Crosse (LACV), Hantaan et le virus de la grippe, ils remarquent qu'une histidine présente chez la plupart des *Bunyavirales* et des Orthomyxovirus est remplacée par un acide glutamique (GLU51) chez les Arenavirus. Egalement, l'acide aspartique ASP66 n'est plus impliqué dans la coordination chez les Arenavirus alors qu'il l'était dans les autres familles (Figure 26).

3. Un mécanisme commun : le mécanisme à deux ions métalliques catalytiques

Bien que ces deux nucléases aient des fonctions différentes, elles possèdent un mécanisme d'action commun. En effet, l'activité de ces deux nucléases consiste à cliver un ARN. Cette opération se déroule grâce à un mécanisme catalytique à deux ions métalliques. Dans les faits, il s'agit d'une substitution nucléophile bimoléculaire (SN_2).

Ce mécanisme met en jeu des ions métalliques divalents, cofacteurs des nucléases respectives. Les activités nucléases qui sont à ce jour décrites dans la littérature peuvent faire intervenir un, deux voire trois ions catalytiques⁸¹.

Dans le cas des Arenavirus, les réactions catalysées par l'endonucléase et l'exonucléase impliquent deux ions (Mg^{2+} ou Mn^{2+}). A l'état initial, l'endonucléase contient deux ions dans son site actif alors que dans les quelques structures d'exonucléases d'Arenavirus reportées (LASV, LCMV, MOPV), un seul ion est clairement défini. L'hypothèse la plus probable est que le recrutement du deuxième ion est assuré par la venue du substrat ARN⁶⁵. Par ailleurs, l'exonucléase est spécifique des ARNdb tandis que

⁸¹ E. A. Galburt, B. L. Stoddard, *Biochemistry*, 2002, 41, 13851–13860.

l'endonucléase va cliver uniquement les ARNs. Par ailleurs, ces deux enzymes ayant des spécificités de séquence.

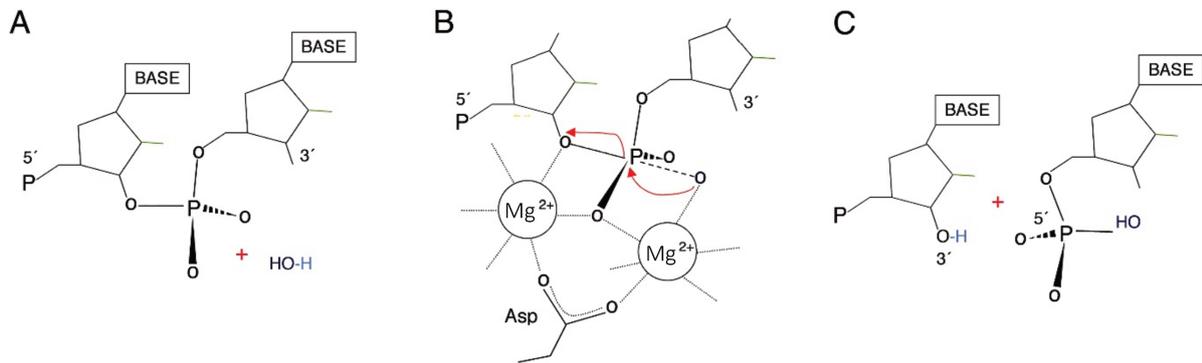


Schéma 1. Mécanisme catalytique à deux ions métalliques de clivage de l'ARN (Yang et al.⁸²). (A) Liaison phosphodiester appartenant au substrat ARN. Une molécule d'eau est en attente de déprotonation pour devenir un nucléophile activé. (B) Intermédiaire de réaction pentacovalent formé à l'aide de la coordination aux deux ions métalliques divalents. (C) Formation des produits de réaction.

Ce mécanisme comporte plusieurs étapes : la première consiste à former un nucléophile à partir de la déprotonation d'une molécule d'eau (Schéma 1, Panel A). Ensuite, un intermédiaire stable se forme et joue le rôle d'état de transition (Schéma 1, Panel B). Il possède une géométrie bipyramide trigonale avec trois oxygènes équatoriaux et deux oxygènes axiaux. Les oxygènes entrant ou partant sont ceux en position axiale. Les deux métaux divalents sont donc positionnés de part et d'autre de la liaison phosphodiester⁸³ qui va ensuite être clivée⁸⁴. L'un des métaux va permettre de réduire le pKa d'une molécule d'eau pour former un ion hydroxyle HO⁻ qui va jouer le rôle de nucléophile. L'autre métal, va stabiliser l'intermédiaire pentacovalent et faciliter le départ du groupe partant en 3'. L'électrophilie de l'atome de phosphore est augmentée par la liaison aux métaux Mn²⁺ ou Mg²⁺ qui jouent le rôle d'acides de Lewis (Schéma 1, Panel C).

Les paramètres les plus importants de cette catalyse sont l'alignement et la géométrie des métaux par rapport aux acides aminés catalytiques et au substrat. Les métaux participent ainsi à la reconnaissance du substrat et au relargage du produit. De plus, ils sont très sensibles à la modification de leur sphère de coordination et la moindre différence thermodynamique induite peut avoir un impact sur l'activité des enzymes, témoignant de leur spécificité.

4. Des cibles thérapeutiques potentielles

La compréhension des structures et des fonctions de ces deux nucléases met en lumière leur implication à la survie et à la multiplication du virus.

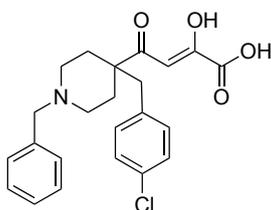
⁸² W. Yang, J. Y. Lee and M. Nowotny, *Mol. Cell*, 2006, 22, 5–13.

⁸³ T. A. Steitz and J. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 6498–6502.

⁸⁴ G. Palermo, A. Cavalli, M. L. Klein, M. Alfonso-Prieto, M. Dal Peraro and M. De Vivo, *Acc. Chem. Res.*, 2015, 48, 220–228.

L'endonucléase constitue aujourd'hui une réelle cible thérapeutique. En effet, le mécanisme de vol de coiffe est unique et essentiel pour le bon déroulement de la transcription. L'inhibition de l'endonucléase permettrait de bloquer la réplication virale au premier niveau de transcription. D'autre part, ce phénomène de vol de coiffe n'a pas d'équivalent cellulaire puisqu'il est spécifique de certains virus⁸⁵. Enfin, il a été montré que le site actif de cette enzyme est hautement conservé structurellement chez les Arenavirus mais également chez les virus appartenant à l'ordre *Bunyavirales*⁸⁰. L'endonucléase des Arenavirus est donc une cible spécifique du monde viral. Son inhibition, en plus de traiter les infections par les Arenavirus pourrait également permettre le développement d'antiviraux *pan-genus*.

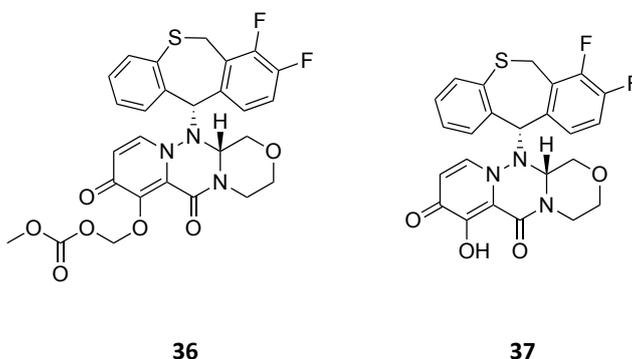
Par ailleurs, l'endonucléase du virus de la grippe est considérée depuis des années comme une cible thérapeutique, puisque dès 1996, Hastings *et al.*⁸⁶ ont mené des études *in vivo* chez la souris et ont découvert un inhibiteur capable d'inhiber la réplication du virus de manière dose-dépendante (Figure 27).



35

Figure 27. Structure du composé **35** développé par Hastings *et al.*

En présence du composé **35** (L-742,001), le titre viral (TCID₅₀/mL) passe de 10^{4,21} à 10^{0,35} lorsque 9.6 mg/kg sont administrés à la souris 24h après l'infection. De plus, très récemment, la société Shionogi (Japon) a entamé des essais cliniques pour le composé **36**, pro-drogue du composé **37** qui inhibe les endonucléases de la grippe A et B.



36

37

Figure 28. Structure du composé **36**, le Baloxavir marboxil, pro-drogue du composé **37**.

⁸⁵ A. Ramanathan, G. B. Robb, S.-H. Chan, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, **44**, 7511–7526.

⁸⁶ J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski and J. E. Tomassini, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, **40**, 1304–1307.

Dans l'étude de phase II, 400 patients possédant une grippe conventionnelle sans complications ont été soumis à une administration à l'aveugle de différentes doses uniques du composé (10 mg, 20 mg, et 40 mg) et comparées au placebo. Chacune des administrations a abouti à une baisse significative des symptômes grippaux et à une réduction du titre viral à 24h et 48h post-traitement par rapport au placebo. En phase III, des patients porteurs du virus de la grippe ont reçu une dose unique de cette molécule (40 mg pour les patients < 80kg, 80 mg au-delà) ce qui a permis de réduire le titre viral beaucoup plus rapidement que lors de l'administration d'Oseltamivir⁸⁷.

Au niveau de son mécanisme d'action, le composé **37** a été conçu comme un chélateur des métaux du site actif de l'endonucléase du virus de la grippe (voir [Chapitre 1, IV.2](#)). Ce composé a été co-cristallisé avec la cible en 2018⁸⁸ (Figure 29).

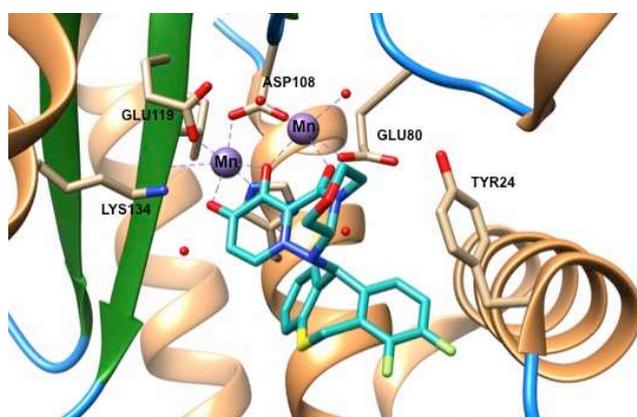


Figure 29. Endonucléase de la grippe A en complexe avec le composé **37** (Code PDB: 6FS6).

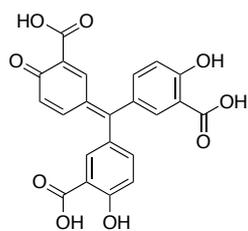
Il a été approuvé en février 2018 au Japon, et à Taïwan en juillet 2018. La FDA rendra sa décision de mise sur le marché aux USA courant décembre 2018. Cette récente mise sur le marché est la preuve de concept que l'inhibition d'une endonucléase virale est une stratégie thérapeutique prometteuse de par son mécanisme d'action unique. Elle conforte ainsi notre projet visant à développer des inhibiteurs spécifiques d'endonucléases d'Arenavirus.

L'exonucléase ayant un lien direct avec le déclenchement de la réponse immunitaire, elle apparaît également comme une cible thérapeutique potentielle. Toutefois, seulement une publication datant de 2016 relate l'identification d'inhibiteurs de l'activité exonucléase de la NP du virus Lassa. Il s'agit de Huang *et al.*⁸⁹ qui montrent que les composés **38** et **39** possèdent respectivement des IC₅₀ de 6.8 μM et 66.2 μM *in vitro* (Figure 30).

⁸⁷ S. Portsmouth, K. Kawaguchi, M. Arai, K. Tsuchiya and T. Uehara, *Open Forum Infect. Dis.*, **2017**, **4**, S734.

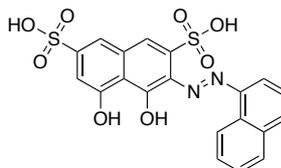
⁸⁸ S. Omoto, V. Speranzini, T. Hashimoto, T. Noshi, H. Yamaguchi, M. Kawai, K. Kawaguchi, T. Uehara, T. Shishido, A. Naito and S. Cusack, *Sci. Rep.*, **2018**, **8**, 9633.

⁸⁹ K.-W. Huang, K.-C. Hsu, L.-Y. Chu, J.-M. Yang, H. S. Yuan and Y.-Y. Hsiao, *J. Med. Chem.*, **2016**, **59**, 8019–8029.



38

$IC_{50} = 6.8 \mu M$



39

$IC_{50} = 66.2 \mu M$

Figure 30. Composés **38** et **39**, premiers inhibiteurs de l'activité exonucléase de LASV décrits dans la littérature.

Ces travaux sont les seuls à ce jour publiés concernant le développement d'inhibiteurs d'exonucléases virales. Les activités de ces composés sont un commencement mais aucun test cellulaire ou *in vivo* n'a validé leur efficacité. Ceci souligne le cruel manque de recherche d'inhibiteurs de cette enzyme peu étudiée comme cible thérapeutique.

Tous ces éléments appuient le fait que ces deux nucléases constituent des cibles thérapeutiques de choix pour le développement d'antiviraux. Ces deux activités enzymatiques étant métal-dépendantes, une stratégie prometteuse de développement d'antiviraux est d'utiliser des molécules chélatantes de Mg^{2+} ou Mn^{2+} pour créer une inhibition compétitive avec l'ARN substrat et ainsi empêcher son clivage. Des stratégies thérapeutiques de chélation du magnésium et/ou du manganèse ont déjà fait leurs preuves dans diverses applications⁹⁰.

⁹⁰ D. Rogolino, M. Carcelli, M. Sechi and N. Neamati, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, **256**, 3063-3086

III. La chélation du magnésium ou du manganèse comme stratégie thérapeutique

1. Les médicaments chélateurs de métaux commercialisés aujourd'hui

La création de liaisons métalliques impliquées dans le mode d'action d'un médicament est une stratégie utilisée dans le cas d'antiviraux lorsque les cibles thérapeutiques sont des métalloprotéines⁹¹. La majorité des complexes formés dans des systèmes biologiques entre un ligand et un ion métallique sont en équilibre dynamique. Au vu de la présence de métaux disponibles dans l'organisme, une inhibition sélective à travers la chélation de métaux circulant librement paraît improbable, et serait dépendante de leur concentration. En réalité, il faut s'intéresser à la formation de complexes avec des métaux déjà liés à l'enzyme d'intérêt, où le métal n'est alors plus libre. C'est en ce sens que l'on peut atteindre une inhibition sélective.

Pour savoir quel type de ligand construire, il convient de s'intéresser à la nature du métal que l'on souhaite chélater et à ses propriétés dures ou molles selon la classification de Pearson (Tableau 2).

<i>Ions métalliques</i>	<i>Ligands</i>
<i>Durs</i> Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Al ³⁺ , Fe ³⁺	<i>Durs</i> Ligands se liant grâce à : O- (e.g, P(O)-O ⁻ , RO ⁻ , RCOO ⁻), ROH, R ₂ O, Cl ⁻ , NH ₃
<i>Intermédiaires</i> Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺	<i>Intermédiaires</i> Amines se liant grâce à l'azote (I, II et III)
<i>Mous</i> Cu ⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺	<i>Mous</i> Ligands se liant grâce à S (e.g., RS ⁻ , R ₂ S), CN ⁻ , R ₃ P

Tableau 2. Atomes durs et mous et ligands associés.

Historiquement, les chélateurs de métaux étaient utilisés comme traitements anti-poisons (Figure 31).

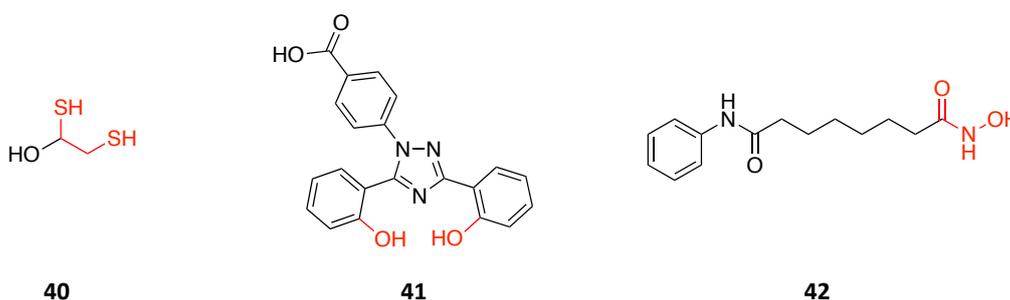


Figure 31. Composés **40**, **41**, et **42** chélateurs de métaux commercialisés aujourd'hui.

⁹¹ DW. Hutchinson. *Antiviral Res.* **1985**, 193–205.

Le composé **40** (Dimercaprol ou British Anti Lewisite, 1941)⁹² est le premier composé chélateur de métaux utilisé en médecine pour traiter les intoxications à l'arsenic, au mercure, à l'étain, à l'or et au plomb. D'autres maladies ont nécessité l'usage de tels médicaments comme l'utilisation du composé **41** (Deferasirox, 2005)⁹³ qui chélate le Fer chez les patients recevant des transfusions sanguines et les anémiques. Il est sélectif du Fe (III) et possède une faible affinité pour le zinc et le cuivre. Le composé **42** (Vorinostat, 2006)⁹⁴ possédant une fonction acide hydroxamique est un inhibiteur d'histone désacetylase commercialisé pour lutter contre les lymphomes cutanés à cellules T. C'est un chélateur du zinc.

2. Les composés chélateurs de Mg et Mn

a. *Le manganèse et le magnésium, co-facteurs d'enzymes virales*

Comme indiqué sur le Tableau 2, le magnésium et le manganèse sont tous deux des atomes durs et montrent donc une forte affinité pour l'oxygène, et se complexeront plus facilement à des carboxylates, des dicétones qu'à des atomes de soufre ou autres atomes mous.

Le magnésium est beaucoup plus présent dans l'organisme humain que le manganèse. Il est nécessaire au fonctionnement d'une multitude d'organes. Essentiel pour la structure des os et des dents, il joue également un rôle de cofacteur dans l'activité de plus de 300 enzymes (liaison à l'ATP lors des réactions kinase, influence sur la perméabilité des membranes excitables et transmission neuromusculaire⁹⁵). Le corps humain en contient environ 20 mmol/kg de tissu non adipeux. La concentration de magnésium intracellulaire varie de 5 à 20 mmol/L dont 1 à 5 % est ionisé. La quantité restante est liée à des protéines, des molécules chargées négativement et à l'ATP. A noter qu'il est quasiment impossible pour le magnésium de traverser des canaux étroits dans les membranes biologiques (alors qu'elles sont aisément traversées par le calcium), car le magnésium possède une sphère d'hydratation 400 fois supérieure à son rayon initial, et peut difficilement s'en défaire⁹⁶.

Quant au manganèse, le corps humain en contient entre 200 et 400 µmol, quantité négligeable comparée au magnésium. Sa concentration dans les mitochondries est plus élevée que dans le cytoplasme ou d'autres organites. Toutefois, dans un contexte d'étude *in vitro* qui met en jeu des systèmes artificiels, il est intéressant d'utiliser le manganèse à la place du magnésium car il permet souvent de maintenir une activité mesurable et peut aider à la cristallisation⁹⁷.

⁹² S. J. S. Flora, V. Pachauri, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2010**, *7*, 2745–2788.

⁹³ L. P. H. Yang, S. J. Keam, G. M. Keating, *Drugs*, **2007**, *67*, 2211–2230.

⁹⁴ V. M. Richon, *Br. J. Cancer* **2006**, *95*, S2.

⁹⁵ S. Long and A. M. Romani, *Austin J. Nutr. Food Sci.*, **2014**, *2*.

⁹⁶ W. Jahnhen-Dechent and M. Ketteler, *Clin. Kidney J.*, **2012**, *5*, i3–i14.

⁹⁷ C. W. Bock, A. K. Katz, G. D. Markham and J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 7360–7372.

Le magnésium possède un seul état d'oxydation (+II) tandis que le manganèse fait partie des éléments de transition et peut atteindre les états d'oxydation de -III à +VII. L'atome de manganèse divalent est légèrement plus gros que celui de magnésium divalent (0.75 Å contre 0.65 Å pour Mg). Alors que le magnésium se lie uniquement à l'oxygène, le manganèse chélate également l'azote, c'est un atome plus mou que le magnésium, et plus polarisable. Il permet donc une meilleure adaptation dans des systèmes artificiels *in vitro*. De par sa flexibilité, il accepte plus de contraintes chimiques, stériques ou électroniques. Le manganèse possède différentes fonctions dans les réactions enzymatiques, il agit en tant qu'acide de Lewis de manière analogue au magnésium mais également en tant que catalyseur d'oxydation.

Que ce soit deux ions Mg^{2+} ou deux ions Mn^{2+} , ces ions divalents métalliques sont indispensables à l'activité de nos deux cibles. Sans eux, le clivage de l'ARN ne peut pas avoir lieu. Ils sont donc nécessairement présents dans le site actif des deux enzymes (Figure 32).

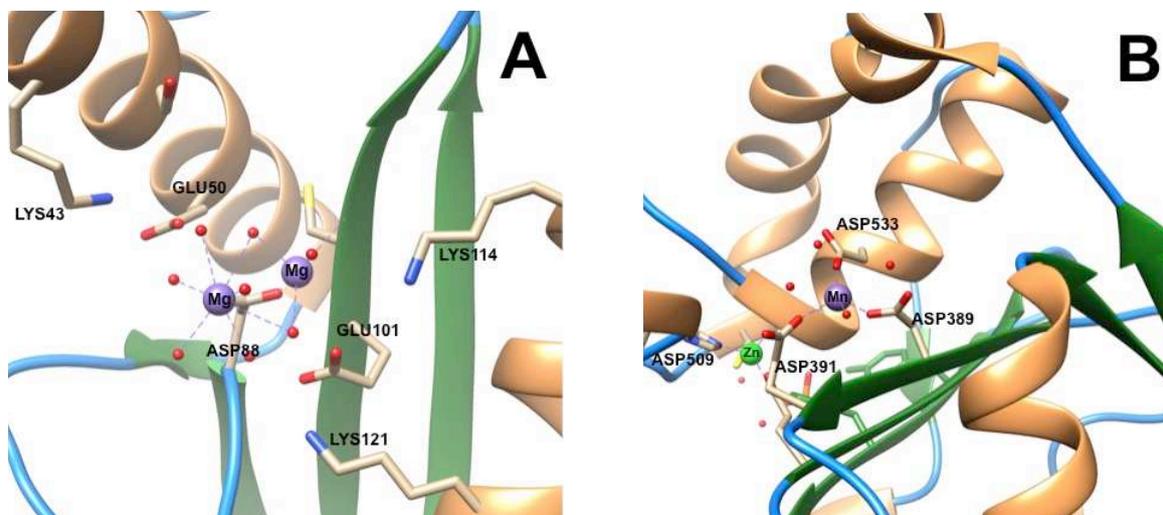


Figure 32. (A) Site actif de l'endonucléase du LCMV, présence de deux magnésiums coordonnés par un réseau de molécules d'eau. (B) Site actif de l'exonucléase de LASV, présence d'un manganèse coordonné par trois acides aspartiques.

Aujourd'hui, il a été démontré que les ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} jouent des rôles importants de cofacteurs dans la réplication de certains virus, à travers leur intervention dans de nombreux processus catalytiques⁹⁰. Dès lors, la conception d'antiviraux chélateurs de ces ions a fait son apparition.

b. Les composés chélateurs de Mg ou Mn

En plus des dicéto-acides, les principales familles de molécules chélatantes de Mg ou Mn sont les polyphénols et les *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones.

> Les polyphénols

Les polyphénols sont connus pour avoir des propriétés anti-oxydantes et chélatantes de métaux. Ils possèdent un mode de chélation bidentes et peuvent piéger suffisamment le métal contrairement aux

polyphénols monodentes (ex : le catéchol chélate le Fe(III) tandis que le phénol non). Les Flavonoïdes sont d'importants polyphénols chélateurs de métaux. Parmi eux, le composé **43** (Quercetine), le composé **44** (Kaempferol) et le composé **45** (Rutine) possèdent différents sites de chélation des métaux selon la disposition des fonctions hydroxyles sur le cycle aromatique ou le motif quinone (Figure 33).

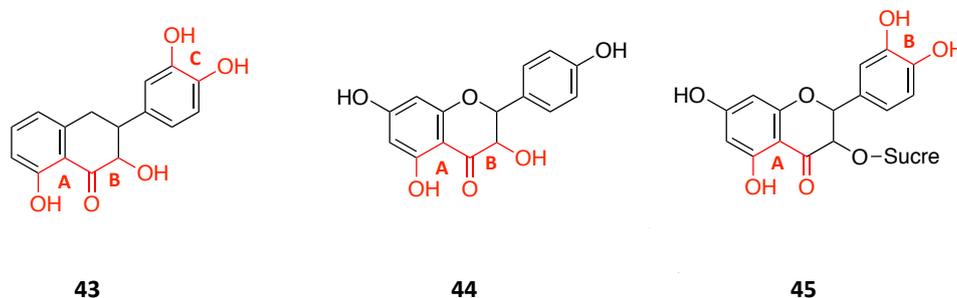


Figure 33. Polyphénols et leurs différents sites de chélation à pH 7. Composé **43** : meilleure affinité de liaison pour le site A. Composé **44** : deux sites de chélation A et B. Composé **45** : deux sites de chélation A et B le troisième ayant disparu à cause de la présence du carbohydate.

Les hydroxyles ont des atomes d'oxygène qui sont durs et vont donc chélater des métaux possédant une haute densité de charge (Fe III, Fe II, Cu II, Zn II). A priori, ils ne chélatent pas les alcalins (Na, K, Ca) mais ils peuvent avoir de faibles interactions avec le magnésium. Toutefois, la chélation d'un catéchol avec un magnésium est moins forte que celle d'un phosphate avec le magnésium⁹⁸.

Parmi les polyphénols, le composé **46** ((-)-Epigallocatechin-3-gallate) inhibe l'endonucléase du virus de la grippe *in vitro* avec une IC₅₀ de 1.9 µM et *in cellula* avec une IC₅₀ de 1.1 µM⁹⁹.

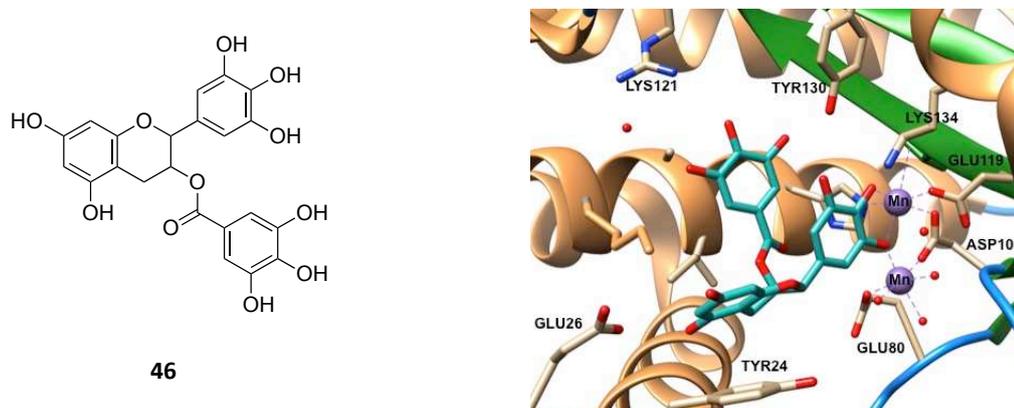


Figure 34. (A) Structure chimique du composé **46**. (B) Structure cristallographique de l'endonucléase du virus de la grippe en complexe avec le composé **46** (Code PDB : 4AWM).

Sa co-cristallisation avec le domaine endonucléase du virus de la grippe a permis de confirmer son mode d'action (Figure 34). En effet, les deux manganèses sont coordonnés aux deux hydroxyles du groupement gallol. Toutefois, une certaine toxicité cellulaire a été observée (CC₅₀= 54.7 µM, SI = 50). D'autres modes

⁹⁸ R. C. Hider, Z. D. Liu, H. H. Khodr, *Meth. Enzymol.*, **2001**, **335**, 190–203.

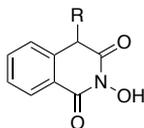
⁹⁹ E. Kowalinski, C. Zubieta, A. Wolkerstorfer, O. H. J. Szolar, R. W. H. Ruigrok and S. Cusack, *PLoS Pathog.*, **2012**, **8**, e1002831.

d'action du composé **46** contre le virus de la grippe ont été reportés¹⁰⁰. Il favorise l'agglomération des particules virales, les empêchant ainsi de s'adsorber sur les cellules¹⁰¹. Par ailleurs, il semble avoir un effet inhibiteur au niveau de l'acidification des compartiments intracellulaires (endosomes et lysosomes), réduisant ainsi la croissance du virus¹⁰².

Ces découvertes, bien que prometteuses attestent de la faible spécificité de cette famille de composés. De plus, certains polyphénols comme les catéchols sont stabilisés par des liaisons hydrogènes intramoléculaires et des interactions électrostatiques. Ils sont donc moins enclins que d'autres motifs à chélater les ions Mg ou Mn, et n'ont d'ailleurs pas fait l'objet de tests plus approfondis.

> Les *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones

Les *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones ont été élaborées à l'origine pour inhiber l'endonucléase du virus de la grippe¹⁰³, l'intégrase et la RNase H du VIH à travers la chélation de Mg²⁺. Ces composés possèdent un motif chélatant *N*-hydroxyimide (Figure 35).



47

Figure 35. Structure du composé **47**, exemple de motif chélatant *N*-hydroxyimide.

Billamboz *et al.*¹⁰⁴ ont initié des travaux sur ces motifs mais malheureusement leur première série de composés présentait une forte cytotoxicité. Ils s'affranchissent de cette toxicité en 2013 en introduisant une chaîne carboxamide (motif R sur la Figure 35) substituée en position 4¹⁰⁵. En effet, les IC₅₀ obtenues pour ces composés sont de l'ordre de 0.1 μM pour l'inhibition *in vitro* de l'étape de transfert de brin. En test cellulaire, les EC₅₀ de ces composés **48** et **49** sont comprises entre 2.3 et 9.2 μM (Figure 36).

¹⁰⁰ J. Steinmann, J. Buer, T. Pietschmann and E. Steinmann, *Br. J. of Pharmacol.*, **2013**, **168**, 1059–1073.

¹⁰¹ M. Nakayama, K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara and T. Shimamura, *Antiviral Res.*, **1993**, **21**, 289–299.

¹⁰² N. Imanishi, Y. Tuji, Y. Katada, M. Maruhashi, S. Konosu, N. Mantani, K. Terasawa and H. Ochiai, *Microbiol. Immun.*, **46**, 491–494.

¹⁰³ K.E.B. Parkes, P. Ermert, J. Fassler, J. Ives, J.A. Martin, J.H. Merret, D. Obrecht, G. Williams and K. Klumpp, *J. Med. Chem.*, **2003**, **46**, 1153–1164

¹⁰⁴ M. Billamboz, F. Bailly, M. L. Barreca, L. De Luca, J.-F. Mouscadet, C. Calmels, M.-L. Andréola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotelle, *J. Med. Chem.*, **2008**, **51**, 7717–7730.

¹⁰⁵ M. Billamboz, V. Suchaud, F. Bailly, C. Lion, J. Demeulemeester, C. Calmels, M. L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotelle, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, **4**, 606–611.

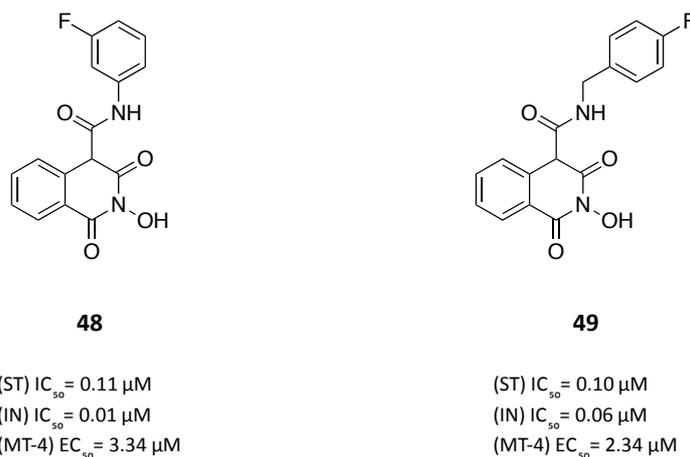


Figure 36. Structure chimique des composés **48** et **49** et leur activité antivirale associée contre différentes cibles du VIH.

Par modélisation moléculaire à partir d'un co-cristal de l'intégrase en complexe avec le Dolutégravir (code PDB : 3S3M), les auteurs ont modélisé le mode de liaison du composé **49**.

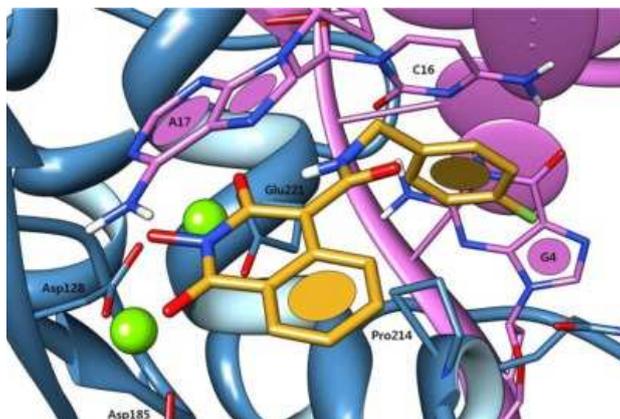


Figure 37. Modélisation moléculaire du composé **49** en complexe avec l'intasome du PFV.

Nous remarquons clairement la chélation des deux ions Mg²⁺ compris entre une fonction carbonyle et l'hydroxyle substitué sur l'azote (Figure 37). Bien que d'autres interactions soient notables comme le l'empilement π-π du groupement fluorobenzyle avec la deoxycytosine C16, la chélation des métaux divalent constitue le premier point d'ancrage de ces composés.

La complexation de ces motifs avec Mg²⁺ a été étudiée par spectroscopie UV-vis et par RMN afin de déterminer leur constante d'association¹⁰⁶. Leurs motifs forment des complexes 1:1 avec Mg²⁺ et 1:2 avec Mn²⁺. Les auteurs mettent en évidence que la formation du complexe nécessite l'énolisation du

¹⁰⁶ M. Billamboz, F. Bailly, C. Lion, N. Touati, H. Vezin, C. Calmels, M.-L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotelle, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 1812–1824.

ligand. Cette famille de molécules a aussi été testée contre la RNase H de HBV¹⁰⁷, enzyme contenant un site actif composé de quatre carboxylates coordonnant deux ions Mg²⁺.

Les composés **50** et **51** sont issus d'un criblage de 39 *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones et présentent des EC₅₀ de 1.4 μM et 2.3 μM lors d'un test d'inhibition de la réplication d'HBV.

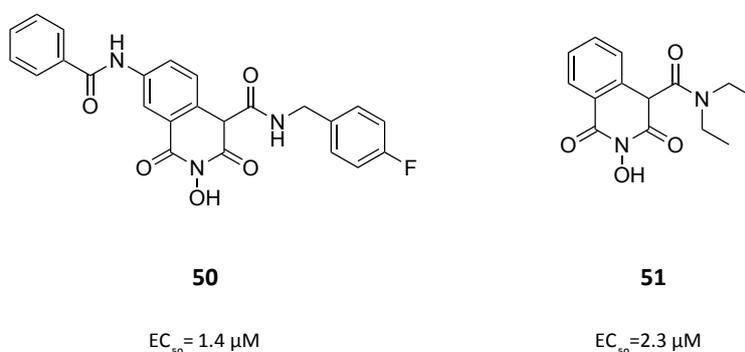


Figure 38. Composé **50** et **51** et leurs efficacités associées dans le cadre de l'inhibition de la réplication d'HBV.

Ces résultats sont prometteurs et sont le point de départ de premières relations structure-activité. Par contre, des tests de spécificité ont été réalisés sur la RNase humaine huRNaseH1, et montrent que la totalité de la chimiothèque des *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones inhibe l'enzyme autour de 20 μM.

Bien que les polyphénols et les *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones aient démontré leurs propriétés chélatantes de Mg et Mn, d'autres types de chélateurs chimiques existent. En particulier, la famille des dicéto-acides qui sont au cœur de ce projet de thèse et qui font l'objet de la partie suivante.

IV. Les dicéto-acides en chimie médicinale

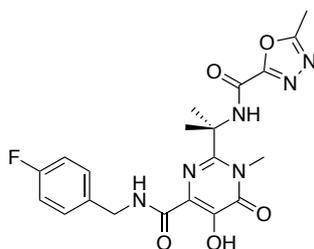
Les dicéto-acides (DCA) sont des composés possédant un large spectre d'application en chimie médicinale. Ils ont été étudiés pour cibler plusieurs infections virales: le virus de l'hépatite C¹⁰⁸, le virus du SIDA le VIH, et le virus de la grippe. Nous nous attarderons ici sur leur mode d'action et sur les données structurales publiées. Tout d'abord, les DCAs sont connus pour inhiber l'intégrase du VIH et constituent la preuve de concept d'une stratégie de drug-design métal-dépendante prometteuse allant jusqu'à la commercialisation d'une molécule (Raltégravir). Enfin, nous nous focaliserons sur l'inhibition de l'endonucléase du virus de la grippe par les DCAs, car elle possède la même fonction de vol de coiffe que celle des Arenavirus.

¹⁰⁷ T. C. Edwards, E. Lomonosova, J. A. Patel, Q. Li, J. A. Villa, A. K. Gupta, L. A. Morrison, F. Bailly, P. Cotelle, E. Giannakopoulou, G. Zoidis and J. E. Tavis, *Antiviral Res.*, **2017**, **143**, 205–217.

¹⁰⁸ V. Summa, A. Petrocchi, P. Pace, V. G. Matassa, R. De Francesco, S. Altamura, L. Tomei, U. Koch and P. Neuner, *J. Med. Chem.*, **2004**, **47**, 14–17.

1. Inhibiteurs de l'intégrase du VIH

L'intégrase du VIH est une cible thérapeutique de choix pour développer des solutions anti-VIH. Cette enzyme catalyse deux processus essentiels de la réplication du virus : l'étape du 3' processing et celle de transfert de brin. Elle met en jeu un mécanisme catalytique à deux ions divalents (Mg^{2+})^{109,110}. En 2007, le premier inhibiteur de l'intégrase du VIH, le composé **52** (Raltégravir), a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA)¹¹¹ (Figure 39).



52

(ST) $IC_{50} = 15$ nM
(MT-4) $IC_{50} = 2-7$ nM

Figure 39. Structure chimique du composé **52**^{112,113}.

Ce composé possède un motif β -hydroxy-amide chélateur de métaux. Sa conception a été initialement inspirée d'une analogie avec le motif DCA car il possède le même mécanisme d'action.

Initialement, différents DCAs ont été testés pour leur capacité à inhiber l'étape de transfert de brin et ont pour la plupart démontré des activités de l'ordre du micromolaire (Figure 40). Les composés **53**, **54**, **55** et **56** ont été les premiers motifs DCAs à inhiber sélectivement l'étape de transfert de brin et ainsi à réduire la réplication du virus^{114,115}.

¹⁰⁹ Y. Shibagaki, M. L. Holmes, R. S. Appa and S. A. Chow, *Virology*, **1997**, **230**, 1–10.

¹¹⁰ V. Ellison and P. O. Brown, *PNAS*, **1994**, **91**, 7316–7320.

¹¹¹ C. Hicks and R. M. Gulick, *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, **48**, 931–939.

¹¹² T. M. Motohide Sato Hisateru Aramaki, T. Matsuda, M. Yamashita, Y. Ito, H. Kawakami, Y. Matsuzaki, W. Watanabe, K. Yamataka, S. Ikeda, E. Kodama, M. Matsuoka, and H. Shinkai, *J. Med. Chem.*, **2006**, **49**, 1506–1508.

¹¹³ C. Liao, C. Marchand, T. R. Burke Jr, Y. Pommier and M. C. Nicklaus, *Future Med. Chem.*, **2010**, **2**, 1107–1122.

¹¹⁴ D. J. Hazuda, P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau and M. D. Miller, *Science*, **2000**, **287**, 646–650.

¹¹⁵ J. S. Wai, M. S. Egbertson, L. S. Payne, T. E. Fisher, M. W. Embrey, L. O. Tran, J. Y. Melamed, H. M. Langford, Guare James P., L. Zhuang, V. E. Grey, J. P. Vacca, M. K. Holloway, A. M. Naylor-Olsen, D. J. Hazuda, P. J. Felock, A. L. Wolfe, K. A. Stillmock, W. A. Schleif, L. J. Gabryelski and S. D. Young, *J. Med. Chem.*, **2000**, **43**, 4923–4926.

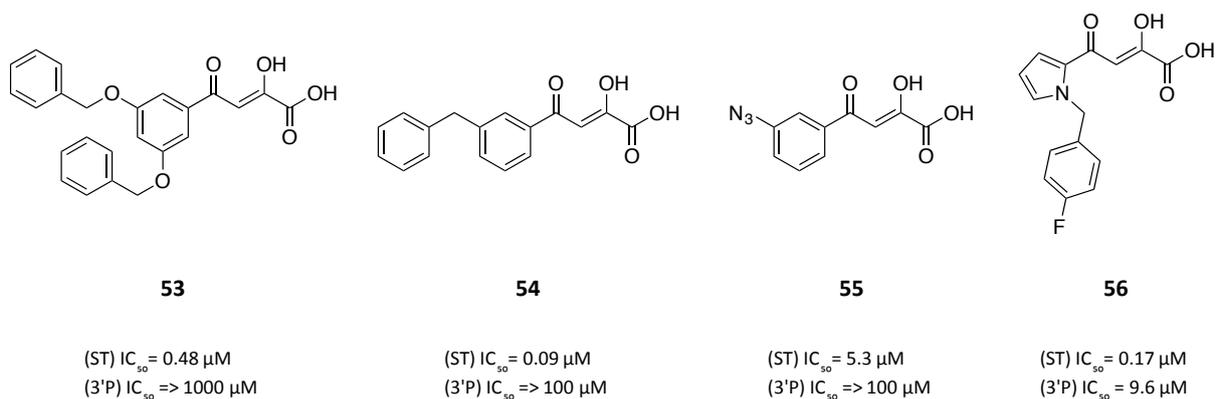


Figure 40. Structures chimiques des DCAs **53**, **54**, **55** et **56** identifiés comme inhibiteurs sélectifs de l'étape de transfert de brin.

Les composés **53** et **56** se sont avérés être les composés les plus prometteurs.

Au niveau du mécanisme, le motif DCA va se fixer sur le site accepteur de l'ADN viral par chélation des ions métalliques Mg^{2+} présents sur ce site. L'approche de l'ADN cellulaire va alors être empêchée et l'étape de transfert de brin ne pourra pas avoir lieu. La chélation de ces ions catalytiques est une étape cruciale puisqu'il a été montré que les DCAs ne se fixaient pas à l'intégrase en l'absence d'ions¹¹⁶.

Les DCAs ont également été étudiés pour cibler la polymérase du virus de l'hépatite C (HCV), et à l'époque, deux équipes de chercheurs travaillaient en parallèle sur ces deux cibles. L'équipe travaillant sur HCV a découvert un dérivé des DCAs qui s'est avéré plus actif, et sélectif que les DCAs¹¹⁷ : les dihydroxypyrimidine carboxamides. Compte-tenu des problèmes de résistance attribués aux motifs DCAs, le programme de recherche sur le VIH n'a pas continué dans leur direction, mais vers cette nouvelle famille chimique. Elle a été construite afin d'améliorer les propriétés drug-like des DCAs tout en conservant leur géométrie permettant la chélation des ions Mg^{2+} dans le site actif. La superposition du composé **59** (inhibiteur de la polymérase d'HCV, IC_{50} = 2.25 μ M) à un DCA classique, le composé **58** (DPBA), montre un alignement similaire des parties chélatantes (Figure 41).

¹¹⁶ J. A. Grobler, K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca and D. J. Hazuda, *PNAS*, **2002**, **99**, 6661–6666.

¹¹⁷ V. Summa, A. Petrocchi, V. G. Matassa, M. Taliani, R. Laufer, R. De Francesco, S. Altamura and P. Pace, *J. Med. Chem.*, **2004**, **47**, 5336–5339.

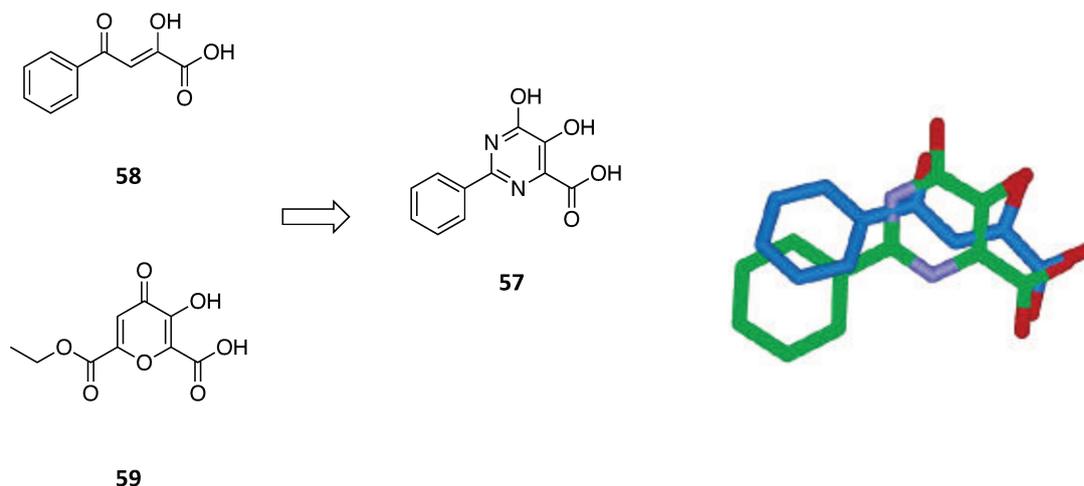


Figure 41. (A) Design de la dihydroxypyrimidine 57 à partir des composés 58 et 59. (B) Superposition du composé 57 et du DCA 58.

Ce type de motif s'est avéré actif contre l'intégrase du VIH lors de l'étape de transfert de brin¹¹⁸.

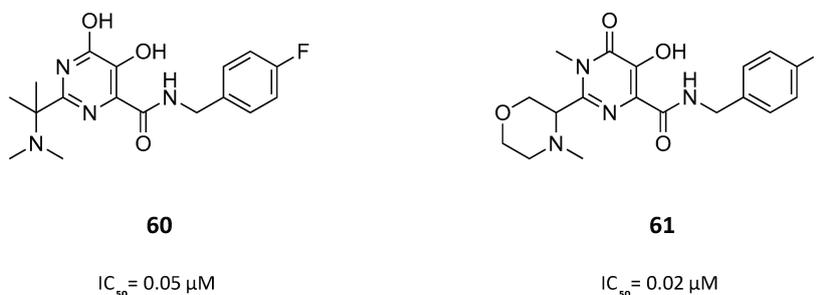


Figure 42. Structures chimiques et activités des composés 60 et 61.

En effet les composés 60 et 61 sont issus de l'optimisation chimique du composé 57, et présentent d'excellentes IC_{50} (Figure 42). C'est ainsi qu'à la suite de plusieurs travaux de SAR sur ces deux composés, le composé 52 (Raltégravir) a été synthétisé et développé.

Malheureusement, il n'existe pas de structure cristallographique de l'intégrase du VIH en complexe avec le Raltégravir 52. Toutefois, en 2010, Hare *et al.*¹¹⁹ obtiennent la structure du *Prototype Foamy Virus Intasome* (un rétrovirus modèle possédant le même mode d'action que le VIH) en complexe avec le composé 52 (Figure 43).

¹¹⁸ V. Summa, A. Petrocchi, V. G. Matassa, C. Gardelli, E. Muraglia, M. Rowley, O. G. Paz, R. Laufer, E. Monteagudo and P. Pace, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 6646–6649.

¹¹⁹ S. Hare, A. M. Vos, R. F. Clayton, J. W. Thuring, M. D. Cummings and P. Cherepanov, *PNAS, Sciences*, 2010, 107, 20057–20062.

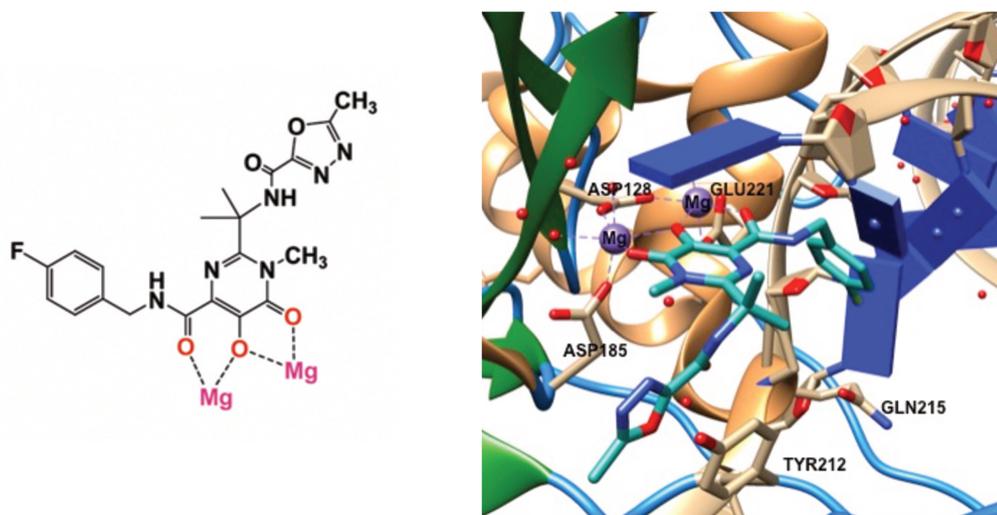


Figure 43. (A) Mode de liaison du composé 52 aux deux Mg²⁺. (B) PFV en complexe avec le composé 52.

De la même manière que les DCAs, le composé 52 chélate les ions Mg²⁺ entre deux pinces portées par les groupements carbonyles et l'hydroxyle.

Bien que les DCAs n'aient pas été sélectionnés au-delà du stade de la recherche pour inhiber l'intégrase du VIH, ils ont constitué le point de départ du développement d'inhibiteurs de cette enzyme. Ils sont la preuve de concept, que la chélation des métaux est une stratégie de drug-design prometteuse. Aujourd'hui, cette stratégie thérapeutique a fait ses preuves puisque trois composés dérivés du Raltégravir 52 ont également été commercialisés. Aussi, dans un cadre préliminaire de recherche d'inhibiteurs d'enzymes métal-dépendantes, ils sont un excellent outil d'étude car ils constituent un premier point d'ancrage à l'enzyme cible.

2. Inhibiteurs de l'endonucléase du virus de la grippe

a. Activité antivirale

Comme mentionné précédemment, l'endonucléase du virus de la grippe portée par le domaine PA apparaît depuis des années comme une cible de choix pour le développement d'antiviraux. Historiquement, les premiers inhibiteurs chélatants de cette enzyme, ont été les DCAs. Parmi eux, une série de molécules a été identifiée par criblage à haut débit par Merck à l'aide de tests de transcription *in vitro*¹²⁰. Ces composés possèdent des IC₅₀ comprises entre 0.2 et 29.0 μM. Les relations structure-activité de ces composés ont révélé que la fonction DCA était nécessaire à l'activité inhibitrice et que la présence de groupements lipophiles améliorait l'efficacité. Ces molécules ont fait l'objet d'un brevet¹²¹.

¹²⁰ J. Tomassini, H. Selnick, M. E. Davies, M. E. Armstrong, J. Baldwin, M. Bourgeois, J. Hastings, D. Hazuda, J. Lewis and W. McClements, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, 38, 2827–2837.

¹²¹ H.G. Selnick, J.J. Baldwin, G. S. Ponticello, J.E. Tomassini, 1997, US005618830A.

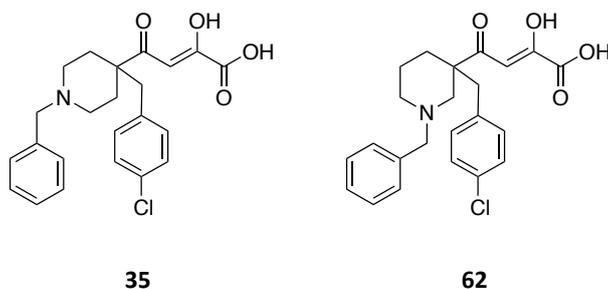


Figure 44. Structure chimique des composés **35** et **62**.

Les composés **35** et **62** (substitution en méta) présentent des IC_{50} respectives de 0.4 et 1.1 μM lors d'un test d'inhibition de la transcription *in vitro* et ont des activités similaires dans leur test de diminution de la production virale (EC_{50} de 0.4 et 1.6 μM).

Pour des raisons de solubilité, le composé **62** a été sélectionné pour des tests *in vivo*¹²². Le composé a été administré à 9.6 mg/kg et a permis de diminuer le titre viral de 3.9 log. Le composé **35** a fait l'objet d'autres tests afin d'approfondir son mode d'action. Stevaert *et al.*¹²³ étudient en 2013 l'effet de mutations dans le site actif de l'endonucléase du virus de la grippe sur son activité afin d'identifier les acides aminés impliqués dans des interactions avec le composé et de déterminer l'origine moléculaire des résistances au virus rencontrées. Par ailleurs, le squelette et la grande affinité du composé **35** ont été exploités pour construire un test compétitif de liaison par polarisation de fluorescence¹²⁴.

b. Données structurales

Le domaine endonucléase du virus de la grippe, PA-Nter, est composé de 7 hélices α et 5 feuillets β . La première structure de la forme holo de PA-Nter a été publiée en 2009 et montre un motif caractéristique (P)DXN(D/E)XK au niveau du site actif formé par un cluster d'acides aminés (GLU80, ASP108 et GLU119, ainsi qu'une proline dans le cas de la grippe A ou d'une alanine dans le cas de la grippe B position 107 et également les lysines 134 et 137) faisant penser aux endonucléase de restriction de type II¹²⁵. Cette triade d'acides aminés coordine deux métaux au sein du site actif. On remarque également la présence d'une histidine HIS41 qui est conservée dans toutes les souches de virus de la grippe.

Concernant le positionnement des ligands, un certain nombre de DCAs ont été cristallisés avec l'endonucléase du virus de la grippe attestant de leur mode de chélation. Tous possèdent un mode de

¹²² J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski and J. E. Tomassini, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, **40**, 1304–1307.

¹²³ A. Stevaert, R. Dallochio, A. Dessi, N. Pala, D. Rogolino, M. Sechi and L. Naesens, *J. Virol.*, **2013**, **87**, 10524–10538.

¹²⁴ B. M. Baughman, P. Jake Slavish, R. M. DuBois, V. A. Boyd, S. W. White and T. R. Webb, *ACS Chem. Biol.*, **2012**, **7**, 526–534.

¹²⁵ P. Yuan, M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao and Y. Liu, *Nature*, **2009**, **458**, 909–913.

chélation identique. Un premier ion est coordonné par l'oxygène carboxylique et l'oxygène énolique, tandis que le deuxième est encadré par l'oxygène énolique et la γ cétone.

Une structure du composé **35** avec la souche A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) montre que le groupement carboxyle forme une liaison ionique avec la LYS134 et que les deux bras benzyle et chlorobenzyle se disposent dans différentes poches¹²⁶ (Figure 45, Panel A).

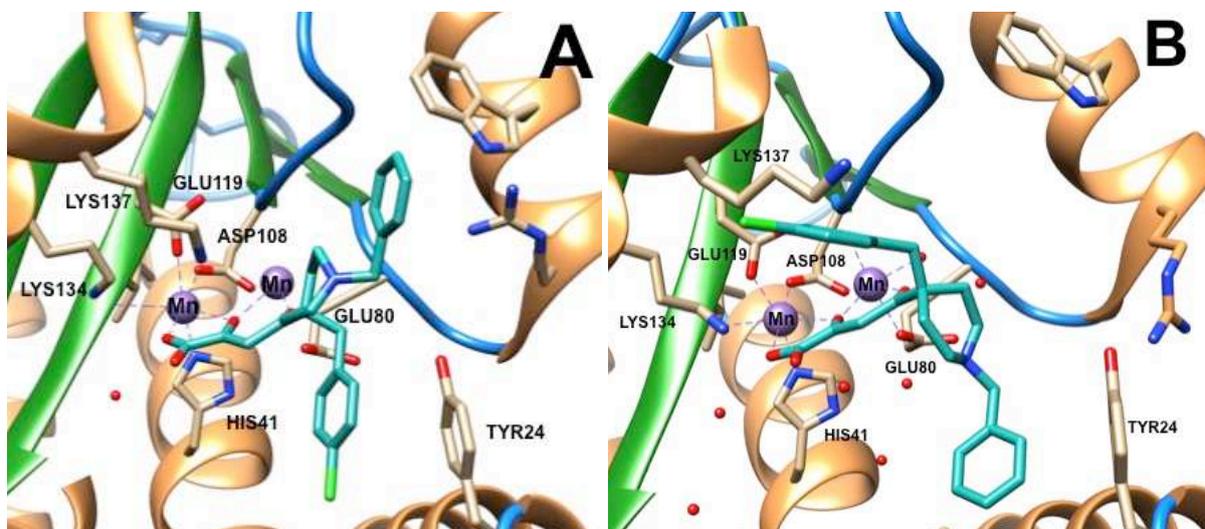


Figure 45. Deux structures cristallographiques de l'endonuclease du virus de la grippe en complexe avec le composé **35** (Code PDB : 4E5H, 2012 et 5CGV, 2015).

Un complexe récemment obtenu avec une autre souche virale confirme que la partie DCA arbore le même mode de chélation (Figure 45, Panel B). Toutefois, les deux bras aromatiques pointent vers des directions radicalement opposées par rapport à la première structure pour occuper d'autres poches. Ce constat permet d'envisager une certaine malléabilité du positionnement du ligand et ceci est également observé avec des structures proches du composé **35** comportant d'autres substitutions. Ceci confirme les observations de Stevaert *et al.*¹²³ qui montrent à travers des expériences de docking une orientation différente des deux bras du composé par rapport à la structure cristallographique.

Ces deux applications thérapeutiques montrent que le motif chimique DCA s'est avéré actif contre une diversité d'enzymes grâce à un mécanisme métal-dépendant. Ces molécules possèdent un squelette commun capable de chélater un à deux métaux et sont le jalon de plusieurs programmes de recherche d'antiviraux.

Notre objectif est d'utiliser ce même mode de chélation et de construire de nouveaux ligands visant à inhiber les deux nucléases d'Arenavirus. Toutefois, le design de ligands sélectifs doit également tenir compte de considérations de structures qu'elles soient stériques ou électroniques pour pouvoir

¹²⁶ R. M. Dubois, P. J. Slavish, B. M. Baughman, M.-K. Yun, J. Bao, R. J. Webby, T. R. Webb and S. W. White, *PLoS Pathog.*, **2012**, *8*, e1002830.

apporter de la spécificité et de la sélectivité sur les molécules cibles, la chélation de métaux étant nécessaire à la fixation du récepteur mais pas suffisante. Il faudra que les molécules cibles soient spécifiques de l'endonucléase virale et non active sur d'autres nucléases cellulaires. Avant le début de ce projet de thèse, des travaux préliminaires avaient été réalisés au laboratoire. Ils sont décrits ci-dessous.

V. Travaux préliminaires réalisés au laboratoire

Notre stratégie thérapeutique consiste à inhiber les nucléases d'Arenavirus de façon compétitive par rapport au substrat ARN, grâce à la présence de molécules chélatantes de métaux. Au début de ce projet de thèse, un criblage de plusieurs familles de molécules a mis en évidence de potentiels ligands. Diverses familles de molécules chimiques chélatantes de Mg ou Mn ont été analysées : les dicéto-acides (DCA), les polyphénols (POP), les *N*-hydroxyisoquinoline-1,3-diones (HID), les amides salicyliques, les tetracyclines, les chalcones, et les benzophénones. La synthèse et la caractérisation biophysique de certains de ces composés de 1^{ère} génération, ont initié le début de ces travaux de thèse.

1. Endonucléase du LCMV

a. Criblage par DSF

Un criblage préliminaire a été réalisé par analyse différentielle fluorimétrique (DSF) afin d'identifier des familles de molécules chimiques capables de se fixer à l'endonucléase. Cette technique permet de déterminer les variations de température de dénaturation d'une protéine sous l'influence de différentes conditions en présence d'un cofacteur ou d'un ligand (voir [Chapitre 3, I.1-a](#)). La liaison d'un ligand à une protéine peut augmenter la stabilité thermique de cette dernière¹²⁷. Les composés chélateurs sélectionnés ont donc été évalués pour leur aptitude à stabiliser la protéine par interaction, se traduisant par une augmentation de la température de dénaturation T_m . La température de dénaturation initiale de l'endonucléase du LCMV est de 38°C en l'absence de cofacteur ou de ligand. L'ajout d'un mélange d'ions Mn^{2+} et Mg^{2+} stabilise la protéine ($T_m=46^\circ C$). Cette température a été utilisée comme référence pour le criblage. 56 composés ont été testés à deux concentrations (220 μM et 440 μM , ratio protéine/ligand de 3 et 6). Aucune différence entre les deux concentrations n'a été observée.

Les POPs (composés **89** à **98**, Figure 46) ont montré une déstabilisation de la protéine. Les HIDs ont montré une faible stabilisation avec un ΔT_m compris entre 2 et 9 °C (composés **99** à **108**, Figure 46). Les tetracyclines, chalcones et benzophénones n'ont apporté aucun changement (composés **63** à **68**, Figure

¹²⁷ D. E. Koshland, *PNAS*, **1958**, **44**, 98–104.

46). Enfin, la famille des DCAs a montré une stabilisation significative allant de 4 à 17°C (composés **58** à **88**, Figure 46).

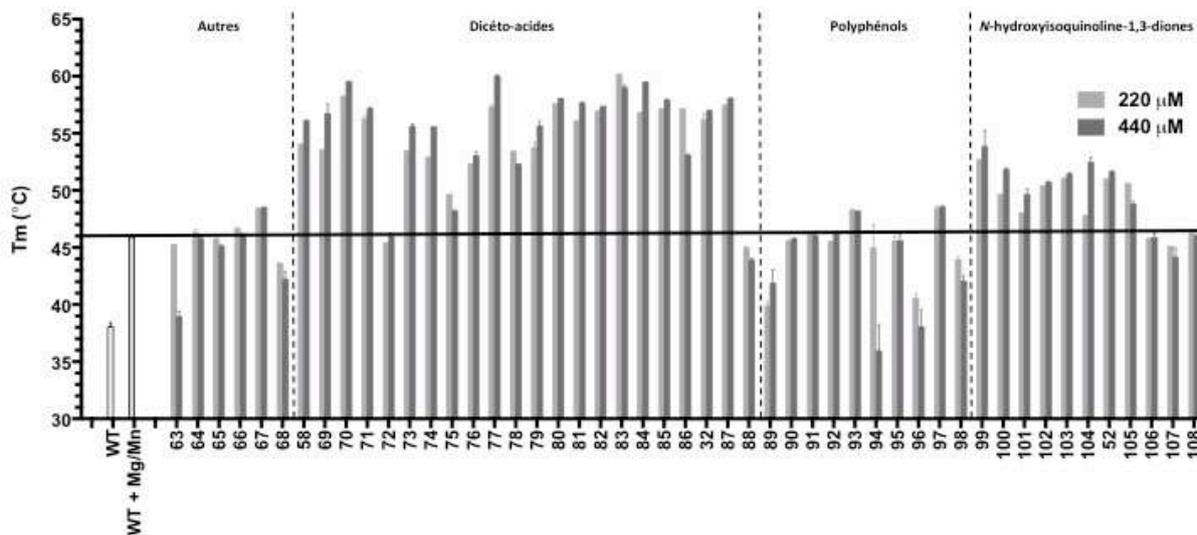


Figure 46. Résultats du criblage de molécules chélatantes de métaux par analyse différentielle fluorimétrique.

Ces premiers résultats ont mis en lumière le potentiel des DCAs à stabiliser l'endonucléase du LCMV. Des analyses par thermophorèse à micro-échelle ont ensuite été conduites pour quantifier la potentielle affinité de ces familles de ligands pour l'enzyme d'intérêt.

b. Evaluation par thermophorèse à micro-échelle (MST)

Certains composés issus de ces différentes familles ont été évalués par thermophorèse à micro-échelle (MST). La plupart des POPs testés ayant un effet déstabilisant en DSF, seuls les K_d de quelques-uns ont été déterminés et il a été confirmé qu'ils n'étaient pas de bons ligands (K_d compris entre 14 µM et 67 µM pour les composés **92** et **94**, >250 µM pour les autres). Les HIDs ont présenté des affinités intéressantes, le composé **45** possède un K_d de 2.17 µM. L'introduction d'un motif N-benzylecarboxamide en position 4 a permis d'abaisser le K_d à 0.25 µM.

Enfin, l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour les DCAs se situe autour du micromolaire, mais des différences sont notables selon les substitutions sur le cycle aromatique. Le détail de ces relations structure-activité sera présenté dans le [Chapitre 2, Partie 1, II.1](#) puisqu'elles ont été utilisées pour la conception de la 2^{nde} génération de ligands.

c. Activité in vitro et efficacité en mini-génome

L'activité *in vitro* de ces différentes familles de molécules a été testée à l'aide d'un test radiomarqué. Un ARN radiomarqué a été incubé avec l'endonucléase du LCMV et son clivage a été analysé sur gel de polyacrylamide dénaturant et visualisé à l'aide d'un phosphoimager. Le composé **92** appartenant à la

famille des POPs qui présentait un bon K_d vis-à-vis de l'enzyme, montre une très faible activité puisqu'il inhibe l'enzyme à hauteur de 8%. Concernant les composés **99** et **52** appartenant aux HIDs, ils sont des inhibiteurs modérés (43% et 58% d'inhibition). Les résultats d'activité *in vitro* concernant les DCAs de 1^{ère} génération seront présentés dans le [Chapitre 2, Partie 1, II.1](#).

Certains composés ont ensuite été évalués dans un test de mini-génome en collaboration avec le Dr. Sébastien Emonet, IRBA, Lyon). Pour résumer, des cellules BHK-21 ont été transfectées par des plasmides contenant le matériel génétique du LCMV minimum pour assurer la réplication et la transcription (L et NP), sans les autres gènes viraux qui sont remplacés par des gènes rapporteurs. Les composés sont ensuite mis en présence de ces cellules transfectées et l'expression du mini-génome est ainsi suivie au cours du temps (pour plus de détails, voir [Chapitre 3, III.2](#)). Plusieurs composés représentants des trois différentes familles ont été testés. Concernant le seul POP testé, le composé **92** n'inhibe pas l'expression du mini-génome. Chez les HIDs, le composé **99** ne présente également aucune efficacité et le composé **52** s'est avéré cytotoxique avec plus de 50% de mort cellulaire à trois jours post-infection. Enfin, dans la famille des DCAs, le composé **35** a montré une inhibition du mini-génome, accompagnée d'une forte toxicité. Son efficacité sera détaillée dans le [Chapitre 2, Partie 1, II.1](#).

d. Structures cristallographiques

Des expériences de co-cristallisation ont permis d'obtenir deux complexes enzyme-ligand. Une première structure avec le composé **58** (DPBA) montre qu'il se lie aux deux Mg^{2+} du site actif à l'aide de deux oxygènes carbonyles (Figure 47, Panel A). Toutefois, il n'y a pas d'autre interaction directe avec les résidus du site actif. Une seconde structure enzyme-ligand a été obtenue avec le composé **35**.

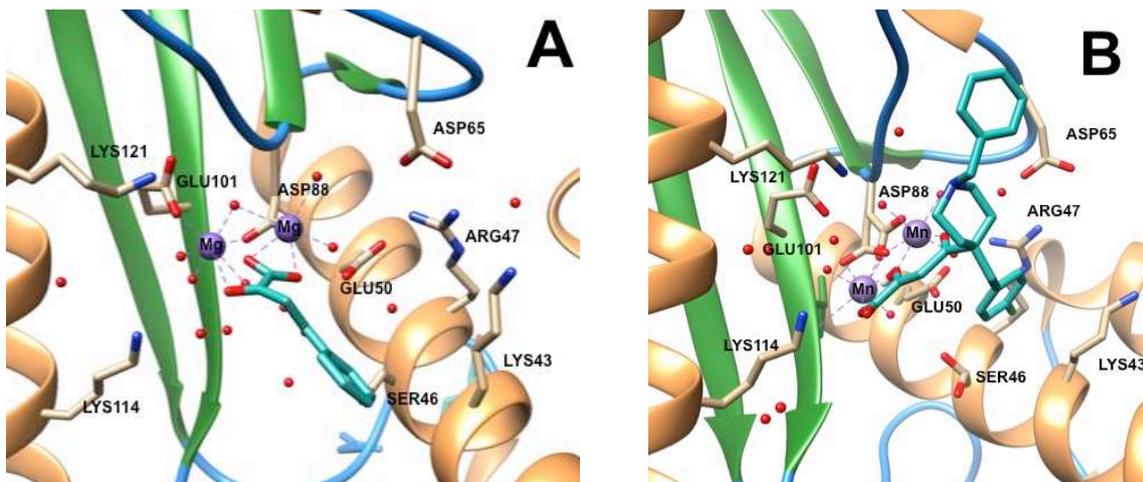


Figure 47. (A) Endonucléase du LCMV en complexe avec deux Mg^{2+} et le composé **58** (Code PDB: 5LTN). (B) Endonucléase du LCMV en complexe avec deux Mn^{2+} et le composé **35** (Code PDB : 5T2T).

Contrairement au composé **58**, le composé **35** semble avoir un mode de liaison quelque peu différent, puisque trois oxygènes semblent être impliqués dans la chélation (Figure 47, Panel B). De plus, le

groupement chlorobenzyle vient se positionner dans une poche formée des acides aminés ARG47, SER46, LYS43 et GLU50. Il pourrait interagir avec eux.

2. Exonucléase du MOPV

a. Structure cristallographique

Une structure de l'exonucléase du MOPV a été résolue par Yekwa et *al.* au sein du laboratoire¹²⁸. L'enzyme possède 206 acides aminés et est présente sous forme d'homodimère (Figure 48). Un ion Zn^{2+} structural près du site actif est coordonné par les acides aminés GLU400, CYS507, HIS510, et CYS530 qui sont hautement conservés chez les *Arenaviridae*. Un second ion métallique est présent au sein du site actif. Il s'agit d'un Mg^{2+} interagissant avec les résidus ASP390, GLU392, ASP534 et une molécule d'eau. Les acides aminés catalytiques DEDD forment une cavité acide et sont hautement conservés chez les Arenavirus du nouveau et de l'ancien monde. Des analyses comparatives avec les structures d'exonucléases de LASV, LCMV, et TCRV montrent un très fort pourcentage d'identité. Par ailleurs, les acides aminés catalytiques sont parfaitement superposés. Le site actif de l'exonucléase possède une conformation plus fermée que celui de l'endonucléase.

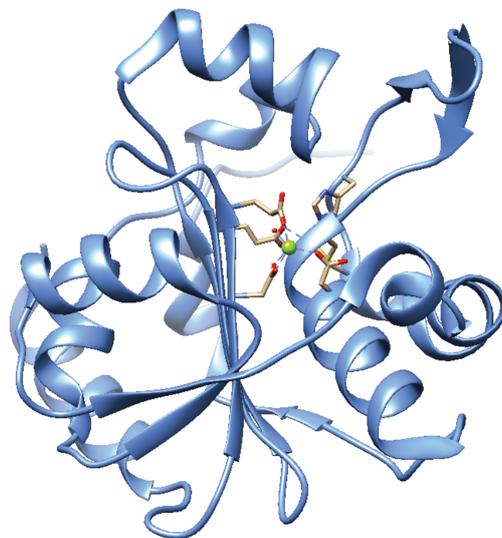


Figure 48. Structure cristallographique d'un monomère du domaine exonucléase du virus de Mopeia.

La structure comporte 2 feuillets β ainsi que 8 hélices α connectées par plusieurs boucles.

b. Criblage *in silico* d'une chimiothèque

Un screening *in silico* d'une chimiothèque de 10 000 composés réalisé par le Dr. Yekwa dans l'équipe a permis d'identifier un premier hit, le composé 109 (structure confidentielle), possédant le même mode

¹²⁸ E. Yekwa, J. Hourieh, B. Canard, N. Papageorgiou and F. Ferron, *Acta Cryst.*, 2017, 73, 641–649.

d'action métal-dépendant que les DCAs a montré une légère inhibition de deux exonucléases d'Arenavirus avec une IC_{50} de 66.0 μ M pour le LCMV et de 68.6 pour MOPV en test radioactif. Sa spécificité a également été évaluée sur la protéine nsp14 du virus SARS de la famille des Coronavirus qui possède également une activité exonucléase 3'-5'. Ce composé n'a pas été capable d'inhiber cette enzyme. Ce résultat est la preuve de concept qu'il est possible d'obtenir un inhibiteur sélectif de l'exonucléase des Arenavirus et constitue l'initiation d'une stratégie de drug-design. Toutefois, ce composé est relativement petit et possède peu de possibilités d'optimisation chimique. L'exonucléase possédant le même mécanisme d'action que l'endonucléase des Arenavirus, il serait également judicieux de tester les ligands appartenant à la famille des DCAs sur l'exonucléase de MOPV dans l'optique de développer une stratégie antivirale duale.

Ce projet d'identification d'antiviraux ciblant les nucléases d'Arenavirus a permis de générer de solides résultats préliminaires.

La famille des DCAs a été identifiée comme ligands potentiels de l'endonucléase du LCMV. Leur mode d'action à travers la chélation des métaux du site actif des nucléases a été validé par des méthodes biophysiques (MST, DSF), et leur activité a été étudiée *in vitro* et *in cellula*. Concernant l'exonucléase, le composé **109** s'est montré faiblement actif mais sélectif de l'exonucléase de MOPV.

Des outils technologiques ont été ainsi mis en place et développés au sein du laboratoire. La DSF et la thermophorèse ont permis de quantifier la stabilité des cibles thérapeutique et l'affinité de l'enzyme pour ces premiers ligands. Le test radiomarqué a permis d'évaluer la capacité des ligands à dégrader l'ARN substrat. Toutefois, il n'est pas approprié pour tester un grand nombre de composés. Enfin, le test en mini-génome, étant représentatif des deux cibles (la L et la NP sont présentes et sont les protéines minimales requises pour la réplication) nous permet de quantifier la diminution de l'expression du mini-génome en présence d'un inhibiteur.

Nous allons donc nous focaliser sur la famille des DCAs et plus particulièrement sur le composé **35** afin d'augmenter ses propriétés inhibitrices des nucléases d'Arenavirus et de s'affranchir de sa toxicité (voir Chapitre 2, Partie 1, II-1).

Objectifs de recherche

Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet de thèse est de faire des avancées dans le développement d'antiviraux contre les Arenavirus. Il s'agira de développer des ligands améliorés, possédant une structure chimique commune (le motif DCA), mais dont les modifications chimiques permettront un meilleur ancrage dans le site actif des nucléases d'Arenavirus. Pour ce faire, plusieurs points seront abordés :

1. Une chimiothèque de molécules analogues du composé **35** sera synthétisée dans le but d'introduire de nouvelles interactions avec les résidus du site actif des enzymes cibles. Ces molécules comporteront des différences de structure chimique couvrant une large gamme de modifications (extension de chaîne ou homologation, introduction d'hétéroatomes, changement hétérocyclique, introduction de liaison amide et carbamate). Un soin sera également apporté au développement de dérivés bioisostériques visant à anticiper une mauvaise pénétration cellulaire des DCAs, composés ionisables.
2. Concernant la partie synthèse organique, la voie de synthèse du squelette principal de ces composés sera optimisée en vue d'améliorer le rendement global de synthèse. De plus, le raccourcissement de cette synthèse sera étudié afin d'obtenir un schéma plus convergent et d'accéder aux composés finaux plus rapidement. La synthèse chimique du motif final DCA sera revisitée et optimisée à partir de l'état de l'art, pour obtenir les molécules dans des conditions douces et peu coûteuses.
3. L'affinité des nucléases d'Arenavirus pour les nouveaux ligands sera déterminée par thermophorèse à micro-échelle (MST) et complétée par une évaluation de la capacité des composés à stabiliser les deux enzymes (DSF). Ces tests permettront de confirmer le mode d'action des ligands à travers la chélation d'ions métalliques.
4. A l'aide de collaborations internes, le potentiel inhibiteur des composés sera évalué *in vitro*. Les composés seront testés contre l'exonucléase de MOPV par test radiomarqué (Thi-Hong Van Nguyen, AFMB). Ils seront testés contre l'endonucléase du LCMV par FRET (Dr. Sergio Hernandez, AFMB).

5. Enfin, la viabilité cellulaire des composés sera évaluée (Dr. Sergio Hernandez, AFMB), dans le but de sélectionner les composés non toxiques et de tester leur efficacité en mini-génome (Dr. Sergio Hernandez, AFMB). Les composés seront également envoyés à des collaborateurs travaillant sur le virus Junin (Dr. Cybel Garcia, Argentine).

La stabilité des composés en milieu cellulaire sera évaluée par une étude cinétique analysée par HPLC afin d'identifier de potentiels métabolites.

En complément, les composés seront envoyés pour être testés sur différents *Bunyavirales* famille de virus étroitement proche des Arenavirus en termes de génome : les hantavirus (Dr. Tischler, Cienca & Vida, Chili), le virus Tahyna, le virus de la vallée du rift, et le virus Hazara (Dr. Querat, IRD, Marseille).

Chapitre 2. Conception et synthèse des composés cibles

Chapitre 2 – Conception et synthèse des composés cibles

PARTIE 1 – Les dicéto-acides

I. Le composé 35 et les dicéto-acides

1. Synthèse historique du composé 35

Le composé **35** est initialement issu d'un criblage de Merck & Co pour identifier des inhibiteurs de l'endonucléase du virus de la grippe. Sa première voie de synthèse a été brevetée en 1997 par Selnick *et al.*¹²¹. Elle comporte huit étapes en commençant la synthèse à partir de l'ester pipéridinyle **110** protégé par un groupement Boc (Schéma 2). Toutefois, cet intermédiaire est relativement coûteux (100€/25g) si l'on souhaite effectuer la synthèse à large échelle, il faut donc compter neuf étapes de synthèse en rajoutant la protection de l'azote de la pipéridine et l'isolement du dicéto-ester (DCE) à l'étape G1. D'autre part, il s'agit d'une synthèse linéaire alors que l'emploi d'une synthèse convergente serait plus judicieux.

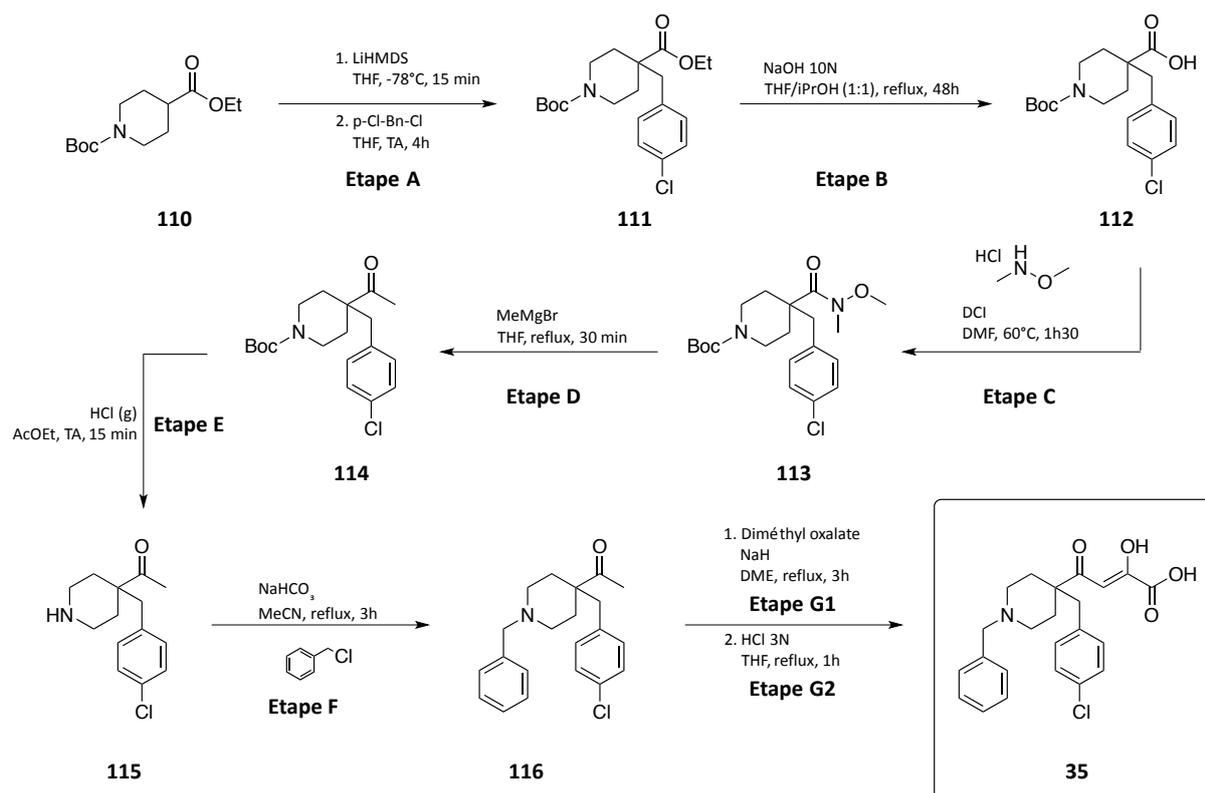


Schéma 2. Voie de synthèse historique du composé **35** (1997).

En 2012, la synthèse du composé **35** a été revisitée par Baughman *et al.* dans le but de concevoir un dérivé fluorescent du composé pour des essais de polarisation de fluorescence¹²⁴. Si le nombre d'étapes reste identique, leur ordre est changé. Ils réalisent la substitution nucléophile (Schéma 2, **étape F**) avant l'obtention de la méthyle cétone. Des modifications de réactifs sont aussi notables.

Plus récemment, en 2015, l'équipe de Stevaert *et al.*¹²⁹ a revisité la synthèse de ce composé en modifiant certaines conditions opératoires, au niveau de l'**étape B** (hydrolyse de l'ester), l'**étape C** (couplage peptidique), l'**étape D** (formation de la méthyle cétone), l'**étape E** (déprotection du groupement Boc), et l'**étape G** (condensation de Claisen). Il s'agit essentiellement de modifications de température, solvant, et parfois de réactifs. Toutefois, aucun changement de voie de synthèse n'a été décrit.

Suivant les auteurs, l'alkylation du carbone en position 4 sur le cycle pipéridine et en α de la fonction ester (**Etape A**) se réalise de manière aussi efficace en présence de LiHMDS (introduit à froid) à température ambiante ou à -78°C . Les rendements sont de l'ordre de 80%.

L'**étape B** requiert des températures élevées (reflux du solvant) en milieu fortement basique. Différentes conditions opératoires sont utilisées : NaOH 10N dans un mélange iPrOH/THF à reflux pendant 48h, KOH dans le MeOH à reflux pendant 17h, ou encore KOH dans un mélange eau-dioxane à reflux pendant 17h.

L'**étape C** est un couplage peptidique avec la N,O-Diméthylhydroxylamine pour former l'amide de Weinreb **113**. Une diversité d'agent de couplage est employée selon les sources (Figure 49).

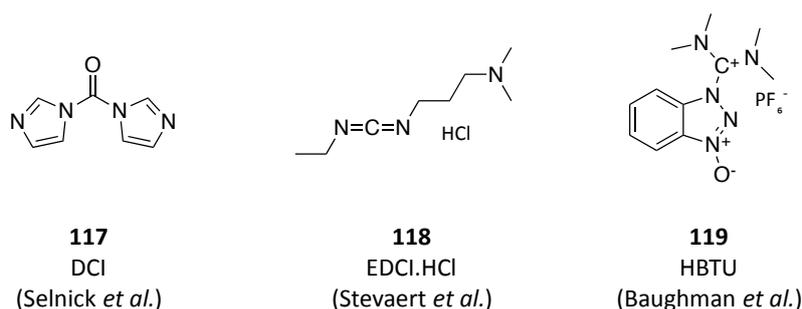


Figure 49. Agents de couplages **117**, **118**, et **119** utilisés pour la synthèse de l'amide de Weinreb **113**.

La DCI (ou carbodiimidazole) **117** est souvent employée lors de synthèse à large échelle. L'EDCI **118** est introduit sous forme de sel de carbodiimide, mais curieusement aucune base n'est ajoutée pour le déprotoner dans l'un des protocoles reportés. L'avantage de l'utilisation de l'EDCI est qu'il entraîne la formation d'un sous-produit urée soluble dans l'eau et donc facilement éliminé par extraction contrairement au dérivé urée, généré par l'utilisation de DCC. L'HBTU **119** a été également employé. Cet agent a prouvé son efficacité lors de couplages impliquant des réactifs encombrés stériquement.

L'**étape D** consiste à faire réagir le bromure de méthyle magnésium sur l'amide de Weinreb **113** pour obtenir sélectivement la méthyle cétone **114**. Il s'agit d'une réduction de Weinreb permettant de

¹²⁹ A. Stevaert, S. Nurra, N. Pala, M. Carcelli, D. Rogolino, C. Shepard, R. A. Domaaol, B. Kim, M. Alfonso-Prieto, S. A. E. Marras, M. Sechi and L. Naesens, *Mol. Pharmacol.*, **2015**, *87*, 323–337.

2. Synthèse chimique des DCAs

a. Les dicéto-acides : structure et propriétés

Les DCAs sont des composés dicarboxylés en position 2 et 4 comportant une fonction acide carboxylique en position 1. Les trois oxygènes portés par les deux fonctions cétones et la double liaison O de la fonction acide carboxylique sont coplanaires (Exemple du DPBA **58**, Figure 50).

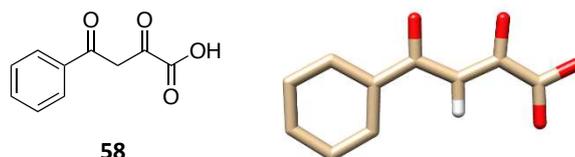


Figure 50. Gauche : Structure chimique 2D du DPBA **58**. Droite : représentation 3D du composé **58**.

> Formes tautomères

Les DCAs présentent plusieurs formes tautomères, c'est-à-dire des isomères de constitution interconvertibles par migration d'un atome d'hydrogène et d'une liaison π . En effet, les deux fonctions carbonyles donnent lieu à des équilibres céto-énoliques en solution. Le rapport entre tautomères est alors fonction du solvant, de la température et du pH. En solution aqueuse, Brecker *et. al*¹³¹ invoquent l'existence de trois principales structures : la forme dicéto, la forme énol, et un hydrate formé par addition/élimination en position 2 dans le cas de DCAs possédant une chaîne aliphatique (Schéma 4).

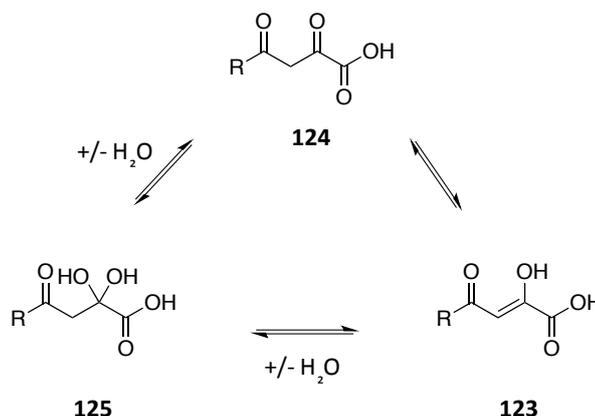


Schéma 4. Formes tautomères **123**, **124**, et **125** d'un DCA avec le groupement R étant une chaîne aliphatique.

Dans le cas de l'acide acétopyruvique **123** (avec R = Me), Il semblerait que la forme énol soit favorisée avec l'augmentation du pH et soit présente à 80% à pH 10.5.

¹³¹ L. Brecker, M. Pogorevc, H. Griengl, W. Steiner, T. Kappe and D. W. Ribbons, *New J. Chem.*, **1999**, **23**, 437–446.

Cette dernière forme hydrate n'est plus présente lorsque la position 4 est substituée par un groupement aromatique. En effet, une étude par RMN de la structure du composé **58** en solution aqueuse a montré que le spectre obtenu présente de larges signaux pour le proton en position 3, il en est de même pour les carbones en position 2, 3, et 4. Les déplacements chimiques observés, ainsi que la forme des signaux, ne sont pas compatibles avec une forme céto ou énol stable mais témoignent plutôt de la présence d'un système π délocalisé dû à l'interconversion rapide de deux possibles formes énols (Schéma 5).

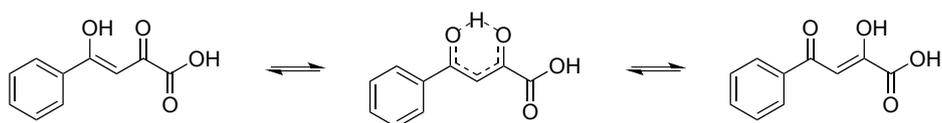


Schéma 5. Structure du composé **58** en solution aqueuse avec deux extrêmes formes énol qui s'inter-convertissent rapidement.

Dans un solvant organique aprotique comme le chloroforme, 98% de la forme énol est observée que la position 4 soit substituée par un groupement aliphatique ou aromatique. Les autres formes ne sont pas détectées car la forme énol est énergétiquement la plus favorable.

> Propriétés acido-basiques

En termes de propriétés acido-basiques, les DCAs existent sous différentes formes en fonction du pH. Ils présentent deux acidités. La première, caractérisée par le proton carboxylique (pK_{a1}), la deuxième par le proton de la fonction énol en position 2 (pK_{a2}) (Figure 51).

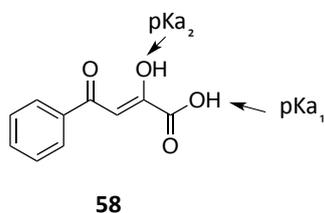
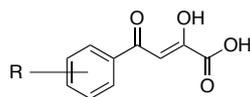


Figure 51. Localisation des protons acides du composé **58**.

Verbic *et al.*¹³² ont réalisé une étude par spectrophotométrie sur les équilibres acido-basiques de plusieurs phényle-DCAs qui a permis de déterminer les pK_{a1} et pK_{a2} . Les données sont rassemblées dans le Tableau 3.

¹³² T. Verbic, B. Drakulic, M. Zloh, J. Pecelj, G. Popovic and I. Juranic, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2007**, **72**, 1201–1216.



Entrée	R =	pK_{a1}	pK_{a2}
1	H-	2.06	7.56
2	4-Me-	2.22	7.99
3	4- <i>i</i> -Pr-	2.29	7.85
4	4- <i>t</i> -Bu-	2.21	7.72
5	3,4-di-Me-	2.06	7.92
6	4-F	2.06	7.50
7	4-Cl-	2.09	7.30
8	4-Br-	2.06	7.53
9	4-NO ₂	1.87	6.63
10	4-OH	2.29	7.73
11	4-MeO-	2.28	8.13

Tableau 3. Variation du pK_{a1} et pK_{a2} de différents phényle-DCA en fonction du substituant R.

L'acidité du proton carboxylique (pK_{a1}) varie de 1.87 à 2.29 en fonction du substituant R. Celle du proton de l'énol (pK_{a2}) varie de 6.63 à 8.13. Ces importantes variations indiquent clairement l'impact des effets électroniques du noyau phényle sur l'acidité du motif DCA.

Les groupements alkyle et alkoxy à effet donneur diminuent l'acidité du proton carboxylique (entrées 2 à 4, 10 et 11). Les halogènes à effet attracteur ne modifient pas l'acidité (Entrées 6 à 8) alors que le groupement nitro l'augmente (Entrée 9). Concernant le proton énolique, la même tendance est observée.

b. La condensation de Claisen, étape clé de la synthèse des DCAs

La première synthèse du composé **58**, le plus simple des phényle-DCA a été décrite par Bromme et Claisen en 1937¹³³. Il s'agit d'une réaction entre l'acétophénone **126** et l'oxalate de diéthyle **127** par action de l'éthanolate de sodium en tant qu'agent de condensation (Schéma 6).

¹³³ Bromme, L. Claisen, *Ber.*, **1937**, **21**, 1131-1146

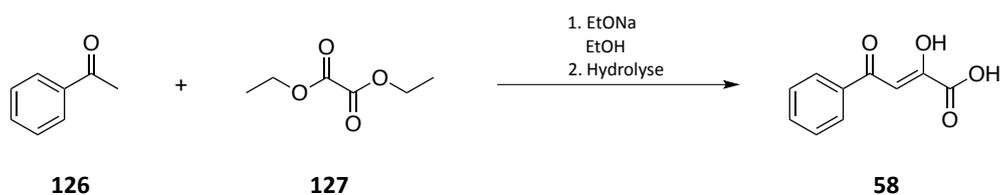


Schéma 6. Synthèse du composé **58** selon Bromme et Claisen¹³³.

Dans une première étape, la réaction de condensation de Claisen entre une méthyle cétone et un ester oxalique donne le dicéto-ester (DCE) correspondant. Puis, une hydrolyse en milieu acide ou basique conduit au DCA. A ce jour, c'est cette unique voie de synthèse qui est décrite dans la littérature avec différentes conditions opératoires.

Quelques essais envisageant une nouvelle voie de synthèse ont été reportés dans un manuscrit de thèse à travers l'utilisation de couplages de Stille ou de Sonogashira¹³⁴. En effet, l'auteur essaie de construire un synthon organostannique comportant la fonction DCE prête à être couplée à un halogénure d'aryle (Schéma 7).

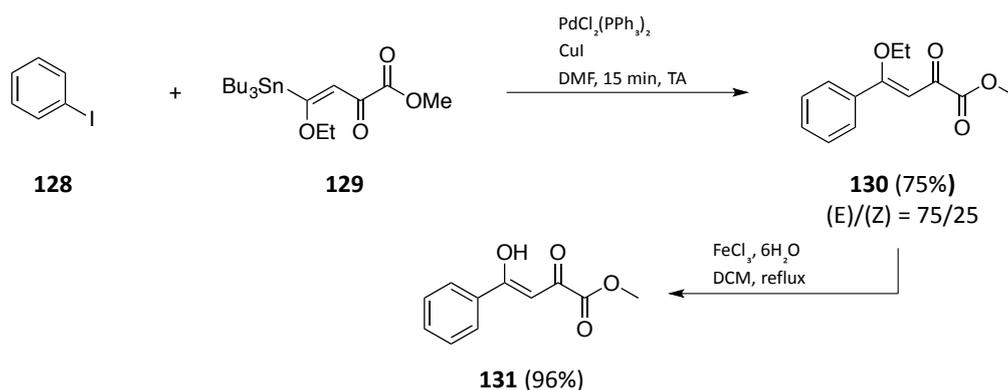
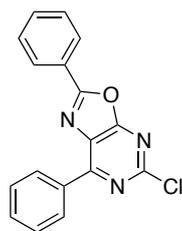


Schéma 7. Couplage de Stille entre l'iodobenzène **128** et le composé **129** conduisant après déprotection du composé **130** au DCE **131**.

Après avoir synthétisé le synthon **129**, ils réalisent un couplage de Stille avec l'iodobenzène modèle **128** permettant de former le composé **130** qui, une fois déprotégé en présence de chlorure de fer (III) donne le DCE **131**.

Toutefois, ce schéma appliqué à leur dérivé **132** (Figure 52) n'a pas fonctionné manquant sans doute de réactivité.

¹³⁴ U. Pradere. Synthèse métallo-catalysée d'analogues de nucléosides et d'oxazo[4,5-d]pyrimidines à visée thérapeutique [en ligne]. Chimie Organique. Université d'Orléans, 2009, 256 pages.

**132**Figure 52. Structure chimique du composé **132**.

Un autre type de couplage est ensuite envisagé, celui de Sonogashira entre leur substrat **132** et le triméthylsilylacétylène. L'idée est de déprotéger le groupe TMS et d'acyler l'alcyne avec le chlorure d'oxalate pour accéder au DCE et ensuite l'hydrolyser. Malheureusement, cette voie ne fonctionne pas et aucune formation de produit n'est observée.

Ces deux exemples figurent parmi le peu de tentatives effectuées pour identifier de nouvelles voies de synthèse du motif DCA. La condensation de Claisen est la seule méthode efficace à ce jour. Elle a lieu en présence d'une base forte afin de former l'énolate correspondant par déprotonation du carbone en α de la fonction carbonyle.

> Bases

Le choix de la base est primordial puisqu'elle ne doit pas avoir de caractère nucléophile et s'additionner sur le carbone électrophile de la fonction carbonyle. Historiquement, ce sont surtout les alcoolates qui ont été utilisés mais l'emploi de bases plus fortes telles que les amidures ou les hydrures a aussi été décrit.

Les alcoolates sont utilisés sous forme de sel ou en solution dans des solvants. Les plus utilisés sont MeONa^{135} et EtONa^{136} , mais de récents travaux reportent également l'utilisation d'alcoolates plus encombrés tels que t-BuONa^{137} , ou t-BuOLi^{138} . L'éthanolate et le méthanolate sont généralement préparés *in situ* par réaction du sodium solide $\text{Na}_{(s)}$ avec l'alcool correspondant, nécessitant des précautions de manipulation.

L'utilisation du t-BuOLi a aussi été décrite pour des méthyle cétones encombrées par Jiang *et al.* en 2013¹³⁸. Les DCEs sont dans le cas de ces travaux utilisés pour former des cycles pyrazoles.

¹³⁵ M. J. Drysdale, S. L. Hind, M. Jansen and J. F. Reinhard, *J. Med. Chem.*, **2000**, **43**, 123–127.

¹³⁶ R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, G. Miele, G. Cuzzucoli Crucitti, A. Iacovo, F. Rosi, A. Lavecchia, L. Marinelli, C. Di Giovanni, E. Novellino, L. Palmisano, M. Andreotti, R. Amici, C. Maria Galluzzo, L. Nencioni, A.T. Palamara, Y. Pommier, and C. Marchand, *J Med Chem*, **2008**, **51**, 4744–4750.

¹³⁷ S. Liu, L.-F. Zeng, L. Wu, X. Yu, T. Xue, A. M. Gunawan, Y.-Q. Long and Z.-Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, **130**, 17075–17084.

¹³⁸ J.-A. Jiang, W.-B. Huang, J.-J. Zhai, H.-W. Liu, Q. Cai, L.-X. Xu, W. Wang and Y.-F. Ji, *Tetrahedron*, **2013**, **69**, 627–635.

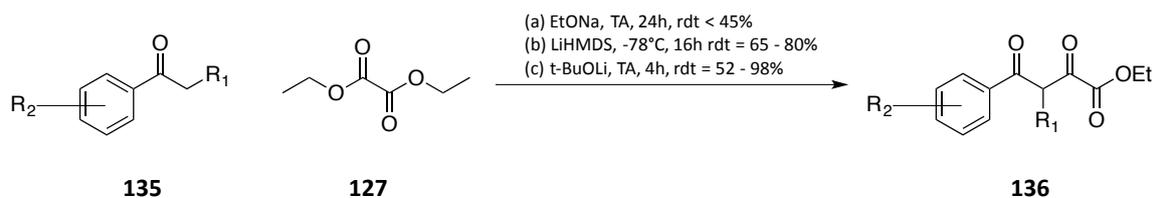


Schéma 8. Condensation de Claisen selon les travaux de Jiang et al. (a) et (b) : conditions classiques (c) conditions développées dans cette publication.

Si l'on compare l'emploi de leurs conditions classiques (a) ou (b) avec l'utilisation de t-BuOLi, une nette amélioration est observée (Schéma 8). Ces conditions permettent de réduire le temps de réaction, d'utiliser une base moins forte et d'augmenter les rendements. Contrairement au sodium et au potassium, le lithium possède une affinité plus grande pour l'atome d'oxygène^{139,140}. La formation d'un sel énoate de lithium intermédiaire stable formant un cycle à six carbones favorise la réaction.

L'emploi du LiHMDS a aussi été décrit¹⁴¹. Il est souvent utilisé en tant que base forte (pKa = 25) et permet aussi de générer des énoates de lithium. Il s'agit d'une base plus forte que les alcoolates mais plus faible que BuLi (pKa = 50) ou LDA (pKa = 36), ce qui permet de trouver un compromis entre ces deux types de base. Elle s'avère adaptée à la synthèse des DCEs puisqu'elle est oxophile par la présence du lithium.

Enfin, l'utilisation d'hydrure de sodium^{142,143} (pKa = 35) conduit également aux DCEs. Toutefois, il est souvent nécessaire de porter la réaction à reflux pour arriver à conversion totale. Cette base est insoluble dans les milieux organiques c'est pourquoi toutes les réactions dans lesquelles elle entre en jeu s'opère à la surface du solide. Elle a été très largement utilisée dans les réactions de condensation de type Dieckmann, Stobbe, et Darzen.

¹³⁹ A. B. Sannigrahi, T. Kar, B. G. Niyogi, P. Hobza and P. v. R. Schleyer, *Chem. Rev.*, **1990**, *90*, 1061–1076.

¹⁴⁰ U. Olsher, R. M. Izatt, J. S. Bradshaw and N. K. Dalley, *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 137–164.

¹⁴¹ O. Sari, V. Roy, M. Métifiot, C. Marchand, Y. Pommier, S. Bourg, P. Bonnet, R. F. Schinazi and L. A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *104*, 127–138.

¹⁴² G. C. G. Pais, X. Zhang, C. Marchand, N. Neamati, K. Cowansage, E. S. Svarovskaia, V. K. Pathak, Y. Tang, M. Nicklaus, Y. Pommier and T. R. Burke, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3184–3194.

¹⁴³ A. K. Sharma, U. H. Sk, M. A. Gimbor, J. A. Hengst, X. Wang, J. Yun and S. Amin, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 4149–4156.

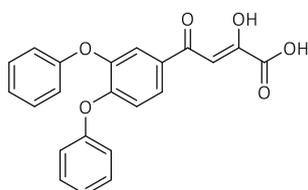
II. Origine des composés cibles et résultats préliminaires

A ce jour, aucune molécule inhibitrice d'endonucléase d'Arenavirus n'a été reportée. Dans le cas de l'exonucléase, certaines molécules ont été reportées mais ne sont que des preuves de concept¹⁴⁴. Le début de ce projet de thèse s'est focalisé sur la détermination des relations structure-activité des DCAs de 1^{ère} génération. La synthèse de certains DCAs de 1^{ère} génération a été réalisée et a également servi à optimiser la voie de synthèse du motif DCA (voir [Partie 1, III](#)). Aussi, afin de bâtir une chimiothèque de DCAs de 2^{nde} génération, nous avons exploité d'une part les structures cristallographiques des enzymes cibles en complexe avec les ligands de 1^{ère} génération et nous avons d'autre part exploité les données SAR obtenues.

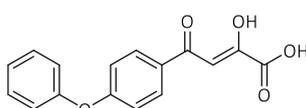
1. Endonucléase du LCMV : relations structure-activité déterminées pour la 1^{ère} génération de DCAs

a. Evaluation des DCAs par thermophorèse à micro-échelle (MST)

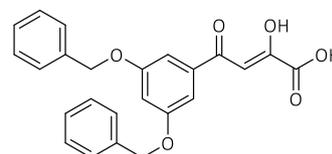
L'affinité des DCAs issus de ce premier criblage a été déterminée par thermophorèse. Le principe de cette technique repose sur le mouvement de molécules sous l'influence d'un gradient de température⁷⁹. Toute molécule placée dans un gradient de température va se déplacer préférentiellement dans une zone donnée, avec une certaine mobilité en fonction de sa taille, sa masse, sa charge, sa surface d'hydratation et de son environnement (voir [Chapitre 3, I.2-a](#)). La protéine marquée par un fluorophore est incubée avec une quantité croissante de ligand et est ensuite soumise à un gradient de température. La modification de fluorescence induite par l'effet thermophorétique va permettre de déterminer l'affinité du ligand pour la cible. Ainsi, les K_d s 28 DCAs de 1^{ère} génération a été déterminée selon cette méthode. Le composé **58** (DPBA) le plus simple des phényle-DCAs possède un K_d de 5.38 μ M. Dans l'ensemble, les DCAs testés possèdent un K_d autour de 1 μ M mais l'affinité semble être améliorée lorsque les substituants sur le groupement phényle voient leur taille et leur hydrophobicité augmenter.



76
 $K_d = 0.39 \mu\text{M}$



77
 $K_d = 0.39 \mu\text{M}$



53
 $K_d = 0.32 \mu\text{M}$

¹⁴⁴ K.-W. Huang, K.-C. Hsu, L.-Y. Chu, J.-M. Yang, H. S. Yuan and Y.-Y. Hsiao, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 8019–8029.

Figure 53. Structures chimiques des ligands **76**, **77**, et **53** et affinités de l'endonucléase du LCMV pour ces ligands déterminées par MST.

En effet, les composés **76**, **77** et **53** présentent des K_d autour de $0.30 \mu\text{M}$ (Figure 53). Les composés **80**, **82** et **83** possédant des groupements anthracène, phénanthrène, et bi-phényle ont des K_d de 0.35 , 0.25 , et $0.05 \mu\text{M}$ qui sont 10 à 100 fois meilleurs que celui du composé **58** (Figure 54).

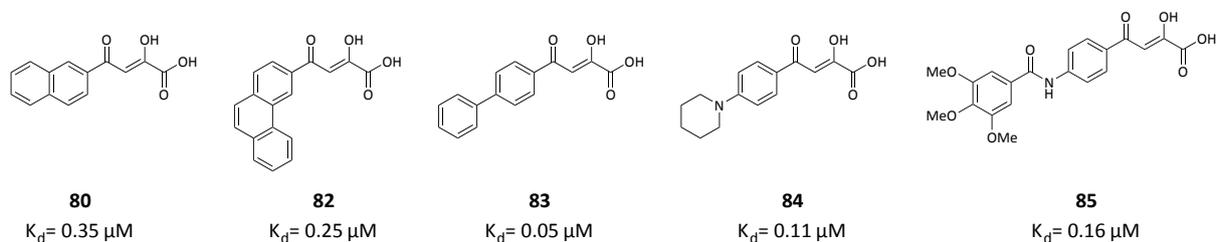


Figure 54. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les ligands **80**, **82**, **83**, **84**, et **85**.

L'aromaticité et l'électronégativité de la substitution du phényle du squelette DCA semblent diriger l'efficacité de liaison. Des ligands plus volumineux ont été également testés, notamment le composé **85** possédant un K_d de $0.16 \mu\text{M}$, 30 fois plus petit que celui du composé **58**. La position du substituant en ortho, méta ou para a montré l'importance de l'orientation dans l'agencement de la molécule au sein du site actif, le composé méta réduisant l'affinité du squelette ($K_d > 250 \mu\text{M}$). Enfin, le composé **35** possède un K_d de $0.51 \mu\text{M}$.

La conclusion de ces travaux, est que l'introduction de substituants aromatiques de plus grande taille sur le motif phényle-DCA renforcerait l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour les ligands à travers la création de contacts hydrophobes.

b. Activité *in vitro* et efficacité en mini-génome

L'activité de 6 DCAs issus du criblage biophysique a été testée *in vitro*. Un ARN 5' radiomarqué a été incubé avec l'endonucléase et $50 \mu\text{M}$ de ligand. La dégradation de l'ARN a permis de quantifier l'inhibition des ligands (Figure 55).

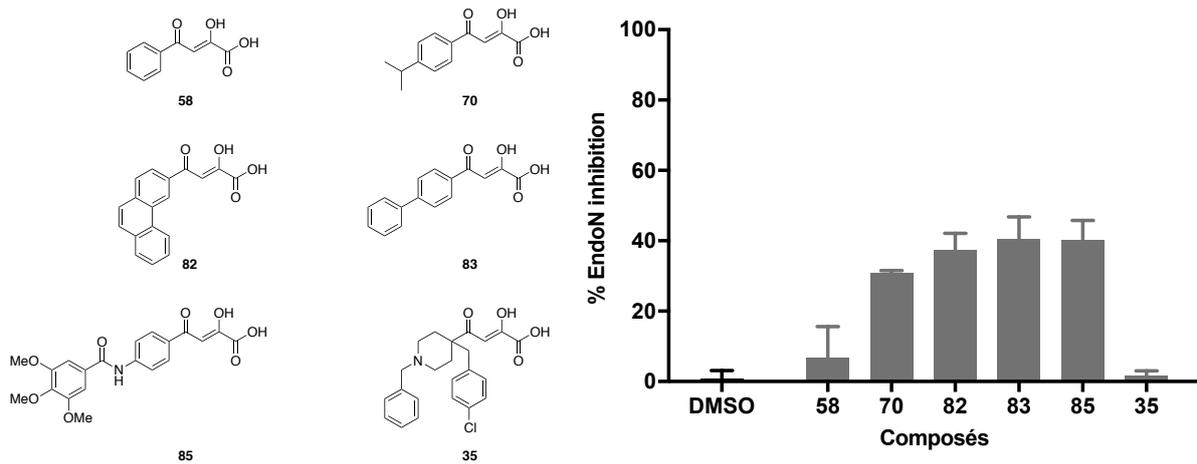


Figure 55. Quantification de l'inhibition de l'endonucléase du LCMV en présence des composés **58, 70, 82, 83, 85**, et **35**. Les composés (50 μM) ont été incubés avec 20 μM de protéine et 1 μM d'ARNsb. Après 6h de réaction les produits ont été analysés sur gels (20% polyacrylamide/8M urée). Les ARNs non dégradés ont été quantifiés par un Phosphorimager (Fuji).

Les composés **58** et **35** montrent une faible inhibition de l'endonucléase du LCMV à 50 μM tandis que les ligands **82** et **83** inhibent à hauteur de 40% cette activité. Cette inhibition est identique pour les composés **70** et **85** possédant des groupements isopropyle et benzamide phényle.

L'efficacité de 13 DCAs a été évaluée en mini-génome. Le composé **35** présente une forte toxicité cellulaire. Le composé **70** possède une toxicité modérée autour de 85% de viabilité cellulaire, et montrent une légère inhibition de l'expression du mini-génome. Le composé **85** présente un effet modéré. Certains composés ont été ensuite sélectionnés afin de déterminer leur effet sur la croissance du LCMV. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec un MOI de 0.01 par le virus et incubé avec les ligands.

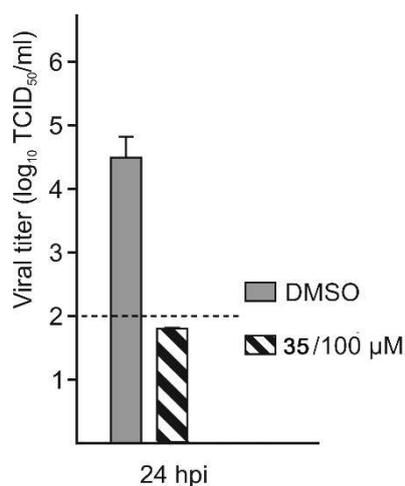


Figure 56. Inhibition de l'expression du mini-génome en présence du composé **35**. Des cellules BHK-21 ont été infectées par le LCMV avec un MOI de 0.01 et mis en présence du ligand à 100 μM.

Trois jours après l'infection, le titre viral a été déterminé après collection des surnageants. Sur les 4 DCAs testés, un seul a montré un effet inhibiteur. Le composé **35**, bien que toxique à J+3, inhibe de manière prononcée l'expression du mini-génome à J+1 (Figure 56). Le titre viral en présence de 100 μ M de composé **35** est réduit de 3 logs. Ce résultat semble prometteur et ouvre la voie à l'optimisation de ce composé afin d'identifier où se situe la toxicité et de s'en affranchir.

2. Exploitation des structures cristallographiques

a. Structure des composés **58** et **35** en complexe avec l'endonucléase du LCMV

Les deux complexes de l'endonucléase du LCMV avec les ligands **58** et **35** ont été analysés. La structure 3D du complexe avec le composé **58** met en évidence un ancrage exclusivement basé sur la chélation des ions métalliques par le motif DCA (Figure 57, Image A). En effet, un premier ion Mg^{2+} est coordonné par le groupement carboxyle de la partie DCA. Le second Mg^{2+} est coordonné par l'énol et le groupement carboxyle. La cétone γ pointe en direction opposée de 180° et forme des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau médiant l'interaction avec les acides aminés SER46 et GLU50. La structure ne montre pas d'interaction entre les acides aminés du site actif et le cycle phényle.

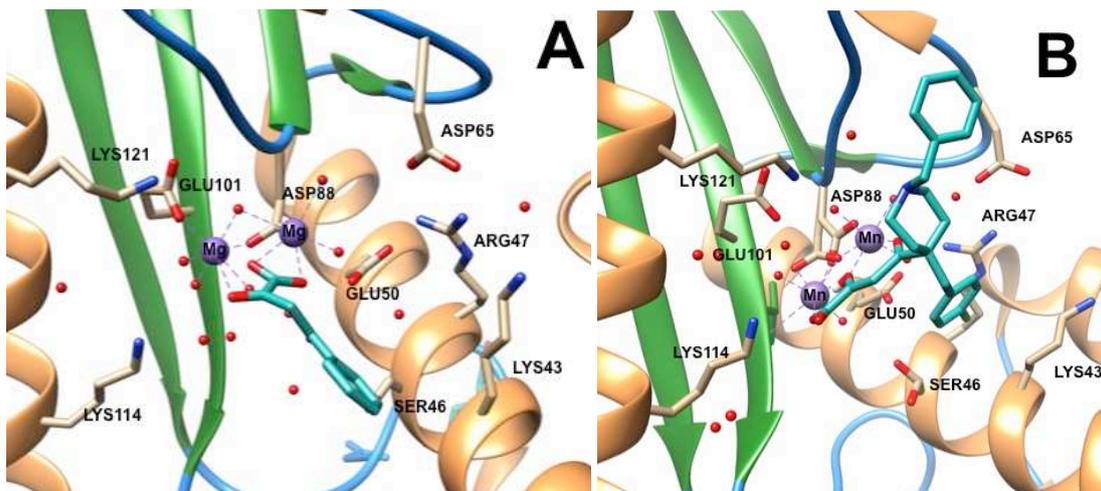


Figure 57. (A) Endonucléase du LCMV en complexe avec le Composé **58** (PDB Code: 5LTN). (B) Endonucléase du LCMV en complexe avec le Composé **35** (PDB Code : 5T2T)

Concernant le composé **35**, la partie DCA chélate les deux ions Mn^{2+} du site actif. Un premier ion est coordonné à un oxygène carboxylique et à l'oxygène énolique tandis que le deuxième ion est coordonné entre l'oxygène énolique et la γ cétone (Figure 57, Image B). Cette partie chélatante constitue le premier point d'ancrage. Le noyau chlorobenzyle se trouve dans une cavité constituée des acides aminés SER46, ARG47 et LYS43. Le noyau benzyle est peu défini suggérant une grande flexibilité, toutefois, dans la structure il s'oriente vers les acides aminés formant une boucle (ILE86, ILE85, LE84) largement hydrophobe.

L'endonucléase du LCMV possède 5 régions conservées⁷⁸ (Figure 58). Les motifs 1 à 4 représentent les 4 positions qui peuvent être visées pour l'ancrage des ligands.

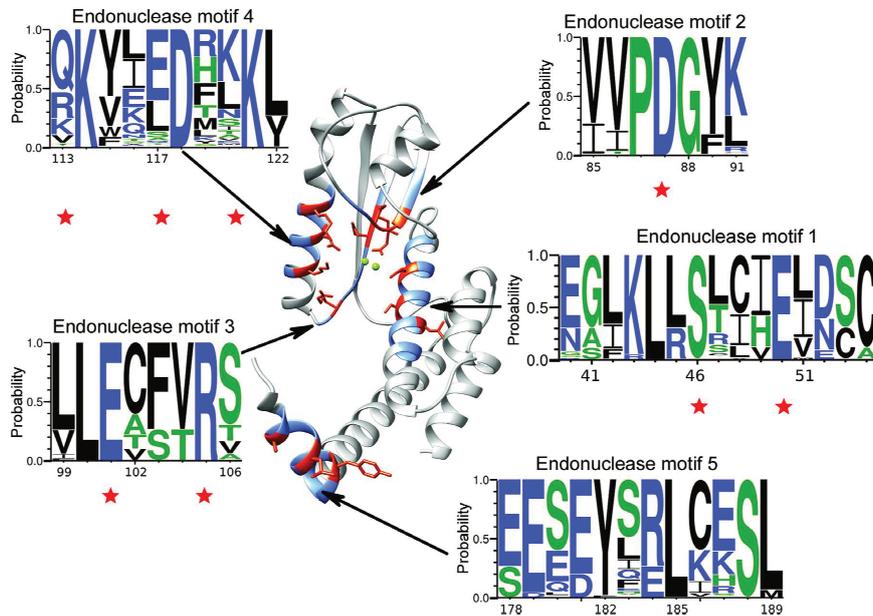


Figure 58. Superposition des 5 motifs (en bleu) conservés sur toutes les séquences d'endonucléases d'Arenavirus reportées dans la littérature sur la structure de l'endonucléase du LCMV. Les AA conservés sont représentés par Weblogo. La taille de la lettre représente la fréquence d'observation de ce résidu. Les résidus marqués d'une étoile sont impliqués dans le site actif ou dans la liaison au substrat. Leur chaîne latérale apparaît en rouge.

L'étude du site actif permet de dégager trois cavités (Figure 59).

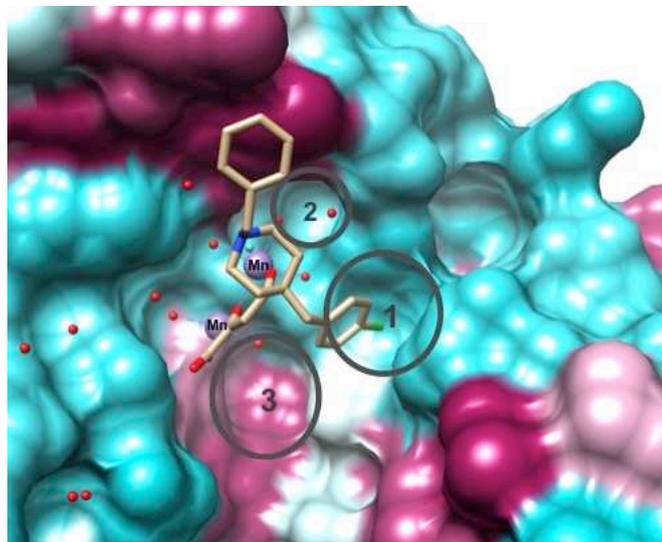


Figure 59. Structure 3D de l'endonucléase du LCMV en complexe avec le composé **35**. La surface représente les parties hydrophobes en rose et polaires en bleu. Les cavités formées sont représentées par des cercles gris.

- 1- La première poche est celle où le groupement p-chlorobenzyle se positionne. Elle est formée de la LYS43, hautement conservée et exposée, l'ARG47 (peu conservée) et la SER46, hautement conservée mais plutôt enfouie dans le site actif. Le chlore se situe plus proche de la SER46 et

l'ARG47 à une distance moyenne de 3.7 angströms, suggérant qu'il reste de l'espace dans cette poche.

- 2- La deuxième poche se situe au-dessus de la précédente, et est formée de l'ARG47, l'HIS61 hautement conservée, l'ASP88 impliqué dans la chélation des ions, et l'ASP65 (peu conservé) et l'ILE86 (conservée et exposée).
- 3- La troisième poche est relativement grande et ouverte et formée de la SER46 conservée, la VAL104 conservée, la TYR146 conservée et hautement exposée, la CYS102 moyennement conservée et l'ILE49, conservée.

Le reste du site actif est plutôt une zone de relief dans laquelle on retrouve les lysines catalytiques LYS121 et LYS114 intéressantes à atteindre car elles joueraient un rôle de positionnement du substrat dans la réaction catalytique.

b. Exonucléase du MOPV : holoenzyme

A ce jour, aucune structure entre une exonucléase d'Arenavirus et un ligand n'a été reportée. Il convient donc d'étudier le site actif de l'exonucléase en complexe avec son ion catalytique. Celle de MOPV a été résolue au sein du laboratoire¹²⁸.

Cette enzyme, faisant partie de la famille des exonucléases DEDDh, comporte les acides aminés catalytiques ASP-GLU-ASP-ASP ainsi qu'une histidine proximale du site actif. Dans le cas de l'exonucléase du MOPV, il s'agit des résidus ASP467, ASP534, GLU392, ASP390 et HIS529. Le co-facteur Mg^{2+} est coordonné par les acides aminés ASP534, ASP390 et GLU392 ainsi qu'une molécule d'eau (Figure 60).

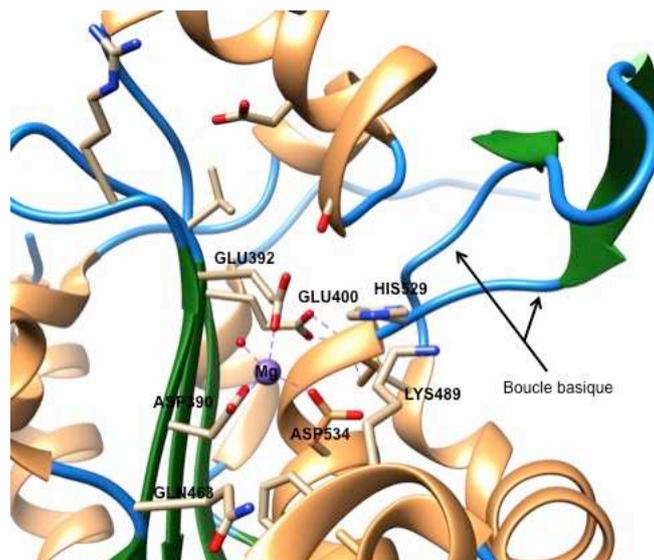


Figure 60. Site actif de l'exonucléase du MOPV.

Des expériences de mutations ont montré que le deuxième ion Mg^{2+} serait coordonné par l'ASP467. La protéine est très flexible car elle possède une série de boucles. Deux régions flexibles principales

existent : une boucle basique comprise entre les résidus 514 et 526 proche du site actif et la boucle correspondant au domaine C terminal (résidus 549 à 570). Le site actif est donc propice à se distordre, ce qui ne nous permet pas d'identifier des cavités bien définies.

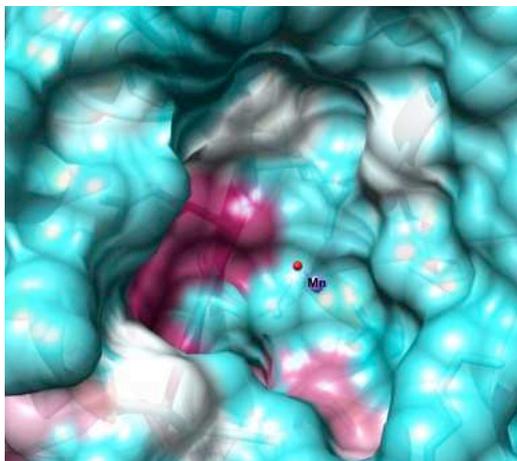


Figure 61. Structure 3D de l'exonucléase du LCMV en complexe avec un ion Mg^{2+} . La surface représente les parties hydrophobes en rose et polaires en bleu.

Par ailleurs, si l'on observe la structure en termes de surface, le site actif apparaît plus fermé que celui de l'endonucléase du LCMV et il est principalement polaire. Mais une zone hydrophobe se distingue et pourrait être intéressante pour l'ancrage des ligands (Figure 61). Elle est composée des acides aminés ILE389 (peu conservée), ILE391 (conservée), ILE468 (conservée), et PHE538 (conservée).

3. Design de nouveaux composés

Notre programme d'optimisation chimique pour la création d'une chimiothèque de DCAs de 2nde génération s'est concentré sur le composé **35**.

En effet, l'endonucléase du LCMV présente une bonne affinité pour ce composé ($K_d = 0.51 \mu M$). Il a également présenté une activité cellulaire contre des cellules infectées par le LCMV, bien que possédant une certaine cytotoxicité. Enfin, la structure 3D de ce composé avec l'endonucléase du LCMV montre deux points d'ancrage de la molécule dans le site actif (la chélation des ions et la cavité où s'insère le groupement p-chlorobenzyle), la troisième position pouvant être optimisée.

Le mécanisme commun d'hydrolyse d'un ARN entre l'endonucléase et l'exonucléase des Arenavirus nous a laissé entrevoir la possibilité de tester notre chimiothèque de 2nde génération sur les deux cibles. Toutefois, ce travail a été surtout rationalisé sur l'endonucléase du LCMV grâce au complexe enzyme-ligand obtenu avec le composé **35**, permettant de concevoir des DCAs de 2nde génération plus actifs et plus spécifiques.

Des modifications chimiques ont été entreprises afin de concevoir les DCAs de 2nde génération plus actifs et spécifiques. En chimie médicinale, les principales modifications chimiques que l'on peut entreprendre visant à augmenter l'affinité/activité sont : l'homologation, les transformations de cycles, les effets de substituants et des descripteurs. Ces modifications devraient permettre d'introduire de nouvelles interactions parmi lesquelles des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes, des liaisons ioniques, ou encore des interactions de type Van der Waals.

Concernant la chimiothèque de composés que nous souhaitons construire, la Figure 62 illustre le squelette du composé **35** avec les motifs qui seront conservés ou et ceux qui seront modifiés).

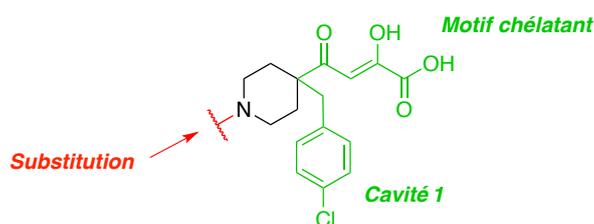


Figure 62. Modifications chimiques envisagées sur le squelette du composé **35**. Vert : parties conservées. Rouge : partie modifiée.

Le motif DCA constitue le premier point d'ancrage, il sera inchangé dans un premier temps. Sur la co-structure du composé **35** avec l'endonucléase du LCMV, il est visible que le groupement chlorobenzyle s'insère de manière définie dans la cavité 1, il sera lui aussi inchangé.

L'objectif ici est d'introduire de nouveaux groupements sur l'azote de la pipéridine. Un large panel de modifications chimiques a été choisi :

- 1- L'allongement de chaîne et/ou l'augmentation de l'hydrophobicité de la molécule. Cette modification sera étudiée afin de déterminer l'impact sur l'encombrement stérique, la flexibilité et la solubilité (Figure 63).

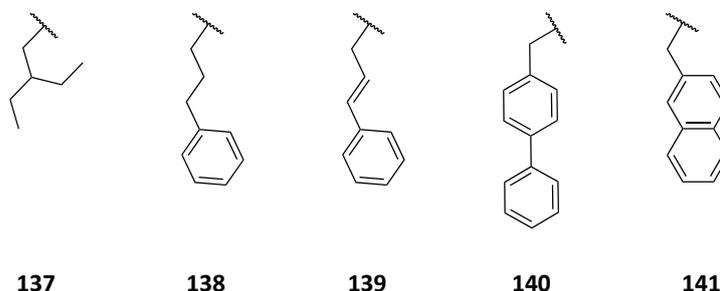


Figure 63. Structures partielles des composés **137** à **141**. Substitution de l'azote du motif pipéridinyle par des motifs 3-méthylpentyle, 1-phénylpropyle, 1-propén-1-ylbenzyle, 4-méthylbiphényle, et 2-méthylnaphtalène.

- 2- Le remplacement de la chaîne alkyle par une liaison amide (composés N-acylés). Cette modification a pour objectif d'introduire une nouvelle interaction grâce à la liaison carbonyle, potentiellement réceptive à une interaction ion-dipôle avec une lysine catalytique. L'influence de substituants

hydrophobes (t-Bu), polaires donneurs (OMe), ou attracteurs (F), par rapport au simple cycle phényle sera aussi étudiée (Figure 64).

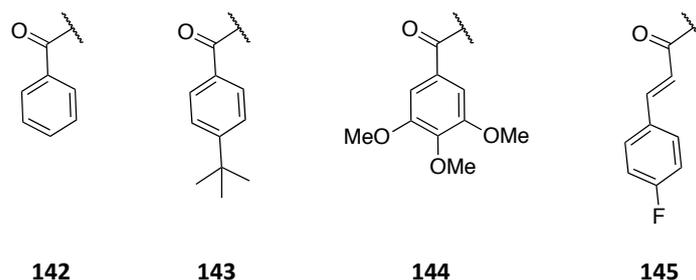
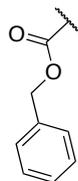


Figure 64. Structures partielles des composés **142** à **145**. Création d'une liaison amide sur le motif pipéridinyle avec variation des groupements : Benzoyl, 4-(2-Méthyl-2-propanyl)benzoyl, 3,4,5-triméthoxybenzoyl, 3-(4-fluorophényl)cinnamoyle.

- 3- Le remplacement de la chaîne alkyle par une liaison carbamate (Figure 65). Les carbamates sont des motifs clés présents dans de nombreux médicaments commercialisés (Ritonavir, Irinotecan...)¹⁴⁵. Ils constituent une alternative à la liaison amide de par leur grande stabilité chimique et leur capacité à mieux traverser les membranes cellulaires.



146

Figure 65. Structure partielle du composé **146**. Création d'une liaison carbamate de benzyle sur le motif pipéridinyle.

L'utilisation de ce motif permettra éventuellement la création de liaisons hydrogènes à travers le groupe carbonyle.

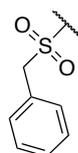
- 4- Le remplacement de la chaîne alkyle par un lien sulfonamide (-SO₂NH-) (Figure 66). Ce lien est souvent utilisé en chimie médicinale (antibactérien¹⁴⁶, diurétique¹⁴⁷, hypoglycémique¹⁴⁸...) pour augmenter la solubilité aqueuse du composé.

¹⁴⁵ A. K. Ghosh and M. Brindisi, *J. Med. Chem.*, **2015**, **58**, 2895–2940.

¹⁴⁶ J. Drews, *Science*, **2000**, **287**, 1960–1964.

¹⁴⁷ C. T. Supuran, A. Scozzafava and A. Casini, *Med. Res. Rev.*, **2003**, **23**, 146–189.

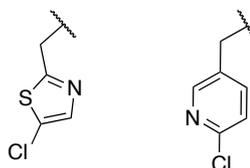
¹⁴⁸ A. E. Boyd, *Diabetes*, **1988**, **37**, 847–850.



147

Figure 66. Structure partielle du composé **147**. Substitution de l'azote du motif pipéridinyle par un motif benzylsulfonamide.

- 5- Le changement du cycle aromatique. Cette modification a pour but d'introduire des hétéroatomes permettant de conserver l'aromaticité tout en ayant un impact positif sur la solubilité des composés ou de créer de nouvelles interactions autres que des interactions π - π . Un groupement thiazole et une pyridine substituée également ont été envisagés afin d'étudier l'influence électronique du cycle aromatique, et éventuellement de créer des interactions dipôle-dipôle (Figure 67).

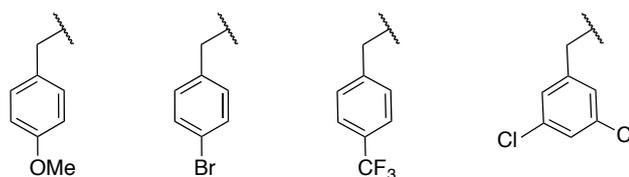


148

149

Figure 67. Structure partielle des composés **148** et **149**. Substitution de l'azote du motif pipéridinyle par les motifs 5-chloro-2-méthylthiazole ou 2-chloro-5-méthylpyridine.

- 6- Introduction de groupements à effets inductifs attracteurs (halogènes) et donneurs (-OMe). (Figure 68). Ces modifications permettront d'étudier l'influence d'effets électroniques sur le motif benzyle.



150

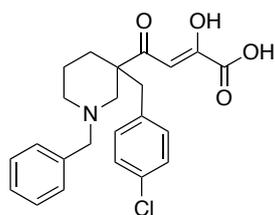
151

152

153

Figure 68. Structure partielle des composés **150** à **153**. Substitution de l'azote du motif pipéridinyle par les motifs 1-méthyl-4-méthoxybenzyle, 1-bromo-4-éthylbenzyle, 1-méthyl-4-(trifluorométhyl)benzyle et 1,3-dichloro-2-éthylbenzyle.

- 7- La position de l'azote sur le cycle pipéridine. En effet, l'analogue du composé **35**, où l'azote est positionné en méta sur le cycle pipéridine sera synthétisé afin d'étudier la modification de l'orientation du « bras benzyle » (Figure 69). La conception de ce composé introduit une chiralité dans le squelette. C'est le mélange racémique qui sera produit.



62

Figure 69. Structure chimique du composé 62. Positionnement de l'azote de la pipéridine en position méta.

III. Résultats : optimisation de la voie de synthèse des DCAs à partir de synthons modèles de type phényle-DCA

Nous avons choisi d'optimiser les étapes de synthèse du motif DCA sur des composés accessibles commercialement ou nécessitant peu d'étapes de synthèse. Cette partie se concentre donc sur l'optimisation des conditions de la réaction de Claisen et de l'hydrolyse du DCE pour obtenir les DCAs suivants :

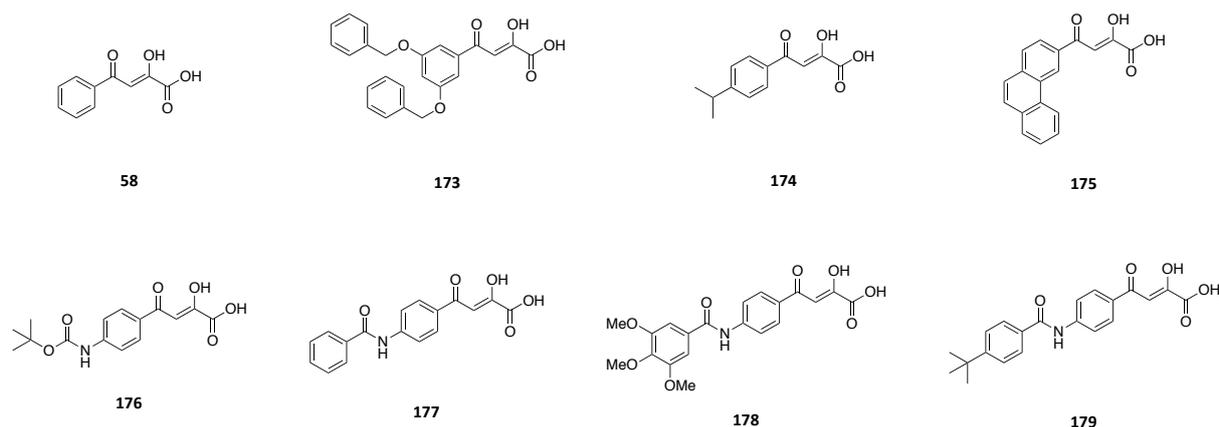


Figure 70. Structures chimiques des composés 58, et 173 à 179.

1. Obtention des synthons méthyle cétones 158 à 161

Pour rappel, la condensation de Claisen nécessite l'emploi de la méthyle cétone du motif à étudier. Si les méthyles cétones 126, 157, 162 et 163 sont commerciales, les méthyles cétones 156, 158 à 160 ont été synthétisées.

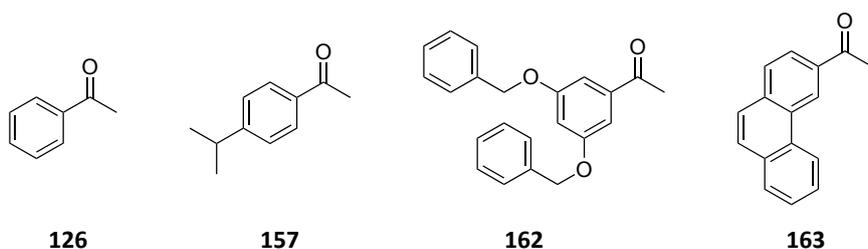


Figure 71. Structures chimiques des méthyles cétones 126, 157, 162 et 163.

La méthyle cétone **156** a été synthétisée par réaction entre la 4-aminoacétophénone et $(\text{Boc})_2\text{O}$ en présence de Et_3N à température ambiante pendant 24h (Schéma 9).

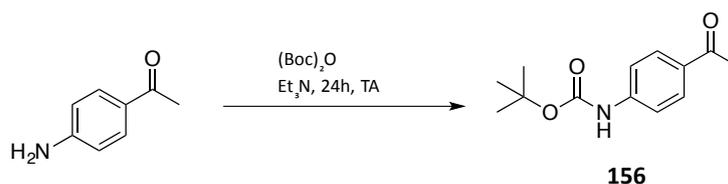


Schéma 9. Synthèse de la méthyle cétone **156** par réaction de la 4-aminoacétophénone avec $(\text{Boc})_2\text{O}$.

Le produit est obtenu quantitativement. Les méthyle cétones **158** à **160** ont été préparées par addition nucléophile de la 4-aminoacétophénone sur le chlorure d'acyle correspondant d'après la procédure adaptée de celle de Hwang *et al.*¹⁴⁹ (Schéma 10).

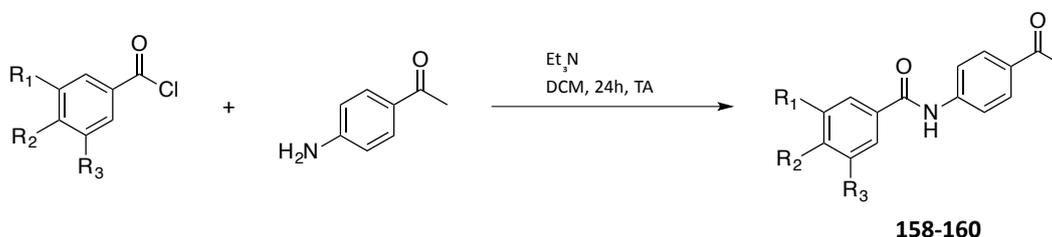


Schéma 10. Synthèse des méthyle cétones **158** ($R_1, R_2, R_3 = \text{H}$), **159** ($R_1, R_2, R_3 = \text{OMe}$) et **160** ($R_1, R_3 = \text{H}, R_2 = t\text{-Bu}$) par substitution nucléophile.

Les composés **158**, **159** et **160** sont obtenus respectivement avec 50%, 60%, et 95% de rendement.

2. Optimisation de la réaction de Claisen

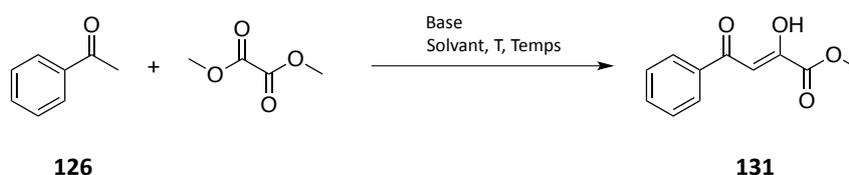
La synthèse des DCAs peut avoir lieu sans isolement du DCE correspondant, l'hydrolyse se faisant directement après la condensation de Claisen. Toutefois, au cours de ce projet nous souhaitons isoler les DCEs afin de les utiliser comme contrôles lors de nos évaluations, mais également de voir s'ils peuvent jouer le rôle de pro-drogues (voir [Chapitre 2, III.1](#)). Il a donc fallu trouver un moyen de les isoler et de les purifier.

Comme mentionné précédemment, les conditions les plus répandues pour réaliser la condensation de Claisen entre une méthyle cétone et un ester oxalique emploient des alcoolates générés *in situ* tels que le méthanolate de sodium. L'inconvénient réside dans la manipulation délicate de sodium solide, et les faibles rendements obtenus lorsque la condensation est réalisée avec des méthyle cétones encombrées.

¹⁴⁹ S. Hwang, S. Y. Choi, J. H. Lee, S. Kim, J. In, S. K. Ha, E. Lee, T.-Y. Kim, S. Y. Kim, S. Choi and S. Kim, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, **18**, 5602–5609.

a. Influence du contre-ion métallique de la base sur la condensation de Claisen

Pour obtenir de manière systématique les motifs DCEs, nous nous sommes intéressés aux alcoolates encombrés de type t-BuOM (où M est un métal). La réaction de condensation de Claisen a été réalisée en faisant varier le métal (Li, Na, K, Mg) pour étudier l'influence du cation sur la force de la base. Ces premiers essais ont été réalisés sur l'acétophénone **126**, précurseur du composé **58** avec utilisation de l'oxalate de diméthyle **161**. Le protocole utilisant Na, K et Mg a été adapté de la procédure de Liu *et al.*¹³⁷. Celui impliquant le lithium est directement repris de la procédure de Jiang *et al.*¹³⁸. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 4.



Entrée	Base	Eq. Base	Solvant	Température	Temps de suivi	Conversion ^a	Rendement ^b
1	t-BuONa	4	THF/DME (1 : 1)	TA puis Reflux	3 j	0%	-
2	t-BuOK	4	THF/DME (1 : 1)	TA	3 j	90%	Produits secondaires
3	t-BuOLi	1,3	THF	TA	4 h	100%	81%
4	(t-BuO) ₂ Mg	4	THF/DME (1 : 1)	TA puis Reflux	3 j	0%	-

^a Quantification par LCMS de la disparition de la méthyle cétone **126**.

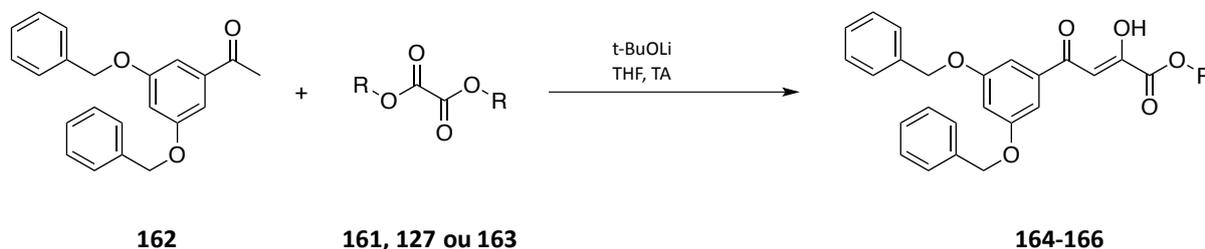
^b Rendements bruts obtenus après traitement de la réaction.

Tableau 4. Conditions opératoires, conversion, et rendements de synthèse du composé modèle **131**.

L'emploi de t-BuONa et (t-BuO)₂Mg ne conduit pas au composé **131** (Entrées 1 et 4). La méthyle cétone **126** reste intacte et ne réagit pas, même après trois jours de réaction. Lors de l'utilisation de t-BuOK, la méthyle cétone est lentement consommée (Entrée 2). Toutefois, l'analyse par CCM montre la formation de nombreuses taches de même intensité attestant de la formation de produits secondaires. Enfin, la réaction en présence de t-BuOLi a été testée selon les conditions de Jiang *et al.*¹³⁸. La conversion est totale au bout de 4h à température ambiante (Entrée 3). Un seul produit plus polaire se forme, correspondant au DCE qui est obtenu avec 80% de rendement. Le t-BuOLi est la seule base réagissant avec la méthyle cétone **126**. Ceci indique que le contre-ion joue un rôle sur la force de la base. Le lithium est le métal le plus dur parmi ceux utilisés. Lui et l'oxygène sont des atomes durs et ont donc plus d'affinité l'un pour l'autre. D'autre part, il possède le plus petit rayon ionique, et peut donc créer de fortes interactions¹³⁹. L'intermédiaire énoate de lithium formé lors de cette réaction est donc plus stable et la réaction est favorisée.

b. Influence de l'oxalate utilisé sur la condensation de Claisen.

Nous avons étudié l'impact du groupement R sur les différents types d'oxalates commercialisés. Dans le but de valider notre voie de synthèse, les essais ont été réalisés sur le composé **162** (3,5-dibenzoyloxyacétophénone, DBOAP).



DCE	Oxalate	Temps	Pureté
164	161 R= Me	30 min	+
165	127 R= Et	30 min	-
166	163 R= t-Bu	60 min	-

Tableau 5. Conditions opératoires, réactifs, temps de réaction et puretés obtenues pour la synthèse des composés **164** à **166**.

Quelque soit l'oxalate utilisé, la réaction a lieu. Elle est légèrement plus lente avec l'oxalate de di-tert-butyle **163**, ce qui se justifierait par son encombrement (Tableau 5). Sans purification ultérieure, il reste des traces d'oxalate dans le cas de l'oxalate de diéthyle **127** et de l'oxalate de di-tert-butyle **163**. La meilleure pureté est obtenue avec l'emploi de l'oxalate de diméthyle **161**.

Jiang *et al.*¹⁵⁰ suggèrent que l'utilisation des oxalates de diéthyle ou diméthyle présente des limitations dans la synthèse de certains phényle DCEs. Lorsque le phényle est substitué avec des groupements attracteurs ou donneurs les méthyles cétones sont plus réactives avec l'oxalate de tert-butyle méthyle et fournissent de meilleurs rendements.

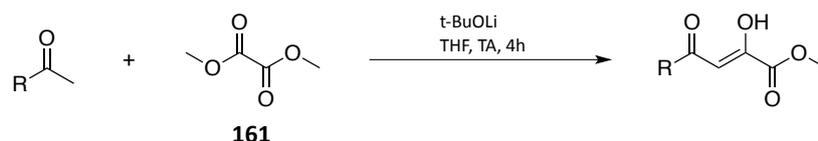
Toutefois, dans ces travaux, la base utilisée est le méthanolate de sodium. Il est suggéré mécanistiquement que le méthanolate de sodium réagit dans un premier temps avec l'oxalate de tert-butyle méthyle pour générer l'oxalate de diméthyle et l'anion tert-butanolate par trans-estérification. Dans un deuxième temps, ce serait le tert-butanolate qui réagirait en tant que base pour déprotoner la méthyle cétone (Schéma 11). Ceci expliquerait pourquoi quand t-BuOLi est utilisé, les résultats ne soient pas améliorés avec l'oxalate de di-tert-butyle puisque la base fournit déjà le groupement tert-butanolate.

¹⁵⁰ X.-H. Jiang, L.-D. Song and Y.-Q. Long, *J. Org. Chem.*, **2003**, **68**, 7555–7558.



Schéma 11. Proposition de mécanisme de trans-estérification lors de l'utilisation de l'oxalate de tert-butyle méthyle pour la synthèse de DCEs.

Nous avons choisi de conserver l'emploi de l'oxalate de diméthyle. Afin de valider nos conditions de réaction, la condensation de Claisen a été réalisée sur 8 méthyle cétones différentes (Tableau 6).



Produit	R	Rendement ^a
131		80%
164		46%
167		72%
168		60%
169		75%
170		52%
171		58%
172		48%

^a Rendements obtenus sans purification ultérieure.

Tableau 6. Rendements obtenus pour des condensations de Claisen réalisées sur les méthyle cétones **131**, **164**, **167** à **172**.

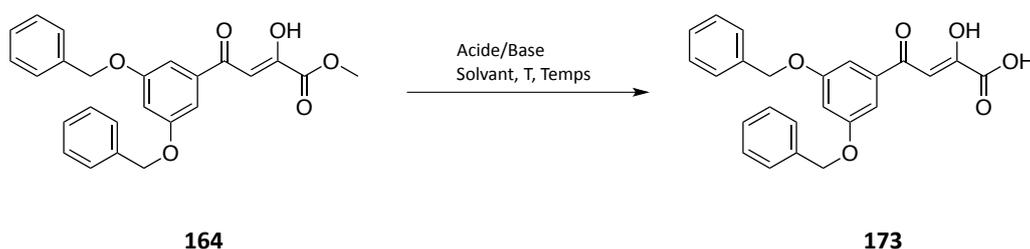
Les rendements obtenus varient en fonction de la méthyle cétone. En particulier, ils semblent diminuer avec l'augmentation de l'encombrement stérique sur la méthyle cétone. En effet, pour les composés

170 à **172** de type benzyle amide, les rendements sont de l'ordre de 50% alors que pour les composés **58** et **167** les rendements sont respectivement de 80% et 72%.

Les conditions optimisées de la réaction de Claisen donnent accès à une large gamme de DCEs dans des conditions douces, à température ambiante, et dans un temps court. Elles seront appliquées dans toute la suite de ce projet.

3. Optimisation de l'hydrolyse du DCE

L'hydrolyse du DCE peut avoir lieu en conditions basiques ou acides. Trois conditions ont été évaluées sur le DCE modèle **164** afin de valider les meilleures (Tableau 7).



Acide/Base	Température	Temps	Solvant	Rendement ^a
NaOH 1M	TA	30 min	THF/MeOH (1 :1)	70%
LiOH 1M	TA	30 min	THF/MeOH (1 :1)	68%
HCl 1M	Reflux	8 h	Dioxane	70%

^a Rendements obtenus sans purification ultérieure.

Tableau 7. Conditions opératoires utilisées et rendements obtenus pour l'hydrolyse du motif DCE **164**.

Les conditions acides requièrent 16 fois plus de temps que les conditions basiques pour atteindre la conversion totale¹⁵¹ du DCE **164** en DCE **173**. L'emploi de NaOH 1M dans un mélange (1:1) MeOH/THF¹⁵² sera donc adopté par la suite.

Lors du suivi de la réaction, la méthyle cétone **162** apparaît progressivement avec le temps. Un essai d'hydrolyse acide a été poussé jusqu'à 24h pour voir jusqu'à quel point la méthyle cétone **162** se formait. Après 24h de reflux, nous observons uniquement la méthyle cétone **162** avec disparition totale du DCA **173**. Le même effet se produit en milieu basique. Il s'agit d'une réaction de rétro-Claisen, favorisée par la présence de méthanol agissant comme nucléophile.

Il y a donc compétition entre la saponification du DCE en DCA et la réaction de rétro-claisen. (Schéma 12).

¹⁵¹ C. Maurin, F. Bailly and P. Cotelle, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6479–6486.

¹⁵² Y.-S. Xu, C.-C. Zeng, X.-M. Li, R.-G. Zhong and Y. Zeng, *Chin. J. Chem.*, **2006**, *24*, 1086–1094.

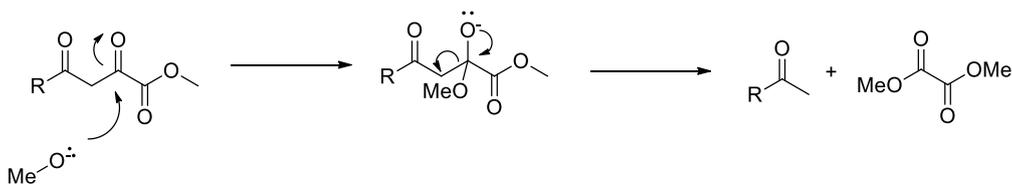


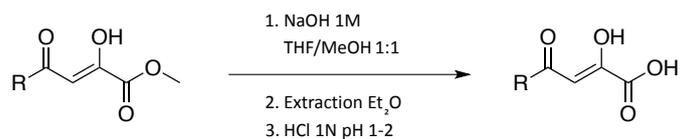
Schéma 12. Réaction de Rétro-Claisen dans le cas d'une hydrolyse basique en présence de MeOH.

Dans les conditions acides HCl 1M dans le dioxane, c'est l'eau qui joue le rôle de nucléophile. Il est impossible de totalement s'affranchir de cette réaction parasite, toutefois, il est possible de la limiter en réalisant l'hydrolyse sur un temps court.

Amélioration de la pureté du DCA

Le caractère polaire des DCAs ne permet pas de réaliser une purification sur colonne chromatographie de gel de silice en phase normale. La purification en phase inverse s'avère aussi contraignante, nous avons donc envisagé d'optimiser la pureté du DCA lors du traitement de la réaction.

Classiquement, le milieu réactionnel est acidifié par addition de HCl, pour fournir le DCA correspondant après extraction en phase organique, entraînant aussi les possibles traces de méthyle cétone formées lors de l'hydrolyse du DCE. Une alternative a été de procéder à une extraction à l'Et₂O avant l'acidification au HCl, pour éliminer la méthyle cétone. De cette manière, le DCA est obtenu avec une pureté supérieure à 95% déterminée par HPLC. Pour valider les conditions optimisées d'hydrolyse basique, 8 DCAs ont été synthétisés. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 8.



Produit	R	Rendement ^a
58		80%
173		70%
174		99%
175		90%
176		46%
177		95%
178		99%
179		20%

^a Rendements obtenus après purification par extraction à l'Et₂O.

Tableau 8. Rendements obtenus pour l'hydrolyse des différents DCEs en milieu basique.

Les rendements obtenus varient de 20% à 99% en fonction du DCE. Ces importantes variations sont dues à la réaction de rétro-claisen qui n'est pas contrôlée et qui se produit de manière inégale suivant le DCE. Même en réduisant le temps de réaction, il n'a pas été possible d'améliorer le rendement de synthèse du DCA **179**.

Après avoir optimisé la synthèse du motif DCA sur des composés modèles, la voie d'accès aux composés cibles analogues du composé **35** a été revisitée et optimisée. De plus, des essais de modification de la voie de synthèse en vue de réduire le nombre d'étapes ont été conduits.

IV. Résultats : synthèse des dérivés du composé 35

1. Voie classique

La synthèse totale de 9 étapes, évoquée en introduction de ce chapitre 2 (voir [Partie 1, I.1](#)), sera décrite en 3 sections : l'obtention de la méthyle cétone **115**, synthon clé à partir duquel sera introduite toute la diversité ; la synthèse des méthyle cétones substituées **116**, **182-191**, **193-199**, et **204** à partir desquelles seront obtenus les DCEs et l'hydrolyse des DCEs pour conduire aux DCAs finaux.

a. Synthèse de la méthyle cétone **115** : synthon clé pour introduire la diversité structurale

La première étape (**étape A**) consiste à protéger l'amine secondaire de la pipéridine par un groupement tert-butoxycarbonyle (Boc). Cette réaction a été réalisée par du $(\text{Boc})_2\text{O}$ en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 16h et conduit au composé **110** quantitativement¹⁵³ (Schéma 13).

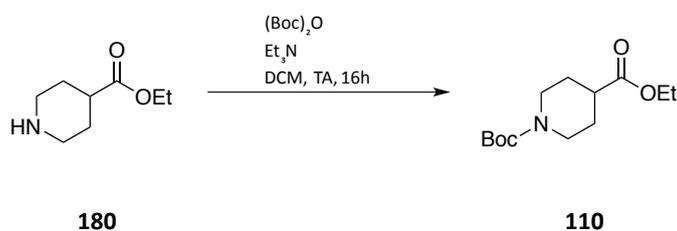


Schéma 13. Synthèse du composé **110** (Étape A).

Le groupement Boc est très stable et résiste à la plupart des nucléophiles et des bases. De plus, il est retiré aisément en conditions acides anhydres.

L'**étape B** consiste à introduire le bras chlorobenzyle en position 2 par C-alkylation ou substitution nucléophile. L'énolate du composé **110** est formé par action de LiHMDS à -78°C dans le THF. En effet, le proton en α de la fonction ester présente une acidité induite par le groupement ester attracteur. L'énolate généré réagit ensuite avec le 1-Chloro-4-(chlorométhyl)benzène à -78°C et la réaction est poursuivie pendant 4h à TA.

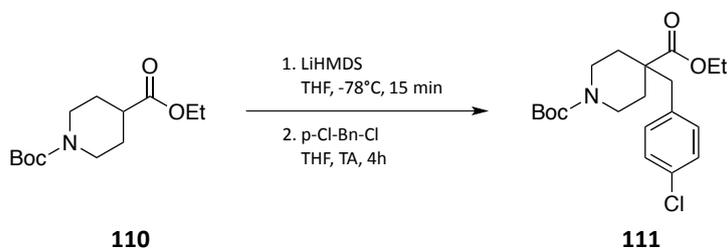


Schéma 14. Synthèse du composé **111** (Étape B).

¹⁵³ B. P. Reddy, V. M. Sharma, K. R. Reddy, M. P. Kumar, K. B. Reddy, M. Narsingam, M. Venkati, L. VL. Subrahmanyam, R. M. Reddy, **2015**, US2015/0119373A1.

La poursuite de la réaction à TA et non à $-78,5^{\circ}\text{C}$ comme décrit par Stevaert *et al.*, a permis d'augmenter le rendement de 40 à 70% et d'atteindre la conversion totale, ce qui n'était pas le cas lors de la reproduction des conditions opératoires de Stevaert *et al.*

L'**étape C** consiste à saponifier l'ester éthylique **111**. L'encombrement de l'ester rend cette hydrolyse plus difficile à réaliser et requiert des conditions basiques fortes : avec NaOH (10N) dans le THF/iPrOH à reflux pendant 48h¹²¹ ou KOH dans le MeOH à reflux pendant 17h¹²⁹. Pour améliorer cette étape, nous avons envisagé de chauffer le milieu réactionnel par activation aux micro-ondes. Cette technique permet de réduire drastiquement le temps de réaction, de limiter une exposition prolongée à des conditions susceptibles de dégrader le produit et d'augmenter ainsi le rendement.

La chimie assistée par micro-ondes est basée sur un phénomène de chauffage diélectrique¹⁵⁴. Un solvant ou réactif a la capacité d'absorber l'énergie micro-ondes et de la transformer en chaleur. Ce transfert est possible grâce à la polarisation dipolaire et les pertes par conduction. La température est immédiatement contrôlable par le réglage de l'intensité du champ électrique. Ainsi, une irradiation micro-ondes activera directement la plupart des molécules présentant un moment dipolaire ou les molécules ioniques. Une fois exposé à une fréquence micro-ondes, le moment dipolaire d'un échantillon s'aligne avec le champ électrique. A chaque fois que le champ électrique oscille, le moment dipolaire de l'échantillon se réaligne sur le champ, et ce phénomène induit une perte d'énergie sous forme de chaleur à travers l'échauffement moléculaire et la perte diélectrique. La quantité de chaleur générée lors de ce phénomène est directement reliée à la capacité du moment dipolaire de l'échantillon à s'aligner avec le champ électrique à une fréquence donnée.

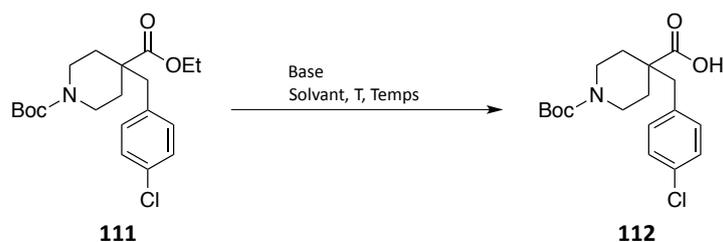
L'aptitude au chauffage micro-ondes d'un milieu est quantifiée par ses propriétés diélectriques. La capacité d'une substance à convertir l'énergie électromagnétique en chaleur, à une fréquence et température donnée, est déterminée par le facteur de perte $\tan \delta$ (avec $\tan \delta : \epsilon''/\epsilon'$, ϵ'' la perte diélectrique, indicative de l'efficacité avec laquelle l'énergie électromagnétique est convertie en chaleur. ϵ' est la constante diélectrique, décrivant la capacité d'une molécule à être polarisée par un champ électrique). Un milieu réactionnel avec une haute valeur de $\tan \delta$ est donc nécessaire pour une absorption efficace de l'énergie électromagnétique et en conséquence un chauffage rapide. En général, les solvants peuvent être classés comme : à potentiel fort ($\tan \delta > 0.5$), à potentiel moyen ($0.1 < \tan \delta < 0.5$) et à potentiel faible ($\tan \delta < 0.1$) d'absorption des micro-ondes (Tableau 9).

¹⁵⁴ C. O. Kappe and A. Stadler, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry: KAPPE:MICROWAVES O-BK*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2005.

Solvant	$\tan \delta$	Solvant	$\tan \delta$
Ethylène glycol	1.350	DMF	0.161
EtOH	0.941	1,2-dichloroéthane	0.127
DMSO	0.825	Water	0.123
iPrOH	0.799	Chlorobenzène	0.101
Acide formique	0.722	Chloroforme	0.091
MeOH	0.659	Acétonitrile	0.062
Nitrobenzène	0.589	Acétate d'éthyle	0.059
1-butanol	0.571	Acétone	0.054
2-butanol	0.447	THF	0.047
1,2-dichlorobenzène	0.280	DCM	0.042
NMP	0.275	Toluène	0.040
AcOH	0.174	Hexane	0.020

Tableau 9. Facteur de perte ($\tan \delta$) de différents solvants (2.45 GHz, 20°C) selon Kappe et al.

Avec une technique de chauffage conventionnel, la chaleur est conduite à la substance par l'intermédiaire des parois du réacteur puis du solvant, induisant un transfert d'énergie lent et peu efficace. Les micro-ondes atteignent directement les molécules du mélange réactionnel sans aucun intermédiaire, conduisant à une augmentation rapide de la température. Différentes conditions expérimentales faisant varier la base, le solvant, la température, l'activation sous micro-ondes ou non ont été testées et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 10.



Entrée	Base	Solvant	Température	Micro-ondes	Temps	Rendement ^a
1	KOH _(s)	MeOH	Reflux	Non	17 h	Transestérification
2	NaOH 10N	THF/iPrOH (1 : 1)	Reflux	Non	48 h	80%
3	NaOH 10N	THF/iPrOH (1 : 1)	100°C	Oui	12 h	65%
4	NaOH 10N	THF/iPrOH (1 : 1)	110°C	Oui	6 h	65%
5	NaOH 10N	THF/iPrOH (1 : 1)	120°C	Oui	4 h	85%

^a Rendements obtenus sans purification ultérieure au traitement de la réaction.

Tableau 10. Conditions opératoires, base, solvant, température, mode de chauffage, durée et rendement pour l'obtention du composé **112** (Etape C).

Les conditions utilisées par Stevaert *et al.* (Entrée 1) n'ont pas permis de conduire au composé **112** et c'est uniquement un produit de trans-estérification qui a été obtenu après 17h à reflux. Dans les conditions initiales du brevet (Entrée 2), le produit attendu est obtenu avec 80% de rendement après 48h à reflux. En utilisant la même base et le même mélange de solvants, l'activation aux micro-ondes à 100°C a permis de diminuer le temps de réaction de 48h à 12h mais le rendement est légèrement affecté. Par contre, une activation aux micro-ondes à 120°C (Entrée 5) permet de réduire le temps de réaction à 4h ainsi que de conserver le rendement à 85%.

L'étape D consiste à synthétiser l'amide de Weinreb **113**. Il s'agit d'un couplage peptidique entre l'acide carboxylique **112** et la diméthylhydroxylamine (Schéma 15).

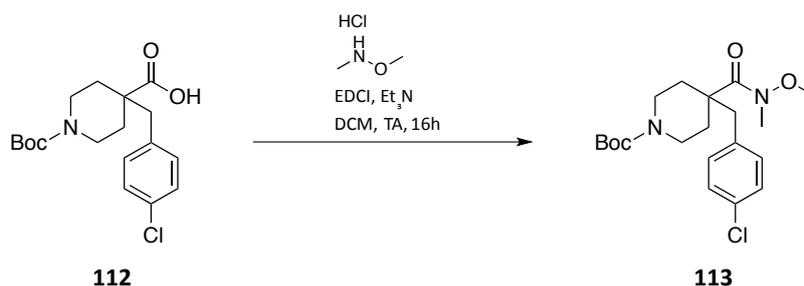


Schéma 15. Synthèse du composé **113** (Etape D).

Une activation de l'acide carboxylique est nécessaire et peut se faire grâce à l'EDCI, un carbodiimide¹⁵⁵. Présente sous forme de sel chlorhydrate, une base telle que la triéthylamine est nécessaire pour

¹⁵⁵ C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827–10852.

déprotonner l'agent de couplage. Le produit **113** est obtenu avec 60% de rendement. Pour rappel, l'intérêt de l'utilisation de l'EDCI par rapport à d'autres agents comme la DCC ou DCI est qu'il entraîne la formation d'un sous-produit urée soluble dans l'eau et donc facilement éliminé par extraction contrairement au dérivé urée, généré par l'utilisation de DCC ou DCI.

L'étape **E** consiste en l'introduction du motif méthyle cétone par réduction de l'amide de Weinreb. Elle est réalisée par réaction du bromure de méthylmagnésium avec l'amine de Weinreb dans le THF en chauffant.

La principale caractéristique de l'amide de Weinreb est que, après l'attaque nucléophile sur le carbonyle, l'intermédiaire tétraédrique est stabilisé sous la forme d'un chélate cyclique à cinq chaînons (Schéma 16). Lors du traitement, le nucléophile fort est désactivé, le métal est éliminé par lavage et l'intermédiaire tétraédrique peut se décomposer en cétone.

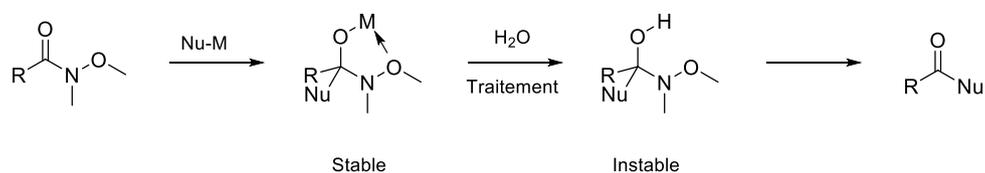


Schéma 16. Mécanisme d'une réduction de Weinreb.

A l'inverse, si la réaction est réalisée à partir d'un ester, l'intermédiaire formé est instable, il est rapidement hydrolysé pour conduire à la méthyle cétone qui est encore plus réactive que l'ester et s'ensuit alors une seconde attaque nucléophile pour conduire à un alcool tertiaire (Schéma 17).

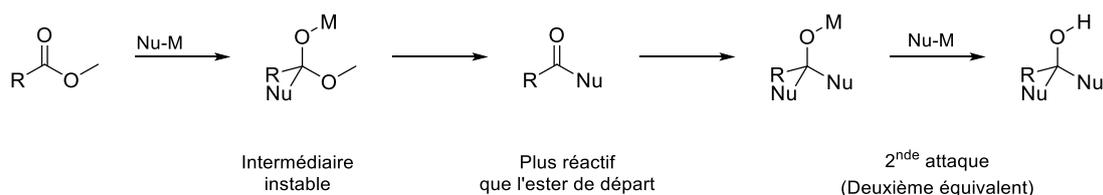
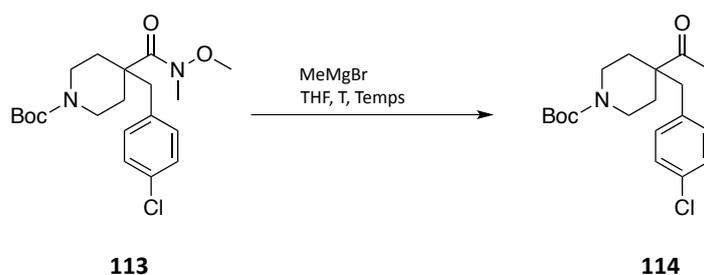


Schéma 17. Mécanisme de réduction d'un ester en cétone, puis alcool tertiaire.

Différentes températures et durées de réaction ont été testées et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 11.



Entrée	Température	Temps	Rendement ^a
1	66°C	1 h 30	40%
2	90°C	40 min	Dégradation
3	50°C	4 h	86%

^a Rendements obtenus après purification par colonne chromatographique sur gel de silice.

Tableau 11. Conditions opératoires, température, durée et rendement obtenus lors de la réduction du composé **113** par action de MeMgBr.

En voulant améliorer le rendement de 40% (Entrée 1) où la réaction est réalisée à 66°C pendant 1h30, la température de réaction a été augmentée jusqu'au reflux du THF (90°C, Entrée 2). Malheureusement, cette augmentation de température provoque la dégradation du substrat. Finalement, c'est en abaissant la température à 50°C qu'un rendement de 86% peut être obtenu avec un temps de réaction de 4h.

Le composé **114** est ensuite déprotégé par action d'un mélange équimolaire TFA/DCM (**étape F**) pendant 4h à TA pour conduire quantitativement au synthon clé **115** (Schéma 18).

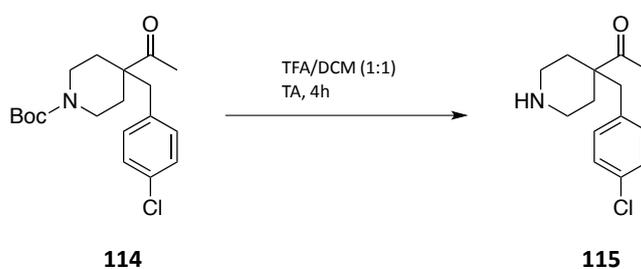
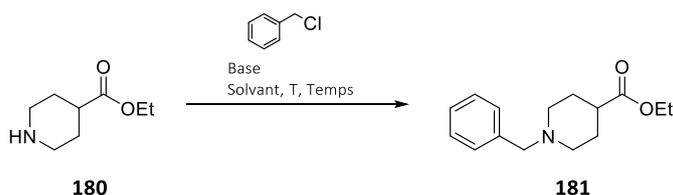


Schéma 18. Synthèse du composé **115** (Étape F).

b. Synthèse des méthyles cétones substituées **116**, **182-191**, **193-199**, et **204**

> N-alkylation de la pipéridine

L'**étape G** est une étape clé dans la synthèse puisqu'elle permet d'introduire la diversité chimique sur le squelette conduisant aux 12 composés rassemblés dans le *Tableau 13*. Un travail préliminaire de criblage de conditions opératoires a été réalisé sur le substrat modèle **180**. Différentes conditions expérimentales faisant varier la base, le solvant, la température avec activation sous micro-ondes ou non, la durée de réaction ont été testées et les résultats obtenus sont rassemblés dans le *Tableau 12*.



Entrée	Base	Solvant	Température	Durée	Rendement ^a
1	DIEA	MeCN	TA	4h	67%
2	DIEA	MeCN	70°C	20h	74%
3	DIEA	DMF	μW 100°C	40min	100%
4	NaOH ¹⁵⁶	H ₂ O	μW 100°C	30min	0%
5	K ₂ CO ₃	EtOH	RT	48h	100%
6	K ₂ CO ₃	EtOH	μW 80°C	40min	90%
7	K ₂ CO ₃	EtOH	μW 80°C	5min	80%

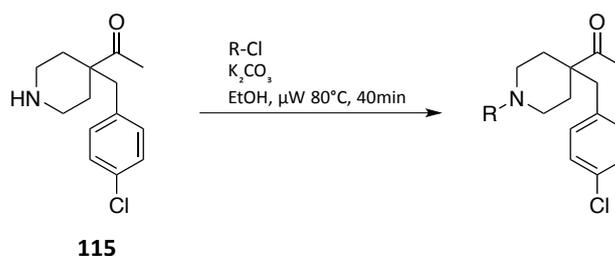
^a Rendements obtenus après purification par colonne chromatographique sur gel de silice.

Tableau 12. Conditions opératoires et rendements obtenus pour la synthèse du composé **181** (Etape G).

La réaction de substitution nucléophile conduisant au composé **181** nécessite une base dans le milieu. La DIEA dans le MeCN conduit au composé attendu avec des rendements de l'ordre de 70% (Entrées 1 à 2). Le chauffage traditionnel à 70°C n'améliore pas le rendement (Entrée 2). Toutefois, le changement de solvant pour le DMF (Entrée 3) associé à un chauffage sous irradiation micro-ondes à 100°C permet de réduire fortement la durée de réaction (de 6 à 30 fois) et d'augmenter le rendement de 30%. Dans les mêmes conditions de chauffage sous irradiation micro-ondes, le changement de base (Entrée 4) par le NaOH dans l'eau est totalement défavorable et ne permet pas d'obtenir le produit attendu. Par contre, l'utilisation de K₂CO₃ dans l'EtOH (Entrées 5, 6 et 7) permet d'augmenter le rendement entre 80 et 100% et de réduire (de 8 à 240 fois) la durée de réaction jusqu'à 5 minutes (Entrée 7) sous irradiation micro-ondes à 80°C.

Un compromis entre durée de réaction et augmentation du rendement a été choisi en optant pour les conditions de l'entrée 6 avec 40 min de réaction par activation micro-ondes à 80°C. Ces conditions ont ensuite été appliquées au composé **115** pour conduire aux composés substitués **116**, **182-191**, et **193** (Tableau 13) avec des rendements variant de 32% à 61%.

¹⁵⁶ Y. Ju and R. S. Varma, *Green Chem.*, **2004**, *6*, 219.



Composé	R	Rendement ^a
116		60%
182		53%
183		32%
184		44%
185		48%
186		61%
187		58%
188		61%
189		58%
190		48%
191^b		60%
193		44% ^c

^a Rendements obtenus après purification par colonne chromatographique sur gel de silice.

^b Composé méta.

^c le composé **193** a été obtenu selon différentes conditions opératoires décrites ci-après : DIEA, DCM, TA, 24h.

Tableau 13. Rendements obtenus pour la synthèse des synthons clés **182** à **193** par substitution nucléophile du composé **115**.

Lors de cette réaction de N-alkylation de la pipéridine, les rendements obtenus sont plus faibles que pour le motif modèle **180** mais cela est dû au substrat **115** plus encombré et qui présente une solubilité plus faible dans l'éthanol. Le K₂CO₃ a été préféré à la DIEA, plus coûteuse et toxique. De même, l'emploi de l'éthanol en tant que solvant est plus adapté pour l'activation au micro-ondes (meilleur facteur de perte tan δ). Les meilleurs rendements obtenus sont de l'ordre de 60% pour les composés **116**, **186-188**, **189** et **191** qui comportent tous des groupements attracteurs ou aucune substitution sur le cycle phényle. La substitution de l'azote par des groupements de type 1-phénylpropyle, 1-propén-1-

ylbenzyle, 4-méthylbiphényle, et 2-méthylnaphtalène (composés **182** à **185**) semble plus difficile, ainsi que la substitution avec un chlorophényle porteur d'un groupement donneur +M de type -OMe (composé **193**).

En effet, l'addition du 1-(Chlorométhyl)-4-méthoxybenzène sur l'amine **115** en présence $K_2CO_3/EtOH$ n'a pas conduit à la formation du composé attendu. Il faut réaliser la réaction en présence de DIEA dans le DCM à TA pendant 24h pour obtenir le composé **193**.

> Particularité du substituant 3-chlorométhylpentyle

L'introduction du motif 3-méthylpentyle selon la méthode $K_2CO_3/EtOH$ (Entrée 6, Tableau 12) n'a pas fonctionné. Le réactif de départ n'est pas ou peu consommé, et aucune trace du produit attendu n'est détectée par analyse LCMS. Le 3-(chlorométhyl)pentane porte un groupement alkyle donneur qui semble donc très défavorable à la réaction.

En 2010, Escudero *et al.*¹⁵⁷, ont publié l'alkylation d'imides aromatiques cycliques par l'utilisation de Cs_2CO_3 . Le carbonate de césium est utilisé avec succès pour des N-alkylation de sulfonamides¹⁵⁸, d'amines¹⁵⁹, d'indoles¹⁶⁰ et d'autres hétérocycles¹⁶¹. L'atome de césium étant mou, le carbonate de césium est relativement soluble dans les solvants organiques par rapport au K_2CO_3 . De plus, le Cs_2CO_3 est le plus basique des carbonates de métaux alcalins.

Les auteurs parviennent à alkyler des imides avec des halogénures d'alkyles. Avec le 4-chlorobutanoate d'éthyle **202**, une activation aux micro-ondes permet d'obtenir le composé **203** en 10 min avec 91% de rendement (Schéma 19).

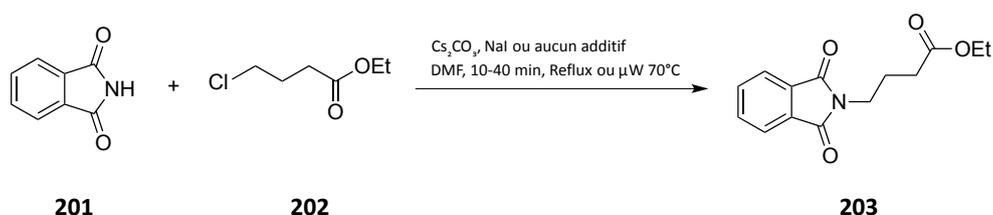


Schéma 19. Conditions opératoires de l'N-alkylation de l'imide **201** par le 4-chlorobutanoate d'éthyle **202** reportées par Escudero *et al.*¹⁵⁷

L'emploi d'additifs de type iodures inorganiques tels que CsI, KI, ou NaI a permis d'augmenter le rendement de 20%. Cette réaction pourrait être une alkylation de Finkelstein modifiée (car dans le DMF et non dans l'acétone) qui a lieu *in situ*. En effet, l'utilisation de NaI permettrait un échange d'anion entre le Cl^- et I^- et favoriserait la réaction puisque l'ion iodure est un meilleur groupe partant que l'ion

¹⁵⁷ M. I. Escudero, L. D. Kremenichukzy, I. A. Perillo, H. Cerecetto and M. M. Blanco, *Synthesis*, **2011**, 571–576

¹⁵⁸ W.R. Bowman, D.R. Coghlan, *Tetrahedron*, **1997**, **53**, 15787

¹⁵⁹ N.P. Link, J.E. Diaz, L.R. Orelli, *Synlett*, **2009**, 751.

¹⁶⁰ N. Yasmin, J.K. Ray, *Synlett*, **2008**, 751

¹⁶¹ Y.R. Jorapur, J.M. Jeong, D.Y. Chi, *Tetrahedron Lett*, **2006**, **47**, 2435.

chlorure. Ce type d'échange est un équilibre, qui à cause de la précipitation du sel insoluble (NaCl), accélère la réaction dans le sens de formation du produit.

Sur le même modèle, nous avons réalisé la réaction sur le composé **115** et le 3-(chlorométhyl)pentane **200** dans le DMF en présence de Cs_2CO_3 et de NaI (1 eq.) sous activation aux micro-ondes pendant 1h à 100°C (Schéma 20).

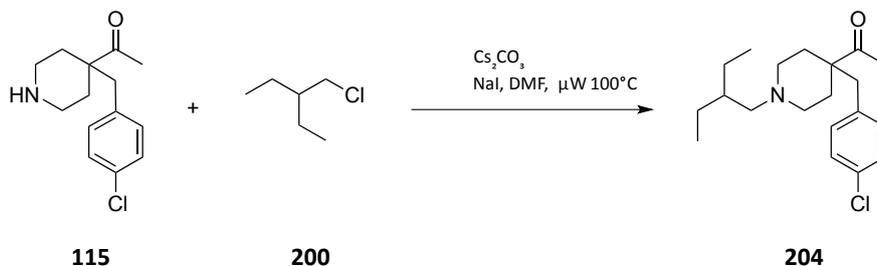
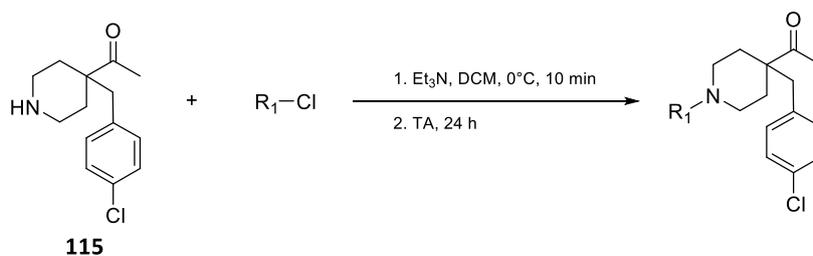


Schéma 20. Conditions opératoires utilisées pour la N-alkylation du composé **115** par le 3-(chloro)propane en présence de Cs_2CO_3 et de NaI.

Nous observons la formation du produit **204** en LCMS caractérisé par l'ion moléculaire $336.17 [\text{M}+\text{H}]^+$, qui est ensuite isolé avec 45% de rendement. Le changement de type de carbonate en combinaison avec l'utilisation de NaI a permis à la réaction de s'opérer.

> N-acylation, N-sulfonation et N-carbamation de la pipéridine

Les composés portant une liaison amide, carbamate ou sulfonamide ont été synthétisés par N-acylation, N-carbamation ou N-sulfonation. La réaction a lieu dans le DCM en présence de triéthylamine afin de neutraliser l'équivalent d'acide formé. L'addition du chlorure d'acyle, de sulfonyle ou de carbamoyle correspondant a lieu à 0°C car la réaction est exothermique. Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est laissé à TA pendant 24h. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 14.



Composé	R ₁	Rendement ^a	Composé	R ₁	Rendement ^a
194		50%	197		83%
195		71%	198		55%
196		55%	199		65%

^a Rendements obtenus après purification par colonne chromatographique sur gel de silice.

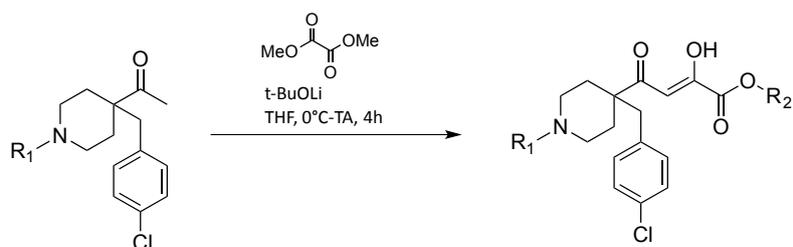
Tableau 14. Conditions opératoires et rendements obtenus pour la synthèse des composés **194** à **199** par N-acylation du composé **115**.

Pour la N-acylation, les rendements obtenus sont variables allant de 50% à 83% selon le groupement R₁. Le meilleur rendement est obtenu pour le composé **197**. Pour la N-sulfonation ou N-carbamation, les rendements sont sensiblement identiques, autour de 60%.

c. Condensation de Claisen sur les méthyle cétones 182-191, 193-199, et 204 : synthèse des DCEs

Les méthyles cétones **182-191**, **193-199**, et **204** comportant les différentes substitutions sur l'azote de la pipéridine ont ensuite été condensées avec l'oxalate de diméthyle ou l'oxalate de diéthyle à l'aide de t-BuOLi dans le THF selon les conditions optimisées dans la **Partie 1, III.2** de ce chapitre.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 15.



Composé	R ₁	R ₂	Rendement	Composé	R ₁	R ₂	Rendement
205		Me	86% ^a	215		Me	70% ^a
206		Me	29%	216		Me	56% ^a
207		Me	99% ^a	217		Me	67%
208		Et	53%	218		Et	80%
209		Me	54%	219		Me	41%
210		Me	46%	220		Me	65%
211		Et	50% ^a	221		Me	70%
212		Et	80%	222		Et	73%
213		Me	97% ^a	223 ^b		Me	81%
214		Me	51%				

^a Rendements obtenus après traitement de la réaction.

^b Composé méta.

Tableau 15. Conditions opératoires, structures et rendements obtenus pour la synthèse des composés **205 à 223** par condensation de Claisen.

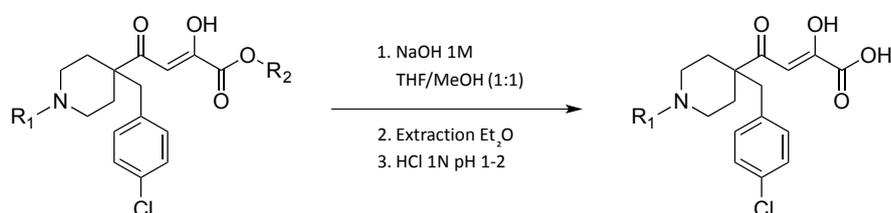
Les 19 DCEs synthétisés ont été obtenus avec des rendements compris entre 29 et 99%. Les rendements sont très variables et il n'existe pas d'explication évidente sur l'effet du substituant de l'azote de la pipéridine sur la modulation de l'acidité de la méthyle cétone ou encore sur un encombrement stérique possible qui serait responsable d'une réaction de Claisen défavorisée. A l'exception de quelques

composés (205, 207 ou 213) qui ont été obtenus avec d'excellents rendements, la plupart des composés sont obtenus avec des rendements de corrects à bons.

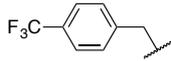
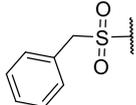
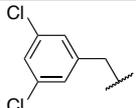
d. Hydrolyse des DCEs : synthèse des DCAs analogues du composé 35

Les DCEs synthétisés précédemment ont été hydrolysés selon les conditions développées dans la **Partie 1, III.3** de ce chapitre en présence de NaOH 1M dans un mélange THF/MeOH (1 :1) pendant 30 min à TA.

Après conversion, la phase aqueuse basique a été extraite à l'Et₂O pour retirer les traces de méthyle cétone issues de la réaction de rétro-claisen. Enfin, la phase aqueuse basique a été acidifiée à l'HCl 1N et extraite à l'AcOEt fournissant les DCAs finaux. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 16.



Composé	R ₁	Rendement ^a	Composé	R ₁	Rendement ^a
35		51%	148		33%
137		71%	149		56%
138		36%	62 ^c		6% ^b
139		95%	142		86%
140		76%	143		98%
141		45%	144		87%
150		62%	145		30% ^b
151		98%	146		75%

152		62%	147		80%
153		35%			

^a Rendements obtenus après purification par extraction à l'Et₂O (comme décrit dans la partie 1, III, 3).

^b Rendements obtenus après purification par HPLC en phase inverse.

^c Composé méta.

Tableau 16. Structures et rendements des composés **35**, **137-141**, **150-153**, **148** et **149**, **62**, et **142-147**.

Les 19 DCAs synthétisés ont été obtenus avec des rendements compris entre 6 et 98%. Les rendements sont très variables et ces importantes variations pourraient être dues à la réaction de rétro-claisen qui n'est pas contrôlée et qui se produit de manière inégale suivant le DCE. Comme indiquée dans la partie **Partie 1, III.3** de ce chapitre, il est possible de se débarrasser, la plupart du temps, de la méthyle cétone formée lors de la rétro-claisen en réalisant une extraction à Et₂O avant l'acidification et l'isolement du DCA. Toutefois, quand celle-ci se forme en quantité trop importante, il n'est plus possible de l'éliminer totalement par extraction et la présence de traces nécessite alors une purification par HPLC en phase inverse.

A l'exception de quelques composés (**139**, **142**, **144** et **151**) qui ont été obtenus avec d'excellents rendements, la plupart des composés sont obtenus avec des rendements de corrects à bons et certains sont obtenus avec de faibles rendements (composés **62** et **145**) quand il a été nécessaire de réaliser une purification par HPLC en phase inverse. Au total 18 DCAs analogues du composé **35** ont été synthétisés selon la voie de synthèse en 9 étapes. Toutefois, plusieurs essais pour une nouvelle voie d'accès à ces composés, plus rapide, ont été envisagées et font l'objet des parties suivantes.

2. Voie raccourcie

Dans le but de raccourcir la voie de synthèse des composés cibles, nous avons envisagé d'enlever les étapes de protection et déprotection par le groupement Boc en introduisant dès les premières étapes le substituant voulu sur l'azote de la pipéridine. Ceci raccourcit la synthèse à 7 étapes. La séquence de synthèse est illustrée sur le Schéma 21.

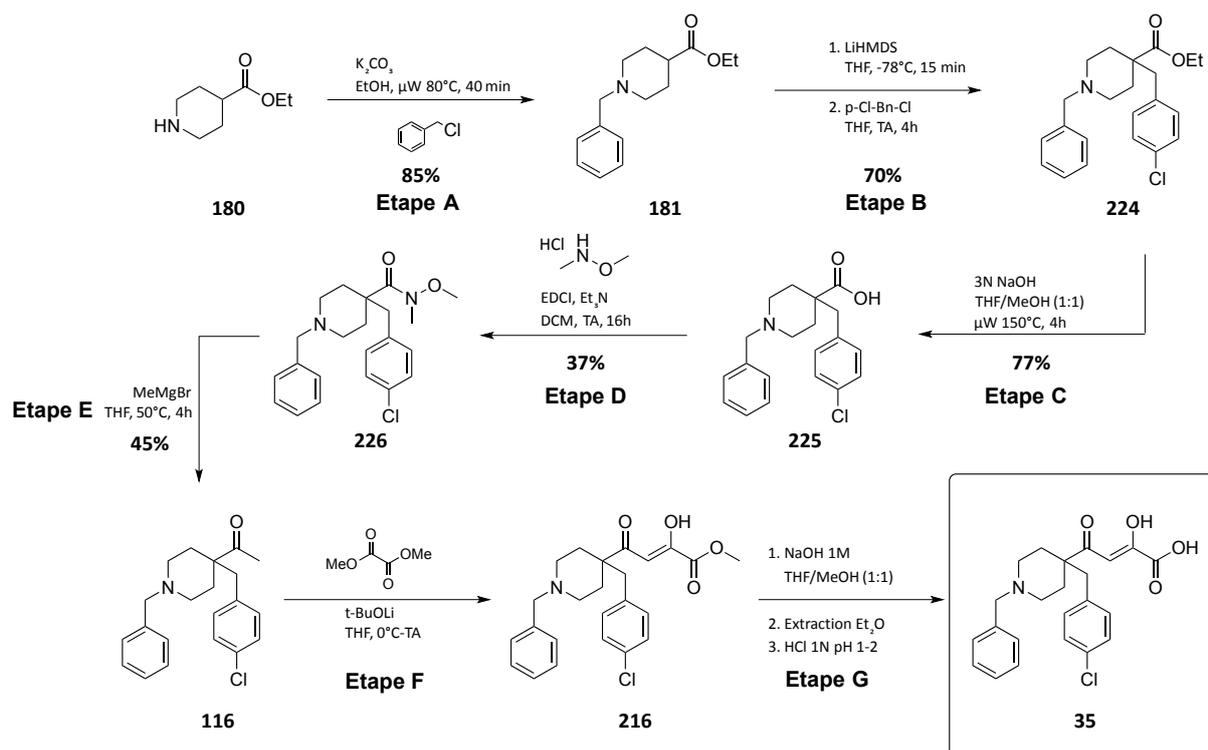
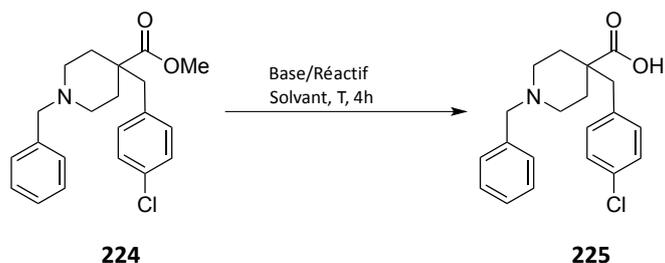


Schéma 21. Voie de synthèse raccourcie du composé **35** revisitée.

L'**étape A** consiste donc à introduire le groupement benzyle le composé de départ **180**, à la place du groupement Boc dans les conditions optimisées décrites dans la **Partie 1, IV.1-a** de ce chapitre.

L'**étape B** est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (**Partie 1, IV.1-a**, Schéma 14) et permet d'obtenir le composé **224** avec 70% de rendement.

L'**étape C** est l'hydrolyse de la fonction ester du composé **224**. Dans les conditions employées lors de la voie classique (**Partie 1, IV.1-a**, Tableau 10), la réaction n'arrive pas à conversion totale. Nous avons essayé d'améliorer la réaction en réalisant l'hydrolyse basique sur l'ester méthylique à la place de l'ester éthylique. Différentes conditions expérimentales faisant varier la base, le solvant et la température ont été testées et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 17.



Entrée	Base/Réactif	Solvant	Température	Conversion ^a
1	NaOH 10N	THF/iPrOH	120°C μ W	44%
2	NaOH 10N	DMSO	120°C μ W	49%
3	NaOH 3N	THF/iPrOH	120°C μ W	40%
4	NaOH 3N	THF/MeOH	120°C μ W	87%
5	NaOH 3N	THF/MeOH	150°C μ W	100%

^a Conversion déterminée par LCMS.

Tableau 17. Conditions opératoires testées pour l'hydrolyse du composé **213**.

A conditions opératoires équivalentes à l'hydrolyse de l'ester éthylique **111** (Partie 1, IV.1-a, Entrée 5, Tableau 10), la conversion diminue de 50% lorsque l'ester est substitué par le groupement benzyle au lieu du Boc (Entrée 1, Tableau 17). Il pourrait s'agir d'un problème de solubilité du substrat. L'azote de la pipéridine est substitué par un groupement benzyle, plus hydrophobe que le groupement Boc substitué sur le composé **111**. Le groupement Boc contenant un lien carbamate peut former des liaisons hydrogènes avec l'eau, rendant le substrat plus soluble et homogène dans le milieu. Au contraire, le groupement benzyle n'est pas soluble dans l'eau et pourrait être responsable de la formation d'agrégats réduisant la conversion.

Le mélange d'hydrolyse NaOH 10N dans le THF et l'iPrOH est une solution très concentrée et se présente plutôt sous forme d'une suspension en limite de solubilité. Nous avons donc décidé pour avoir un milieu réactionnel plus homogène de diminuer la concentration en soude à 3N et de substituer l'isopropanol par le méthanol. Dans ces conditions (Entrées 4 et 5), la conversion atteint 87% en 4h à 120°C et même 100% à 150°C.

L'**étape D** consiste à convertir l'acide carboxylique **225** en l'amide de Weinreb **226**. Dans les mêmes conditions que la voie classique (Partie 1, IV.1-a), le rendement obtenu est plus faible (37%).

Enfin, l'**étape E** consiste à réduire l'amide de Weinreb **226** pour obtenir le synthon clé méthyle cétone **116**. Ici également, le rendement obtenu est plus faible (45%).

Les **étapes F** et **G** sont communes à celle de la voie classique et permettent d'accéder aux DCAs finaux.

Bien que cette voie raccourcie soit réalisable, elle n'est stratégiquement pas pertinente. En effet, elle consiste à introduire de la diversité chimique directement à la première étape de synthèse. Par ailleurs les rendements globaux sont plus faibles. Nous avons décidé de ne pas poursuivre dans cette voie.

3. Voie pyruvate

Une voie de synthèse totalement originale a été envisagée dans le but de réduire le nombre d'étapes (Schéma 22). Pour rappel, la synthèse classique du DCE **205** implique la condensation de la méthyle cétone **116**, obtenue en 7 étapes, avec l'ester oxalique **161**.

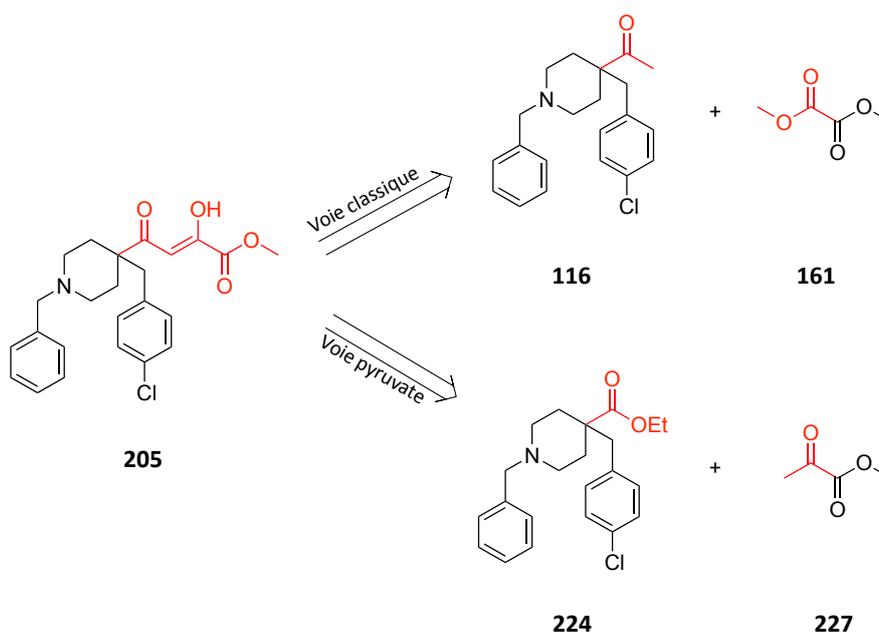


Schéma 22. Schéma rétrosynthétique du composé **216** selon la voie classique ou la voie pyruvate.

Il a été décidé de regarder la possibilité d'inverser les rôles entre la méthyle cétone **116** et l'ester oxalique **161**, c'est-à-dire de faire réagir l'ester **224** obtenu à l'étape **B** de la voie raccourcie (Partie 1, IV.2) avec un pyruvate de type **227**.

Ce changement permettrait de supprimer les étapes de synthèse de la méthyle cétone **116** (synthèse de l'amide de Weinreb, addition du magnésien) et également les étapes de protection/déprotection du groupement Boc. Finalement, cela reviendrait à une synthèse de 4 étapes, plus rapide et convergente.

Les premiers essais exploratoires se sont portés sur l'utilisation du méthyl pyruvate **227** sur un ester modèle, mais ils n'ont rien donné. En effet, le méthyl pyruvate **227** n'est pas un réactif de choix car il possède à la fois un site électrophile et un site nucléophile (H en α), peut ainsi s'additionner sur lui-même. C'est très certainement cette réaction parasite qui est à l'origine de l'échec de ces essais.

Plus récemment, Donohoe *et al.*¹⁶² ont développé le caractère nucléophile des pyruvates en masquant leur électrophilie à travers la synthèse d'un OBO-ortho-ester, un pyruvate modifié comportant un groupement OBO facilement retiré en conditions acides (Schéma 23).

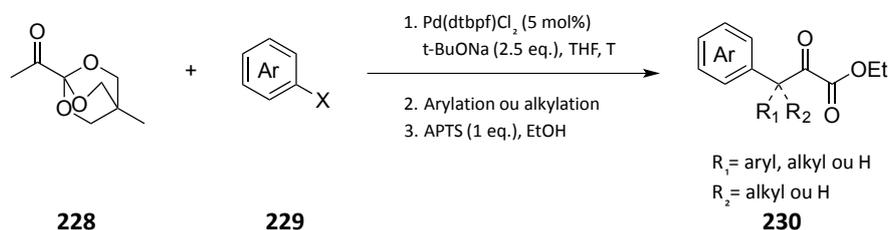
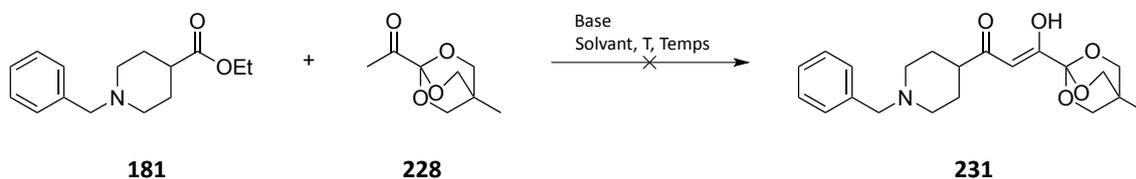


Schéma 23. Réactions d'arylation entre le pyruvate **218** et le composé **219**.

Ici, l'OBO-ortho-ester est utilisé dans des réactions d'alkylation ou d'arylation. L'utilisation d'ortho esters permet de masquer la fonction électrophile du carbone du carbonyle et réduit également l'acidité de l'hydrogène en α . Cet ortho ester **218** (4-méthyl-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octane (OBO)) a été développé au départ par Corey¹⁶³ dans le but de protéger le groupe acide carboxylique d'attaques par des nucléophiles.

Nous avons voulu utiliser cet OBO ester **218** dans le but de le condenser avec l'ester **224**. Compte-tenu de son relatif encombrement, la réaction a été testée sur l'ester modèle **181** pour valider dans un premier temps la faisabilité de la réaction. Plusieurs conditions ont été criblées en faisant varier la base, le solvant, la température de la réaction. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 18.



Entrée	Base	Solvant	T	Résultat ^a
1	t-BuOLi	THF	TA	Réactif de départ
2	LiHMDS	THF	TA	Réactif de départ
3	NaH	THF	TA	Réactif de départ
4	KOH	THF	TA	Réactif de départ
5	KOH	EtOH	TA	Réactif de départ
6	KOH	EtOH	$\mu\text{W } 80^\circ\text{C}-120^\circ\text{C}$	Réactif de départ
7	t-BuOLi	DMF	TA	Réactif de départ
8	NaH	Et ₂ O	TA	Réactif de départ

¹⁶² C. H. Alves Esteves, C. J. J. Hall, P. D. Smith and T. J. Donohoe, *Org. Lett.*, **2017**, **19**, 5248-5251.

¹⁶³ E. J. Corey, N. Raju, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, **24**, 5571-5574

9	t-BuONa	NMP	μW 100°C	Réactif consommé
10	t-BuONa	DMF	μW 100°C	Réactif consommé

^a L'avancement des réactions est suivi par analyse CCM et LCMS

Tableau 18. Criblage de conditions opératoires pour réaliser une condensation de Claisen entre l'OBO-ester **228** et le composé **181**.

Lorsque la réaction est conduite dans les conditions de condensation de Claisen optimisées pour l'obtention des DCEs (t-BuOLi, THF, TA, Entrée 1), le réactif de départ **181** reste intact. Le changement de la base par LiHMDS (Entrée 2), NaH (Entrée 3) ou KOH (Entrée 4) n'a également aucun effet. Des changements de solvants adaptés à différentes bases ont été effectués sans succès (Entrées 5, 7 et 8). Finalement, certains essais ont été conduits par activation micro-ondes afin de voir si cela pouvait amorcer un début de réaction. L'utilisation de KOH dans l'éthanol chauffé par micro-ondes entre 80°C et 120°C n'a rien donné (Entrée 6). Par contre, l'emploi de t-BuONa dans le DMF ou la NMP a permis de consommer entièrement le réactif de départ (Entrées 9 et 10).

Dans les conditions de l'entrée 9, le réactif de départ **181** a disparu et plusieurs composés plus polaires sont visibles par suivi en CCM. Par suivi LCMS, l'ion moléculaire attendu correspondant au composé **231** n'est pas observé. Nous avons toutefois décidé de poursuivre et de réaliser une étape de déprotection du brut pouvant correspondre à l'ester OBO **231** dans les conditions décrites dans la publication de Donohoe *et al.*

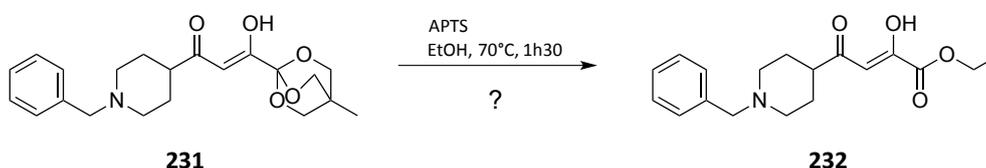


Schéma 24. Conditions opératoires utilisées pour la déprotection du suspecté composé **231**.

Au bout d'1h30 de réaction, la CCM témoigne d'une disparition totale du brut de départ. La présence de deux pics en LCMS est détectée, un à 4.38 min, correspondant à l'ion moléculaire 317.18 [M+H]⁺, pouvant être l'ester attendu, ainsi qu'un pic à 5.83 min de même intensité où l'ion est détecté à 236.14 et 243.18, Inconnu.

Nous engageons ce brut réactionnel dans une hydrolyse basique pour voir si le DCA correspondant est généré.

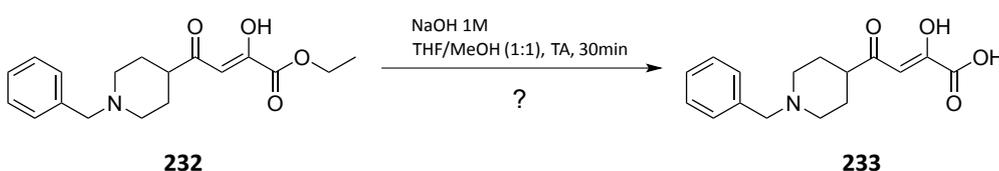


Schéma 25. Tentative de déprotection du suspecté composé **232**.

Malheureusement, le pic correspondant à l'hypothétique DCE détecté à 4.38 min ne disparaît pas au cours du temps. La réaction ne fonctionne pas. Cette voie de synthèse, bien que prometteuse, n'a pas encore abouti.

Une chimiothèque de 18 composés analogues du composé **35** a été synthétisée. Les conditions opératoires pour chacune des étapes ont été revisitées et optimisées permettant d'améliorer temps de réaction et rendements. Plusieurs essais ont été envisagés pour raccourcir le nombre d'étape. Si la suppression des étapes de protection/déprotection par le groupement Boc n'a pas été concluante, la piste de la condensation de Claisen impliquant un pyruvate encombré n'a pas donné de résultats à ce jour, mais semble prometteuse pour accéder plus rapidement aux composés cibles. Les 18 composés synthétisés feront l'objet de caractérisations (Partie 3) et de plusieurs évaluations biologiques pour évaluer leur capacité à cibler les deux nucléases d'Arenavirus (Chapitre 3).

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la modification du motif clé de nos molécules cibles, la partie dicéto-acide grâce à la conception de composés bioisostériques.

PARTIE 2 - Composés bioisostériques et analogues des dicéto-acides et

1. Les bioisostères

a. Définition

Les bioisostères sont des groupements chimiques possédant des similitudes physico-chimiques mais également biologiques.

Selon Burger¹⁶⁴, les bioisostères sont des molécules ou groupements d'atomes possédant des volumes et une forme similaire, une distribution électronique identique, et des propriétés physiques similaires.

La conception de bioisostères introduit des changements structuraux qui peuvent être bénéfiques ou délétères à la molécule d'intérêt selon le contexte. Lors de la synthèse de bioisostères, de nombreux paramètres peuvent être modifiés sur la structure chimique initiale : taille et forme de la molécule, répartition électronique, liposolubilité, hydrosolubilité, pKa, réactivité chimique, liaisons hydrogène.

Leur utilisation en chimie médicinale permet de résoudre des problèmes de stabilité, de toxicité, de sélectivité ou de pénétration cellulaire. En effet, une majorité de molécules médicaments sont des acides faibles ou des bases faibles. Elles existent donc sous forme ionisée ou non-ionisée et ce ratio dépend du pKa de l'espèce ainsi que du pH environnant¹⁶⁵.

La forme ionisée d'un médicament, qu'elle soit négativement ou positivement chargée, est généralement défavorable à la traversée de la membrane cellulaire. Il est donc nécessaire de connaître le pH auquel sera exposée la molécule, pour pouvoir étudier le ratio de forme protonée et déprotonée et conclure sur le pourcentage de molécule qui va pouvoir pénétrer dans la cellule. Logiquement, les acides faibles exposés à un pH acide seront favorisés pour traverser les membranes puisqu'ils ne seront pas ionisés. L'intérêt d'utiliser des bioisostères apparaît ici puisqu'ils permettent en théorie de s'affranchir de ce problème.

Deux types de bioisostères sont à distinguer :

- Les bioisostères classiques, possèdent des atomes ou groupes d'atomes dont la couche périphérique d'électrons peut être considérée comme identique (Exemple : le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor).
- Les bioisostères non-classiques, possèdent un nombre d'atomes et d'électrons de valence différents mais expriment une similarité dans leur activité biologique (Exemple : le remplacement d'une fonction acide carboxylique par un groupement tétrazole).

¹⁶⁴ A. Burger, *Prog. Drug. Res.*, **1991**, *37*, 287-371

¹⁶⁵ T.B. Fulton, *Lecture, Diffusion and Transport Across Cell Membranes*

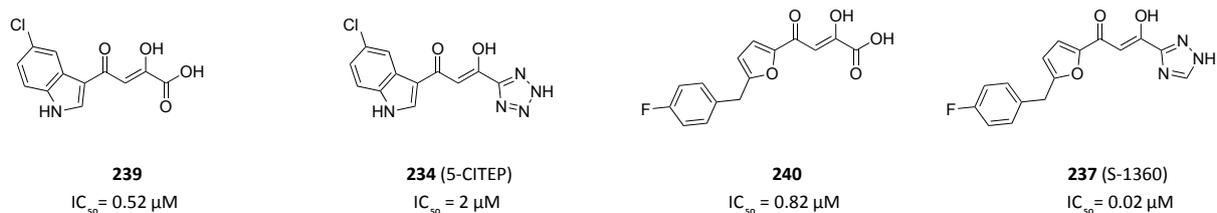


Figure 73. Structures chimiques et activité biologique contre l'intégrase du VIH des DCAs **239** et **240** et leur bioisostères triazole **237** et tétrazole **234** associés.

Le composé **234** (5-CITEP) a été synthétisé par Shionogi & Co et possède une IC_{50} de 2 μM vis-à-vis de l'intégrase dans un test *in vitro*. Comparativement au DCA parent **239**, la substitution du groupement acide carboxylique par son bioisostère tétrazole a abaissé l'activité.

Le composé **237** (S-1360) a été le premier inhibiteur de l'intégrase du VIH à entrer en phase clinique¹⁶⁹. Il s'agit d'une 1,3-dicétone portant un cycle furane substitué d'un côté et un cycle 1,2,4-triazole de l'autre. Il est un dérivé du DCA **240**, qui possède une IC_{50} de 0.82 μM ¹⁷⁰ contre l'intégrase. Le remplacement de la fonction acide carboxylique par un motif triazole en position 1 a permis d'augmenter l'activité inhibitrice de la molécule de 40 fois. Il a montré une excellente efficacité *in cellula* avec une EC_{50} de 0.20 μM sur des cellules MT-4 et un indice de sélectivité de 60.

Ces deux exemples sont la preuve que la modification de la fonction acide carboxylique des DCAs par un groupement triazole ou tétrazole permet de maintenir dans le même ordre de grandeur l'activité biologique des composés ou parfois même de l'augmenter.

Nous allons dans un premier temps essayer de synthétiser les analogues du composé **35** en dicéto-triazole et dicéto-tétrazole.

b. Résultats : synthèse

Dans le but d'obtenir l'analogue du composé **35** où l'acide carboxylique est substitué par un triazole ou tétrazole, nous avons étudié les différentes voies d'accès à ces motifs. Généralement, les dicéto-triazole et dicéto-tétrazole s'obtiennent à partir d'une méthyle cétone et d'un ester triazolique ou tétrazolique (Schéma 26).

La condensation de Claisen directe entre le composé **116** et l'ester **241** (1H-1,2,4-triazole-5-carboxylate de méthyle) ne s'opère pas, bien que la méthyle cétone soit entièrement consommée, la réaction donne lieu à plusieurs produits de dégradation non identifiables.

¹⁶⁹ N. Neamati, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2002**, **12**, 709–724.

¹⁷⁰ S. Akihiko, Y. Tomokazu, F. Toshio, **2000**, CA2353961A1

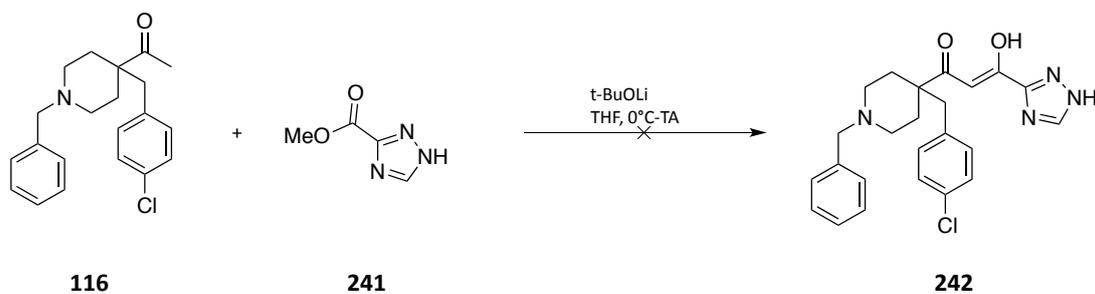


Schéma 26. Tentative de condensation de Claisen entre la méthyl cétone **116** et l'ester **241**.

Les triazoles et tétrazoles possèdent un proton acide réactif qui doit être protégé. Une publication de Shimizu *et al.*¹⁷¹ relate l'utilisation de différents groupes protecteurs du cycle 1,2,4-triazole à l'échelle du procédé. L'utilisation du groupement trityle **243**, du méthoxypropyle **244**, ou du tétrahydropyranyle **245**, y est décrite (Figure 74).

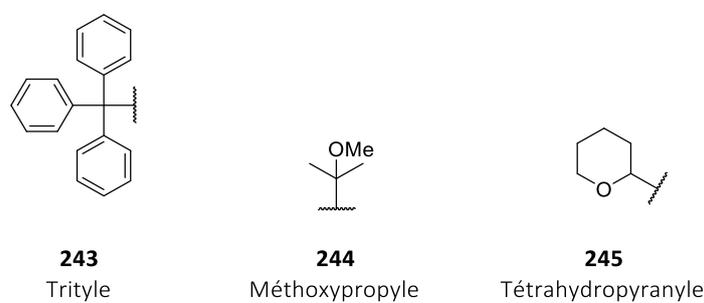


Figure 74. Groupes protecteurs des triazoles et tétrazoles décrits dans la littérature.

Ce sont des groupements protecteurs des alcools ou amines. Le groupement trityle est retiré en milieu acide (TFA¹⁷², HCl¹⁷³, ou TsOH¹⁷⁴). Le groupe 2-tétrahydropyranyle (THP) se retire par hydrolyse acide, générant du 5-hydroxypentanal. Enfin, le groupe méthoxypropyle (MOP) s'élimine en présence d'un mélange Pyr-TsOH.

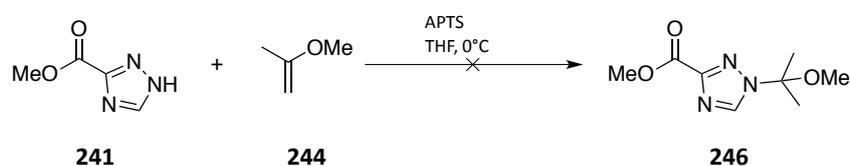


Schéma 27. Conditions opératoires de protection de l'ester **241** par le 2-méthoxypropène **244**.

Nous avons réalisé un premier essai de protection du composé **241** avec le 2-méthoxypropène **244** dans le THF à 0°C en présence d'une quantité catalytique d'APTS. Le produit attendu **246** n'est pas observé (Schéma 27). Dans la publication de Shimizu *et al.*, la protection du triazole et la condensation de Claisen

¹⁷¹ S. Shimizu, T. Endo, K. Izumi and H. Mikamiyama, *Org. Process Res. Dev.*, **2007**, **11**, 1055–1058.

¹⁷² M. Maccoss, D.J. Cameron, *Carbohydr. Res.* **1978**, **60**, 206-209.

¹⁷³ Y.M. Choy, A.M. Unrau, *Carbohydr. Res.*, **1971**, **17**, 439-443.

¹⁷⁴ A. Ichihara, M. Ubukata, S. Sakamura, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, **18**, 3473.

se font généralement en « one-pot ». Nous avons donc mis en réaction le composé **162** avec les l'ester de triazole **241** et le 2-méthoxypropène **244** à 0°C en milieu acide, puis dans un second temps le t-BuOLi a été ajouté (Schéma 28).

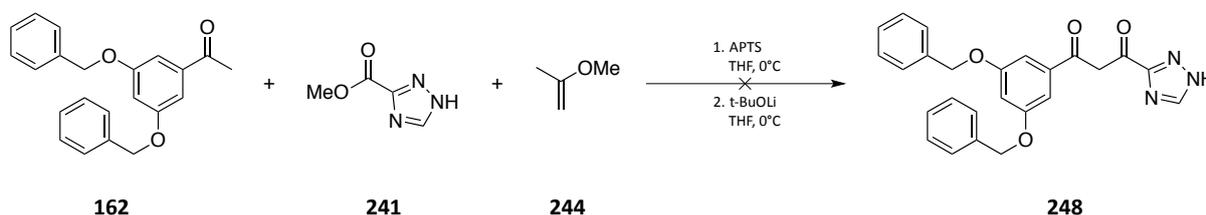


Schéma 28. Tentative de réaction "one-pot" combinant protection et condensation de Claisen.

La réaction a été suivie par LCMS et un signal correspondant à un produit de masse 427 ($428.13 [M+H]^+$, $426.12 [M+H]^+$) a été observé. Ce signal ne correspond pas au produit attendu de masse exacte de 499.21, mais cela pourrait correspondre à un produit de couplage dicéto-triazole **248** qui aurait perdu le groupement MOP.

Cet essai préliminaire nous a incité à tester les conditions de réaction « one-pot » sur la méthyle cétone **116** (Schéma 29).

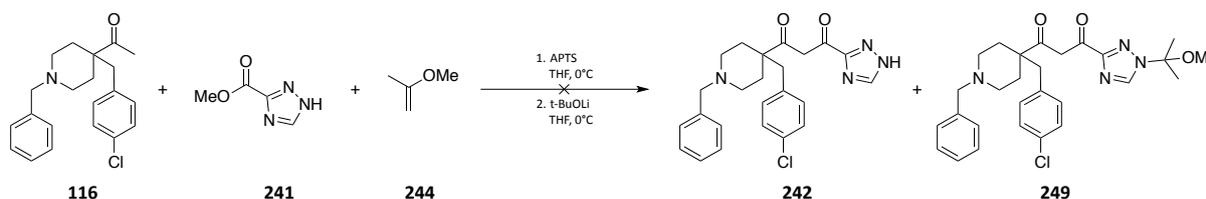


Schéma 29. Tentative de réaction "one-pot" sur la méthyle cétone **116**.

La méthyle cétone **116** a donc été incubée, avec les l'ester de triazole **241** et le 2-méthoxypropène **244** selon le même protocole, et la réaction a été suivie par LCMS. Le produit attendu n'a pas été observé, même après plusieurs heures de réaction.

La protection avec le groupement THP a ensuite été testée. Dans un premier temps, la synthèse de l'ester de triazole protégé **250** a été réalisée. Le substrat **241** a été incubé avec le réactif **245** dans le THF, en présence d'APTS à 45°C pendant 1h et la réaction a été suivie par LCMS (Schéma 30).

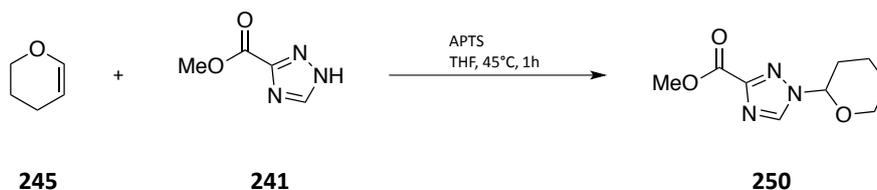


Schéma 30. Conditions opératoires utilisées pour la protection de l'ester-triazole **241** par le 3,4-DHP **245**.

Le composé attendu **250** est obtenu avec un rendement de 88% après purification sur colonne de gel de silice.

La même procédure appliquée à l'ester tétrazolique **251** permet d'obtenir l'ester protégé avec 73% de rendement (Schéma 31).

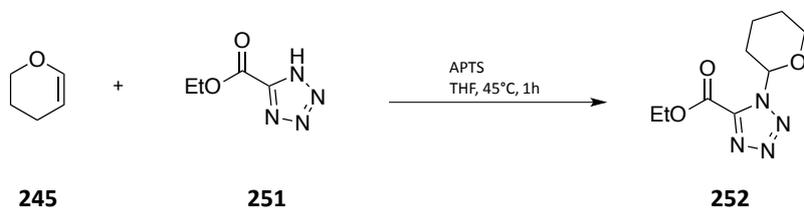


Schéma 31. Protection de l'ester-tétrazole **251** par le 3,4-DHP **245**.

La méthyle cétone **116** a ensuite été incubée avec le composé **250** pendant 4h en présence de t-BuOLi dans le THF et la réaction a été suivie par LCMS (Schéma 32).

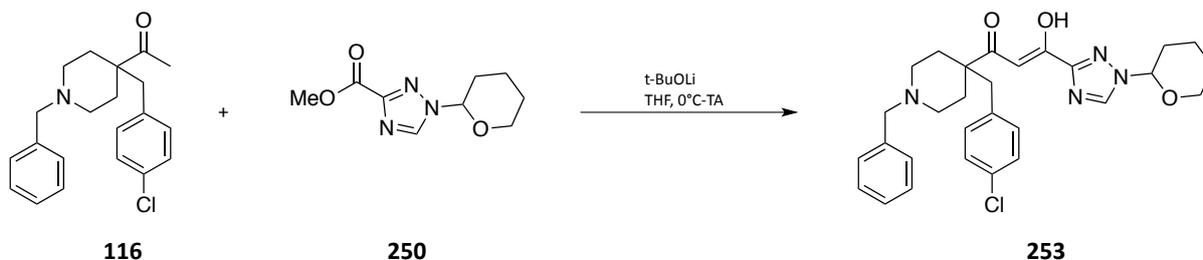


Schéma 32. Condensation de Claisen du composé **250** avec le composé **116**.

L'analogue triazole **253** est obtenu avec seulement 26% de rendement.

Les mêmes conditions appliquées à l'ester tétrazolique protégé **252** (Schéma 33) conduisent au composé **254** avec 40% de rendement.

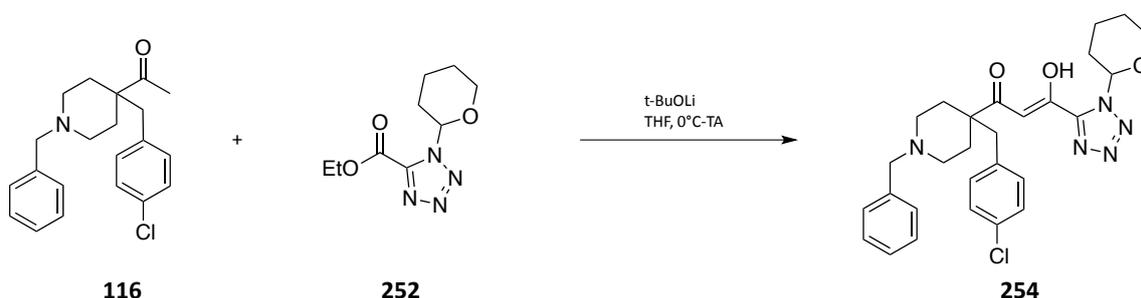


Schéma 33. Condensation de Claisen du composé **252** avec le composé **116**.

Dans les deux cas les rendements obtenus sont assez bas car la conversion de la méthyle cétone **116** n'est pas totale même après plusieurs heures de réaction. Il serait peut-être judicieux d'envisager la réaction à plus haute température.

Le composé **253** a été déprotégé par action d'HCl 6N dans l'iPrOH à 60°C pendant 1h (Schéma 34).

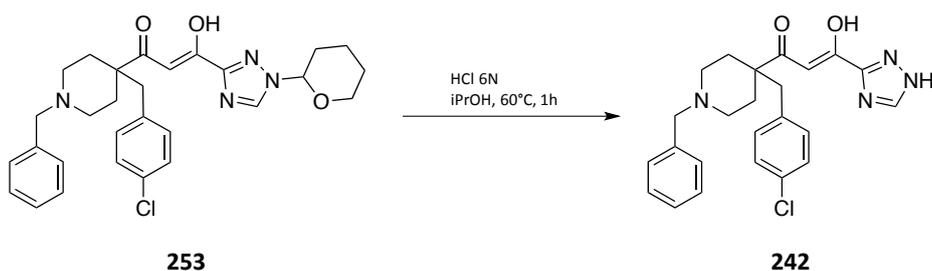


Schéma 34. Conditions opératoires utilisées pour la synthèse du composé **242**.

Le composé **242** est obtenu avec 14% de rendement après purification en phase inverse par HPLC semi-préparative.

Les mêmes conditions de déprotection ont été appliquées au composé **254** (Schéma 35).

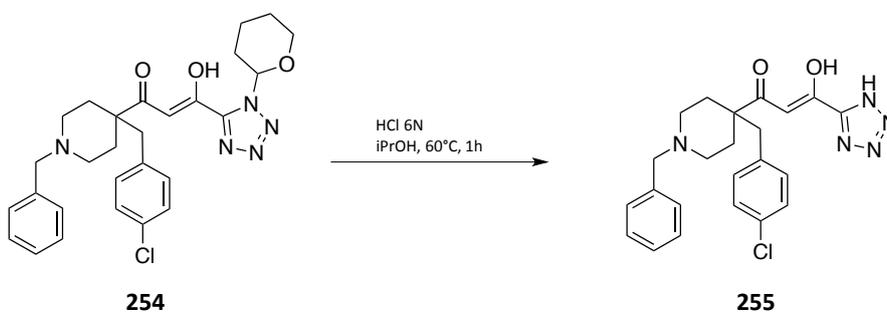


Schéma 35. Conditions opératoires utilisées pour la synthèse du composé **255**.

Le composé **255** est obtenu avec 14% de rendement après purification en phase inverse par HPLC semi-préparative.

2. Dicéto-acides hydroxamiques et dicéto-carboxamides

Les dicéto acides hydroxamiques (DAH) et dicéto-carboxamides (DCCA) n'ont pas été décrits comme étant des bioisostères des DCAs mais nous avons trouvé judicieux de les étudier comme alternatives à la fonction acide carboxylique, notamment pour étudier l'impact que cela pouvait avoir sur la chélation des ions métalliques.

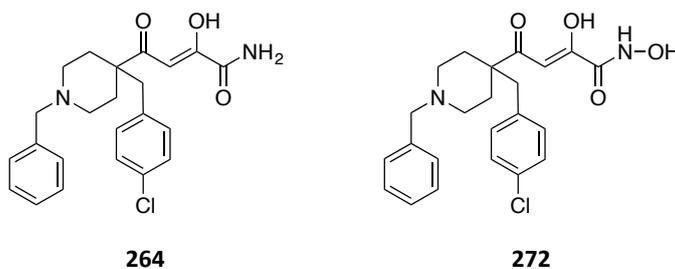


Figure 75. Structures chimiques des composés **264** et **272**.

Là est tout le défi, puisqu'à ce jour, aucune structure comportant la fonction DAH ou DCCA n'a été reportée dans la littérature.

a. Bibliographie

> Dicéto-carboxamides (DCCA)

Ce sont des dicétones comportant une fonction amide primaire en position 1. De manière générale, les amides sont faiblement basiques et se comportent même comme des acides en solution. Ce sont des donneurs de liaisons hydrogène mais pas des accepteurs car le doublet de l'azote est engagé dans la délocalisation avec le carbonyle. Peu d'informations sur ces amides primaires en tant que groupement chimique utilisé en chimie médicinale sont disponibles. Certains benzamides ont des propriétés biologiques, notamment des activités antimicrobiennes comme le composé **256** avec des propriétés anti-fongiques¹⁷⁵.

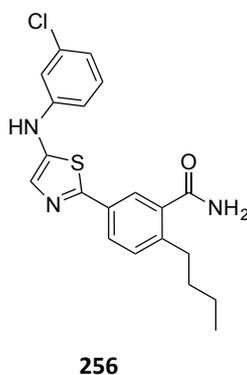
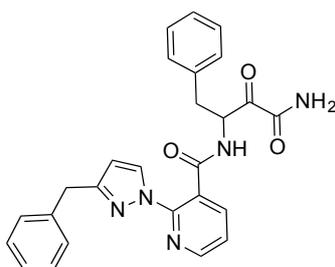


Figure 76. Structure chimique de l'antifongique **256**.

En 2017, King *et al.*¹⁷⁶ reportent la structure du composé **257** comme inhibiteur de calpaïnes. Ce sont des protéases impliquées dans des processus comme la réorganisation du cytosquelette, la différenciation cellulaire, ou l'apoptose. Elles semblent jouer un rôle majeur dans la maladie d'Alzheimer. Le composé **257** comporte une fonction céto-carboxamide.

¹⁷⁵ B. Narayana, K.K Vijaya Raj, B.V. Ashalatha, N. Suchetha Kumari, B.K Sarojini, *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, **39**, 867–872.

¹⁷⁶ A. Kling, K. Jantos, H. Mack, W. Hornberger, K. Drescher, V. Nimmrich, A. Relo, K. Wicke, C. W. Hutchins, Y. Lao, K. Marsh and A. Moeller, *J. Med. Chem.*, **2017**, **60**, 7123–7138.



257

K_i Cal1 = 0.018 μ M

Figure 77. Structure chimique et activité biologique du composé **257** contre Calpaïne 1 (Cal1).

Il possède un K_i de 0.018 μ M contre la calpaïne 1.

Des squelettes chimiques de type DCCA n'ont jamais été reportés dans la littérature. Le DCCA **264**, analogue du DCA **35** sera synthétisé et évalué contre les deux nucléases d'Arenavirus.

> Dicéto-acides hydroxamiques (DAH)

Le premier acide hydroxamique fut synthétisé en 1869 par Lossen¹⁷⁷, il s'agissait de l'acide oxalohydroxamique. Ils ont cependant d'autres propriétés notamment en agriculture comme insecticides, antimicrobiens ou régulateurs de croissance pour certaines plantes. En chimie médicinale, ils ont montré leur utilité dans une variété de maladies (cancer, maladies cardiovasculaires, HIV, Alzheimer, Tuberculose, empoisonnement aux métaux...). Historiquement les acides hydroxamiques jouaient le rôle de sidérophores pour le Fe(III). En effet, les molécules comportant cette fonction sont capables d'inhiber une grande variété d'enzymes. Une revue de 2002¹⁷⁸ reporte leur utilisation en tant qu'inhibiteurs d'uréases, de peroxydases, ou encore des métalloprotéinases. On peut citer notamment le Vorinostat mentionné dans le Chapitre 1, qui est commercialisé par Merck comme inhibiteur d'histone désacétylase.

Les acides hydroxamiques sont des acides faibles (pKa autour de 8.5/9 selon les motifs)¹⁷⁹. Ils possèdent deux formes tautomères ainsi qu'une isomérie (Z)/(E). Par ailleurs, ce sont des chélateurs de différents métaux tels que le Fe(III), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cu(II) et ont plus d'affinité pour les ions trivalents que les divalents¹⁸⁰.

En complément à leurs propriétés chélatantes, ils ont une forte capacité à former des liaisons hydrogènes à travers leur fonction hydroxyle. Ainsi, ils sont susceptibles de créer de fortes interactions

¹⁷⁷ H. Lossen, *Liebigs Ann. Chem.* **1869**, **150**, 314-322

¹⁷⁸ E. M. F. Muri, M. J. Nieto, R. D. Sindelar and J. S. Williamson, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, **9**, 1631-1653.

¹⁷⁹ T. Bugg, *ChemBioChem*, **15**, 2467-2467.

¹⁸⁰ Martell and Smith, **1982**

avec leurs récepteurs et c'est pourquoi ils constituent un motif clé en chimie médicinale. Ils peuvent être des ligands monodentes ou bidentes (Figure 78).

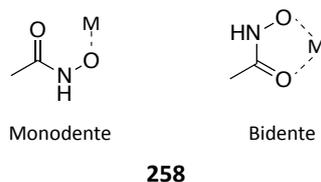


Figure 78. Modes de chélation de l'N-hydroxyacétamide **258**.

Les acides hydroxamiques montrent une affinité particulière pour les atomes durs.

En 1996, Cianci *et al.*¹⁸¹ identifient des inhibiteurs de la polymérase du virus de la grippe possédant une fonction hydroxamate. Le composé **258** identifié par criblage à haut-débit, présente une IC_{50} de 40 μM *in vitro*, et initie ainsi une inhibition de la transcription (Figure 79).

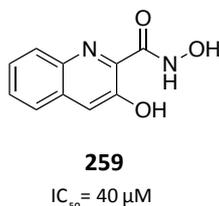


Figure 79. Structure du composé **259** identifié par criblage à haut-débit par Bristol Myers Squibbs.

Sa sélectivité est également notable puisqu'il est inactif contre l'ARN polymérase ARN dépendante du virus de la stomatite vésiculaire (VSV, un autre virus à ARN négatif), ainsi que contre l'ARN polymérase ADN dépendante du bactériophage T7. Son mécanisme d'inhibition semble donc unique et potentiellement dû à l'activité endonucléase, alors spécifique du virus de la grippe. Un test d'activité endonucléase a confirmé ce mode d'action. D'autre part, la synthèse chimique d'analogues de ce composé montre que la modification ou la suppression du motif hydroxyle ou acide hydroxamique abolit complètement l'inhibition de l'enzyme suggérant l'importance de ces fonctions chimiques. Cette inhibition pourrait être métal dépendante à travers la chélation du magnésium.

Cependant, un parallèle est fait entre le composé **259** et des analogues comportant le motif N-hydroxyimides que nous connaissons aujourd'hui comme chélateurs de Mn^{2+} et Mg^{2+} . La fonction acide hydroxamique a donc un rôle à jouer dans l'inhibition d'endonucléases métal-dépendante.

Dans l'optique de synthétiser des analogues du motif DCA, nous avons essayé d'obtenir l'analogue DAH **272**, à ce jour jamais décrit dans la littérature.

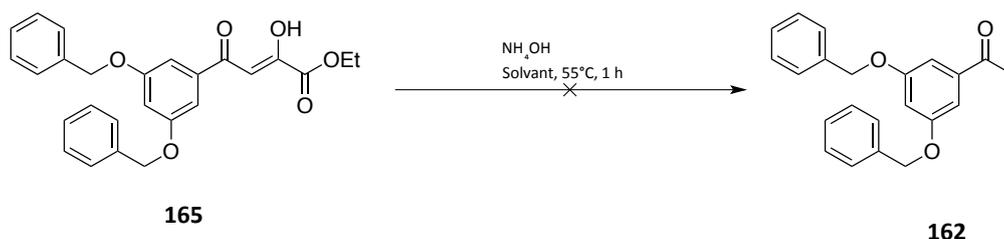
¹⁸¹ C. Cianci, T. D. Y. Chung, N. Meanwell, H. Putz, M. Hagen, R. J. Colonna and M. Krystal, *Antivir. Chem. Chemother.*, **1996**, *7*, 353–360.

b. Résultats : synthèse

> Dicéto-carboxamide (DCCA)

Les carboxamides sont classiquement obtenus à partir de leurs esters correspondants par action d'ammoniaque dans un solvant protique type méthanol¹⁸². L'adaptation de cette méthode a été appliquée pour obtenir le motif DCCA.

Plusieurs conditions opératoires ont ainsi été testées et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 19.



Réaction	Base	Solvant	Température	Résultat
1	NH ₄ OH	MeOH	TA	Rétro-claisen
2	NH ₄ OH	MeOH/THF 1 : 3	55°C	Rétro-claisen

Tableau 19. Conditions opératoires utilisées pour l'obtention du composé dicéto-carboxamide **246** par action de l'ammoniaque conduisant à la régénération de la méthyle cétone **162**.

Le DCE **165** a été mis en présence d'ammoniaque dans le méthanol et le mélange laissé à TA (Entrée 1). Au bout d'une heure, la méthyle cétone **162** est régénérée. La réaction a été réessayée avec une proportion de méthanol réduite à un tiers par l'ajout de THF. De plus, généralement la transformation d'un ester en carboxamide nécessite de chauffer légèrement, une température de 55°C a donc été choisie. Malgré ces changements, la méthyle cétone **162** se forme aussi.

La synthèse standard du motif DCCA à partir du DCE **165** s'avère inadaptée puisque les conditions opératoires (milieu basique et chauffage) conduisent à la réaction de rétro-claisen et donc à la régénération complète de la méthyle cétone **162** en seulement 1h.

En 2003, Nezhad *et al.*¹⁸³ ont synthétisé des carboxamides à partir d'acides carboxyliques réagissant avec de l'urée en présence d'imidazole sous irradiation micro-ondes (Schéma 36). Le rôle de l'imidazole est de former un sel d'acide carboxylique permettant de favoriser l'absorption de l'énergie micro-onde.

¹⁸² R. Ovadia. Réaction multicomposants pour la synthèse de dimères de PNA ciblant la réplication du virus de l'hépatite C [en ligne]. Chimie Organique. Université d'Aix-Marseille, **2014**, 276 pages.

¹⁸³ A. Khalafi-Nezhad, B. Mokhtari and M. N. Soltani Rad, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, **44**, 7325–7328.

La réaction s'effectue en 5 min maximum, sans solvant, et permet d'obtenir des rendements de l'ordre de 80% (Schéma 36). Au vu de la puissance utilisée (300 W) il semblerait que les réactifs entrent en fusion et réagissent ainsi plus facilement.

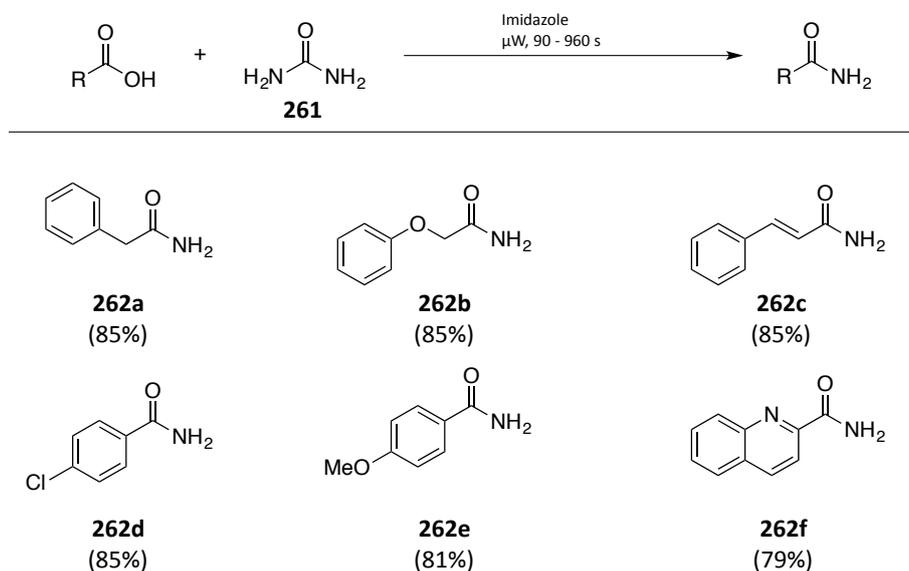
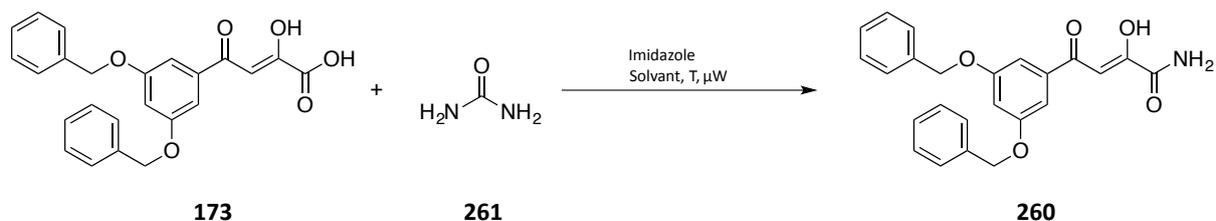


Schéma 36. Synthèse de carboxamides par réaction entre acides carboxyliques et l'urée **261** réalisées par Nezhad et al.

Les dérivés carboxamides **262a-f** sont tous obtenus avec des rendements supérieurs à 80%.

Nous avons choisi d'adapter la réaction sur le DCA **173**. Plusieurs conditions ont été testées faisant varier la présence ou non de solvant, la température de la réaction sous irradiation micro-ondes, et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 20. Les réactions ont été suivies par LCMS.



Entrée	Température	Solvant	Durée	Résultat
1	μW 60°C	Aucun	1h	Réactif de départ
2	μW 80°C -> 130°C	iPrOH	6h30	260 + produit secondaire
3	μW 130°C	iPrOH	2h30	Réactif entièrement consommé

Tableau 20. Essais d'obtention du motif dicéto-carboxamide adapté de Nezhad et al.

En absence de solvant (Entrée 1), sous irradiation micro-ondes à 60°C, le composé attendu **260** n'est pas formé, seul le composé de départ **173** caractérisé par un temps de rétention de 6.35 min et de

masse 404 est visible en suivi LCMS. Il est probable que la température ne soit pas assez élevée pour obtenir la fusion des composés et donc une bonne mise en contact pour la réactivité.

Dans l'isopropanol (Entrée 2) sous irradiation micro-ondes de 80°C à 130 °C, un composé caractérisé par un temps de rétention de 6.10 min et de masse 403 (402.14 [M+H]⁺, 404.11 [M+H]⁺) se forme mais le composé de départ **173** n'est toujours pas totalement consommé après 1h30 de réaction. En poussant la réaction plus longtemps, un composé caractérisé par un temps de rétention de 7.34 min et de masse 446 apparaît. Il s'agit du composé **263** correspondant à une addition d'urée sur le motif DCA (Figure 80).

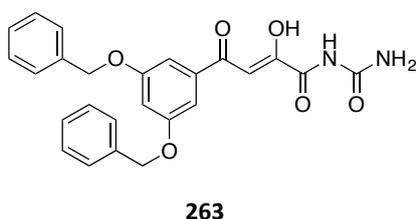


Figure 80. Composé **263** secondaire issu de la conversion du dicéto-acide en dicéto-carboxamide de masse 446.15.

Il n'est pas possible d'atteindre la conversion totale du composé **173** en composé **260** sans favoriser la formation du composé **263** au cours du temps. Nous nous contenterons pour la suite de chauffer à 130°C sur une durée maximale d'une heure

Nous avons ensuite adapté la réaction sur le DCA **35** (Schéma 37). Nous avons mis en réaction le composé **35** en présence d'urée et d'imidazole dans l'iPrOH, sous irradiation micro-ondes à 130°C pendant 1h. Le composé attendu **264** est obtenu, mais avec un très faible rendement après purification en phase inverse (4%).

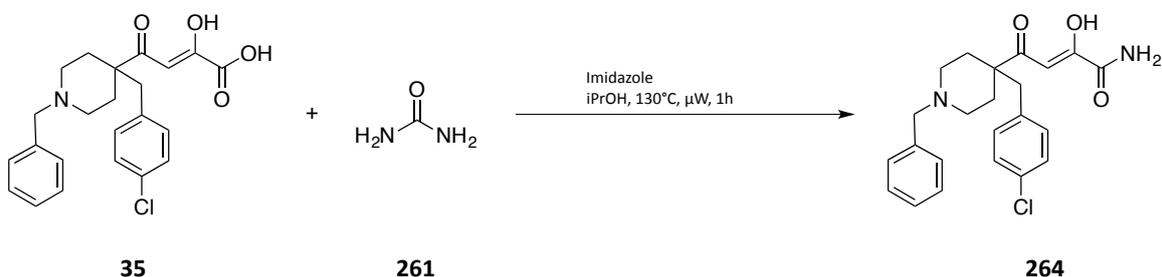
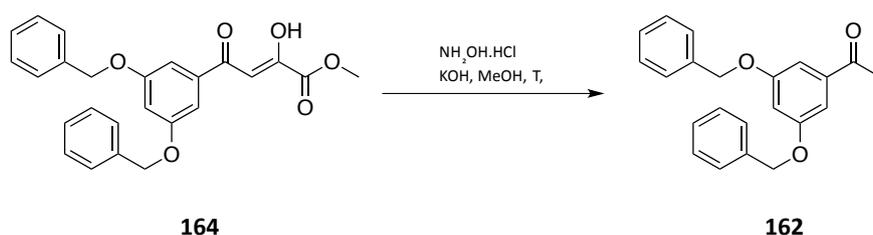


Schéma 37. Synthèse du composé **264** par réaction avec l'urée.

Bien que la conversion du composé **35** soit totale, le produit secondaire issu de la double addition de l'urée se forme à hauteur de 30% impactant donc le rendement. Par la suite, il faudrait continuer à optimiser ces conditions de réaction pour augmenter le rendement et la sélectivité.

> Dicéto-acide hydroxamiques (DAH)

Les acides hydroxamiques peuvent être obtenus à partir d'esters par action de l'hydroxylamine sous forme de sel ou en solution à 50%w dans l'eau. L'enjeu ici est d'accéder au DAH. Dans un premier temps, la réaction a été réalisée sur le DCE **164** avec le chlorhydrate d'hydroxylamine selon les conditions de Ohtsuka *et al.*¹⁸⁴ et la réaction a été suivie par LCMS. Un test colorimétrique en présence de chlorure de fer (III) a été réalisé avec les différents bruts réactionnels. Il permet de mettre en évidence la présence d'une fonction acide hydroxamique par formation d'un complexe rouge. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 21.



Entrée	Hydroxylamine	Température	Résultat
1	NH ₂ OH.HCl	TA	Rétro-Claisen
2	NH ₂ OH.HCl	μW 80°C	Rétro-Claisen

Tableau 21. Essais d'obtention du dicéto acide hydroxamique **265**.

Le DCE **164**, mis en présence du chlorhydrate d'hydroxylamine et de KOH dans le méthanol à TA pendant 24h, ne conduit pas au composé attendu, mais uniquement à la méthyle cétone **162** par réaction de rétro-claisen (Entrée 1). Les mêmes conditions ont été testées par activation micro-ondes à 80°C et conduisent au même résultat en 30 min (Entrée 2).

La réaction de rétro-claisen est donc prédominante puisque nous sommes en milieu fortement basique (KOH) et en présence de MeOH. Même à température ambiante il y a régénération de la méthyl cétone. Un essai aux micro-ondes a été conduit comme décrit par Massaro *et al.*¹⁸⁵ en vue de voir une potentielle influence sur la sélectivité de la réaction, mais le résultat est identique.

Il faut donc s'affranchir des conditions basiques et de chauffage, et donc éviter l'emploi d'une base supposée être utile pour déprotoner le sel HCl mais plutôt préférer l'utilisation de l'hydroxylamine en solution dans l'eau.

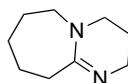
En 2016, Beillard *et al.*¹⁸⁶ ont développé une méthode de synthèse d'acides hydroxamiques n'utilisant pas de bases minérales comme KOH ou MeONa, dans le but de minimiser l'hydrolyse des esters de

¹⁸⁴ N. Ohtsuka, M. Okuno, Y. Hoshino and K. Honda, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, **14**, 9046–9054.

¹⁸⁵ A. Massaro, A. Mordini, G. Reginato, F. Russo and M. Taddei, *Synthesis*, **2007**, **2007**, 3201–3204.

¹⁸⁶ A. Beillard, Y. Bhurruth-Alcor, C. Bouix-Peter, K. Bouquet, S. Chambon, L. Clary, C. S. Harris, C. Millois, G. Mouis, G. Ouvry, R. Pierre, A. Reitz and L. Tomas, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, **57**, 2165–2170.

départ. Pour cela, ils emploient la DBU (**266**, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) comme base. Il s'agit d'une superbases nucléophile pouvant catalyser un large panel de réactions. Elle est utilisée par exemple pour catalyser des déhydrohalogénations, des carbonylations, et des amidations (Figure 81).



266

Figure 81. Structure de la base **266**, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene.

Différentes conditions ont été testées par les auteurs (Schéma 38).

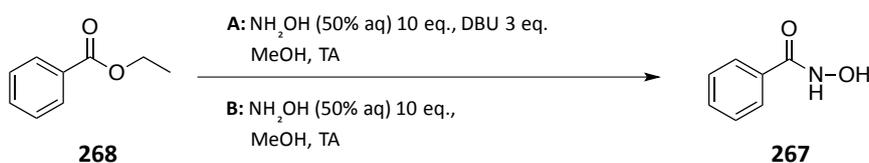
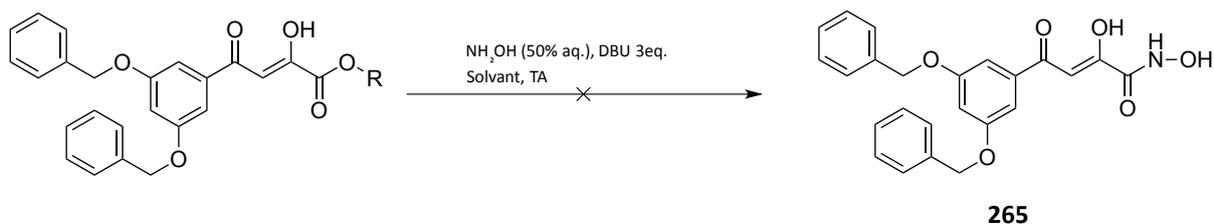


Schéma 38. Conditions opératoires pour l'obtention de l'acide hydroxamique **267** réalisées par Beillard *et al.*

La réaction de l'ester éthylique **268** sans DBU (Conditions B), conduit à la formation de l'acide hydroxamique **267** à 91% et à l'acide carboxylique correspondant à 9%. La totalité de l'ester est consommée en 3h. En présence de DBU (Conditions A), la réaction est 12 fois plus rapide et conduit même à une proportion plus faible (5%) de l'acide carboxylique non désiré.

La méthode publiée par Beillard *et al.* a ensuite été validée sur le DCE modèle **164** et **165** avec une solution aqueuse d'hydroxylamine, en présence de DBU, en faisant varier le solvant de réaction (MeOH ou EtOH). Les réactions ont été suivies par LCMS. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 22.



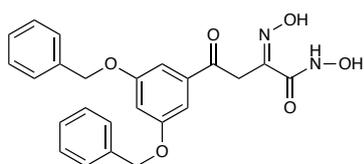
Entrée	Réactif	Hydroxylamine	Base	Solvant	Produit
1	165 R = Et	NH ₂ OH	DBU	MeOH	269a,b,c
2	165 R = Et	NH ₂ OH	DBU	EtOH	269a,b,c
3	164 R = Me	NH ₂ OH	DBU	MeOH	269a,b,c
4	164 R = Me	NH ₂ OH	DBU	EtOH	269a,b,c

Tableau 22. Conditions expérimentales testées pour la conversion des DCEs **164** et **165** en dicéto-acide hydroxamique.

Dans tous les cas, l'ester de départ **164** ou **165** est entièrement consommé au bout de 30 min. Sur l'ester modèle **165** (Entrées 1 et 2), la réaction aussi bien dans le MeOH que dans l'EtOH conduit à la formation complète d'un composé possédant une masse de 434 (435.20 [M+H]⁺, 433.18 [M+H]⁻). Après 1h de réaction, le test au FeCl₃ s'est avéré positif attestant de la présence d'un groupement acide hydroxamique. Toutefois, l'analyse LCMS ne permet pas d'identifier le composé **265** de masse 419.14. A première vue, il pourrait s'agir de l'addition du méthanol sur la fonction acide hydroxamique.

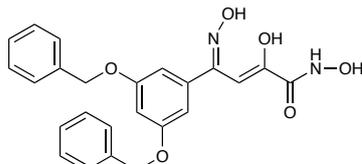
Un deuxième essai a donc été conduit dans les mêmes conditions mais à partir de l'ester méthylique **164** (Entrées 3 et 4), pour vérifier si l'éthanol s'additionne également. Nous obtenons la même masse que précédemment de 434 et non la masse supposée de 449 (Me vs Et).

Le composé **269a** ou **269b** ou **269c** porte un motif acide hydroxamique, qui a été identifié par la réponse positive au test au FeCl₃. C'est un adduit de 16 unités de masse par rapport à la masse du composé attendu **265** (MM = 419) qui a attiré notre attention durant l'analyse LCMS, et après quelques recherches bibliographiques, l'hypothèse la plus probable pourrait être celle de la formation d'un motif oxime en plus du motif acide hydroxamique, conduisant au composé **269a** ou **269b**, deux isomères pouvant se former en plus des tautomères, ou du composé **269c** (Figure 82). Ces structures chimiques sont originales et la confirmation de leur structure est en cours.



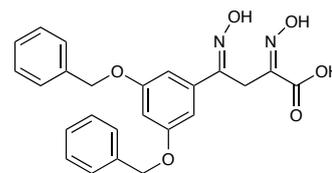
269a

Masse exacte: 434,15



269b

Masse exacte: 434,15



269c

Masse exacte: 434,15

Figure 82. Structure des composés **269a**, **269b** et **269c** potentiellement formées lors du couplage entre le DCE et l'hydroxylamine.

Afin d'obtenir le composé **265**, plusieurs stratégies ont alors été envisagées :

- 1- Un couplage peptidique entre le DCA **173** et l'hydroxylamine à l'aide d'agents de couplages tels que les carbodiimides.
- 2- L'hydrolyse de la fonction oxime des composés **269a/269b** si leur structure est confirmée. Une réaction similaire a été décrite par Quan *et al.*¹⁸⁷.
- 3- La protection temporaire du carbonyle sur le DCE **164** ou **165** pour éviter la formation du motif oxime.

Dans un premier temps, nous avons effectué un essai de couplage peptidique entre le DCA **173** et l'hydroxylamine en présence d'EDCI et de DMAP dans l'acétonitrile à TA pendant 24h. La formation du complexe **173**-EDCI est observée par signal LCMS, toutefois la masse du produit attendu est absente. La réaction n'a pas lieu.

Une publication datant de 2003 de Lu *et al.*¹⁸⁸, relate l'obtention d'un motif acide hydroxamique sur un motif quinolone en présence de DCI et de NMM additionné à 0°C à partir de l'acide carboxylique correspondant dans le DMF à pendant 24h à TA (Schéma 39).

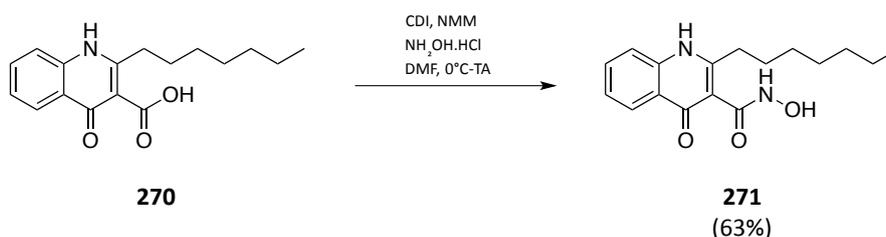


Schéma 39. Conditions opératoires pour la synthèse du composé **271** réalisée par Lu *et al.*

L'acide hydroxamique **271** y est obtenu avec 63% de rendement.

¹⁸⁷ N. Quan, X.-X. Shi, L.-D. Nie, J. Dong and R.-H. Zhu, *Synlett*, **2011**, **2011**, 1028–1032.

¹⁸⁸ C. Lu, B. Kirsch, C. K. Maurer, J. C. de Jong, A. Braunshausen, A. Steinbach and R. W. Hartmann, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, **79**, 173–183.

Des conditions identiques ont été appliquées au DCA modèle **173** (Schéma 40). La réaction a été suivie par LCMS pendant 4h.

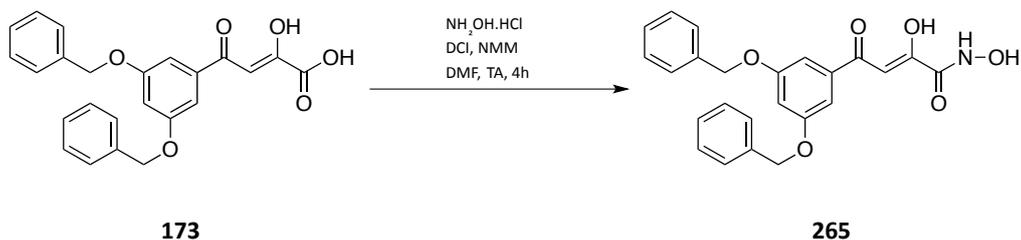


Schéma 40. Couplage peptidique entre le DCA **173** et l'hydroxylamine.

L'emploi combiné de la DCI et de NMM permet a priori à l'acide de se coupler avec l'hydroxylamine. En effet, un pic à 5.73 min est détecté en LCMS avec une masse de 419 (420.01 [M+H]⁺, 418.13 [M+H]⁻) et pourrait correspondre au produit **265**. Par ailleurs quelques traces d'oxime **269a-b** de masse 434 sont détectées suggérant le fait que la réaction ne doit pas durer plus longtemps.

Nous avons ensuite adapté la réaction sur le DCA **35** pour obtenir le DAH **272** (Schéma 41).

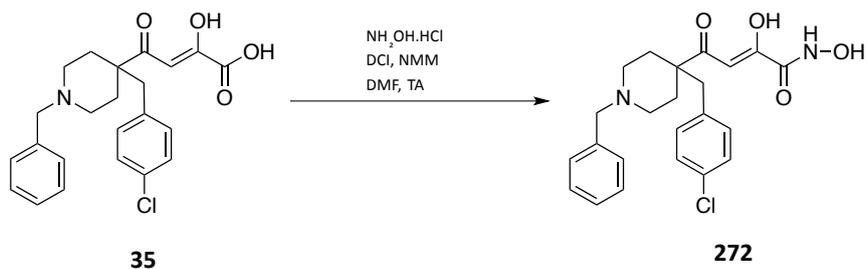


Schéma 41. Couplage peptidique employant la NMM entre le composé **35** et l'hydroxylamine.

Le composé **35** a été mis en réaction avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, la DCI, et la NMM dans le DMF à TA. Au bout de 30 min, le composé **272** est détecté en LCMS à 3.54 min (429.24 [M+H]⁺, 427.20 [M+H]⁻). Il est isolé et purifié en phase inverse, avec un faible rendement ne permettant pas de caractériser le produit par spectroscopie RMN. Les conditions opératoires de cette réaction doivent être optimisées. Sa re-synthèse est en cours ainsi que la validation de sa structure.

PARTIE 3 - Caractérisation par RMN des DCAs de 2^{nde} génération

Des problèmes d'analyse de spectres RMN pour les composés finaux ont été rencontrés. Pour des raisons de solubilité, les DCEs et DCAs ont été analysés en solution dans le DMSO-d₆. Les spectres obtenus présentent des raies très élargies, caractéristiques de phénomènes d'échanges. De plus, les DCEs sont instables à TA et à des températures supérieures. Compte-tenu de cette instabilité, les analyses RMN de ces composés ne sont pas présentées ici, et il a aussi été choisi de ne pas étudier leur activité biologique, alors qu'ils avaient été envisagés comme pro-drogues. En ce qui concerne les DCAs, aucune dégradation n'est notée et les analyses ont pu être réalisées. Toutes les expériences RMN sur les produits finaux ont été réalisées par le Dr. Carine Baragney (IBMM, Montpellier).

a. Les phénomènes d'échanges en RMN

L'existence de phénomènes dynamiques peut avoir des conséquences sur l'allure des spectres obtenus. L'étude RMN dynamique permet d'étudier ces différents échanges chimiques ou conformationnels qui peuvent être de différente nature : rotations restreintes autour de liaisons, inversion pyramidale de l'azote, inversion de cycles, équilibre de tautomérisation céto-énolique, échange de proton intermoléculaire, etc...

La rotation restreinte de la liaison N-CO du DMF est un cas typique d'échange conformationnel qui peut être observé par RMN et différents régimes d'échanges sont à distinguer (Figure 83). L'échange lent ($T < T_c$, avec T_c = température de coalescence) est le régime pour lequel des signaux distincts et relativement fins sont observés pour chaque état/conformation. Dans le cas du DMF, il a lieu à 40°C et on distingue en effet les deux signaux caractéristiques des groupements CH₃. L'échange intermédiaire ($T = T_c$) correspond à la coalescence des signaux, sous forme d'une large bande à 120°C. Enfin, l'échange rapide est l'autre extrême, pour lequel les raies ont coalescé en une seule raie fine ($T > T_c$) qui s'observe à 160°C pour le DMF.

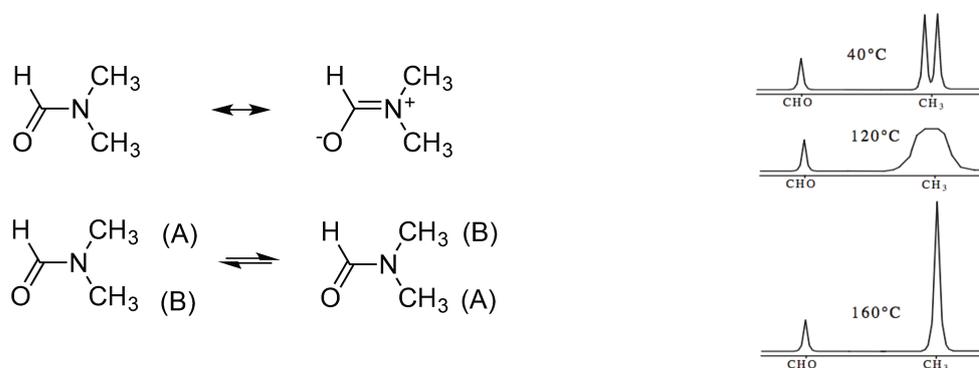


Figure 83. Gauche : formes mésomères et équilibre rotationnel du DMF. Droite : Spectre RMN ¹H du DMF à 40°C, 120°C et 160°C.

Comme le prouve l'analyse de ce spectre, ce n'est donc pas l'équilibre céto-énolique qui est responsable de l'élargissement des pics.

Equilibre conformationnel de la pipéridine

Les molécules cibles possèdent une pipéridine centrale pouvant s'interconvertir entre ses deux formes chaises^{190,191}. En effet, la pipéridine présente deux conformations chaises selon si la liaison entre l'azote et son substituant est en position axiale ou équatoriale (Figure 85).

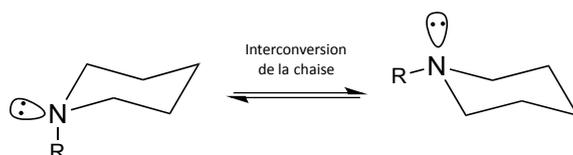


Figure 85. Equilibre conformationnel de la pipéridine.

Pour des pipéridines N-substituées comme des N-méthylpipéridines, la conformation dans laquelle le substituant se trouve en position équatoriale est plus stable^{192,193}. Ces différentes conformations sont en équilibre et s'échangent plus ou moins vite en fonction du milieu et de la température.

Inversion de l'azote

Un autre phénomène pouvant se produire, est l'inversion de l'azote de la pipéridine. En effet, cette inversion se produit car l'azote possède un doublet non-liant et que la barrière d'énergie pour qu'il s'inverse est basse¹⁹⁴. Sur les cycles à 3 et 4 (Aziridine et Azetidine), le cycle est trop tendu pour autoriser l'inversion. En revanche sur des cycles plus souples (5 à 6), l'inversion peut se produire. L'inversion de l'azote est souvent très rapide et peut être influencée par la présence de traces d'acide.

Protonation de l'amine de la pipéridine

Dans le cas des composés aminés, il existe également un équilibre de protonation/déprotonation. En général cet équilibre est rapide, mais il dépend du solvant utilisé.

c. Solutions mises en œuvre

Plusieurs solutions sont envisageables pour palier ce problème d'analyse et parvenir à obtenir des signaux plus fins, mieux définis et interprétables.

Solvant d'analyse

¹⁹⁰ M. Rubiralta, E. Giralta and A. Diez, Eds., *Studies in Org. Chem.*, Elsevier, **1991**, **43**, 34–87.

¹⁹¹ J. B. Lambert and R.G. Keske, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, **88**, 620-622.

¹⁹² P. J. Crowley, M. J. T. Robinson and M. G. Ward, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1974**, 825–826.

¹⁹³ L. Carballeira and I. Pérez-Juste, *J. Comput. Chem.*, **1998**, **19**, 961–976.

¹⁹⁴ F. A. L. Anet and I. Yavari, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, **99**, 2794–2796.

Une solution envisagée pour améliorer l'aspect des spectres consiste à changer de solvant. En effet, la modification de la polarité et de la proticité du solvant peut provoquer des différences significatives sur les spectres. L'utilisation de solvants aromatiques de type pyridine ou benzène pourrait stabiliser un des conformères à travers des interactions d'empilement π - π . L'objectif étant de trouver un solvant permettant à la fois de dissoudre le composé et d'observer un spectre analysable, nous n'avons finalement pas trouvé meilleur solvant que le DMSO. De plus, nous allons être amené à chauffer parfois drastiquement nos échantillons ce que nous permet sa température d'ébullition suffisamment haute ($T_{eb} = 189^\circ\text{C}$).

Augmentation de la température

Les variations de températures ont un effet significatif sur les systèmes en échange et sont fréquemment utilisées pour étudier les systèmes dynamiques. L'emploi du DMSO comme solvant d'analyse ne permet pas d'envisager de figer le système en descendant à basse température. A l'inverse, en chauffant suffisamment pour accélérer les échanges, nous parvenons à obtenir des pics plus fins, représentatifs de la moyenne des différentes espèces en solution.

d. Résultats

La Figure 86 montre les spectres de RMN ^1H du composé **152** entre 25°C et 90°C .

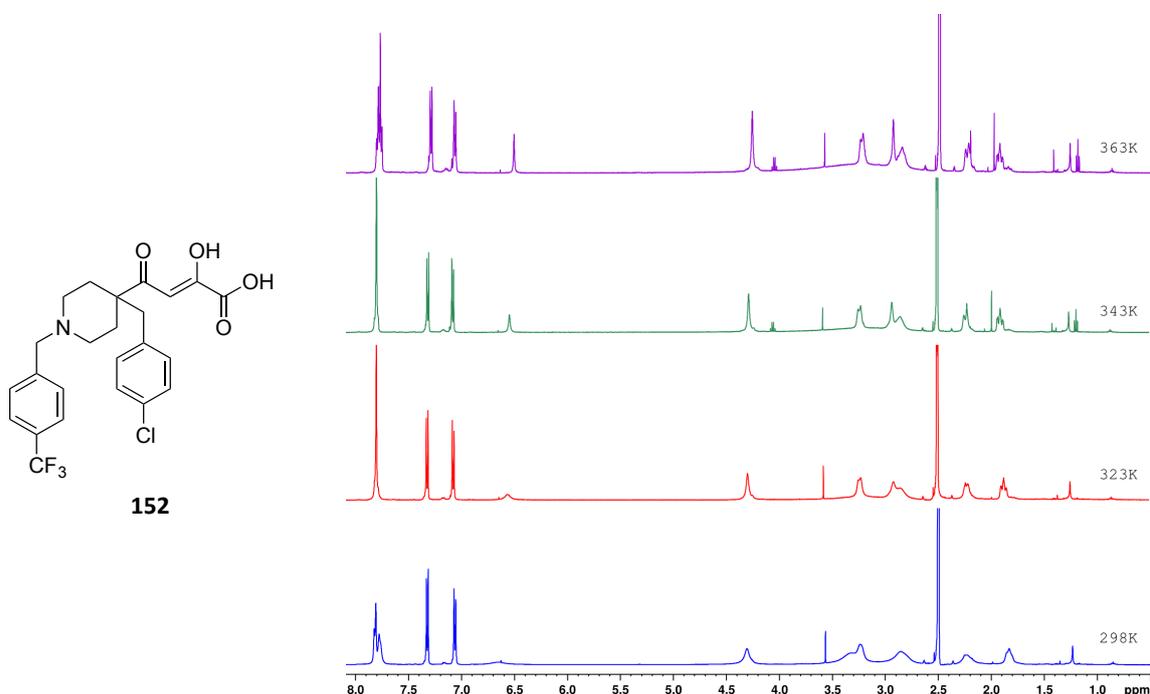


Figure 86. Spectres RMN $1\text{D } ^1\text{H}$ du composé **152** dans le DMSO-d_6 entre 25°C (298 K) et 90°C (363 K).

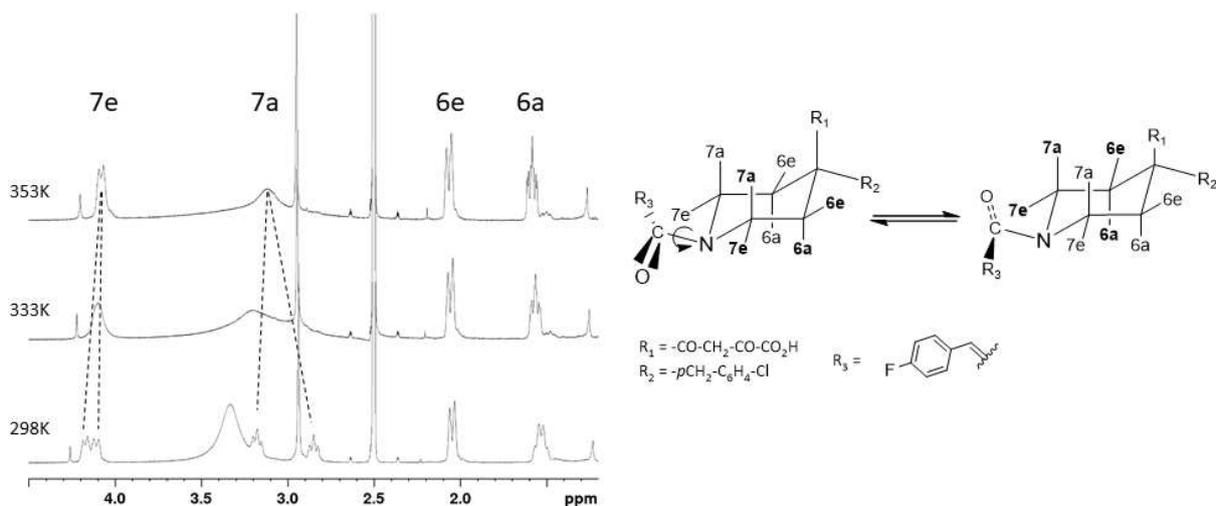


Figure 87. Spectre de RMN ^1H du composé **145** dans la zone des méthylènes de la pipéridine à 25°C (298 K), 60°C (333 K), et 80°C (353 K).

Si les méthylènes de la pipéridine ne sont pas équivalents 2 à 2 à 25°C, c'est en raison de la rotation restreinte autour de la liaison C-N. En effet, la présence du carbonyle sur l'azote confère à celle-ci un caractère partiel de double liaison. L'environnement des méthylènes (et en particulier celui qui est en α de l'azote) est différent selon l'orientation du carbonyle et l'équilibre entre les 2 rotamères est suffisamment lent à TA pour que chacun des 4 hydrogènes des méthylènes en position 7 donne un signal. Enfin, le composé N-sulfonylé **147** présente une dynamique rapide à 25°C et tous ses signaux sont fins et interprétables à température ambiante.

> *Composés N-alkylés, N-arylés et N-benzylés*

Pour les composés N-alkylés, N-arylés et N-benzylés, où l'azote de la pipéridine forme une amine tertiaire, et l'inversion pyramidale de l'azote conduit à un équilibre entre les 4 conformères (Figure 88).

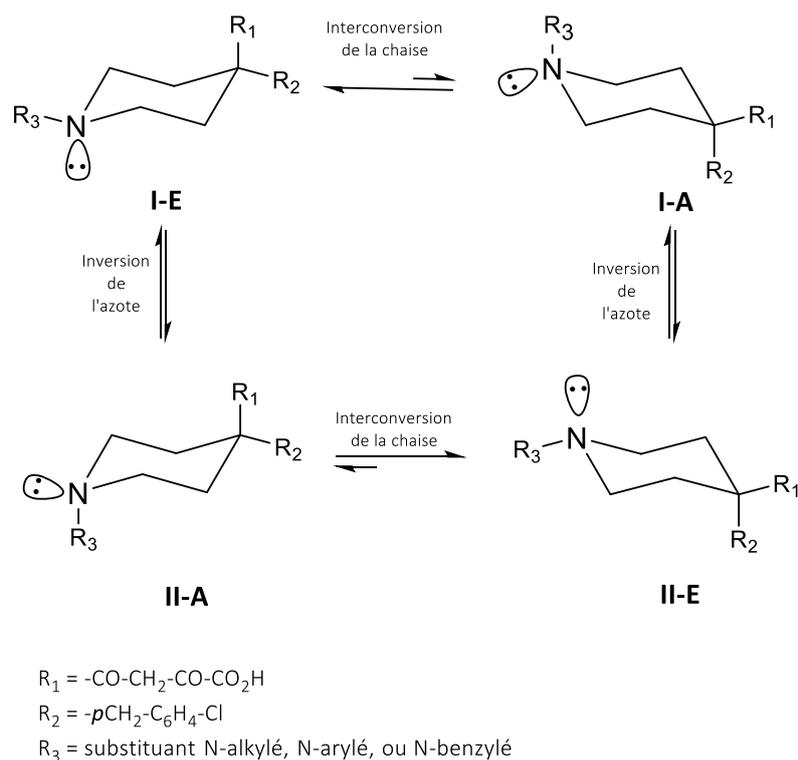


Figure 88. Equilibres conformationnels des composés N-alkylé, N-arylés, et N-benzylés.

Ainsi, l'inversion de l'azote du conformère **I-E** (plus stable que **I-A**), va conduire au conformère **II-A**. Ce dernier étant déstabilisé par la position axiale du groupement R_3 , le cycle va alors basculer vers la conformation **II-E** où R_3 se trouve en position équatoriale. La cinétique de ces échanges conduit donc à un élargissement des raies qui impose de fortes montées en température.

Cette montée en température a été globalement suffisante pour observer des signaux interprétables. Les composés **62**, **137-141**, **148-153** ont bénéficié d'un chauffage allant de 60°C à 90°C.

Dans l'optique de trouver une alternative au chauffage nous avons envisagé de mettre à profit le caractère basique des amines pour améliorer la qualité des spectres.

Influence de l'ajout de TFA à la solution

Les composés N-alkylés, N-arylés et N-benzylés diffèrent des composés précédents car ils possèdent une fonction amine tertiaire. Or, les amines sont susceptibles de se protonner en milieu acide, ce qui a pour effet de réduire considérablement la vitesse d'interconversion entre les conformères car l'azote du cycle pipéridine étant entièrement protonné, l'inversion pyramidale de s'en trouve bloquée (Figure 89). On passe alors à un régime d'échange lent et les deux conformères les plus stables apparaissent alors sur le spectre RMN sous forme de 2 jeux de signaux distincts (Figure 89).

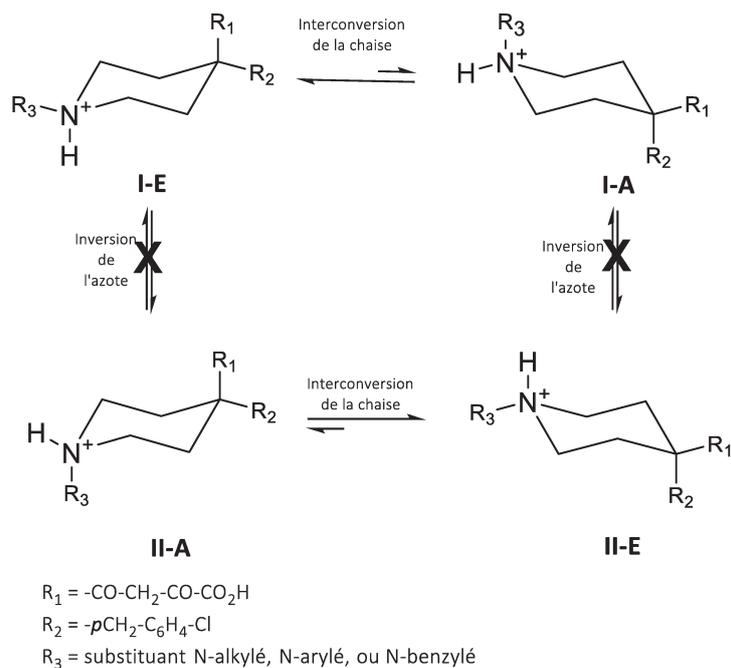


Figure 89. Equilibres conformationnels des DCAs de 2^{de} génération N-alkylé, N-arylés, et N-benzylés en milieu acide.

L'addition de TFA dans le milieu peut ainsi être une alternative au chauffage des composés, où l'on obtenait un signal affiné moyenné sur toutes les conformations.

Par exemple, le composé 138 a dû être chauffé à 70°C pour obtenir un spectre correct en DMSO seul. Par ajout de 0.2% de TFA à la solution, nous avons pu obtenir des pics fins et dédoublés même à température ambiante (Figure 90).

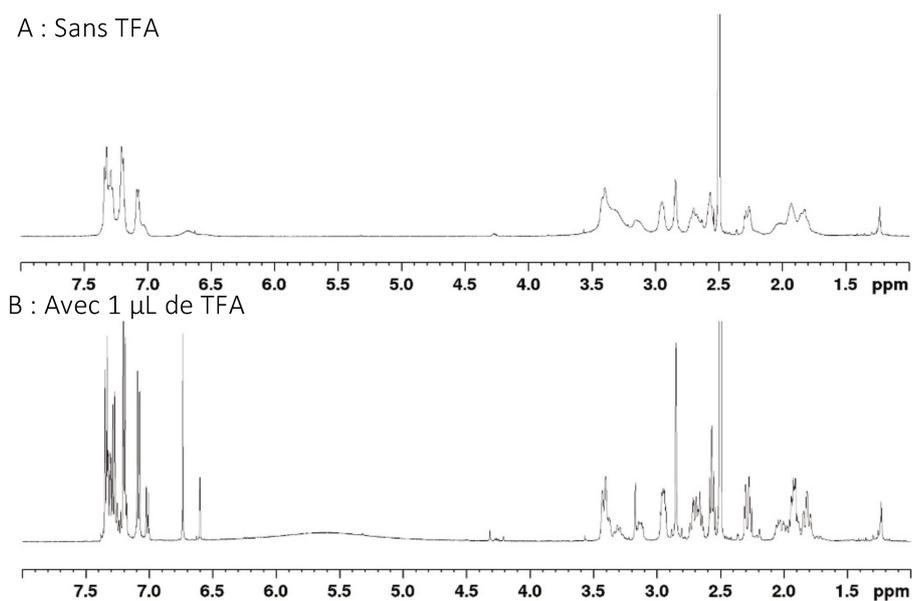


Figure 90. Spectres RMN 1D ¹H du composé 138 à 25°C sans TFA (A), et avec TFA (B).

De cette manière, un régime d'échange ralenti est observé, présentant uniquement les deux conformères les plus stables en proportion 1:3.

Par contre, sur un composé N-acylé comme le composé 144, l'ajout de TFA n'a aucun effet (Figure 91).

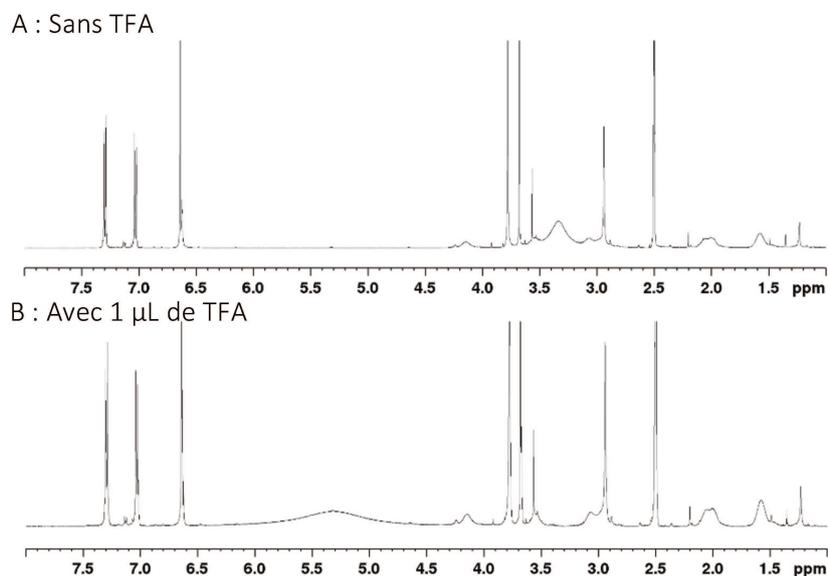


Figure 91. Spectres RMN 1D ^1H du composé 144 à 25°C sans TFA (A), et avec TFA (B).

Détermination des conformations majoritaires des DCAs de 2nd génération

Une étude conformationnelle a été réalisée pour deux composés représentatifs des DCAs N-alkylés et N-acylés par spectre 2D NOESY. Cette séquence homonucléaire donne accès à des corrélations qui traduisent, soit une interaction dipolaire, donc une certaine proximité spatiale, soit un échange chimique.

Le spectre 2D NOESY du composé N-alkylé 138 en présence de TFA est présenté dans la Figure 92.

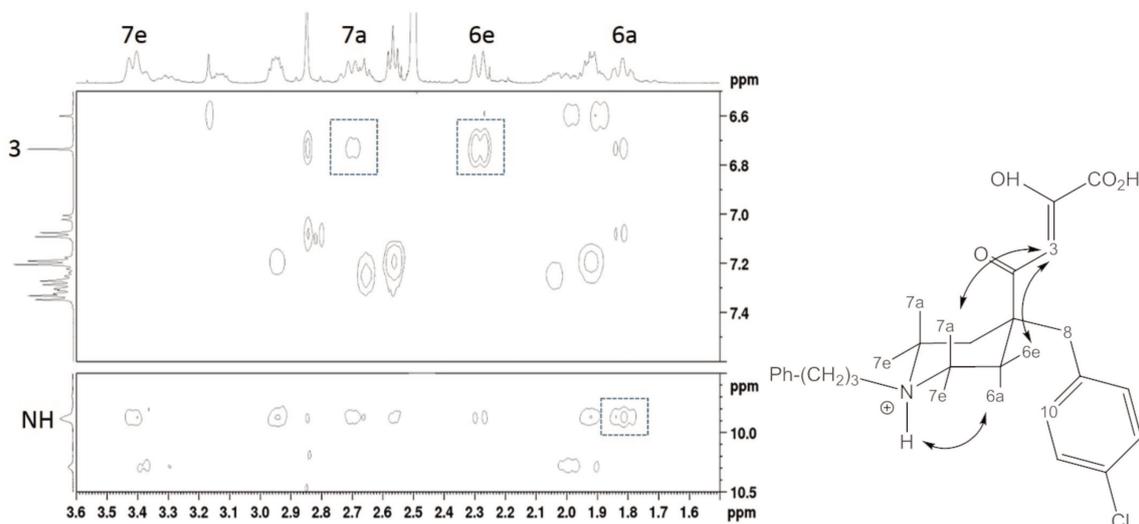


Figure 92. Gauche : parties du spectre RMN 2D NOESY du composé **138** (298 °C après addition de TFA). Droite : structure du conformère majoritaire. Les interactions importantes relevées pour l'espèce majoritaire sont reportées sur le spectre et sur la structure.

La corrélation entre l'hydrogène fixé sur l'azote et le proton H_{6a} est notable, ce qui confirme le positionnement du groupement phénylepropyle en position équatoriale. De plus, le proton énolique H₃ corrèle avec les protons méthyléniques H_{7a} et H_{6e} présents sur le plan supérieur de la chaise montrant que la partie DCA se positionne en *cis* du groupement phénylepropyle. Les deux substituants aromatiques sont donc en *trans*. La conformation **I-E** est donc la forme privilégiée.

L'analyse du spectre 2D NOESY pour le composé **144** a également permis de déterminer la structure du conformère majoritaire (Figure 93). Les pics relevés, contrairement au cas précédent, correspondent à la structure moyenne puisqu'on ne peut séparer les conformères par addition d'acide. Cependant, la conformation majoritaire est suffisamment représentée dans le mélange pour que les corrélations soient significatives.

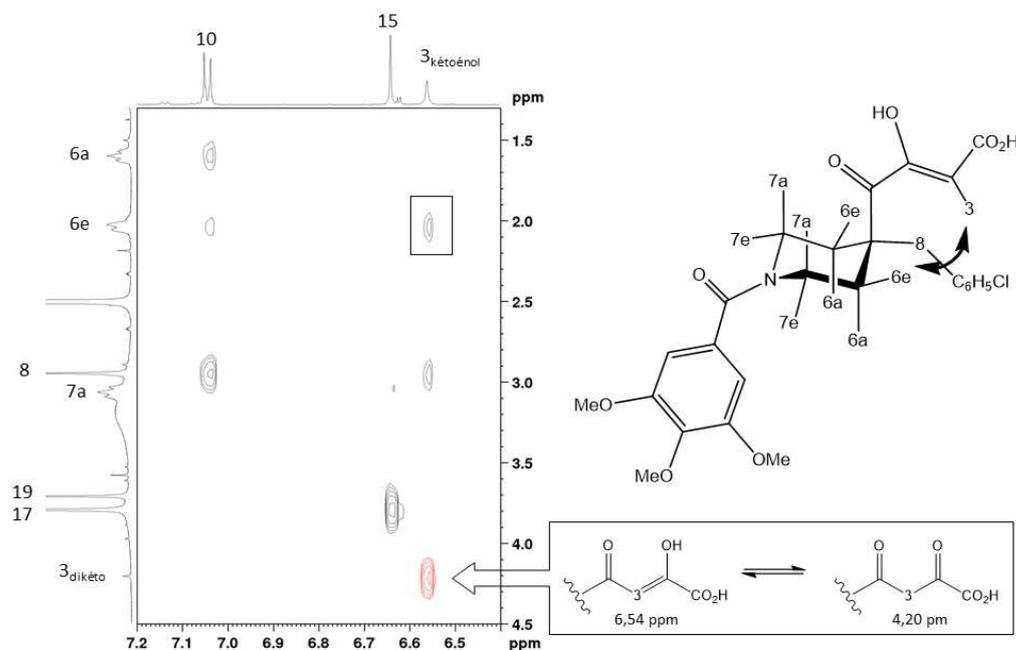


Figure 93. Gauche : parties du spectre RMN 2D NOESY du composé **144** (50°C, DMSO-d₆). Droite : structure du conformère majoritaire. Les interactions montrant que la conformation **I-E** est la forme privilégiée sont reportées sur le spectre et sur la structure.

Les mêmes corrélations que celles notées pour le composé **138** entre le proton énolique H₃ et les protons méthyléniques H_{7a} et H_{6e} sont visibles sur le spectre, montrant que pour ce composé acylé également la conformation **I-E** est privilégiée.

Chapitre 3. Evaluation biophysique et
biologique des DCAs de 2^{nde} génération
et des bioisostères du composé 35

Chapitre 3 - Evaluation biophysique et biologique des DCAs de 2nde génération et des bioisostères du composé 35

Les DCAs de 2nde génération ont été évalués par différentes techniques pour déterminer leur aptitude à inhiber les deux nucléases virales cibles d'Arénavirus.

Premièrement, la stabilité thermique des deux enzymes en présence des différents ligands a été étudiée par fluorimétrie différentielle à balayage (DSF). Cette étude a été complétée par la détermination de l'affinité des nucléases pour les DCAs par thermophorèse à micro-échelle (MST).

Dans un second temps, l'activité des composés a été évaluée *in vitro*. Les composés ont été testés contre l'exonucléase de MOPV par test radiomarqué (Thi-Hong Van Nguyen, AFMB). Un composé a été testé de façon préliminaire contre l'activité endonucléase de la protéine L du LCMV par gel d'électrophorèse révélé au bleu de méthylène (Dr. Sergio Hernandez, AFMB).

Enfin, l'efficacité des DCAs a été déterminée *in cellula* grâce à un test en mini-génome (Dr. Sergio Hernandez, AFMB). Ce test s'est accompagné de l'évaluation de la cytotoxicité des composés et de leur stabilité en milieu de culture. En parallèle, nous avons eu l'opportunité d'envoyer certaines molécules pour être testées contre le virus de Junin (Dr. Cybel Garcia, Argentine).

En dernier lieu, les composés ont été envoyés pour être testés sur différents *Bunyavirales*, ordre comportant des familles de virus étroitement proches des Arenavirus : les hantavirus (Dr. Nicole Tischler, Cienca & Vida, Chili), le virus Tahyna, le virus de la vallée du Rift, et le virus Hazara (Dr. Gilles Querat, IRD, Marseille). Quelques résultats ont été obtenus auprès du Dr. Querat.

I. Evaluation biologique des DCAs et analogues de 2^{nde} génération contre l'endonucléase du LCMV

1. Fluorimétrie différentielle à balayage (DSF)

a. Principe de la technique

La fluorimétrie différentielle à balayage (DSF ou TSA, *Thermal Shift Assay*) permet d'évaluer la stabilité d'une protéine en présence d'un fluorophore¹⁹⁵ dans des conditions particulières de milieu et en fonction de la température. La stabilité de la majorité des protéines décroît avec l'augmentation ou la diminution de la température. Lorsque la température augmente, l'énergie libre de Gibbs ΔG de dépliement de la protéine diminue jusqu'à atteindre l'équilibre ($\Delta G = 0$), moment où les concentrations de protéine repliée et dépliée sont égales. Cet état correspond à la température de dénaturation de la protéine T_m ¹⁹⁶ (Figure 94). Expérimentalement, seul le T_m des hautes températures est accessible et sera utilisé dans toute la suite de ce projet.

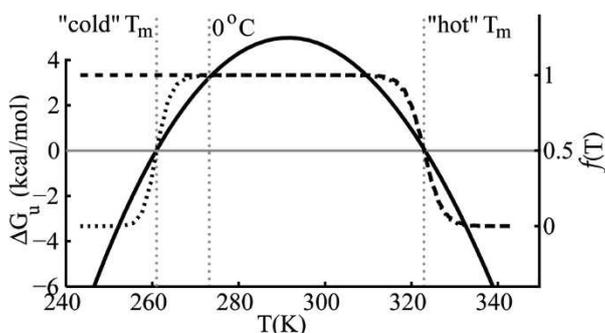
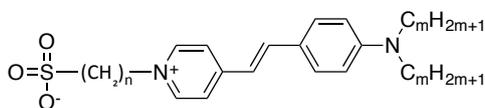


Figure 94. Transition thermodynamique du repliement d'une protéine. Ordonnée gauche : stabilité de la protéine en fonction de la température. Ordonnée droite : fraction de protéine repliée.

C'est ce phénomène qui est observé et enregistré en DSF grâce à un appareil de RT-PCR. Le signal enregistré est une fluorescence émise par un fluorophore, sensible à son environnement, ajouté à la protéine. Le fluorophore le plus couramment utilisé est le Sypro orange **261** (Figure 95).



261

Figure 95. Structure chimique du Sypro Orange **261** avec $m = 2 - 10$, $n = 3 - 4$.

¹⁹⁵ M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane and F. R. Salemme, *J. Biomol. Screen.*, **2001**, **6**, 429–440.

¹⁹⁶ F. H. Niesen, H. Berglund and M. Vedadi, *Nature Protocols*, **2007**, **2**, 2212–2221.

En solution aqueuse, l'émission de fluorescence du Sypro Orange **261** est atténuée par un phénomène d'extinction car il s'auto-associe. Une fois le fluorophore en présence de la protéine, le système est soumis à un gradient de température entre 20°C et 95°C. Au fur et à mesure de l'augmentation de la température, la protéine va se déplier, et donc exposer ses régions hydrophobes. L'environnement du fluorophore devenant de plus en plus hydrophobe, l'effet d'extinction de sa fluorescence va s'arrêter et ainsi le signal de fluorescence augmentera de manière significative. L'appareil enregistre la fluorescence émise en fonction de la température et fournit une courbe similaire à celle de la Figure 96. Le point d'inflexion de chaque courbe sigmoïde résultante correspond ainsi à la température de dénaturation de la protéine, autrement dit, la température à laquelle la concentration en protéine dénaturées et repliées est égale. Plus le T_m est élevé, plus la protéine est stable dans le milieu choisi.

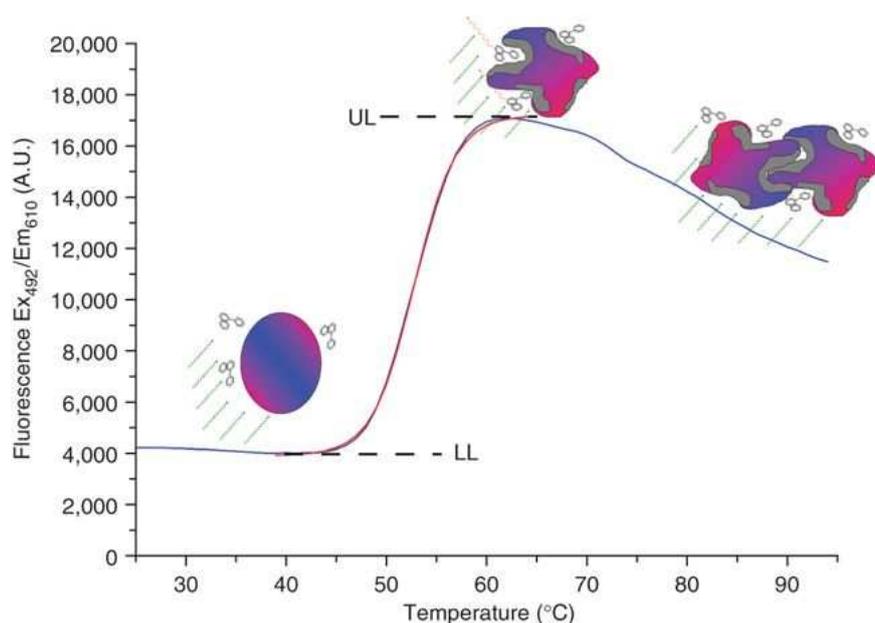


Figure 96. Courbe de DSF illustrant son principe (selon Niesen et al.¹⁹⁶). Le fluorophore est représenté par les trois cycles aromatiques. En présence d'une protéine globulaire (sphère colorée sur le schéma), une fluorescence initiale émet. Au fur et à mesure que la protéine se dénature, des régions hydrophobes s'exposent (zones grises), et il y a une forte émission de fluorescence de la part du fluorophore liée à ces régions. Sur la fin de l'enregistrement du signal, aux plus hautes températures, la fluorescence diminue car les protéines dénaturées s'agrègent dans le milieu et le phénomène observé n'est plus spécifique.

Cette technique permet de caractériser la capacité d'un tampon à stabiliser une protéine mais il est possible également de l'utiliser pour mesurer l'effet d'un ligand, que ce soit une molécule ou une autre protéine ou tout autre co-facteur. La mesure d'une interaction protéine-ligand met en jeu l'équilibre de liaison du ligand à la protéine et celui du repliement de la protéine (Figure 97).

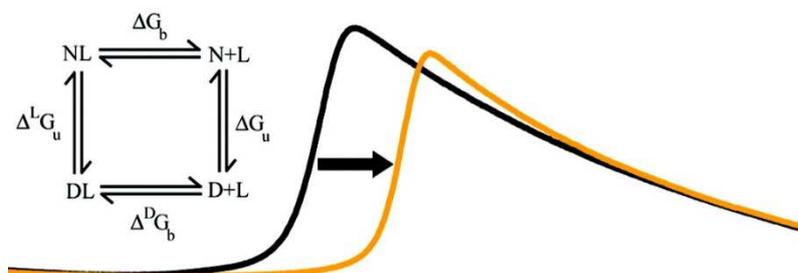


Figure 97. Variation du T_m induite par une liaison à un ligand : équilibres de liaison du ligand et de repliement de la protéine. N : protéine native repliée. D : protéine dénaturée dépliée. L : ligand. NL : complexe natif protéine-ligand. DL : complexe dénaturé protéine-ligand.

En présence d'un ligand se liant préférentiellement à l'état natif de la protéine (complexe NL, Figure 97), une augmentation du T_m est observée¹⁹⁷.

L'avantage de cette technique est qu'elle peut être mise en place à haut-débit (plaque 96 puits). Elle permet ainsi de cribler différents tampons pour optimiser des purifications ou des conditions de stockage des protéines. De plus, elle permet d'étudier dans une première étape la capacité d'une famille de ligands à stabiliser la protéine d'intérêt. Nous avons ainsi utilisé cette technique pour caractériser la chimiothèque de DCAs synthétisée au cours de ce projet de thèse.

b. Résultats : évaluation des ligands synthétisés sur l'endonucléase du LCMV

Pour plus de clarté dans l'analyse des résultats, les DCAs de 2nde génération ont été classés selon la modification portée sur l'azote de la pipéridine (Figure 98).

¹⁹⁷ C. J. Layton and H. W. Hellinga, *Biochemistry*, **2010**, **49**, 10831–10841.

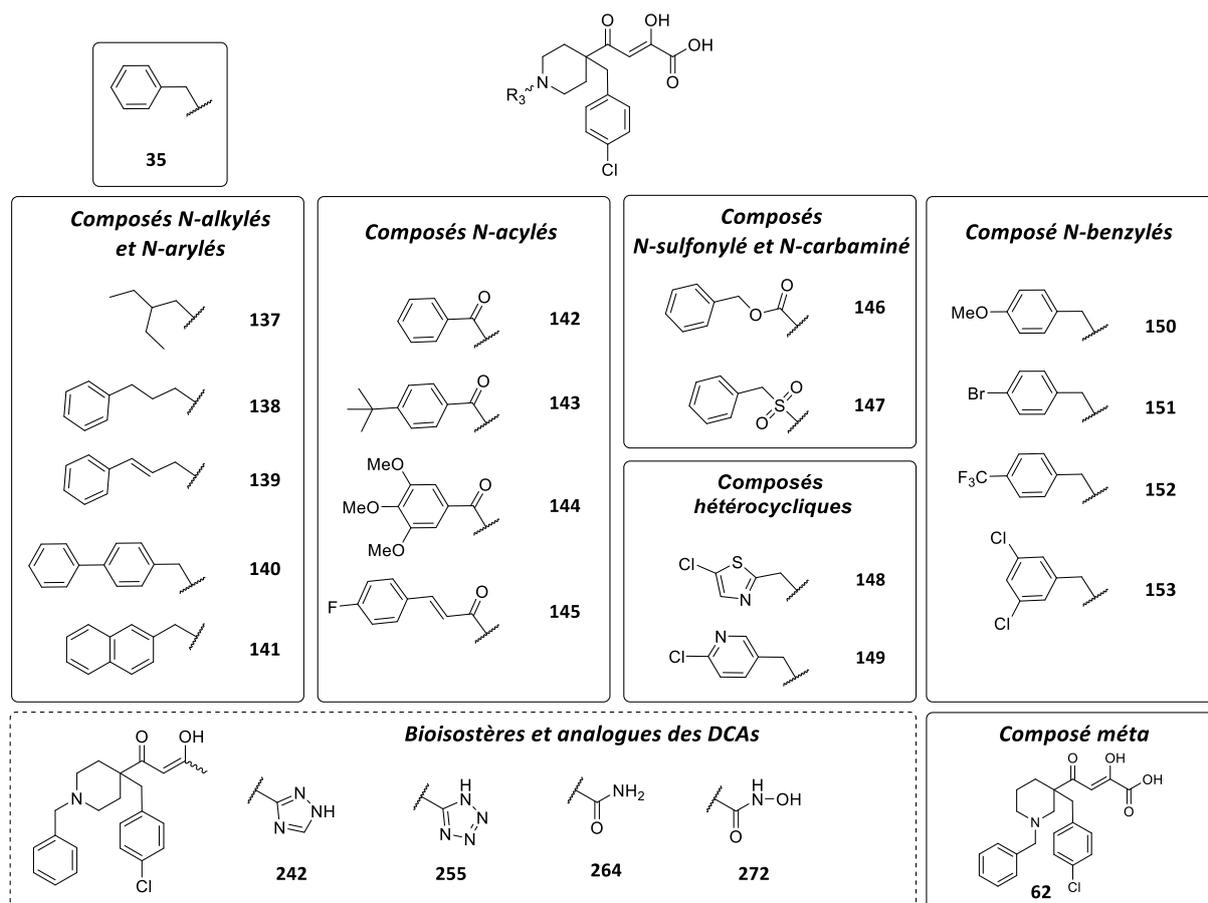


Figure 98. Récapitulatif des DCAs de 2nde génération synthétisés et leur classification.

Le composé **137** : composé à chaîne alkyle

Composés **138** à **141** : composés à chaîne aryle

Composés **142** à **145** : composés N-acylés

Composés **146** et **147** : composés N-sulfonylé et N-carbaminé

Composés **148** et **149** : composés hétérocycliques

Composés **150** à **153** : composés N-benzylés

Composé **62** : composé méta

Composés **242**, **255**, **264** et **272** : bioisostères et analogues du composé **35**

Les DCAs synthétisés ont été testés par DSF afin d'évaluer leur capacité à stabiliser l'endonucléase du LCMV. La protéine (10 μ M) et le Sypro Orange dans un tampon approprié (HEPES 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, DTT 1 mM) ont été mis en présence ou non d'ions ($MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM), de ligands (100 μ M ou 500 μ M, 5% DMSO final) et ont été soumis à une rampe de température allant de 20°C à 95°C.

Les résultats obtenus, sous forme de ΔT_m (°C) sont rassemblés dans la Figure 99. Ils sont présentés par la variation de T_m (°C) par comparaison avec la valeur de référence obtenue en présence d'ions mais en absence de ligand (wT + Mg + Mn, Figure 99). Les données sont classées par familles de molécules.

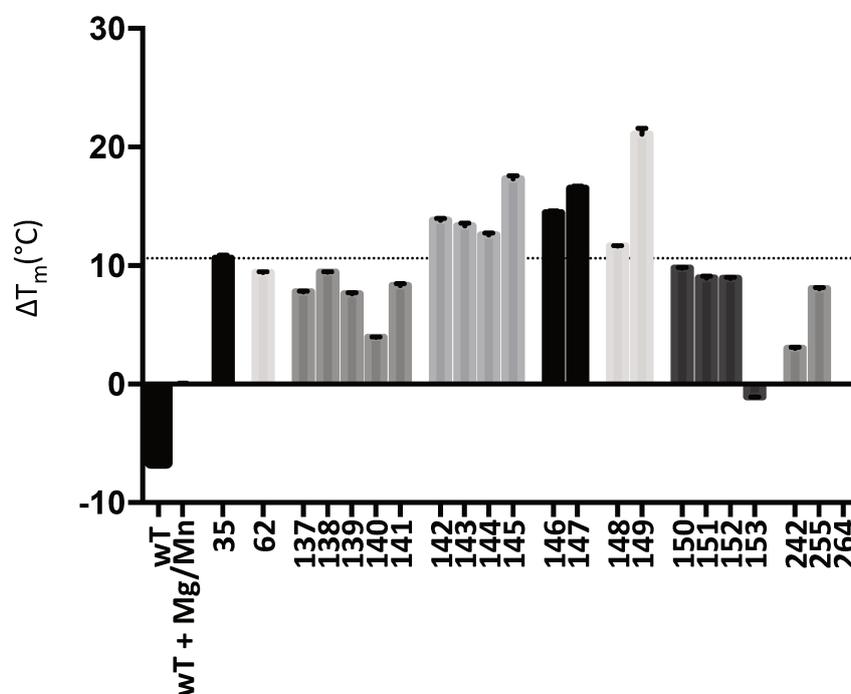


Figure 99. Stabilité thermique de l'endonucléase du LCMV déterminée par DSF. wT : enzyme sans ions. wT + Mg/Mn : enzyme de référence avec ions. Composé 35 et 62 : composé de référence et composé méta. Composé 137-141 : composés à chaîne alkyle ou aryle. Composés 142-145 : composés N-acylés. Composés 146 et 147 : composés N-sulfonylé et N-carmabiné. Composés 148 et 149 : composés hétérocycliques. Composés 150-153 : composés N-benzylés. Composés 242, 255 et 264 : bioisostères et analogues. Ratio protéine/Ligand (50 ou 10 pour les composés dont la solubilité est incertaine dans le tampon de réaction).

A l'exception du composé 153 et du composé 264, tous les ligands participent à la stabilisation de la protéine (Figure 99). La stabilisation, qui découle d'une interaction supposée entre l'enzyme et le ligand, est variable avec des ΔT_m allant de +3 à +20°C, ce qui laisse penser que l'enzyme ne se comporte pas de manière identique avec tous les composés. En absence d'ions, la stabilisation par les ligands n'est pas retrouvée, ce qui indique, comme attendu, que l'interaction enzyme-ligand est médiée par les ions Mg et Mn.

Ces données de DSF ne permettent pas d'avoir des réponses claires sur la capacité de l'enzyme à accommoder ou discriminer tel ou tel ligand mais donnent des pistes d'analyse qui ont été traitées par familles de molécules et qui ont permis de mettre en évidence quelques déterminants de l'interaction enzyme-ligand de manière qualitative.

Le composé **35** de 1^{ère} génération a été choisi comme composé de référence pour l'analyse des résultats et il provoque un effet stabilisant de +11°C. Le composé **62** pour lequel l'azote de la pipéridine est positionné en méta, a quasiment le même effet stabilisant que le composé **35** ($\Delta T_m = +9$).

A l'exception du composé **140**, porteur d'un groupement bi-phényle qui est peu stabilisant, les dérivés à chaîne alkyle (composé **137**) et aryle (composés **138**, **139** et **141**) entraînent une stabilisation avec un ΔT_m de +8°C. Si tous ces composés sont globalement moins stabilisants que le composé **35**, ils semblent toutefois être d'aussi bons ligands.

Les composés N-acylés **142** à **145**, N-carbaminé **146** et N-sulfonylé **147** stabilisent considérablement la protéine avec des ΔT_m allant de 13°C à 17°C, suggérant que ce sont aussi de bons ligands. Dans ces séries, l'effet le plus important est obtenu avec le composé **145**, suggérant que l'homologation de deux carbones sur la chaîne amide renforce l'interaction avec la protéine.

Les composés hétérocycliques **148** et **149** pour lesquels le phényle est remplacé par un hétérocycle chloré thiazole ou pyridine stabilisent encore plus la protéine et en particulier le composé **149** avec un surprenant ΔT_m de +20°C. C'est l'effet le plus important observé, qu'il est difficile de comprendre.

Concernant les effets dus aux différents descripteurs (-I ou +M) présents sur les composés N-benzylés (**150** à **153**), il n'y a pas de variation majeure, à l'exception du composé **153** qui est le seul composé déstabilisant ($\Delta T_m = -1^\circ\text{C}$) et qui présente une di-substitution du cycle aromatique en méta par deux -Cl. Comparé au composé de référence **35**, la présence de 2 atomes de chlore sur le phényle fait du composé **153** un très mauvais ligand.

Enfin, au niveau des bioisostères, le composé **242** stabilise peu l'enzyme ($\Delta T_m = +3^\circ\text{C}$) tandis que le composé **255** stabilise l'enzyme autour de +8°C. Le composé **264** n'apporte aucun effet sur la stabilisation ou la déstabilisation de l'enzyme.

Pour résumer, à l'exception des composés **153** et **264**, tous les composés stabilisent la protéine. Cette étude met toutefois en évidence que suivant la nature du groupement porté par l'azote de la pipéridine, l'impact sur la stabilisation de l'endonucléase du LCMV est différent et par voie de conséquence l'interaction n'est pas la même.

Par exemple, contrairement aux composés N-alkylés, et N-arylés l'azote de la pipéridine sur les composés N-acylés (**142-145**), N-sulfonylé (**147**), et N-carbaminé (**146**) ne peut pas être protonné. Cela doit jouer un rôle dans la fixation du ligand dans la protéine. En particulier, l'oxygène du carbonyle de l'amide, est très basique et est un bon accepteur de liaison H et est donc capable de former des interactions supplémentaires avec les résidus du site actif.

Le composé **149** provoque un effet particulièrement important ($\Delta T_m = + 20^\circ\text{C}$), qui pourrait être du à l'effet électronique du noyau pyridine riche en électrons.

Enfin, la modification de la fonction acide carboxylique de la partie DCA par des bioisostères ou analogues montre une nette baisse de la stabilisation de l'enzyme par rapport au composé de référence **35**. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les fonctions dicéto-triazoles et dicéto-tétrazoles sont moins acides que le motif DCA et cela pourrait avoir un impact sur l'efficacité de chélation des ions, dont on sait que c'est le moteur principal de la fixation à l'enzyme.

L'étape suivante a consisté à générer des données quantitatives en évaluant l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour ces ligands par MST afin de déterminer leurs K_d respectifs.

2. Thermophorèse à micro-échelle (MST)

a. Principe de la technique

Le principe de thermophorèse repose sur le mouvement de molécules sous l'influence d'un gradient de température microscopique¹⁹⁸. L'effet thermophorétique dans les liquides est observé pour la première fois par Carl Ludwig en 1856. En effet, un gradient de température en solution aqueuse contenant des molécules n'induit pas uniquement un flux de chaleur mais également un flux de masse. Il s'agit en fait d'un non équilibre local provoquant la diffusion d'une masse. Un phénomène hors équilibre qui s'appelle aussi la thermodiffusion, la réponse à un gradient de température.

Classiquement, le mouvement des molécules dans un gradient de température est décrit de manière linéaire selon l'équation ci-après. La vitesse d'une molécule est linéairement dépendante du gradient de température, avec la constante proportionnelle D_{Ti} appelé coefficient de diffusion thermique ou mobilité thermophorétique.

$$v = -D_{Ti} \text{grad } T$$

Cette équation n'est valable que pour une faible différence de température. Si le coefficient de diffusion D_{Ti} est positif les molécules diffusent dans le sens opposé au gradient de température, des zones chaudes vers les zones froides. La thermophorèse est dite « positive » lorsque les molécules migrent des zones chaudes vers les zones froides, elle est dite « négative » dans le cas contraire.

A l'état stationnaire, ce mouvement est contrebalancé par la diffusion de masse et l'équation devient :

$$v = -D_{Ti} \text{grad } T - D_i \text{grad } c_i$$

¹⁹⁸ M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *Assay and Drug Development Technology*, **2011**, **9**, 342-353

avec c_i concentration initiale et D_i coefficient de diffusion. L'intégration de cette équation mène à l'équation suivante :

$$c_{Ti} = c_i \exp(-S_{Ti}dT)$$

Pour une position où la température est augmentée de dT (petite variation) proche de la température ambiante. Le coefficient de Soret S_{Ti} est défini comme le rapport de la mobilité thermophorétique sur le coefficient de diffusion :

$$S_{Ti} = D_{Ti}/D_i$$

Généralement, $c_{Ti} < c_i$, la mobilité thermophorétique est positive, le coefficient de Soret également.

Toutefois, selon les propriétés de la molécule étudiée, le coefficient de Soret peut être modifié (taille de la molécule, charge, interaction avec le solvant, conformation).

C'est le changement d'un de ces paramètres dus à un évènement de liaison qui permet d'analyser les interactions entre molécules.

Pour suivre l'évolution de ce phénomène et pouvoir analyser les interactions entre molécules, le signal est suivi par fluorescence. Cette fluorescence peut être intrinsèque à la molécule étudiée, ou alors elle peut être obtenue par marquage de la molécule. Différents types de marqueurs sont disponibles en fonction du choix de la protéine à marquer (Lysines, Cystéines ou Histidines). Dans la majorité des cas, le fluorophore Alexa 647¹⁹⁹ est utilisé pour marquer les lysines. Sa longueur d'onde d'excitation est de 650 nm et sa longueur d'onde d'émission de 668 nm.

Ce marqueur est disponible sous forme activée avec un groupement N-hydroxy-succinimide ester (NHS) réagissant avec les amines primaires, typiquement celles des lysines. Ce groupement a été introduit pour la première fois en 1975 par Bragg and Hou²⁰⁰.



Schéma 43. Ester N-hydroxy-succinimide réagissant avec une amine primaire

Une fois le marquage effectué, la protéine est purifiée pour éliminer l'excès de fluorophore. Ensuite, la protéine marquée est mise en contact avec la molécule dont on veut étudier l'interaction, à différentes concentrations pour pouvoir obtenir une courbe dose-réponse. L'appareil de thermophorèse distribué

¹⁹⁹ Alexa dyes [en ligne]. Disponible sur <<http://www.atdbio.com/content/34/Alexa-dyes#Properties-and-structures>> (12.2017)

²⁰⁰ P.D Bragg, C Hou., *Eur. J. Biochem.*, **1975**, **106**, 495-503

par Nanotemper Technologies enregistre le signal de fluorescence émis sous l'influence d'un gradient de température.

b. Résultats : évaluation de l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour les ligands

> Marquage de l'endonucléase du LCMV

La réaction de marquage consiste à incuber 20 µM d'enzyme avec 60 µM de fluorophore Alexa 647. Le marquage a lieu dans un tampon 10 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl et la réaction est laissée pendant 2h à 4°C et à l'abri de la lumière. La protéine marquée est ensuite purifiée, pour éliminer l'excès de fluorophore à l'aide une colonne NAP-5-GE-Healthcare. L'efficacité du marquage est déterminée par dosage UV. Les aliquots obtenus sont ensuite conservés à l'abri de la lumière à - 80 °C.

> Acquisition des courbes de thermophorèse

100 nM de protéine marquée est mise en présence d'une quantité croissante de ligand (de 15 nM à 500 µM – dilution en cascade) dans 16 capillaires dans un tampon HEPES 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, Tween 20 0.05%, MgCl₂ 0.25 mM, MnCl₂ 0.25 mM, DMSO 5%. Après l'étape du capscan évaluant le bon positionnement des capillaires et l'intensité de fluorescence, les capillaires sont soumis à un gradient de température (de 0 à 8°C) à partir d'une température initiale de 25°C. Un signal est enregistré pour chacun des capillaires. Le signal MST va alors détecter s'il y a un évènement de liaison à travers la quantification du changement de la fluorescence normalisée, permettant de remonter à la valeur du K_d.

> Résultats : détermination de l'affinité de l'endonucléase du LCMV pour les 22 DCAs et analogues synthétisés.

Les constantes de dissociation des 22 DCAs et analogues de 2nd génération ont été déterminées. Elles ont permis de constituer un premier jeu de relations structure-activité.

Dans un premier temps, un contrôle a été réalisé pour valider la spécificité de l'interaction des ligands de 2nd génération *via* la chélation des ions catalytiques. Pour chaque composé, un test sans ion a été réalisé. Un exemple avec le composé **142** est donné sur la Figure 100.

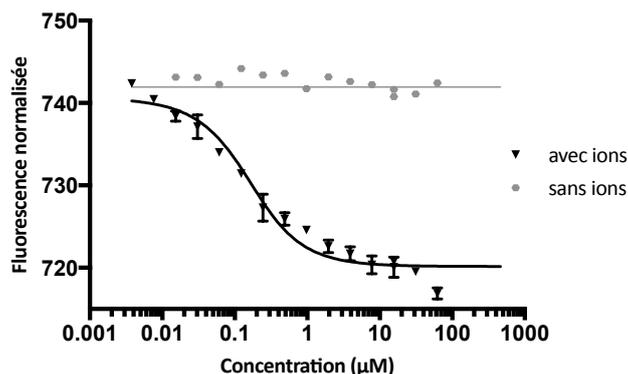


Figure 100. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour le composé **142**. Courbe noire : courbe dose-réponse illustrant la liaison du ligand à l'enzyme avec une affinité déterminée au niveau du point d'inflexion. Courbe grise : expérience réalisée en l'absence d'ions, le plateau de fluorescence observé atteste qu'aucune liaison du composé à l'enzyme n'est observée.

Comme visible sur la Figure 100, une courbe sigmoïde caractéristique de la liaison du composé **142** à l'enzyme est visible en présence d'ions (courbe noire) avec au niveau de l'inflexion une estimation de la valeur du K_d . L'amplitude du signal est aussi une validation de la qualité de la mesure. Par contre, sans ion, c'est un nuage de points avec une faible amplitude qui est obtenu (points gris), caractéristique d'une absence d'événement de liaison.

Avant de débiter l'analyse des données obtenues, il convient de rappeler que pour que deux affinités soient considérées significativement différentes l'une de l'autre, la valeur des K_d doit être de 5 à 10 fois différente.

L'affinité de l'enzyme pour le composé de référence **35** est de 0.51 μ M. Les composés ont été classés par famille de molécules. L'analogue du composé **35** en position méta possède une affinité similaire (0.39 μ M).

Les K_d des composés à chaîne alkyle (**137**) ou aryle (**138-141**) sont présentés Figure 101.

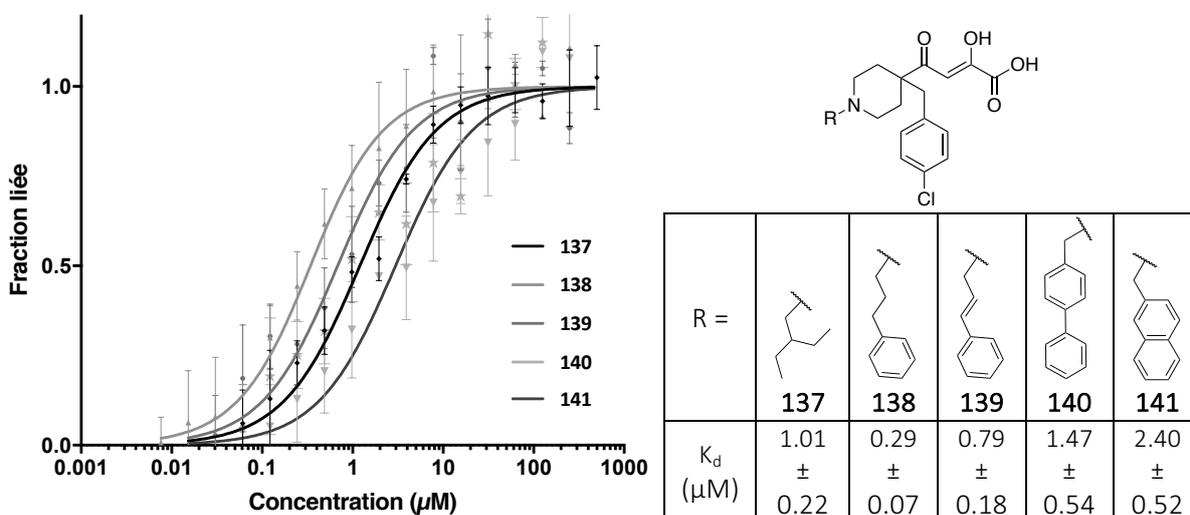


Figure 101. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **137** à **141**. Gauche : courbes dose-réponse. Droite : valeurs des K_d pour chaque composé et l'erreur associée au triplicat.

L'affinité de l'enzyme pour le composé à chaîne alkyle **137** est de 1.01 μM . Les composés **138** et **139** pour lesquels la chaîne linéaire substituée sur l'azote de la pipéridine est augmentée de 2 carbones par rapport au composé **35**, possèdent des K_d respectifs de 0.29 μM et 0.79 μM . Le composé **141**, dont la chaîne substituée sur l'azote de la pipéridine est rigidifiée par un deuxième cycle aromatique formant le naphthalène, possède un K_d de 2.40 μM . L'affinité de l'enzyme pour le composé **141** est dix fois moins bonne que pour le composé **138**, le meilleur de la série. Enfin, le composé **140** comportant une chaîne bi-phényle sur l'azote de la pipéridine présente un K_d de 1.47 μM .

L'endonucléase du LCMV possède dans l'ensemble de bonnes affinités pour les composés N-acylés (Figure 102).

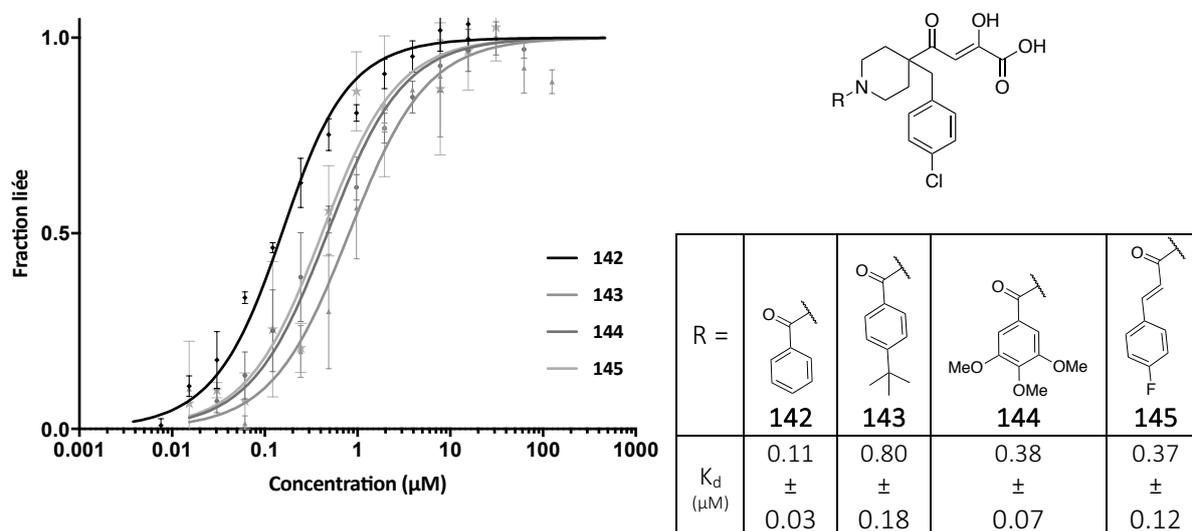


Figure 102. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **142** à **145**. Gauche : courbes dose-réponse. Droite : valeurs des K_d pour chaque composé et l'erreur associée au triplicat.

Le composé **142** possède un K_d de 0.11 μM . Il s'agit de la meilleure affinité obtenue parmi tous les DCAs et analogues de 2^{nde} génération. Les composés **144** et **145** présentent des K_d identiques de 0.38 et 0.37 μM . Enfin, le composé **143** montre un K_d supérieur aux autres composés N-acylés jusqu'à 7 fois supérieur à celui du meilleur du composé de la série.

Etonnamment, les composés comportant une liaison carbamate (composé **146**) et sulfonamide (composé **147**) ne se lient pas à l'enzyme alors qu'ils la stabilisent de manière significative en TSA (Tableau 23).

	 146	 147
K_d (μM)	> 500	> 500

Tableau 23. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **146** et **147**.

Les composés hétérocycliques **148** et **149** où l'azote de la pipéridine est substitué par un cycle thiazole ou pyridine chloré présentent des K_d de 0.5 à 0.7 μM (Figure 103)

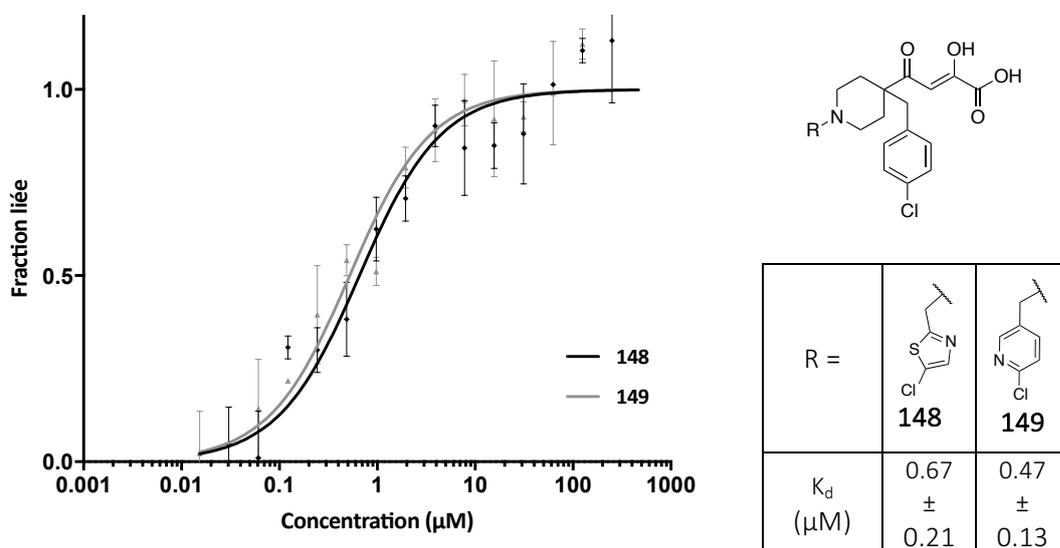


Figure 103. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **148** et **149**. Gauche : courbes dose-réponse. Droite : valeurs des K_d pour chaque composé et l'erreur associée au triplicat.

Les courbes de MST et les données d'affinité obtenues pour les composés **150** à **153** sont représentées sur la Figure 104.

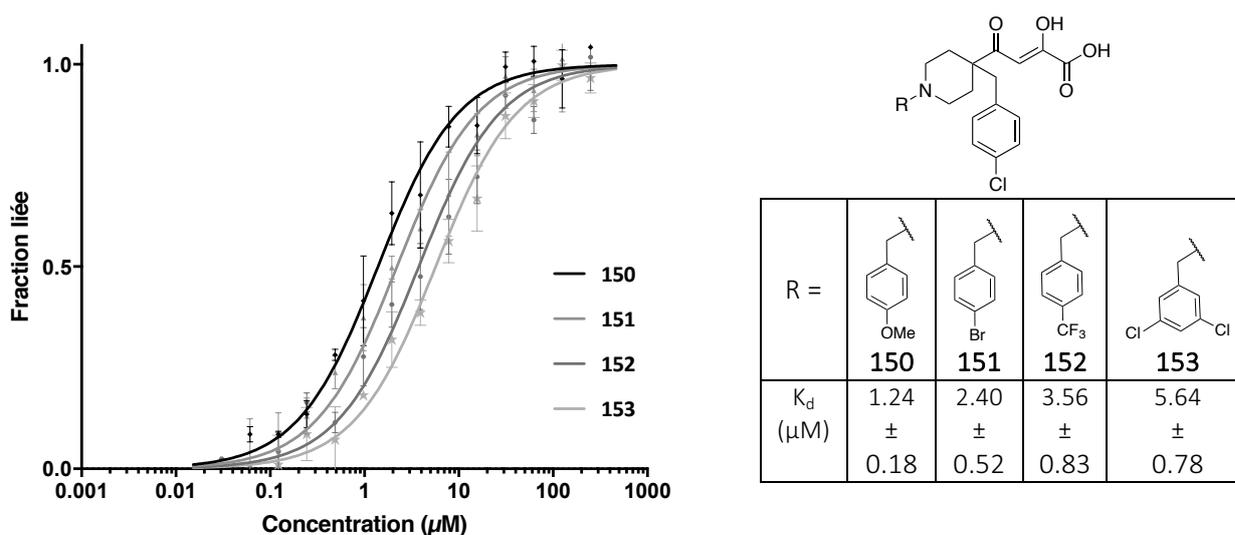


Figure 104. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **150** à **153**. Gauche : courbes dose-réponse. Droite : valeurs des K_d pour chaque composés et l'erreur associée au triplicat.

Les composés N-benzylés **150** à **153**, comportant différents substituants descripteurs présentent tous des K_d supérieures au micromolaire. Le composé **150** (-OMe) donneur +M, a un K_d de 1.24 μM tandis que les composés **151** et **152** (-Br, -CF₃) attracteurs -I, ont des K_d plus élevés de 2.40 μM et 3.56 μM. Enfin, le composé **153**, possédant une double substitution par deux chlores en méta sur le phényle, présente un K_d de 5.64 μM, 5 fois supérieur au composé **150**. Par rapport composé **35**, les affinités obtenues sont significativement moins bonnes allant jusqu'à une augmentation du K_d de 10 fois pour le composé **153**.

	242	255	264
K _d (μM)	> 500	5.48 ± 1.39	> 500

Tableau 24. Affinité de l'endonucléase du LCMV pour les composés **242**, **255**, et **264**.

Concernant les bioisostères, le dicéto-tétrazole **255** est le seul possédant une affinité, qui est de 5.48 μM (Tableau 24). Le dicéto-triazole **242**, et le dicéto-carboxamide **264** n'ont montré aucune liaison à la cible.

Une corrélation entre les données de DSF et de MST a été réalisée pour voir si les résultats des deux techniques convergent qualitativement et quantitativement (Figure 105).

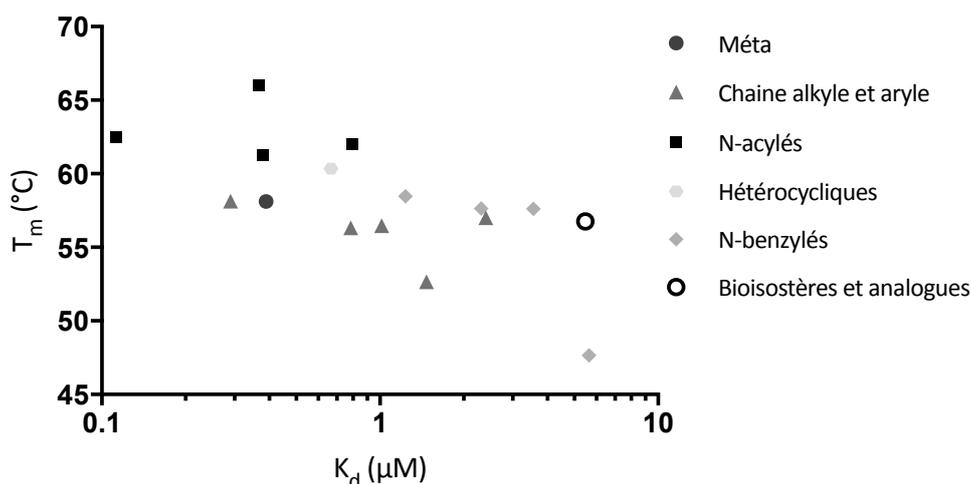


Figure 105. Corrélation des données biophysiques obtenues en TSA (T_m) et en MST (K_d) selon les familles de composés.

Nous constatons que plus le T_m de la protéine est élevé car elle est stabilisée par un ligand, plus le K_d du ligand en question est faible, attestant d'une forte interaction entre ce ligand et l'endonucléase du LCMV. Ont été retirés de cette corrélation les composés **146**, **147**, **242**, et **264** ne présentant pas de K_d mesurable.

L'affinité de l'enzyme pour les composés dépend de facteurs stériques, électroniques, et de la balance hydrophobe/hydrophile des ligands.

Les composés à chaîne aryle (**138-141**) présentent des différences significatives dans leur fixation à l'enzyme. Le composé le plus affin est le composé **138**, qui a priori, est le plus flexible de la série avec son groupement phénylpropyle au contraire du composé **141** qui avec son groupement méthylnaphtalényle semble le plus rigide et présente le K_d le plus élevé. Entre ces deux composés, la rigidification progressive du groupement à travers l'ajout d'une double liaison pour le groupe propénylbenzyle du composé **139** ou encore le groupe bi-phényle du composé **140** semble indiquer que la contrainte stérique ou conformationnelle ou encore la rigidification ne sont pas favorables à une bonne fixation enzyme/ligand. Dans le cas du site actif de l'endonucléase du LCMV qui est très large, il faudrait pouvoir augmenter les interactions hydrophobes avec les acides aminés du site actif, sans utiliser une chaîne aryle trop longue pour éviter le risque de d'empilement π - π avec le chlorobenzyle mais plutôt substituer le phényle du composé **138** en ortho ou méta avec des groupements lipophiles.

L'enzyme cible présente les meilleures affinités pour les composés N-acylés (**142-145**). Les déterminants de la fixation de cette série de ligands semblent rejoindre ceux des dérivés N-arylés. Toutefois, la particularité de la liaison amide formée sur cette série de composés est liée à l'absence de basicité de l'atome d'azote versus la basicité de l'atome d'oxygène du carbonyle. L'oxygène du carbonyle est un très bon accepteur de liaison hydrogène et l'amide non-protonnable, rigidifie la molécule et favorise un

conformère. Cette modification, tout en conservant une aromaticité avec le substituant phényle, offre un nombre limité d'espèces en solution tout en offrant des possibilités de liaison hydrogène (accepteur) avec les acides aminés du site actif.

De manière inattendue, les composés N-carbaminé **146** et N-sulfonylé **147** ne se lient pas à l'enzyme. Il est difficile de comprendre pourquoi ces composés ont perdu toute capacité à se fixer à l'enzyme alors qu'ils possèdent 2 des déterminants principaux de la fixation : la chélation des ions *via* le motif DCA et un bras hydrophobe sur l'azote de la pipéridine, la différence demeure sur le groupement chimique carbamate ou sulfonamide qui relie la pipéridine au benzyle. L'une des pistes que nous pourrions envisager se situe au niveau d'une conformation défavorable de la pipéridine réduisant l'ancrage du composé dans le site actif de l'enzyme. Des études supplémentaires de RMN et MST sont en cours pour tenter de comprendre ces résultats.

Les composés hétérocycliques **148** et **149** ont présenté des affinités similaires au composé **35**. Notre stratégie résidait ici dans le fait d'ajouter des hétéroatomes dans les cycles aromatiques pour améliorer la solubilité des composés, tout en conservant une bonne affinité. A termes, si la tendance est de faire grossir encore plus ces composés, cette stratégie s'avèrera très utile.

Les composés N-benzylés comportant différents groupes descripteurs (**150-153**) sont de moins bons ligands (jusqu'à 10 fois) que le composé **35**, que les substituants soient attracteurs ou donneurs et quelque soit leur position sur le cycle.

Concernant les bioisostères dicéto-triazole **242** et dicéto-tétrazole **255**, l'acidité de ces deux hétérocycles présents en position 1 est très différente de celle d'un acide carboxylique et pourrait jouer un rôle dans la chélation des ions. En effet, le pKa du proton tétrazolique se situe autour de 4-5 tandis que celui d'un proton triazolique est compris entre 9 et 10. Il s'agit d'une différence majeure par rapport à l'acide carboxylique de la fonction DCA qui a un pKa autour de 2. Ceci pourrait expliquer l'impossibilité du composé **242** à chélater les ions du site actif. En revanche, la liaison est maintenue pour le composé **255**, même si l'affinité obtenue est faible.

Le composé **264** ne se lie pas non plus à l'endonucléase. Ici, l'azote de l'amide primaire est indisponible à cause de sa délocalisation, il ne présente ni acidité ni basicité, rendant a priori défavorable la chélation des ions.

Aucun changement significatif d'affinité n'a été observé pour le composé méta **62**. L'affinité est conservée, mais il serait judicieux de séparer le mélange racémique pour voir si l'un des stéréoisomères a une conformation plus privilégiée pour s'ancrer dans le site actif.

Parmi la chimiothèque de 22 DCAs et analogues, l'endonucléase du LCMV a présenté de bonnes affinités allant jusqu'à 0.11 μ M pour le composé **142**. Cette première série de DCA de 2nde génération s'est focalisée uniquement sur la modulation du groupement fixé sur l'azote de la pipéridine sans modifier le groupement chlorobenzyle. De manière générale, ce groupement doit offrir une certaine flexibilité à la molécule et conserver une bonne balance hydrophile/hydrophobe.

Dans la série des bioisostères, les résultats sont malheureusement peu encourageants, sauf pour la modification de type tétrazole. La chélation des ions qui semble souvent perdue dès que le motif DCA est touché et remplacé par un bioisostère reste à ce stade le moteur principal de la fixation de ces composés.

L'étape suivante a consisté à tester ces molécules *in vitro* pour voir si elles sont capables de ralentir ou d'abolir l'activité de l'enzyme en présence de son ARNs substrat.

3. Activité inhibitrice de l'endonucléase du LCMV

a. Principe du test

Initialement, le suivi de l'inhibition de l'activité du domaine de l'endonucléase du LCMV était réalisée grâce à un test d'ARN radiomarqué. Comme mentionné dans le **Chapitre 2, Partie 1, II.1**, des DCAs de 1^{ère} génération ont été testés et leur pourcentage d'inhibition a été évalué^{.79}.

Lors de ce test, le domaine endonucléase est incubé avec un ARNs (19-mer) à 25°C pendant 6h en présence ou non de ligand. Dans ces conditions, la cinétique de dégradation de l'ARN est très lente et même après 6h d'incubation, il subsiste de l'ARN de départ. Cette faible activité n'est pas un cas isolé.

En effet, dans leurs travaux, Reguera *et al.*^{.80} distinguent deux types d'endonucléase parmi les virus à ARN segmenté négatif, incluant les Arenavirus, les virus de l'ordre *Bunyavirales*, et les virus de la famille *Orthomyxoviridae*. D'un point de vue structural, la différence entre ces deux catégories est la présence ou l'absence d'une histidine catalytique dans le site actif. Celles pour lesquelles une bonne activité *in vitro* est observée si elles sont produites séparément du reste de la protéine L possèdent cette histidine (*Bunyavirales*, *Orthomyxoviridae*). En revanche, les domaines endonucléase de la famille *Arenaviridae* ne possèdent pas ce résidu et sont faiblement actifs. Ces éléments suggèrent que d'autres domaines de la protéine L seraient impliqués dans l'activité endonucléase des Arénavirus, notamment pour la liaison à l'ARN substrat ou le bon repliement du domaine. Dans le cas de la polymérase du virus de la grippe,

l'activité endonucléase du complexe hétérotrimérique PA-PB1-PB2 est 140 fois plus élevée que le domaine endonucléase isolé²⁰¹.

Afin d'améliorer cette activité, la protéine L entière du LCMV a été produite au sein de l'équipe par le Dr. Sergio Hernandez. L'idéal étant de mettre en place un test par FRET, nous nous sommes contentés dans un premier temps d'évaluer l'activité de l'enzyme et le pouvoir inhibiteur d'un ligand (Composé 142) par une technique de gel d'électrophorèse de fragments d'ARNs révélés au bleu de méthylène.

b. Résultats

La protéine L (15 µM) a été incubée à 30°C pendant deux heures avec un ARNs_b (13-mer, 7.5 µM) en présence ou non du composé 142 dans un tampon Tris pH 7.5 50 mM, NaCl 500 mM, TCEP 2mM, MnCl₂ (2 mM) et Glycérol 5%. Les résultats figurent sur le gel de la Figure 106.

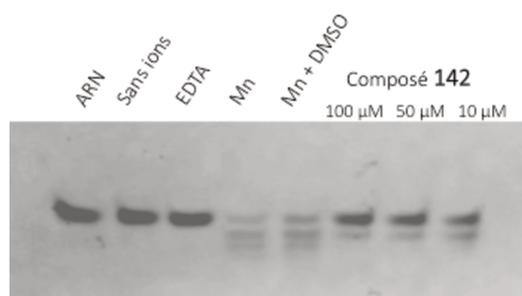


Figure 106. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 7M révélé au bleu de méthylène. ARN : ARN seul. Sans ions : Protéine L dans un tampon sans ions. EDTA : Protéine L + ARN + EDTA. Mn : Protéine L + ARN dans un tampon avec ions. Mn + DMSO : Protéine L + ARN dans un tampon avec ions et 5% DMSO. Composé 142 : Protéine L + ARN + Ligand incubé à 10 µM, 50 µM et 100 µM dans un tampon à 5% DMSO final.

Comme visible sur la Figure 106, la bande correspondant à l'ARN seul est nettement révélée et est utilisée comme référence (Colonne 1). La bande attestant de la présence d'ARN reste intacte lorsqu'il n'y a pas d'ion Mn dans le tampon de réaction (Colonne 2) ou en présence d'EDTA (chélateur d'ions servant de contrôle négatif, Colonne 3). En revanche, en présence d'ions Mn et/ou DMSO (Colonne 4 et 5) la disparition de la bande ARN est clairement visible.

Le composé 142 a été incubé avec l'enzyme et le substrat à différentes concentrations (10, 50 et 100 µM). Il est clairement visible sur gel (Colonne 6, 7 et 8) qu'il exerce un effet inhibiteur de l'activité endonucléase de la protéine L notable dès 10 µM. Ces résultats sont une preuve de concept que les DCAs sont capables d'inhiber l'activité endonucléase de la protéine L. Toutefois ce test n'est pas quantitatif, la mise en place d'un test par FRET (Föster Resonance Energy Transfer) est en cours d'étude.

²⁰¹ W. Xing, O. Barauskas, T. Kirschberg, A. Niedziela-Majka, M. Clarke, G. Birkus, P. Weissburg, X. Liu, B. E. Schultz, R. Sakowicz, H. Kwon and J. Y. Feng, *PLOS one*, 2017, 12, e0181969.

II. Evaluation biologique des DCAs et analogues de 2nde génération contre l'exonucléase de MOPV

1. Fluorimétrie différentielle à balayage (DSF)

La capacité des ligands à stabiliser l'exonucléase de MOPV a également été étudiée par DSF. Il a déjà été montré que les ions Mn et Mg stabilisent fortement l'exonucléase de MOPV¹²⁸ mais aucune donnée n'a encore été obtenue sur l'effet que peuvent avoir des ligands sur cet exonucléase et notamment des ligands DCAs.

Nous avons donc dans un premier temps recherché les conditions expérimentales compatibles avec l'étude de ligands de type DCAs, notamment au niveau de la concentration de l'enzyme pour un ratio enzyme/ligand adapté. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Figure 107.

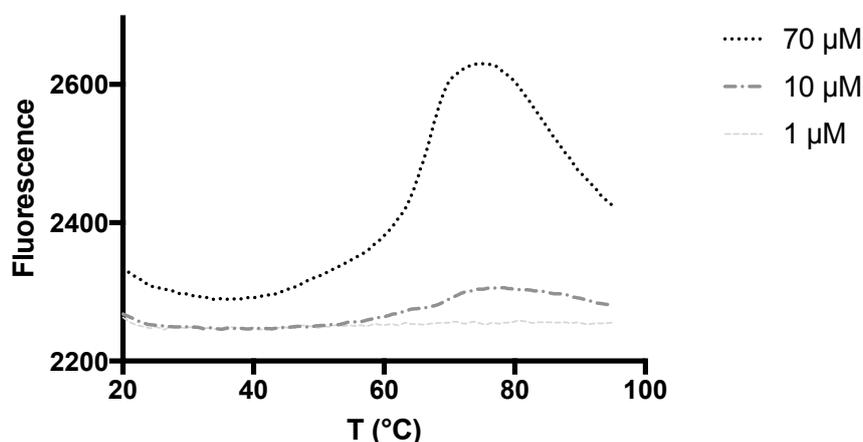


Figure 107. Stabilité thermique de l'exonucléase de MOPV à différentes concentrations d'enzyme.

Les enregistrements de fluorescence ont donc été réalisés dans un tampon (HEPES pH 7.5 20 mM, NaCl 300 mM, MnCl₂ 2 mM, Glycérol 5%) à 70, 10 et 1 µM d'enzyme. Bien que la gamme de concentration recommandée soit comprise entre 1 et 20 µM d'enzyme, nous n'avons obtenu un signal cohérent qu'en présence de 70 µM d'enzyme. Nous avons donc choisi de conserver cette concentration de 70 µM de protéine pour évaluer les ligands (400 µM) avec un ratio protéine ligand de 6.

L'enzyme en présence d'ions Mn possède un T_m de 65.8 °C, qui est déjà haut par rapport à la majorité des protéines (Figure 108, wT + Mn). Les résultats sont rassemblés dans la Figure 108.

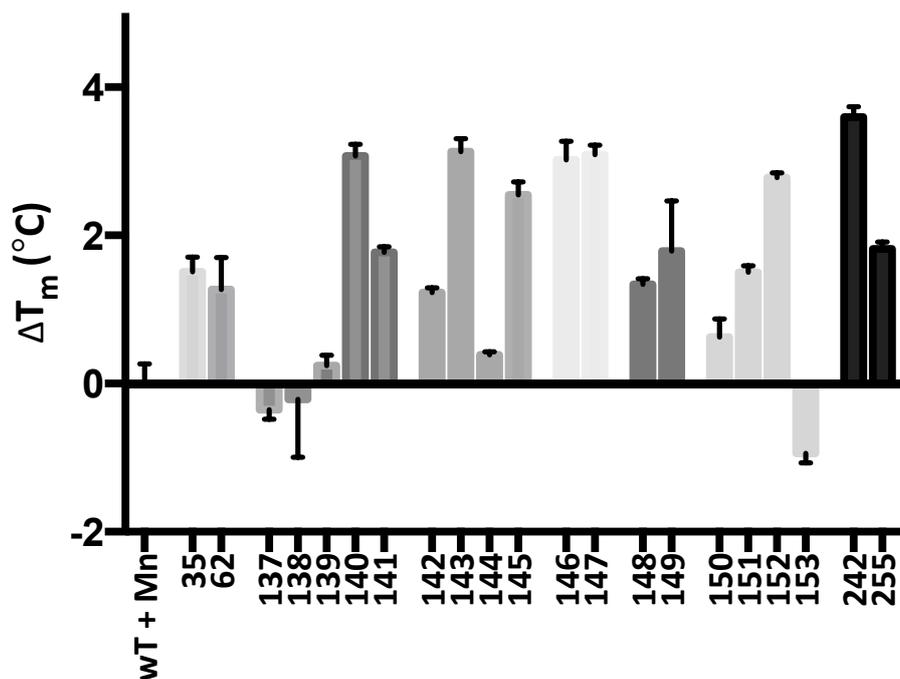


Figure 108. Stabilité thermique de l'exonucléase de MOPV déterminée par DSF. wT + Mn : enzyme avec ions. Composés 35 et 62 : composé de référence et composé méta. Composés 137-141 : substitution hydrophobe/allongement de chaîne. Composés 142-145 : substitution par une liaison amide. Composés 146 et 147 : liaison carbamate et sulfonamide. Composés 148 et 149 : modifications hétérocycliques. Composés 150-153 : substitution par des groupes donneurs ou attracteurs. Composés 242 et 255 : Bioisostères. Ratio protéine/Ligand : 6).

L'amplitude de T_m est moins importante que celle observée pour l'endonucléase du LCMV. Ceci peut s'expliquer par deux raisons. Etant donné le T_m (65.8 °C) déjà élevé de l'enzyme en présence de Mn, il est possible que l'effet induit par la présence d'un ligand soit moins important, l'enzyme étant déjà extrêmement stabilisée par la présence du co-facteur ionique. Sa grande stabilité fait aussi qu'elle expose plus difficilement ses régions hydrophobes.

A l'exception des composés 137, 138 et 153, tous les ligands participent à la stabilisation de la protéine (Figure 108). La stabilisation, qui découle d'une interaction supposée entre l'enzyme et le ligand, est variable avec des ΔT_m allant de 0.2 à 4°C, ce qui laisse penser que l'enzyme ne se comporte pas de manière identique avec tous les composés.

Le composé 35 de 1^{ère} génération a été choisi comme composé de référence pour l'analyse des résultats et il provoque un effet stabilisant de 1.5°C.

Ces données de DSF ne nous permettent pas d'avoir des réponses claires sur la capacité de l'enzyme à accommoder ou discriminer tel ou tel ligand mais nous donnent des pistes d'analyse que nous avons traitées par familles de molécules et qui nous ont permis de mettre en évidence quelques déterminants de l'interaction enzyme-ligand de manière qualitative.

Le composé **62** pour lequel l'azote de la pipéridine est positionné en méta a quasiment le même effet stabilisant que le composé **35** ($\Delta T_m = +1.0^\circ\text{C}$).

Les composés **137**, **138** et **139** pour lesquels le phényle est remplacé par une chaîne alkyle ou des groupements phénylpropyle ou propén-1-ylbenzyle déstabilisent ou stabilisent très légèrement (ΔT_m de -0.4°C à $+0.2^\circ\text{C}$). Par contre, les composés **140** et **141** pour lesquels le phényle est remplacé par des bi-cycles aromatiques stabilisent significativement la protéine et en particulier le composé **140** avec un $\Delta T_m = +3.1^\circ\text{C}$.

A l'exception du composé **144** qui stabilise très légèrement la protéine, les composés N-acylés **142** à **145** stabilisent fortement la protéine avec un ΔT_m compris entre $+1.5$ et $+3.5^\circ\text{C}$. De la même manière, les composés N-carbaminé **146** et N-sulfonylé **147** stabilisent fortement la protéine avec des ΔT_m de $+3^\circ\text{C}$. Les composés hétérocycliques **148** et **149** pour lesquels le phényle est remplacé par un hétérocycle chloré thiazole ou pyridine stabilisent la protéine avec un ΔT_m d'environ 2.0°C .

Les composés N-benzylés **150** à **153** suivant qu'ils portent 1 ou 2 substituants donneurs ou accepteurs sur le cycle phényle se comportent différemment vis-à-vis de l'enzyme. Le composé **150** portant un groupe -OMe en para est moins stabilisant que le composé de référence **35** non-substitué, alors que les composés **151** et **152** (-Br et -CF₃ en para) stabilisent significativement la protéine avec des ΔT_m de $+1.5^\circ\text{C}$ et $+2.8^\circ\text{C}$. Seul le composé **153** doublement substitué est déstabilisant ($\Delta T_m = -0.9^\circ\text{C}$).

Enfin les bioisostères triazole (Composé **242**) et tétrazole (Composé **255**) stabilisent la protéine considérablement avec un ΔT_m de $+3.6^\circ\text{C}$ et $+1.8^\circ\text{C}$.

En conclusion, au niveau de la substitution de l'azote de la pipéridine par des groupements à chaîne aryle, seuls les deux composés comportant deux cycles aromatiques dans la chaîne montre un effet stabilisant significatif (composés **140** et **141**). Il est probable que l'aromaticité et/ou l'encombrement entraînent un effet stabilisant de la protéine par interaction avec la zone conservée hydrophobe du site actif (ILE391, ILE468 et PHE538) en particulier la PHE538 qui peut établir des interactions par empilement π - π avec les cycles aromatiques des composés.

Lorsque l'azote de la pipéridine est acylé par différents groupes benzoyles, la stabilisation de la protéine est plus importante pour les composés les plus volumineux. Le composé **143** porte un groupe t-Bu hydrophobe en para sur le cycle, et le composé **145** est homologué de deux carbones par rapport aux composés **142**, **143** et **144**. Ceci suggère que l'encombrement stérique et l'allongement de chaîne de ce bras du ligand est favorable à sa fixation avec l'enzyme.

Les composés N-carbaminé **146** et N-sulfonylé **147** font partie de ceux qui stabilisent le plus l'exonucléase.

Les composés hétérocycliques thiazole chloré **148** et pyridine chloré **149** sont équivalents au composé de référence **35**.

Les composés N-benzylés substitués par différents descripteurs stabilisent l'exonucléase de MOPV dès lors que les substituants sont attracteurs positionnés en para (composé **151** -Br, et composé **152** -CF₃).

Concernant les bioisostères, un changement significatif est observé pour le composé **242** pour lequel la fonction acide carboxylique du composé **35** a été remplacée par un motif triazole. Sa basicité pourrait être impliquée dans l'interaction suggérant que l'acidité en position 1 n'est pas requise. Compte-tenu de la présence d'une histidine catalytique proximale du site actif de l'exonucléase de MOPV, un telle fonction serait capable d'interagir avec le cycle imidazole de l'histidine (peut-être sous forme de T-shape)

En conclusion, sur les 21 DCAs et analogues testés par DSF sur l'exonucléase de MOPV, 18 stabilisent l'enzyme et sont donc des ligands potentiels. Qualitativement, il est visible que les ligands les plus stabilisants sont ceux qui sont les plus volumineux et/ou les plus hydrophobes.

L'étape suivante a consisté à générer des données quantitatives en évaluant l'affinité de l'exonucléase de MOPV pour ces ligands par MST afin de déterminer leurs K_d respectifs.

2. Thermophorèse à micro-échelle (MST)

La réalisation d'expériences de thermophorèse à micro-échelle sur cette enzyme n'a pas abouti. Malgré de nombreuses tentatives en modifiant le tampon de marquage de la protéine, le tampon de thermophorèse, la concentration de la protéine et des ligands, les capillaires employés ou encore les conditions de mesure sur l'appareil, il n'a pas été possible de mesurer des interactions. Nous en avons conclu, d'une part, que l'enzyme est trop instable dans les conditions de marquage pour le supporter. D'autre part, en plus des ions catalytiques et structuraux Mn ou Mg, elle a besoin de son substrat ARNdb pour être dans une configuration stable et active. Ceci qui laisse à penser que lors des expériences de DSF, s'il a été nécessaire d'utiliser 70 μM d'enzyme pour obtenir un signal mesurable, c'est certainement en partie dû à une grande proportion d'enzyme dépliée et dénaturée en solution.

Il serait intéressant de réaliser les expériences d'interaction avec les trois partenaires (enzyme/ligand/ARN) en utilisant un mutant de l'enzyme pour s'affranchir du clivage de l'ARN.

3. Activité inhibitrice de l'exonucléase du Mopeia

a. Principe du test

L'évaluation de l'activité des composés contre l'exonucléase du MOPV a été réalisée par test radiomarké par Thi-Hong Van Nguyen, dans le cadre d'une collaboration interne à l'AFMB. Le principe du test est le suivant : la protéine (0.25 μ M) est incubée à 37°C en présence de ligand (100 μ M) et d'un ARNdb 22-mer radiomarké au ³²P (1.5 μ M). Après l'incubation, les différentes réactions sont neutralisées par addition d'EDTA à différents intervalles de temps (entre 0 et 30 min). Les réactions sont ensuite déposées sur gels de polyacrylamide. Les gels sont visualisés à l'aide d'un phosphoimager et les bandes d'ARN radiomarké intact ou fragmenté sont quantifiées. Ainsi, il est possible de visualiser la cinétique de dégradation de l'ARNdb, l'effet des différents ligands à inhiber la réaction. En réalisant des gammes de concentrations, les IC₅₀ de certains composés sont déterminées.

b. Résultats

> Inhibition

Des exemples de gels sont reportés sur la Figure 109. Toutes les quantifications sont reportées sur la Figure 110.

En l'absence de ligand, l'enzyme clive l'ARNdb en moins de 30 min. La bande d'ARNdb substrat est visible et intacte à t = 0, cette bande disparaît des 5 min d'incubation au profit de plusieurs bandes attestant de la réaction de clivage de l'ARNdb par l'exonucléase en fragments d'ARN plus petits. Le profil de bandes évolue encore après 15 et 30 minutes d'incubation. En présence du composé **153**, la bande d'ARNdb substrat reste visible plus longtemps attestant que le clivage est clairement ralenti. En revanche, en présence du composé **139**, la bande d'ARNdb substrat de départ disparaît rapidement attestant que le composé est beaucoup moins efficace pour inhiber l'activité.

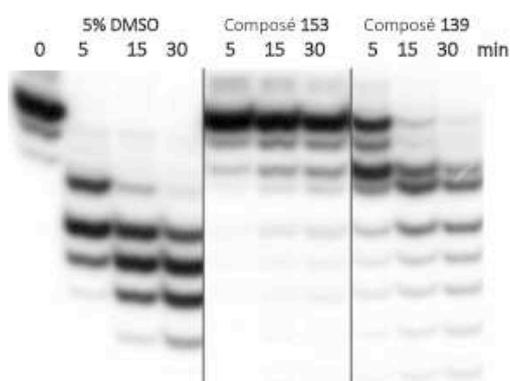


Figure 109. Gels polyacrylamide de l'exonucléase seule en présence de 5% de DMSO, et des composés **153** et **139** (100 μ M) incubés avec 0.25 μ M de protéine et 1.5 μ M d'ARNdb marqué au ³²P.

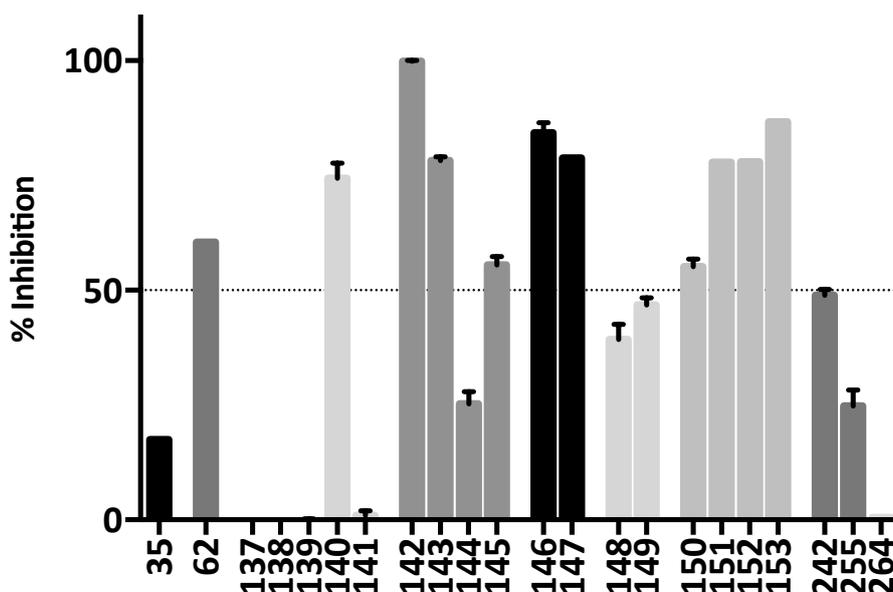


Figure 110. Quantification de l'inhibition de l'exonucléase de MOPV en présence des DCAs synthétisés après 30 min d'incubation. Les composés (100 μ M) ont été incubés avec 0.25 μ M de protéine et 1.5 μ M d'ARN double brin marqué au ³²P.

Dans la série des composés N-alkylés **137** et N-arylés **138** à **141**, seul le composé **140** présente une inhibition de 80% à 100 μ M. Ce résultat est cohérent avec les données de DSF où il était le seul de la famille à provoquer une importante stabilisation de l'enzyme. Tous les composés N-acylés présentent une inhibition de l'enzyme allant de 26% pour le composé le moins actif **144** jusqu'à 100% pour le composé **142**. Les composés **146** et **147** sont aussi très actifs avec, respectivement, 84% et 78% d'inhibition à 100 μ M. Les composés **148** et **149** sont modérément actifs. Les composés N-benzylés **150** à **153** présentent une inhibition de l'enzyme allant de 52% pour le composé le moins actif **150** jusqu'à 90% pour le composé **153**. Sur les trois bioisostères testés, seul le composé triazole **242** présente une inhibition modérée de 50% à 100 μ M, le composé **264** étant totalement inactif.

Le composé **35** qui est la base de ce programme d'optimisation chimique n'avait jamais été testé contre l'exonucléase de MOPV, il fait partie des composés les moins actifs. La modification d'une partie de structure a permis d'accroître de manière significative le pouvoir inhibiteur de ce squelette de 20% d'inhibition initiale pour le composé **35** à 100% d'inhibition pour le meilleur composé **142**.

> Détermination d'IC₅₀ des meilleurs composés

Les meilleurs composés sont ceux qui présentent une inhibition supérieure ou égale à 80% à 30 minutes d'incubation. Les IC₅₀ des composés **140**, **142**, **146**, **147**, et **153** ont été déterminées. Les courbes sont représentées sur la Figure 111.

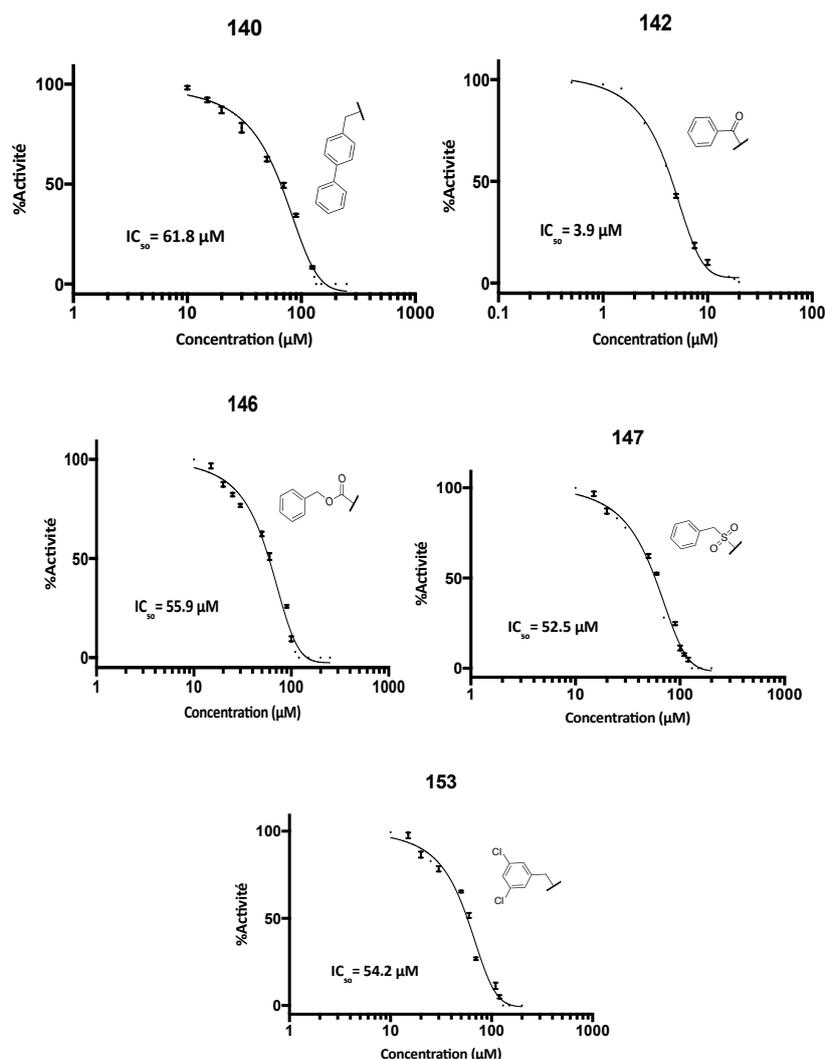


Figure 111. Courbe dose-réponse déterminant les IC_{50} des composés **140**, **142**, **146**, **147** et **153**. Des concentrations croissantes de composés ont été incubés avec $0.25 \mu\text{M}$ de protéine et $1.5 \mu\text{M}$ d'ARN double brin marqué au ^{32}P .

A l'exception du composé **142**, les composés **140**, **146**, **147** et **153** présentent une IC_{50} élevée de $52.5 \mu\text{M}$ à $61.8 \mu\text{M}$. Pour rappel, ces composés n'avaient montré qu'une inhibition de 80 à 90% à $100 \mu\text{M}$, ces résultats sont donc cohérents. A l'inverse le composé **142** qui avait montré 100% d'inhibition à $100 \mu\text{M}$ est effectivement très efficace avec une IC_{50} de $3.9 \mu\text{M}$.

En conclusion, les composés **140**, **146**, **147** et **153** présentent des IC_{50} d'environ $50 \mu\text{M}$. Ce n'est pas suffisant pour envisager ces composés comme bons inhibiteurs. En revanche, le composé **142**, 15 fois plus actif et constitue une première amélioration confirmant que la N-acylation de l'azote de la pipéridine est une voie à considérer. Il s'agit du premier inhibiteur d'exonucléase d'Arenavirus possédant une IC_{50} inférieure à $5 \mu\text{M}$. Il faudra par la suite étudier sa sélectivité.

III. Evaluation en mini-génomme *in cellula* des DCAs et analogues de 2nde génération

1. Viabilité cellulaire des composés en cellules BHK-21

Avant d'évaluer l'efficacité des composés en mini-génomme du LCMV, leur viabilité cellulaire a été mesurée pour discriminer une inhibition due à la mort cellulaire d'une inhibition affectant la réplication virale et pouvoir si nécessaire réaliser un premier tri des composés. Ces expériences ont été réalisées en collaboration dans l'équipe par le Dr. Sergio Hernandez. Tous les composés synthétisés ont été testés ainsi que deux antiviraux de référence : la ribavirine **1**²⁰², et le favipiravir **11**²⁰³.

Des cellules BHK-21 ont été déposées en plaque (densité de 1.5×10^4 cellules par puits) à J-1 avant leur exposition aux inhibiteurs. A J, les composés ont été ajoutés au milieu de culture à différentes concentrations (de 3 à 100 μM) et la viabilité cellulaire a été évaluée à 48h par révélation fluorimétrique à l'aide du réactif PrestoBlue. Le milieu réactionnel est incubé avec ce réactif pendant 1h à 37°C, puis la fluorescence est mesurée. Les résultats obtenus ont été normalisés en utilisant la fluorescence des cellules émise en présence de 0.5% de DMSO comme 100% de viabilité cellulaire. Les résultats à 48h sont présentés dans la Figure 112.

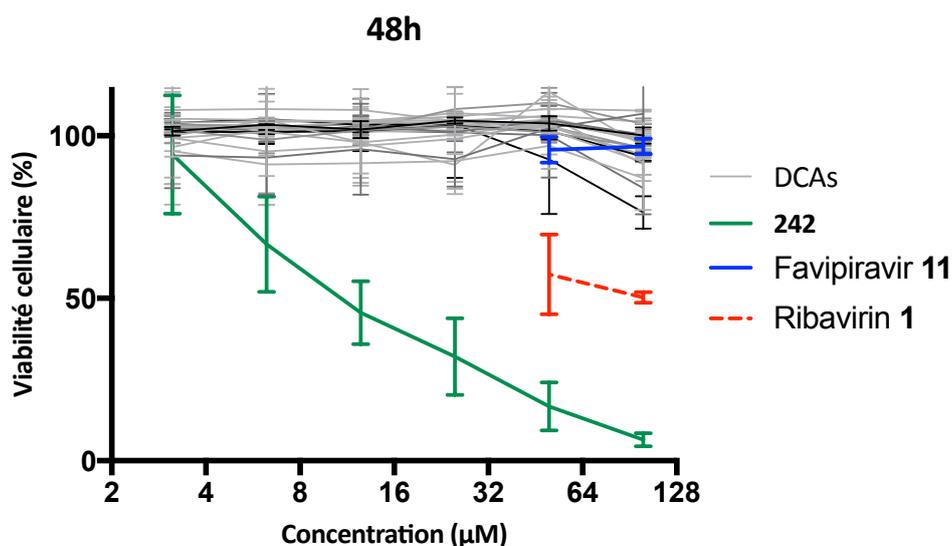


Figure 112. Viabilité cellulaire en BHK-21 à 48h des DCAs en fonction de la concentration. Chaque condition a été testée en triplicat.

A l'exception du composé **242**, les composés n'ont pas montré de cytotoxicité à 48h sur les cellules BHK-21 jusqu'à 100 μM en concentration. Dans le cas le plus défavorable, la viabilité cellulaire est de 80%, deux jours après la mise en contact des composés avec les cellules. Le bioisostère **242**, présentant une toxicité significative de manière dose-dépendante possède une fonction triazole à la place de la fonction

²⁰² J.B. Mccornick, *New. Engl. J. Med.*, **1986**, **314**, 20-26

²⁰³ M. Mendenhall, A. Russel, T. Juelich, E.L. Messina, D.F. Smee, A.N. Freiberg, M.R Holbrook, Y. Fututa, J.C. de la Torre, J.H. Nunberg, and B.B. Gowen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, **55**, 782-787.

acide carboxylique. Etonnamment, la ribavirine **1** s'est montrée relativement toxique à 50 et 100 µM sur les cellules BHK-21.

Enfin, le favipiravir **11**, ne présente pas de cytotoxicité significative à ces concentrations, il représente donc une excellente référence (Courbe bleue).

En conclusion, à l'exception du bioisostère **242**, les DCAs synthétisés ne sont pas toxiques pour les cellules après deux jours d'incubation. Ils sont donc de bons candidats pour être testés en mini-génome.

2. Principe du mini-génome

Un mini-génome est une version tronquée du génome viral complet d'un virus. Il contient uniquement les gènes du virus requis pour la réplication et la transcription. Tous les autres gènes viraux sont retirés et remplacés par des gènes rapporteurs. L'utilité d'un tel système réside dans le fait que le mini-génome est incapable de produire des particules virales infectieuses car ils ne codent pas pour les protéines viraux nécessaires à l'infectivité. Ce système peut donc être manipulé dans un laboratoire de type BSL-2. Le principe du mini-génome est schématisé sur la Figure 115.

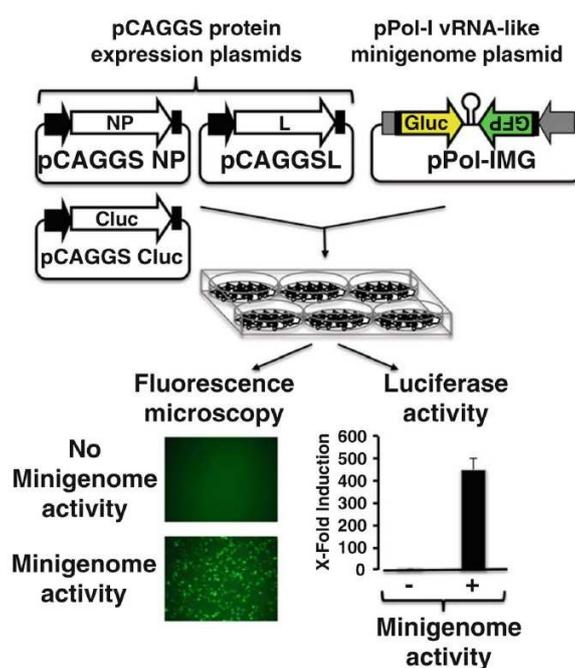


Figure 113. Principe du test en mini-génome selon Martínez-Sobrido et al.²⁰⁴.

Dans le cas du mini-génome du LCMV, des cellules BHK-21 ont été transfectées par deux plasmides (pCAGGS et pPol-IMG, Figure 113). L'un contient les gènes codant pour les protéines viraux du LCMV, la L et la NP, qui sont les protéines minimales requises pour la réplication et la transcription. Le deuxième

²⁰⁴ L. Martínez-Sobrido, B. Y. H. Cheng and J. C. de la Torre, *Methods Mol. Biol.*, **2016**, **1403**, 313–351.

constituant le mini-génome, contient deux gènes rapporteurs remplaçant les gènes viraux de la GP et la NP : la *Gaussia Luciferase (GLuc)* et la protéine fluorescente verte (GFP). Une fois que le système est fonctionnel, les protéines virales sont exprimées. L'activité du mini-génome peut être analysée qualitativement en microscopie de fluorescence visualisée grâce à la GFP, tandis qu'elle peut être mesurée quantitativement en mesurant la luminescence de la luciférase grâce à un fluorimètre.

3. Résultats

Les 22 DCAs et analogues synthétisés ont été testés dans le système de mini-génome du LCMV. A 5h post-transfection, les composés ont été incubés (à 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M) avec des cellules BHK-21 transfectées par les deux plasmides mentionnés ci-dessus.

L'expression des gènes rapporteurs a été suivie après 48h d'incubation à 37°C. La mesure de l'activité *G. Luciferase* a été réalisée à l'aide d'un kit spécifique permettant ainsi de quantifier l'activité du mini-génome. En parallèle, un test de viabilité cellulaire à 48h post-transfection a été réalisé pour chaque concentration de molécule. Les données d'inhibition sont présentées sous forme d'histogrammes en % d'activité G-Luc E et les données de viabilité cellulaire sont présentées en % sous forme de point pour chaque concentration. Les résultats des composés de référence Ribavirine **1** et le Favipiravir (T-705) **11** sont mentionnés dans chaque histogramme.

La Ribavirine 1 diminue de 50% l'activité du mini-génome dès 50 μ M. A 100 μ M, l'activité n'est plus que de 10%. Toutefois, cette inhibition s'accompagne d'une cytotoxicité notable. La viabilité cellulaire de l'ordre de 80% à 50 μ M n'est plus que de 60% à 100 μ M.

Quant au Favipiravir (T-705) 11, il est beaucoup moins efficace, mais permet de ralentir l'activité du mini-génome à hauteur de 40% à 100 μ M, et contrairement à la Ribavirine 1, il ne présente aucune cytotoxicité (100% de viabilité cellulaire).

Le composé 35 ne montre aucun effet sur l'activité du mini-génome quelque soit la concentration utilisée (Figure 114). En revanche, son analogue, le composé 62 où l'azote de la pipéridine se situe en position méta permet de diminuer l'activité du mini-génome de façon dose-dépendante à hauteur de 40% à 50 μ M et 100 μ M.

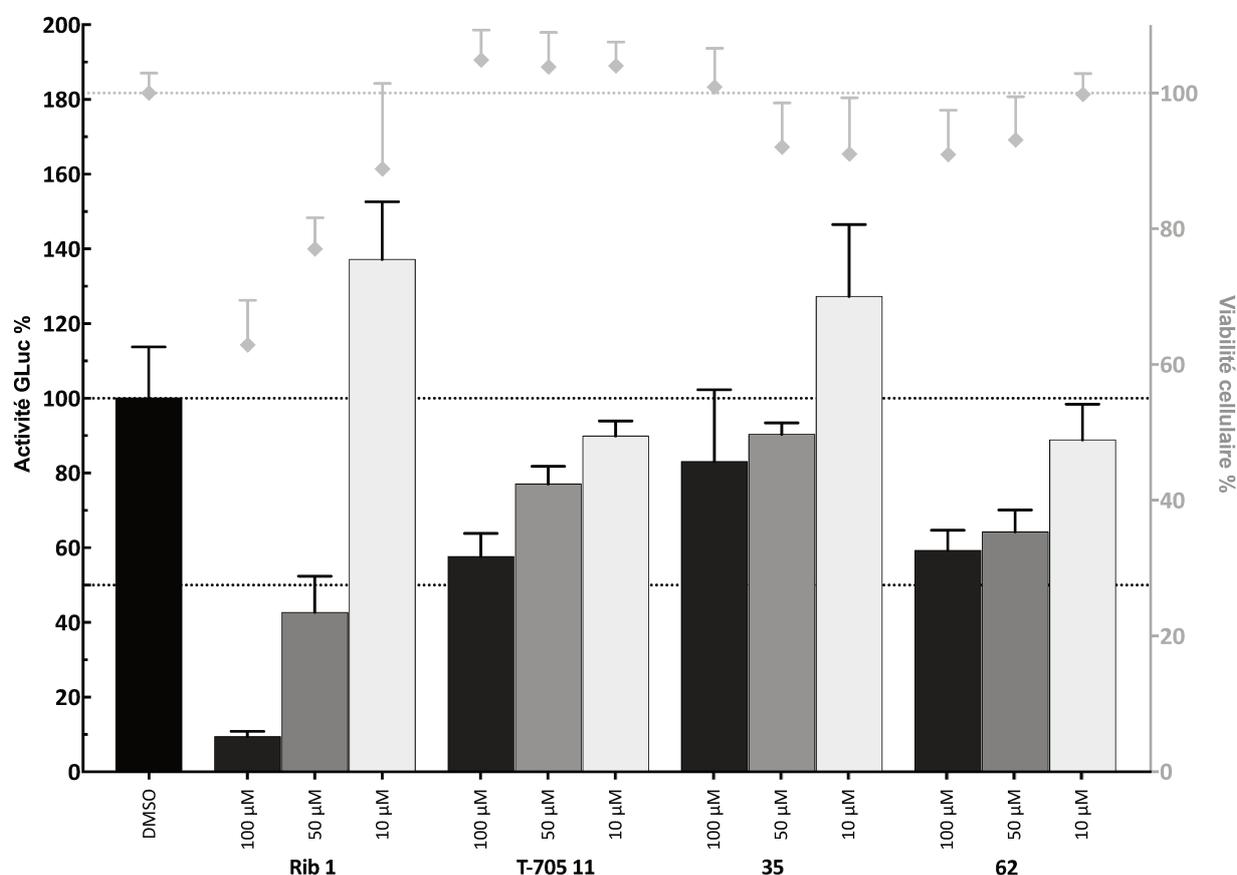


Figure 114. Activité en mini-génome des composés 35 et 62. Ordonnée gauche (noir) : activité GLuc. Ordonnée droite (gris) : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M en triplicat.

Le composé N-alkylé 137 et tous les composés N-Arylés 138 à 141 montrent une activité dose-dépendante et présentent à peu près le même profil d'inhibition de modérée à bonne avec 50% à 100 μ M et 35% à 50 μ M pour les plus actifs (Figure 115). Toutefois, cette inhibition est associée à une forte cytotoxicité à 100 μ M pour les composés 140 et 141 (viabilité \approx 50%) et une toxicité modérée à 100 μ M pour les composés 138 et 139 (viabilité \approx 70%). Seul le composé 137 ne présente pas de toxicité et est légèrement plus efficace que le favipiravir 11.

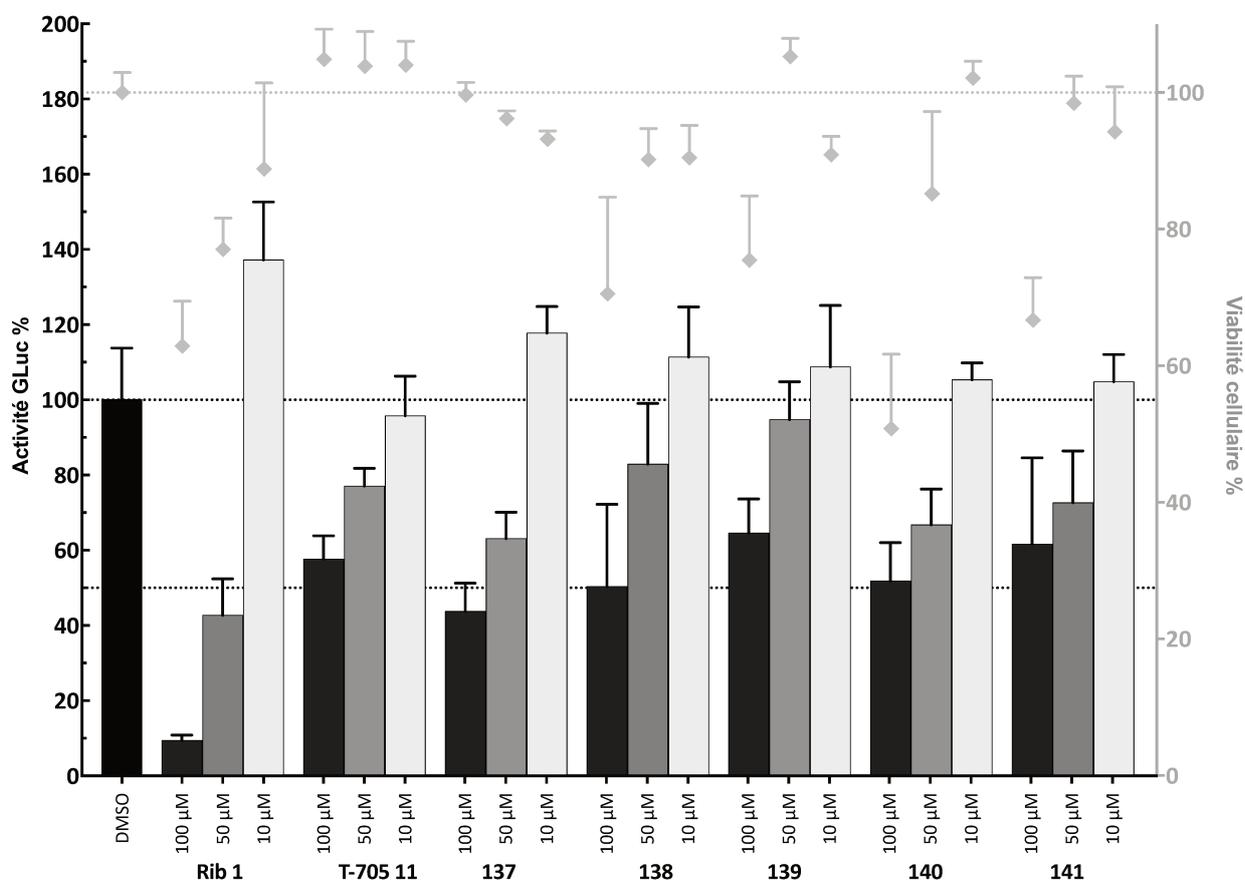


Figure 115. Activité du mini-génome en présence des ligands à chaîne aryle ou alkyle 137-141. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M en triplicat.

Les composés N-acylés 142 à 144 n'inhibent pas l'expression du mini-génome et le composé 143 est fortement cytotoxique à 100 μ M (Figure 116).

Ces composés ne sont donc pas très actifs. Par ailleurs, le composé 143 s'avère cytotoxique avec une perte de 50% de la viabilité cellulaire à 100 μ M. Seul le composé 145 présente une inhibition significative dose-dépendante sans cytotoxicité associée, jusqu'à 40% à 100 μ M, il demeure toutefois moins actif que la ribavirine 1 ou le T-705 11.

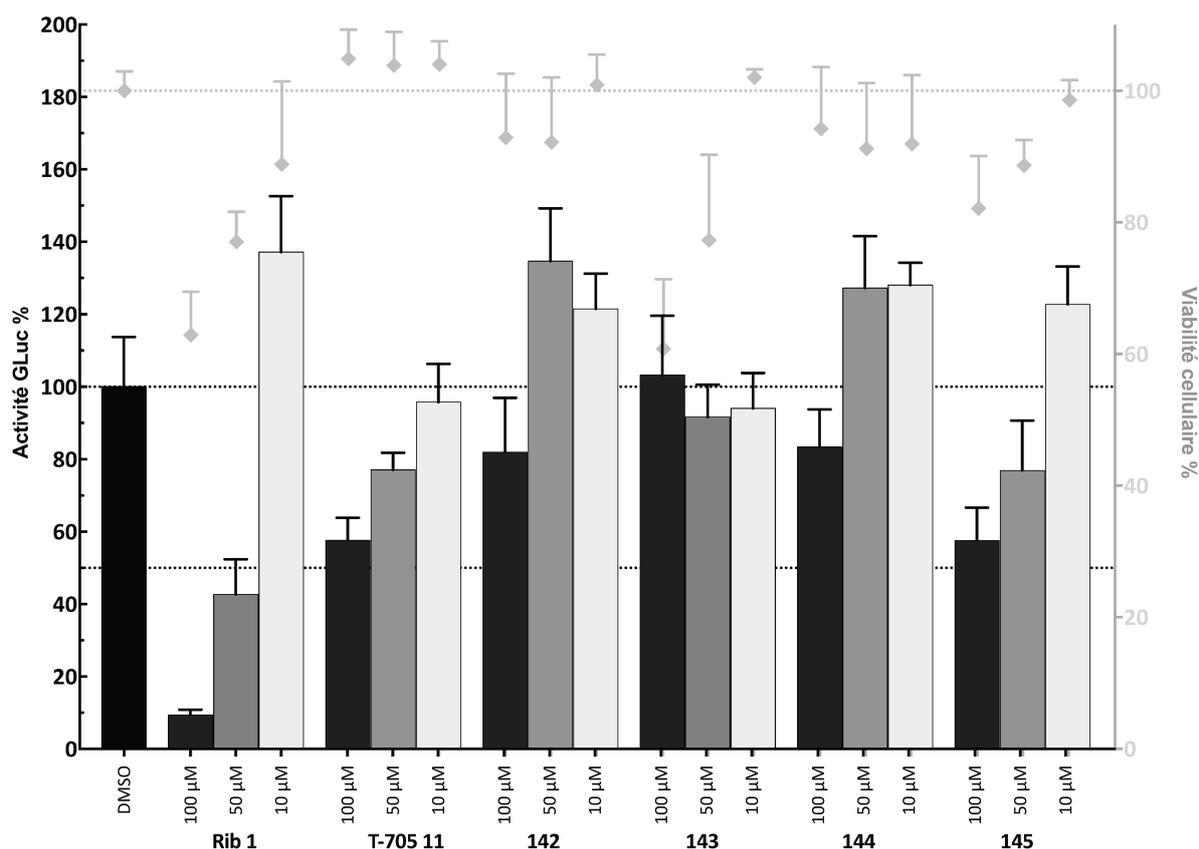


Figure 116. Activité du mini-génome en présence des ligands N-acylés 142-145. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M en triplicat.

Le composé N-carbaminé 146 diminue l'activité du mini-génome de 20% à 100 µM tandis que le composé N-sulfonylé 147 la réduit de 40%, sans aucune cytotoxicité associée (Figure 117).

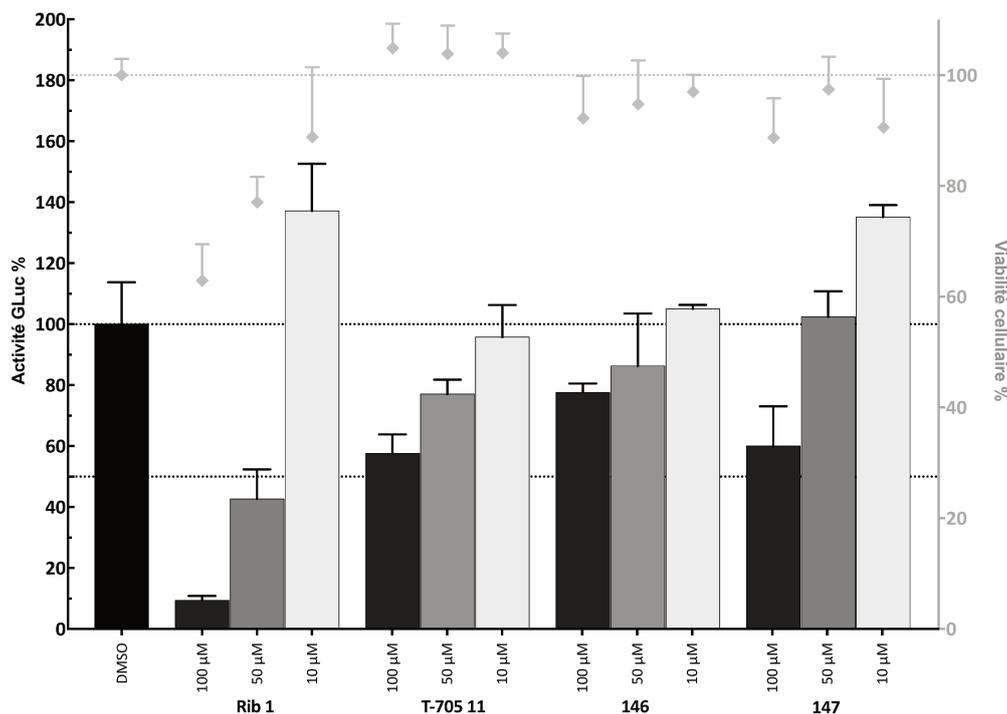


Figure 117. Activité du mini-génome en présence des composés N-carbaminé 146 et N-sulfonylé 147. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 µM, 50 µM et 100 µM en triplicat.

Les composés hétérocycliques 148 et 149 n'ont montré aucun effet sur l'activité du mini-génome quelque soit la concentration (Figure 118).

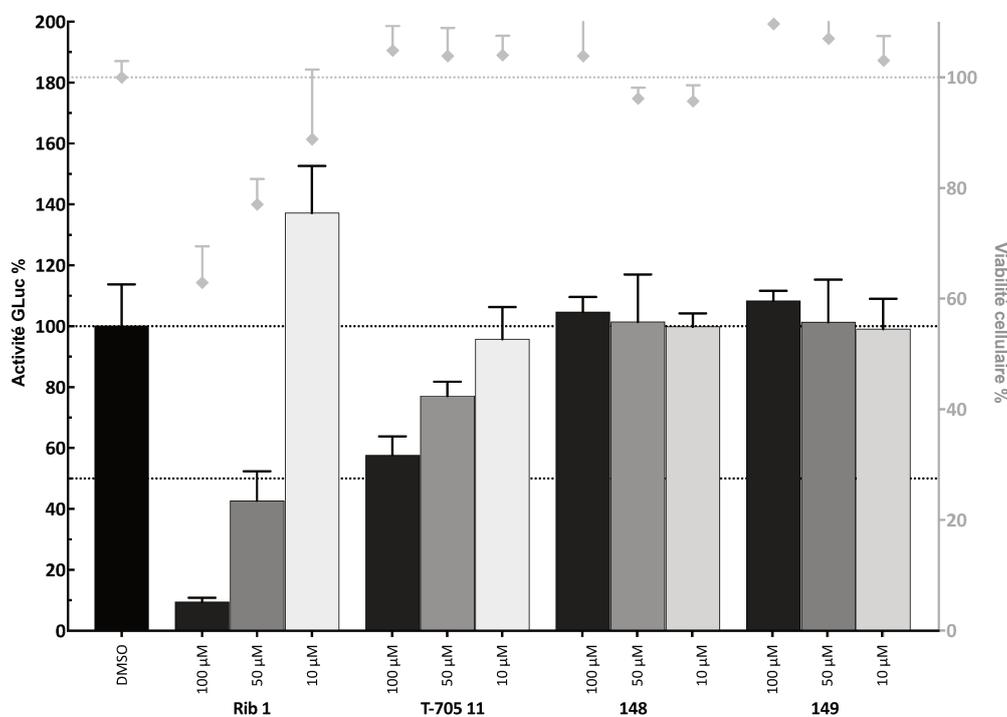


Figure 118. Activité en mini-génome des composés hétérocycliques 148 et 149. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 µM, 50 µM et 100 µM en triplicat.

Les composés N-benzylés 150 à 153 n'ont montré aucune inhibition de l'activité du mini-génome quelque soit la concentration (Figure 119).

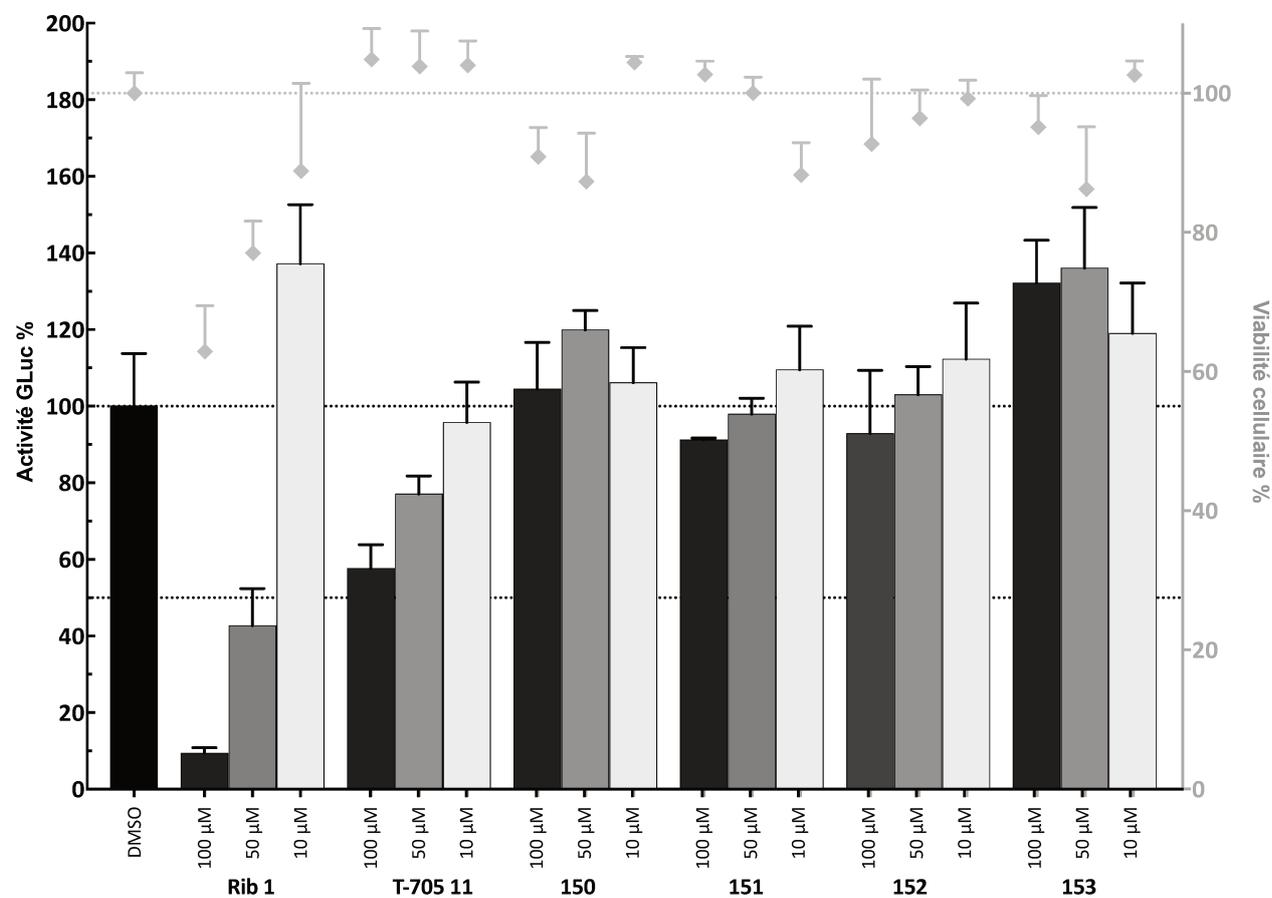


Figure 119. Activité en mini-génome des composés N-benzylés 150-153. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 μM, 50 μM et 100 μM en triplicat.

Le composé bioisostère triazole 242 induit une forte réduction de l'activité du mini-génome de manière dose-dépendante (Figure 119) mais induit aussi une importante cytotoxicité, rendant son activité non-spécifique.

Enfin, les composés bioisostères tétrazole 255 et carboxamide 264 ne présentent ni inhibition de l'activité du mini-génome ni cytotoxicité quel que soit la concentration.

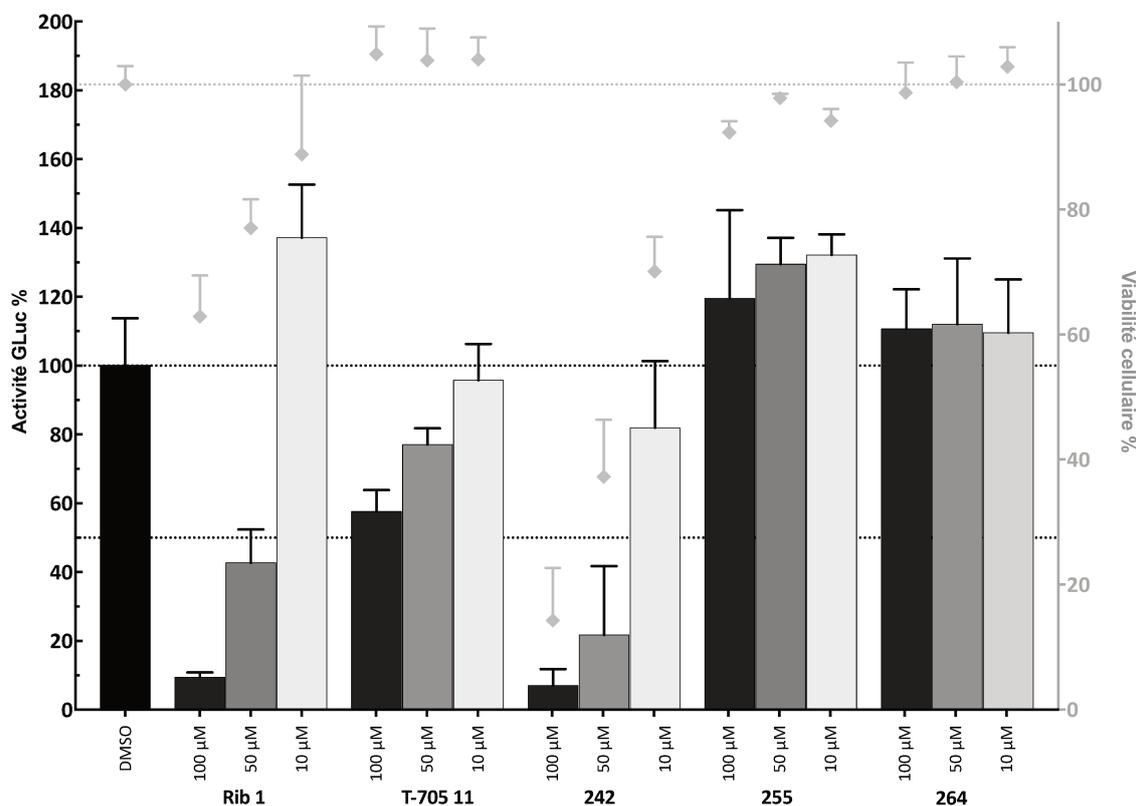


Figure 120. Activité en mini-génome des bioisostères et analogues des DCAs 242, 255, et 264. Ordonnée gauche : activité GLuc. Ordonnée droite : pourcentage de viabilité cellulaire. Chaque composé a été testé à 10 μM, 50 μM et 100 μM en triplicat.

Sur les 22 DCAs et analogues testés, seuls 4 composés présentent une inhibition significative mais modérée, dose-dépendante, de l'expression du mini-génome à 100 μM et parfois à 50 μM, sans cytotoxicité associée.

- Le composé méta N-arylé 62 présente une inhibition de 40% à 100 μM et à 50 μM
- Le composé N-alkylé 137 présente une inhibition de 50% à 100 μM et 35% à 50 μM
- Le composé N-acylé 145 présente une inhibition de 40% à 100 μM et 30% à 50 μM
- Le composé N-sulfonylé 147 présente une inhibition de 40% à 100 μM mais n'est pas actif à 50 μM

Les DCAs sont des composés ioniques dont l'état d'ionisation varie en fonction du pH avec l'acidité de l'acide carboxylique ($pK_a \approx 2$), l'acidité de l'énol ($pK_a \approx 7.8$) et enfin la basicité de l'azote de la pipéridine

(pKa \approx 7.5). Ils sont chargés négativement dans les conditions physiologiques. La forme ionisée d'un médicament, qu'elle soit négativement ou positivement chargée, est généralement défavorable à la traversée de la membrane cellulaire et influe sur la liposolubilité et hydrosolubilité de la molécule. Partant de ces données, il est attendu que les DCAs présentent une mauvaise pénétration cellulaire, handicapante pour leur efficacité dans des systèmes cellulaires

Le log P rend compte de la tendance d'une molécule à s'accumuler dans les membranes biologiques et s'il est élevé, le risque de bioaccumulation est important. Diverses études statistiques ont mis en évidence les valeurs optimales de log P pour qu'un composé (typiquement un médicament) soit absorbé par le corps humain.

Si l'on compare la lipophilie du composé **137** aux composés N-arylés **138** à **141**, il possède un log P un peu élevé de 4.19 (Théorique avec MarvinSketch) mais inférieur à ceux des composés **138** à **141** (log P > 5). Il présente une meilleure balance hydrophile/hydrophobe qui peut lui permettre de mieux pénétrer à l'intérieur des cellules. Les composés **151** à **153** présentent aussi un log P simulé élevé défavorable à leur pénétration cellulaire, ce qui peut être une des raisons de leur absence d'activité sur le mini-génome.

Des bioisostères de DCAs ont été décrites dans la littérature²⁰⁵ pour augmenter l'activité du composé parent dans des tests cellulaires et cette stratégie s'est avérée efficace. En particulier avec un composé triazole dirigé contre l'intégrase de HIV-1 qui était entré en phase clinique. Les trois bioisostères **242**, **255** et **264** ont été synthétisés dans cet objectif. Malheureusement, le bioisostère triazole **242** qui présentait une inhibition de 50% de l'exonucléase de MOPV à 100 μ M s'est montré toxique dès 10 μ M, et particulièrement à 100 μ M avec moins de 15% de viabilité cellulaire. A l'origine de cette toxicité, nous suspectons une dégradation rapide de ce composé dans des conditions physiologiques conduisant à l'accumulation d'un métabolite toxique. Les bioisostères tétrazole **255** et amide **264** ne sont ni actifs ni toxiques sur le mini-génome, ils ne sont pas ou peu actifs sur l'exonucléase de MOPV. Enfin, sur l'endonucléase du LCMV, le bioisostère **255** est un ligand médiocre ($K_d \approx$ 5 μ M) et le **264** ne se fixe pas à l'enzyme.

D'un point de vue mode d'action, la cible du composé **137** ne semble pas être l'exonucléase car le composé n'a montré aucune activité contre l'enzyme à 100 μ M (Figure 110).

Par contre, les composés **62**, **145** et **147** modérément actifs sur le mini-génome (40% à 100 μ M) ont aussi montré une inhibition de l'exonucléase de MOPV à 100 μ M respectivement de 60%, 55% et 80% (Figure 110). Toutefois, les autres composés (**140**, **142**, **146** et **153**) ayant montré une inhibition de

²⁰⁵ V. Nair, M. Okello, *Molecules*, **2015**, **20**, 12623-12651

l'exonucléase de MOPV égale ou supérieure à 80% à 100 µM, n'ont pas montré d'activité significative dans le test mini-génome. Le composé **140** a montré une forte cytotoxicité à 100 µM, les composés **142**, **146** et **153** ne sont ni actifs ni toxiques.

Les données concernant le composé **142** sont surprenantes et décevantes car il possède une IC₅₀ de 3.9 µM sur l'exonucléase de MOPV (Figure 111) et nous avons aussi montré qu'il inhibait l'activité de l'endonucléase du LCMV (Figure 106). Est-ce que son log P un peu élevé est à l'origine d'une mauvaise pénétration cellulaire ou est-ce qu'une métabolisation rapide dans des milieux biologiques est responsable de son absence d'activité en mini-génome ? Des travaux complémentaires sont en cours pour tenter de répondre à ces questions.

Pour tenter de comprendre pourquoi peu de DCAs de 2^{nde} génération réduisent l'expression du mini-génome, nous avons choisi de conduire une étude de stabilité sur quelques DCAs représentant de 2 familles dans les conditions du test en mini-génome.

IV. Etude de stabilité

Deux composés représentant 2 familles (N-arylés, et N-acylés) ont été sélectionnés pour réaliser l'étude de stabilité dans des conditions mimant les fluides biologiques.

Quatre milieux ont été choisis :

- le DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's minimal essential Medium*, **Milieu A**) mime un milieu chimique. C'est un milieu de culture cellulaire contenant des acides aminés, des sels inorganiques (KCl, MgSO₄...), du glucose, et des vitamines (acide folique, nicotinamide, riboflavine et vitamine B12).
- le DMEM + 10% FBS (**Milieu B**). Le sérum de veau foetal est un facteur essentiel de la croissance cellulaire. Il contient essentiellement de la BSA, mais également des acides aminés, des sucres, des lipides et des hormones. Le milieu B mime le milieu extra-cellulaire.
- les extraits cellulaires BHK-21 (**Milieu C**), reflèteront les conditions utilisées lors du test en mini-génome et miment donc le milieu intra-cellulaire.
- Une solution tampon Tris HCl pH 7.4, KCl 140 mM (**Milieu D**), qui est la solution utilisée pour la dilution des extraits de cellules.

Pour chaque condition, les composés ont été incubés à 100 µM dans chaque milieu pendant 72h à 37°C. A chaque intervalle de temps choisi, 200 µL de milieu ont été prélevés et injectés sur un système HPLC grâce à un système de filtration en ligne permettant de s'affranchir de la partie protéique de l'échantillon. Les composés ont été détectés par UV à 290 nm, correspondant à leur maximum d'absorption. L'identification des composés et des métabolites a été confirmée par injection

d'échantillons de références. Les demi-vies ($t_{1/2}$) respectives des composés ont été calculées et sont rassemblées dans le Tableau 25 :

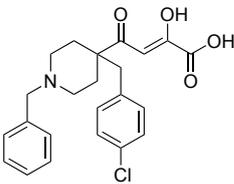
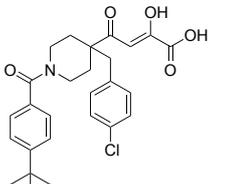
	Composé 35 	Composé 143 
$t_{1/2}$ Milieu A	24h	38h
$t_{1/2}$ Milieu B	40h	60h
$t_{1/2}$ Milieu C	ND	ND
$t_{1/2}$ Milieu D	> 72h	> 72h

Tableau 25. Résultats de l'étude de stabilité des DCAs. Temps de demi-vie estimés dans différents milieux. Milieu A : DMEM. Milieu B : DMEM + 10% FBS. Milieu C : extraits cellulaires BHK-21. Milieu D : Tris HCl pH 7.4, KCl 140 mM.

En milieu A, les composés présentent des demi-vies comprises entre 24h et 38h. En milieu B, les composés présentent des demi-vies comprises entre 40h et 60h. Dans les 2 milieux, c'est le composé N-acylé **143** qui est le plus stable.

Il ne nous a pas été possible d'analyser les résultats des incubations en milieu C. Dans tous les cas, tous les temps d'incubation et pour tous les composés, nous avons observé une précipitation importante du milieu, qu'il ne nous était pas possible d'injecter en HPLC, même après centrifugation ou encore filtration, la précipitation se poursuivait. Des essais de précipitation contrôlée ou encore de filtration ont montré des résultats non homogènes et ininterprétables.

Lors du suivi de la cinétique par HPLC et HPLC/MS des milieux A et B, nous avons tenté d'identifier les métabolites issus de la dégradation des composés parents. Nous avons pu observer une légère apparition de la méthyle cétone correspondante issue d'une possible réaction de rétro-Claisen.

D'autre part, la littérature relate pour le composé **237** (S-1360), entré en phase clinique pour son activité contre l'intégrase du VIH (voir [Chapitre 1, IV.1](#)), une possible dégradation par des aldo-céto réductases qui réduisent l'une des fonctions carbonyles du groupement dicéto²⁰⁶.

²⁰⁶ M. J. C. Rosemond, L. St. John-Williams, T. Yamaguchi, T. Fujishita and J. S. Walsh, *Chem. Biol. Interact.*, **2004**, **147**, 129–139.

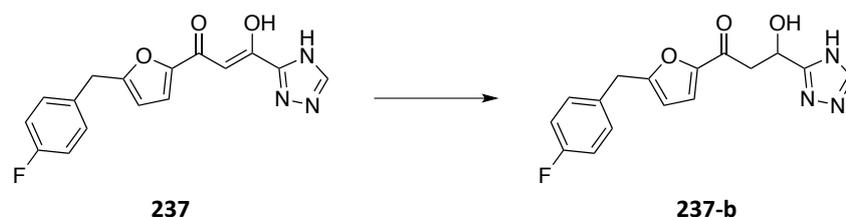


Schéma 44. Dégradation du composé **237** en composé **237-b** par réduction.

Bien que nous n'ayons pas obtenu de données concernant la potentielle métabolisation des DCAs de 2nde génération en extraits cellulaires, ces éléments détectés en LCMS, et cette possible métabolisation sera à considérer.

V. Evaluation de quelques DCAs de 2nde génération contre le virus de Junin

1. Principe du test

16 DCAs et analogues de 2nde génération ont été envoyés à des collaborateurs pour être testés contre le virus de Junin (Dr. Garcia, Argentine). Leur activité antivirale a été déterminée à l'aide d'un test d'inhibition de la production virale. Des cellules Vero ou A549 ont été infectées avec un M.O.I de 0.1 PFU/cell. Les cellules ont ensuite été incubées avec des concentrations croissantes de ligand jusqu'à 500 μ M. Après 48h d'incubation à 37°C, la production virale a été mesurée et a permis de déterminer les EC₅₀. En parallèle, la cytotoxicité des composés a également été déterminée (CC₅₀). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

2. Résultats

A ce jour, seulement 10 composés ont pu être évalués. Leurs EC₅₀ et CC₅₀ sont rassemblées dans le Tableau 26.

Composés	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
35	> 50	> 500
62	> 50	215.85 ± 18.53
139	> 50	> 500
140	4.16 ± 0.09	> 500
142	> 50	> 500
143	6.34 ± 0.35	> 500
144	> 50	> 500
145	25.08 ± 0.32	> 500
146	46.50 ± 0.63	> 500
147	> 50	> 500
149	36.35 ± 1.96	> 500
150	25.85 ± 0.59	> 500
151	27.75 ± 1.47	> 500
152	> 50	292.48 ± 4.34
242	> 5	52.75 ± 10.51
255	> 50	> 500

Tableau 26. Valeurs d'EC₅₀ et de CC₅₀ déterminées lors d'un test de production virale pour les composés 35, 62, 139, 140, 142-147, 149, 150 – 152, 242 et 255.

A l'exception des composés 62, 152, et 242 qui présentent des CC₅₀ de 215 μM, 292 μM et 53 μM, tous les autres composés n'ont pas montré de toxicité jusqu'à 500 μM.

Les composés 139, 142, 144, 147 et 152 possèdent tous des EC₅₀ supérieures à 50 μM. Les composés 145, 150, et 151 présentent des EC₅₀ autour de 25 μM. Enfin, les composés 140 et 143 ont des EC₅₀ autour de 5 μM. Ces résultats sont préliminaires et nous sommes en attente de résultats complémentaires notamment les résultats de tests permettant d'identifier la cible thérapeutique des composés afin de voir s'ils atteignent la machinerie répliquative comme attendu.

VI. Extension au *Bunyavirales*

1. Les *Bunyavirales*

Les *Bunyavirales* sont responsables de plus de 50 millions d'infection chaque année engendrant au moins 30 000 décès. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) est associé à des taux élevés de mortalité. Les hantavirus sont responsables de fièvres hémorragiques à syndrome rénal ou cardio-pulmonaire. L'ordre des *Bunyavirales* regroupent plus de 350 virus et certains ont fait l'objet de

vectorisation comme le virus de la vallée du Rift (RVFV) soulignant la menace de ces virus lors d'une action bio-terroriste. Ils font l'objet de faible priorité d'étude alors que leur danger est imminent.

Comme les Arenavirus, ils possèdent un domaine endonucléase ayant une architecture similaire malgré une faible homologie de séquence⁸⁰. Ce domaine réalise pareillement l'hydrolyse d'un ARNs selon le mécanisme métal-dépendant connu chez les Arenavirus médié par la triade catalytique PD...(D/E)XK.

L'évaluation des DCAs anti-arenavirus contre différents *Bunyavirales* permettrait d'envisager ces molécules comme « *pan-genus* », c'est-à-dire pouvant agir sur un panel de virus proches au niveau de la phylogénie, possédant une endonucléase, pour offrir une solution antivirale à large spectre à long terme.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Gilles Querat (IRD, Marseille), nous avons eu l'opportunité de faire évaluer certains DCAs de 2^{ème} génération. Ils ont été testés sur des cellules infectées par les virus Tahyna (TAHV), Hazara (HAZV) et le virus de la vallée du Rift (RVFV). Ces virus appartiennent respectivement aux genres *Orthobunyavirus*, *Orthonairovirus* et *Phlebovirus*. Leur diversité phylogénique permet d'avoir une bonne représentativité de l'action de ligands sur les virus appartenant à l'ordre des *Bunyavirales*.

2. Evaluation de 8 DCAs de 2nde génération en cellules infectées par des Bunyavirales

a. Principe du test

Des cellules Vero E6 (densité de 5×10^4 cellules par puits) sont infectées par les différents virus puis mises en présence des différents ligands avec une gamme de concentration permettant d'accéder aux IC₅₀. Les incubations sont réalisées à 37°C pendant 72h. La quantité d'ARN viral produit est ensuite quantifiée par RT-PCR et permet de déterminer la production virale.

b. Résultats

Les DCAs de 2nde génération : **35**, **138**, **141**, **143**, **148**, **149**, **152**, et **153** ont été testés contre les virus Tahyna (TAHV), Hazara (HAZV) et de la vallée du Rift (RVFV). Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 27.

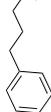
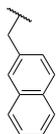
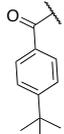
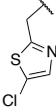
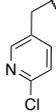
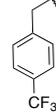
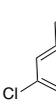
Structure								
Composé	35	138	141	143	148	149	152	153
CC ₅₀ (μM)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	70	170
IC ₅₀ (μM) TAHV	> 50	> 50	> 50	40	> 50	> 50	28	> 50
IC ₅₀ (μM) HAZV	50	> 50	50	34	> 50	> 50	15	> 50
IC ₅₀ (μM) RVFV	> 50	> 50	> 50	15	> 50	> 50	15	50

Tableau 27. CC₅₀ et IC₅₀ des DCAs de 2nde génération contre des cellules infectées par les virus TAHV, HAZV, et RVFV.

Les composés **35**, **138**, et **141** ne présentent pas d'activité significative contre les trois virus, leur IC₅₀ est supérieure à 50 μM. Les composés hétérocycliques **148** et **149** ne présentent pas d'activité significative. La substitution en para du cycle phényle par un groupement -CF₃ (composé **152**) permet d'atteindre des IC₅₀ de 28 μM (TAHV) et 15 μM (HAZV et RVFV) mais ces activités sont associées avec une forte cytotoxicité (SI = 2,5 et 4,6). La di-substitution du cycle phényle en méta par -Cl (composé **153**) n'apporte aucune amélioration (IC₅₀ ≥ 50). Enfin, le composé **143** comportant un groupement benzyle amide et substitué en para par un groupement t-Bu est actif à hauteur de 40 μM (TAHV), 34 μM (HAZV), et 15 μM (RVFV). Ce composé n'est pas cytotoxique (CC₅₀ > 200 μM).

Dans l'ensemble, les DCAs testés n'ont pas montré d'activité antivirale pour les virus TAHV, HAZV et RVFV. Il convient donc de valider leur mode d'action au niveau de tests *in vitro*. Leur mode d'action étant d'agir sur l'endonucléase de ces *Bunyavirales*, il serait judicieux de construire leurs relations structure-activité à l'aide d'un test *in vitro*. Cette expertise a été développée au sein du laboratoire dans l'équipe du Dr. Reguera. Un test par FRET a été développé pour évaluer l'activité de l'endonucléase du virus Toscana (genre Phlebovirus, ordre *Bunyavirales*).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de thèse a pour objectif de concevoir des antiviraux contre les Arenavirus, hautement pathogènes et trop peu étudiés. Ces virus sont transmis par les rongeurs et sont responsables, entre autres, de graves fièvres hémorragiques dont la fièvre de Lassa qui infecte chaque année 300 000 personnes. L'absence actuelle de solutions thérapeutiques efficaces (vaccins et/ou antiviraux) en fait une priorité d'étude. Il est donc urgent de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques et des antiviraux spécifiques associés. Ce projet se propose de considérer l'endonucléase et l'exonucléase des Arenavirus comme nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre ces virus.

A partir d'un criblage préalable d'une chimiothèque de 1^{ère} génération sur l'endonucléase d'un Arénavirus, la famille de dicéto-acides (DCAs) s'est avérée inhibitrice de l'activité de l'endonucléase du LCMV. A partir des relations structure-activité établies pour la 1^{ère} génération de DCAs et de l'étude de structures cristallographiques en complexe enzyme/ligand résolues au laboratoire, une chimiothèque de 18 DCAs a été conçue. De plus, afin d'anticiper le caractère ionisable des DCAs, défavorable en contexte cellulaire, 4 bioisostères de DCA ont été envisagés.

La voie de synthèse des DCAs de 2^{nde} génération a été revisitée et optimisée. Elle a ainsi permis d'accéder aux composés finaux en neuf étapes linéaires. Des stratégies visant à raccourcir cette voie ou à la rendre plus convergente ont été explorées mais n'ont pas encore abouti.

A l'issue de ces optimisations, une chimiothèque de 22 DCAs et analogues a été synthétisée et caractérisée. La caractérisation des DCAs finaux s'est avérée assez complexe en raison du mélange de tautomères et conformères en solution. Une approfondie en collaboration avec le Dr. Carine Baragney (Montpellier) faisant varier les conditions d'acquisition a permis de maîtriser les phénomènes d'échange et d'obtenir des informations importantes sur les conformations majoritaires adoptées par ces composés en solvant organique. Une étude identique en solution aqueuse et/ou en présence d'ions métalliques est en cours pour caractériser les tautomères et conformères et le comportement de chélation de ces composés dans ces milieux.

Les composés ont été évalués sur les deux nucléases d'Arenavirus : l'endonucléase du LCMV et l'exonucléase du MOPV. Ces 2 enzymes ont en commun une activité d'hydrolyse d'un ARN substrat *via* un mécanisme dépendant d'ions métalliques. L'efficacité des composés en tant que ligands et/ou inhibiteurs a été caractérisée par des méthodes biophysiques (DSF et MST), *in vitro* dans des tests biochimiques et *in cellula* dans un système mini-génome et en cultures de cellules infectées.

Au niveau des outils de caractérisation disponibles au démarrage de ce projet, plusieurs verrous technologiques ont orienté nos travaux et certains d'entre eux ont été résolus durant cette thèse. D'une part, aucun test d'activité endonucléase à haut-débit n'était encore disponible au sein du laboratoire, ce qui nous a amené à développer des outils de criblages biophysiques robustes (DSF et MST). Durant l'année 2018, la production par le Dr. Sergio Hernandez de la protéine L entière du LCMV possédant une activité endonucléase adaptée pour du criblage HTS, a permis d'initier une étude *in vitro* et le développement d'un test à haut-débit par FRET est actuellement en cours (plaque 384 puits).

Au niveau des résultats obtenus, à l'exception de deux composés, tous les DCAs stabilisent l'endonucléase du LCMV et l'enzyme a présenté de bonnes affinités pour au moins 8 composés avec des K_d de 0.11 à 1 μ M. Le meilleur composé **142** a un K_d de 0.11 μ M et inhibe l'enzyme dès 10 μ M. Pour compléter ce travail, les 8 meilleurs ligands seront testés *in vitro* sur l'enzyme cible et des tests de spécificité seront réalisés sur d'autres endonucléases.

Sur les 21 DCAs, 18 stabilisent l'exonucléase du MOPV. 11 composés présentent une inhibition supérieure à 50% à 100 μ M et pour 5 d'entre eux une inhibition supérieure à 80% à 100 μ M. Malheureusement, un seul composé **142**, possède une IC_{50} inférieure à 5 μ M. Le composé **142**, inhibe ainsi les deux activités nucléases. Pour compléter ce travail, des tests de spécificité seront réalisés sur différentes exonucléases notamment l'exonucléase de la protéine nsp14 des coronavirus.

Des essais de co-cristallisation des deux nucléases avec le composé **142** sont en cours et réalisés par la doctorante Thi-Hong Van Nguyen au sein du laboratoire. Concernant l'endonucléase du LCMV, ceci nous permettra d'identifier l'impact de la N-acylation de l'azote de la pipéridine (**142**) en termes d'interactions avec les résidus du site actif versus la structure 3D en complexe avec le composé parent **35** à l'origine de ce travail de thèse. Par ailleurs, à ce jour aucune structure d'une exonucléase d'Arénavirus en complexe avec un ligand n'a été reportée. L'obtention d'un tel complexe fournira des informations précieuses sur l'ancrage des ligands dans le site actif de l'enzyme.

L'accès à des facilités de criblage cellulaire HTS de composés contre des Arénavirus est assez limité en France et en Europe. C'est seulement au cours de l'année 2018, que le test en mini-génome LCMV a été mis en place dans l'équipe par le Dr. Sergio Hernandez. Sur 22 DCAs testés, seuls 4 composés présentent une inhibition significative mais modérée, dose-dépendante, de l'expression du mini-génome à 100 μ M et parfois à 50 μ M, sans cytotoxicité associée. Ces faibles inhibitions sont probablement dues à une mauvaise pénétration cellulaire et/ou à une métabolisation trop rapide en contexte cellulaire. Pour commencer à répondre sur ce second point, une étude de stabilité sur 2 composés modèles dans des conditions mimant les fluides biologiques a été réalisée et les résultats nous laissent à penser que le

motif β -céto-énol est suffisamment fragile pour qu'il faille envisager dans le futur de le cycliser pour le protéger. Certaines données sont à compléter.

Dans le cas d'une récente collaboration avec le Dr. Cybel Garcia (Argentine), 16 DCAs de 2nd génération ont été testés dans des cellules infectées par le virus Junin. Des résultats préliminaires ont montré que deux composés (**140** et **143**), non cytotoxiques, possédaient une EC₅₀ inférieure à 5 μ M. Des études complémentaires sont en cours pour voir s'ils ont le mode d'action attendu.

Enfin, il a été envisagé de considérer les DCAs comme des molécules « *pan-genus* », c'est-à-dire pouvant agir sur un panel de virus proches au niveau de la phylogénie, possédant une endonucléase, pour offrir une solution antivirale à large spectre. 8 DCAs ont été testés en collaboration avec le Dr. Gilles Querat (IRD, Marseille) contre plusieurs virus de l'ordre *Bunyavirales* (virus Tahyna (TAHV), Hazara (HAZV) et de la vallée du Rift (RVFV)), mais n'ont pas montré d'activité antivirale notable, à l'exception de deux composés qui ont montré une activité modérée. Un test *in vitro* par FRET en plaques de 384 puits a été développé au sein du laboratoire sur l'endonucléase du virus Toscana, un représentant de cette famille, pour envisager de pousser la caractérisation de ces composés *in vitro*.

Plus généralement, cette thèse est une contribution à l'avancement du développement de molécules « anti-nucléases virales » de la famille des virus à ARN négatif segmentés (*Arenavirus*, *Bunyavirales*, etc...), aussi bien au niveau des outils de criblage développés et en cours d'optimisation, qu'au niveau des résultats obtenus. Une base solide a été obtenue avec les DCAs de 2nde génération, dont on sait déjà qu'il faudra continuer à les optimiser vers une 3^{ème} génération de composés encore plus actifs, plus stables et spécifiques.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] C. Armstrong and R. D. Lillie, Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Luis encephalitis epidemic, *Public Health Reports (1896-1970)*, **1934**, **49**, 1019–1027.
- [2] H. Wulff, B. M. McIntosh, D. B. Hamner and K. M. Johnson, Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in south-east Africa, *Bull World Health Organ.*, **1977**, **55**, 441–444.
- [3] J. Hepojoki, P. Salmenperä, T. Sironen, U. Hetzel, Y. Korzyukov, A. Kipar and O. Vapalahti, Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 8657–8660.
- [4] P. Maes, S. V. Alkhovsky, Y. Bào, M. Beer, M. Birkhead, T. Briese, M. J. Buchmeier, C. H. Calisher, R. N. Charrel, I. R. Choi, C. S. Clegg, J. C. de la Torre, E. Delwart, J. L. DeRisi, P. L. D. Bello, F. D. Serio, M. Digiaro, V. V. Dolja, C. Drosten, T. Z. Druciarek, J. Du, H. Ebihara, T. Elbeaino, R. C. Gergerich, A. N. Gillis, J.-P. J. Gonzalez, A.-L. Haenni, J. Hepojoki, U. Hetzel, T. Hò, N. Hóng, R. K. Jain, P. J. van Vuren, Q. Jin, M. G. Jonson, S. Junglen, K. E. Keller, A. Kemp, A. Kipar, N. O. Kondov, E. V. Koonin, R. Kormelink, Y. Korzyukov, M. Krupovic, A. J. Lambert, A. G. Laney, M. LeBreton, I. S. Lukashevich, M. Marklewitz, W. Markotter, G. P. Martelli, R. R. Martin, N. Mielke-Ehret, H.-P. Mühlbach, B. Navarro, T. F. F. Ng, M. R. T. Nunes, G. Palacios, J. T. Pawęska, C. J. Peters, A. Plyusnin, S. R. Radoshitzky, V. Romanowski, P. Salmenperä, M. S. Salvato, H. Sanfaçon, T. Sasaya, C. Schmaljohn, B. S. Schneider, Y. Shirako, S. Siddell, T. A. Sironen, M. D. Stenglein, N. Storm, H. Sudini, R. B. Tesh, I. E. Tzanetakis, M. Uppala, O. Vapalahti, N. Vasilakis, P. J. Walker, G. Wáng, L. Wáng, Y. Wáng, T. Wèi, M. R. Wiley, Y. I. Wolf, N. D. Wolfe, Z. Wú, W. Xú, L. Yang, Z. Yāng, S.-D. Yeh, Y.-Z. Zhāng, Y. Zhèng, X. Zhou, C. Zhū, F. Zirkel and J. H. Kuhn, Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyvirales: update 2018, *Arch Virol.*, **2018**, 1–16.
- [5] Old world/New world Arenaviruses [en ligne]. Center for Disease Control and Prevention. Disponible sur : < <https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/arenaviruses.html> > (consulté en 12.2017)
- [6] J. Shao, Y. Liang and H. Ly, Human Hemorrhagic Fever Causing Arenaviruses: Molecular Mechanisms Contributing to Virus Virulence and Disease Pathogenesis, *Pathogens*, **2015**, **4**, 283–306.
- [7] N. Singh, M. E. Levi and the AST Infectious Diseases Community of Practice, Arenavirus and West Nile Virus in Solid Organ Transplantation: Arenavirus and WNV in SOT, *Am. J. Transplant.*, **2013**, **13**, 361–371.
- [8] S. K. Fehling, F. Lennartz, T. Strecker, Multifunctional Nature of the Arenavirus RING Finger Protein Z, *Viruses*, **2012**, **4**, 2973–3011.
- [9] S. Olschläger, L. Flatz, Vaccination strategies against highly pathogenic arenaviruses: the next steps toward clinical trials, *PLoS Pathog.* **2013**, **9**, e1003212.
- [10] R. M. Gómez, C. Jaquenod de Giusti, M. M. Sanchez Vallduvi, J. Frik, M. F. Ferrer and M. Schattner, Junín virus. A XXI century update, *Microbes Infect.*, **2011**, **13**, 303–311.
- [11] Lassa Fever - Nigeria. Disease outbreak news [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.who.int/csr/don/27-may-2016-lassa-fever-nigeria/en/> > (consulté en 06.2017)
- [12] Lassa Fever - Nigeria. Disease outbreak news [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.who.int/csr/don/23-march-2018-lassa-fever-nigeria/en/-nigeria/en/> > (consulté en 07.2018)
- [13] J. C. Clegg, Influence of climate change on the incidence and impact of arenavirus diseases: a speculative assessment, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2009**, **15**, 504–509.
- [14] D. D. Auperin, R. W. Compans, D. H. L. Bishop, Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New world and Old world arenaviruses, *Virology*, **1982**, **121**, 200–203.
- [15] D. J. Burri, D. J. R. Palma, S. Kunz, A. Pasquato, Envelope Glycoprotein of Arenaviruses, *Viruses*, **2012**, **4**, 2162–2181.
- [16] W. Cao, M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell, M. B. Oldstone, Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus, *Science*, **1998**, **282**, 2079–2081.
- [17] B. Morin, B. Coutard, M. Lelke, F. Ferron, R. Kerber, S. Jamal, A. Frangeul, C. Baronti, R. Charrel, X. de Lamballerie, C. Vonrhein, J. Lescar, G. Bricogne, S. Günther, B. Canard, The N-Terminal Domain of the Arenavirus L Protein Is an RNA Endonuclease Essential in mRNA Transcription, *PLoS Pathog.*, **2010**, **6**, e1001038.
- [18] J. B. McCormick, I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott, R. Belmont-Williams, Lassa fever. Effective therapy with ribavirin, *N. Engl. J. Med.*, **1986**, **314**, 20–26.
- [19] P. E. Kilgore, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, J. N. Mills, M. R. Villagra, M. J. Montenegro, M. A. Costales, L. C. Paredes, C. J. Peters, Treatment of Bolivian hemorrhagic fever with intravenous ribavirin. Clinical Infectious Diseases, *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, **24**, 718–722.

- [20] K. T. McKee, J. W. Huggins, C. J. Trahan, B. G. Mahlandt, Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental argentine hemorrhagic fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, **32**, 1304–1309.
- [21] N. Mistry, J. Shaper, R. I. Crawford, A review of adverse cutaneous drug reactions resulting from the use of interferon and ribavirin, *Can. J. Gastroenterol.*, **2009**, **23**, 677–683.
- [22] N. Grancher, F. Kedzierewicz, V. Venard, A. Marsura, C. Finance, A. Le Faou, Physicochemical Study of Ribavirin Complexes with alpha-, beta- and gamma- Cyclodextrins, *Incl. Phenom. Macroc. Chem.*, **2005**, **51**, 149–157.
- [23] T. Koma, M. Patterson, C. Huang, A. V. Seregin, P. D. Maharaj, M. Miller, J. N. Smith, A. G. Walker, S. Hallam and S. Paessler, Machupo Virus Expressing GPC of the Candid#1 Vaccine Strain of Junin Virus Is Highly Attenuated and Immunogenic, *J. Virol.*, **2016**, **90**, 1290–1297.
- [24] R. Phillip Pittman and A. Stanley Plotkin. *Biodefense and Special Pathogen Vaccines - Vaccines (Sixth Edition)*, **2013**
- [25] GeoVax Reports Promising Results for Lassa Fever Vaccine [en ligne]. Disponible sur : <<https://www.geovax.com/news/entry/2017/07/10/geovax-reports-promising-results-for-lassa-fever-vaccine.html>> (consulté en 07.2018).
- [26] A. M. Lee, J. M. Rojek, A. Gundersen, U. Ströher, J.-M. Juteau, A. Vaillant and S. Kunz, *Virology*, **2008**, **372**, 107–117.
- [27] A. M. Lee, J. M. Rojek, C. F. Spiropoulou, A. T. Gundersen, W. Jin, A. Shaginian, J. York, J. H. Nunberg, D. L. Boger, M. B. A. Oldstone and S. Kunz, Unique Small Molecule Entry Inhibitors of Hemorrhagic Fever Arenaviruses, *J. Biol. Chem.*, **2008**, **283**, 18734–18742.
- [28] T. Bolken, S. Laquerre, Y. Zhang, T. Bailey, D. Pevear, S. Kickner, L. Sperzel, K. Jones, T. Warren and S. Amandalund, Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenaviruses, *Antiviral Res.* **2006**, **69**, 86–97.
- [29] J. York, D. Dai, S. M. Amberg and J. H. Nunberg, pH-Induced Activation of Arenavirus Membrane Fusion Is Antagonized by Small-Molecule Inhibitors, *J. Virol.*, **2008**, **82**, 10932–10939.
- [30] K. A. Cashman, M. A. Smith, N. A. Twenhafel, R. A. Larson, K. F. Jones, R. D. Allen, D. Dai, J. Chinsangaram, T. C. Bolken, D. E. Hruby, S. M. Amberg, L. E. Hensley and M. C. Guttieri, Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model, *Antiviral Res.*, **2011**, **90**, 70–79.
- [31] L. R. Whitby, A. M. Lee, S. Kunz, M. B. A. Oldstone and D. L. Boger, Characterization of lassa virus cell entry inhibitors: Determination of the active enantiomer by asymmetric synthesis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, **19**, 3771–3774.
- [32] G. Helguera, S. Jemielity, J. Abraham, S. M. Cordo, M. G. Martinez, J. A. Rodríguez, C. Bregni, J. J. Wang, M. Farzan, M. L. Penichet, N. A. Candurra and H. Choe, An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic Fever arenaviruses, *J. Virol.*, **2012**, **86**, 4024–4028.
- [33] J. Y. Rathbun, M. E. Droniou, R. Damoiseaux, K. G. Haworth, J. E. Henley, C. M. Exline, H. Choe and P. M. Cannon, Novel Arenavirus Entry Inhibitors Discovered by Using a Minigenome Rescue System for High-Throughput Drug Screening, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 8428–8443.
- [34] P. Wang, Y. Liu, G. Zhang, S. Wang, J. Guo, J. Cao, X. Jia, L. Zhang, G. Xiao and W. Wang, Screening and Identification of Lassa Virus Entry Inhibitors from an FDA-Approved Drugs Library, *J. Virol.*, **2018**, **92**, e00954-18.
- [35] Y. Furuta, B. B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D. F. Smee and D. L. Barnard, Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor, *Antiviral Res.*, **2013**, **100**, 446–454.
- [36] Y. Furuta, K. Takahashi, K. Shiraki, K. Sakamoto, D. F. Smee, D. L. Barnard, B. B. Gowen, J. G. Julander and J. D. Morrey, T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections, *Antiviral Res.*, **2009**, **82**, 95–102.
- [37] B. B. Gowen, T. L. Juelich, E. J. Sefing, T. Brasel, J. K. Smith, L. Zhang, B. Tigabu, T. E. Hill, T. Yun, C. Pietzsch, Y. Furuta and A. N. Freiberg, Favipiravir (T-705) Inhibits Junin Virus Infection and Reduces Mortality in a Guinea Pig Model of Argentine Hemorrhagic Fever, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, **7**, e2614.
- [38] D. Safronetz, K. Rosenke, J. B. Westover, C. Martellaro, A. Okumura, Y. Furuta, J. Geisbert, G. Saturday, T. Komono, T. W. Geisbert, H. Feldmann and B. B. Gowen, The broad-spectrum antiviral favipiravir protects guinea pigs from lethal Lassa virus infection post-disease onset, *Sci. Rep.*, **2015**, **5**, 14775.
- [39] L. Oestereich, T. Rieger, A. Lüdtke, P. Ruibal, S. Wurr, E. Pallasch, S. Bockholt, S. Krasemann, C. Muñoz-Fontela and S. Günther, Efficacy of Favipiravir Alone and in Combination With Ribavirin in a Lethal, Immunocompetent Mouse Model of Lassa Fever, *J. Infect. Dis.*, **2016**, **213**, 934–938.
- [40] E. Ortiz-Riaño, N. Ngo, S. Devito, D. Eggink, J. Munger, M. L. Shaw, J. C. de la Torre and L. Martínez-Sobrido, Inhibition of arenavirus by A3, a pyrimidine biosynthesis inhibitor, *J. Virol.*, **2014**, **88**, 878–889.

- [41] M. C. Artuso, P. C. Ellenberg, L. A. Scolaro, E. B. Damonte and C. C. García, Inhibition of Junín virus replication by small interfering RNAs, *Antiviral Res.*, **2009**, *84*, 31–37.
- [42] C. S. Sepúlveda, M. L. Fascio, M. B. Mazzucco, M. L. D. Palacios, R. F. Pellón, C. C. García, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte, Synthesis and Evaluation of N-Substituted Acridones as Antiviral Agents against Haemorrhagic Fever Viruses, *Antivir. Chem. and Chemother.*, **2008**, *19*, 41–47.
- [43] C. S. Sepúlveda, C. C. García, M. L. Fascio, N. B. D'Accorso, M. L. Docampo Palacios, R. F. Pellón and E. B. Damonte, Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative, *Antiviral Res.*, **2012**, *93*, 16–22.
- [44] B. W. Neuman, L. H. Bederka, D. A. Stein, J. P. C. Ting, H. M. Moulton and M. J. Buchmeier, Development of Peptide-Conjugated Morpholino Oligomers as Pan-Arenavirus Inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 4631–4638.
- [45] C. S. Sepúlveda, C. C. García and E. B. Damonte, Antiviral activity of A771726, the active metabolite of leflunomide, against Junín virus, *J. Med. Virol.*, **2017**, *90*, 819–827.
- [46] J. M. Rojek, G. Pasqual, A. B. Sanchez, N.-T. Nguyen, J.-C. de la Torre and S. Kunz, Targeting the proteolytic processing of the viral glycoprotein precursor is a promising novel antiviral strategy against arenaviruses, *J. Virol.*, **2010**, *84*, 573–584.
- [47] S. Urata, N. Yun, A. Pasquato, S. Paessler, S. Kunz and J. C. de la Torre, Antiviral Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Arenavirus Glycoprotein Processing by the Cellular Site 1 Protease, *J. Virol.*, **2011**, *85*, 795–803.
- [48] J. Lu, Z. Han, Y. Liu, W. Liu, M. S. Lee, M. A. Olson, G. Ruthel, B. D. Freedman and R. N. Harty, A Host-Oriented Inhibitor of Junin Argentine Hemorrhagic Fever Virus Egress, *J. Virol.*, **2014**, *88*, 4736–4743.
- [49] M. Perez, D. L. Greenwald and J. C. de La Torre, Myristoylation of the RING Finger Z Protein Is Essential for Arenavirus Budding, *J. Virol.*, **2004**, *78*, 11443–11448.
- [50] S. Bartolotta, C. C. García, N. A. Candurra and E. B. Damonte, Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid, *Arch. Virol.*, **2001**, *146*, 777–790.
- [51] S. M. Cordo, N. A. Candurra and E. B. Damonte, Myristic acid analogs are inhibitors of Junin virus replication, *Microbes infect.*, **1999**, *1*, 609–614.
- [52] Á. Vázquez-Calvo, M. A. Martín-Acebes, J.-C. Sáiz, N. Ngo, F. Sobrino and J. C. de la Torre, Inhibition of multiplication of the prototypic arenavirus LCMV by valproic acid, *Antiviral Res.*, **2013**, *99*, 172–179.
- [53] C. C. García, N. Candurra and E. B. Damonte, Antiviral and Virucidal Activities against Arenaviruses of Zinc-Finger Active Compounds, *Antivir. Chem. Chemother.*, **2000**, *11*, 231–237.
- [54] C. C. García, N. A. Candurra and E. B. Damonte, Differential inhibitory action of two azoic compounds against arenaviruses, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2003**, *21*, 319–324.
- [55] C. C. García, N. A. Candurra and E. B. Damonte, Mode of inactivation of arenaviruses by disulfide-based compounds, *Antiviral Res.*, **2002**, *55*, 437–446.
- [56] C. C. García, Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds, *J. Gen. Virol.*, **2006**, *87*, 1217–1228.
- [57] C. C. García, B. N. Brousse, M. J. Carlucci, A. G. Moglioni, M. M. Alho, G. Y. Moltrasio, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte, Inhibitory Effect of Thiosemicarbazone Derivatives on Junin Virus Replication In Vitro, *Antivir. Chem. Chemother.*, **2003**, *14*, 99–105.
- [58] J. S. Barradas, M. I. Errea, N. B. D'Accorso, C. S. Sepúlveda and E. B. Damonte, Imidazo[2,1-b]thiazole carbohydrate derivatives: Synthesis and antiviral activity against Junin virus, agent of Argentine hemorrhagic fever, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 259–264.
- [59] P. Shrivastava-Ranjan, É. Bergeron, A. K. Chakrabarti, C. G. Albariño, M. Flint, S. T. Nichol and C. F. Spiropoulou, 25-Hydroxycholesterol Inhibition of Lassa Virus Infection through Aberrant GP1 Glycosylation, *mBio*, **2016**, *7*, e01808-16.
- [60] P. O. Miranda, B. Cubitt, N. T. Jacob, K. D. Janda and J. C. de la Torre, Mining a Kröhnke Pyridine Library for Anti-Arenavirus Activity, *ACS Infect. Dis.*, **2018**, *4*, 815–824.
- [61] S. R. Welch, L. W. Guerrero, A. K. Chakrabarti, L. K. McMullan, M. Flint, G. R. Bluemling, G. R. Painter, S. T. Nichol, C. F. Spiropoulou and C. G. Albariño, Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems, *Antiviral Res.*, **2016**, *136*, 9–18.
- [62] M. U. Gack, Mechanisms of RIG-I-like receptor activation and manipulation by viral pathogens., Mechanisms of RIG-I-Like Receptor Activation and Manipulation by Viral Pathogens, *J. Virol.*, **2014**, *88*, 5213–5216.
- [63] L. Martínez-Sobrido, P. Giannakas, B. Cubitt, A. García-Sastre and J. C. de la Torre, Differential Inhibition of Type I Interferon Induction by Arenavirus Nucleoproteins, *J. Virol.*, **2007**, *81*, 12696–12703.

- [64] K. M. Hastie, C. R. Kimberlin, M. A. Zandonatti, I. J. MacRae and E. O. Saphire, Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, **108**, 2396–2401.
- [65] X. Jiang, Q. Huang, W. Wang, H. Dong, H. Ly, Y. Liang and C. Dong, Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression, *J. Biol. Chem.*, **2013**, **288**, 16949–16959.
- [66] L. Brunotte, R. Kerber, W. Shang, F. Hauer, M. Hass, M. Gabriel, M. Lelke, C. Busch, H. Stark, D. I. Svergun, C. Betzel, M. Perbandt and S. Günther, Structure of the Lassa virus nucleoprotein revealed by X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, and electron microscopy, *J. Biol. Chem.*, **2011**, **286**, 38748–38756.
- [67] X. Qi, S. Lan, W. Wang, L. M. Schelde, H. Dong, G. D. Wallat, H. Ly, Y. Liang and C. Dong, Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure, *Nature*, **2010**, **468**, 779–783.
- [68] J. M. Levingston Macleod, A. D'Antuono, M. E. Loureiro, J. C. Casabona, G. A. Gomez and N. Lopez, Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein, *J. Virol.*, **2011**, **85**, 2012–2023.
- [69] E. Ortiz-Riaño, B. Y. H. Cheng, J. C. de la Torre and L. Martínez-Sobrido, Self-association of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein is mediated by its N-terminal region and is not required for its anti-interferon function, *J. Virol.*, **2012**, **86**, 3307–3317.
- [70] K. M. Hastie, T. Liu, S. Li, L. B. King, N. Ngo, M. A. Zandonatti, V. L. Woods, J. C. de la Torre and E. O. Saphire, Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2011**, **108**, 19365–19370.
- [71] A. Dias, D. Bouvier, T. Crépin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack, R. W. H. Ruigrok, The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit, *Nature*, **2009**, **458**, 914–918.
- [72] D. Guilligay, F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R. W. H. Ruigrok, J. Ortin, D. J. Hart, S. Cusack, The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008**, **15**, 500–506.
- [73] E. Cheng, M. A. Mir, Signatures of host mRNA 5' terminus for efficient hantavirus cap snatching, *J. Virol.* **2012**, **86**, 10173–10185.
- [74] G. D. Wallat, Q. Huang, W. Wang, H. Dong, H. Ly, Y. Liang, C. Dong, High-Resolution Structure of the N-Terminal Endonuclease Domain of the Lassa Virus L Polymerase in Complex with Magnesium Ions, *PLoS one*, **2014**, **9**, e87577.
- [75] J. Reguera, F. Weber, S. Cusack, Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-Like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription, *PLoS Pathog.*, **2010**, **6**, e1001101.
- [76] S. Devignot, E. Bergeron, S. Nichol, A. Mirazimi, F. Weber, A Virus-Like Particle System Identifies the Endonuclease Domain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, *J. Virol.*, **2015**, **89**, 5957–5967.
- [77] S. J. Plotch, M. Bouloy, I. Ulmanen, R. M. Krug, A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription, *Cell*, **1981**, **23**, 847–858.
- [78] M. Saez-Ayala, E. Laban Yekwa, M. Carcelli, B. Canard, K. Alvarez and F. Ferron, Crystal structures of Lymphocytic choriomeningitis virus endonuclease domain complexed with diketo-acid ligands, *IUCr*, **2018**, **5**, 223-235
- [79] M. Saez-Ayala, E. Laban Yekwa, C. Mondielli, L. Roux, F. Bailly, P. Cotellet, D. Rogolino, B. Canard, S. Emonet, F. Ferron and K. Alvarez, Metal chelators for the inhibition of the lymphocytic choriomeningitis virus endonuclease domain, *Antiviral Res.*, **2018**, in review.
- [80] J. Reguera, P. Gerlach, M. Rosenthal, S. Gaudon, F. Coscia, S. Günther, S. Cusack, Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases, *PLoS Pathog.*, **2016**, **12**, e1005636.
- [81] E. A. Galburt, B. L. Stoddard, Catalytic Mechanisms of Restriction and Homing Endonucleases, *Biochemistry*, **2002**, **41**, 13851–13860.
- [82] W. Yang, J. Y. Lee and M. Nowotny, Making and Breaking Nucleic Acids: Two-Mg²⁺-Ion Catalysis and Substrate Specificity, *Mol. Cell*, **2006**, **22**, 5–13.
- [83] T. A. Steitz and J. A. Steitz, A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, **90**, 6498–6502.
- [84] G. Palermo, A. Cavalli, M. L. Klein, M. Alfonso-Prieto, M. Dal Peraro and M. De Vivo, Catalytic Metal Ions and Enzymatic Processing of DNA and RNA, *Acc. Chem. Res.*, **2015**, **48**, 220–228.

- [85] A. Ramanathan, G. B. Robb, S.-H. Chan, mRNA capping: biological functions and applications, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, 7511–7526.
- [86] J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski and J. E. Tomassini, Anti-influenza virus activities of 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 1304–1307.
- [87] S. Portsmouth, K. Kawaguchi, M. Arai, K. Tsuchiya and T. Uehara, Cap-dependent Endonuclease Inhibitor S-033188 for the Treatment of Influenza: Results from a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active-Controlled Study in Otherwise Healthy Adolescents and Adults with Seasonal Influenza, *Open Forum Infect. Dis.*, **2017**, *4*, S734.
- [88] S. Omoto, V. Speranzini, T. Hashimoto, T. Noshi, H. Yamaguchi, M. Kawai, K. Kawaguchi, T. Uehara, T. Shishido, A. Naito and S. Cusack, Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, 9633.
- [89] K.-W. Huang, K.-C. Hsu, L.-Y. Chu, J.-M. Yang, H. S. Yuan and Y.-Y. Hsiao, Identification of Inhibitors for the DEDDh Family of Exonucleases and a Unique Inhibition Mechanism by Crystal Structure Analysis of CRN-4 Bound with 2-Morpholin-4-ylethanesulfonate (MES), *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 8019–8029.
- [90] D. Rogolino, M. Carcelli, M. Sechi and N. Neamati, Viral enzymes containing magnesium: Metal binding as a successful strategy in drug design, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 3063-3086
- [91] DW. Hutchinson. Metal chelators as potential antiviral agents, *Antiviral Res.* **1985**, 193–205.
- [92] S. J. S. Flora, V. Pachauri, Chelation in metal intoxication, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2010**, *7*, 2745–2788.
- [93] L. P. H. Yang, S. J. Keam, G. M. Keating, Deferasirox : a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload, *Drugs*, **2007**, *67*, 2211–2230.
- [94] V. M. Richon, Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor, *Br. J. Cancer* **2006**, *95*, S2.
- [95] S. Long and A. M. Romani, Role of Cellular Magnesium in Human Diseases, *Austin J. Nutr. Food Sci.*, **2014**, *2*.
- [96] W. Jahnen-Dechent and M. Ketteler, Magnesium basics, *Clin. Kidney J.*, **2012**, *5*, i3–i14.
- [97] C. W. Bock, A. K. Katz, G. D. Markham and J. P. Glusker, Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 7360–7372.
- [98] R. C. Hider, Z. D. Liu, H. H. Khodr, Metal chelation of polyphenols, *Meth. Enzymol.*, **2001**, *335*, 190–203.
- [99] E. Kowalinski, C. Zubieta, A. Wolkerstorfer, O. H. J. Szolar, R. W. H. Ruigrok and S. Cusack, Structural Analysis of Specific Metal Chelating Inhibitor Binding to the Endonuclease Domain of Influenza pH1N1 (2009) Polymerase, *PLoS Pathog.*, **2012**, *8*, e1002831.
- [100] J. Steinmann, J. Buer, T. Pietschmann and E. Steinmann, Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea, *Br. J. of Pharmacol.*, **2013**, *168*, 1059–1073.
- [101] M. Nakayama, K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara and T. Shimamura, Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols, *Antiviral Res.*, **1993**, *21*, 289–299.
- [102] N. Imanishi, Y. Tuji, Y. Katada, M. Maruhashi, S. Konosu, N. Mantani, K. Terasawa and H. Ochiai, Additional Inhibitory Effect of Tea Extract on the Growth of Influenza A and B Viruses in MDCK Cells, *Microbiol. Immun.*, **46**, 491–494.
- [103] K.E.B. Parkes, P. Ermert, J. Fassler, J. Ives, J.A. Martin, J.H. Merret, D. Obrecht, G. Williams and K. Klumpp, Use of a pharmacophore model to discover a new class of influenza endonuclease inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 1153-1164
- [104] M. Billamboz, F. Bailly, M. L. Barreca, L. De Luca, J.-F. Mouscadet, C. Calmels, M.-L. Andréola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotellet, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as Dual Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and the Reverse Transcriptase RNase H Domain, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 7717–7730.
- [105] M. Billamboz, V. Suchaud, F. Bailly, C. Lion, J. Demeulemeester, C. Calmels, M. L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotellet, 4-Substituted 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as a Novel Class of HIV-1 Integrase Inhibitors, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 606–611.
- [106] M. Billamboz, F. Bailly, C. Lion, N. Touati, H. Vezin, C. Calmels, M.-L. Andréola, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotellet, Magnesium Chelating 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones, as Inhibitors of HIV-1 Integrase and/or the HIV-1 Reverse Transcriptase Ribonuclease H Domain: Discovery of a Novel Selective Inhibitor of the Ribonuclease H Function, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 1812–1824.
- [107] T. C. Edwards, E. Lomonosova, J. A. Patel, Q. Li, J. A. Villa, A. K. Gupta, L. A. Morrison, F. Bailly, P. Cotellet, E. Giannakopoulou, G. Zoidis and J. E. Tavis, Inhibition of hepatitis B virus replication by N-hydroxyisoquinolinediones and related polyoxygenated heterocycles, *Antiviral Res.*, **2017**, *143*, 205–217.

- [108] V. Summa, A. Petrocchi, P. Pace, V. G. Matassa, R. De Francesco, S. Altamura, L. Tomei, U. Koch and P. Neuner, Inhibition of hepatitis B virus replication by N-hydroxyisoquinolinediones and related polyoxygenated heterocycles, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 14–17.
- [109] Y. Shibagaki, M. L. Holmes, R. S. Appa and S. A. Chow, Characterization of feline immunodeficiency virus integrase and analysis of functional domains, *Virology*, **1997**, *230*, 1–10.
- [110] V. Ellison and P. O. Brown, A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro, *PNAS*, **1994**, *91*, 7316–7320.
- [111] C. Hicks and R. M. Gulick, Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor., *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, *48*, 931–939.
- [112] T. M. Motohide Sato Hisateru Aramaki, T. Matsuda, M. Yamashita, Y. Ito, H. Kawakami, Y. Matsuzaki, W. Watanabe, K. Yamataka, S. Ikeda, E. Kodama, M. Matsuoka, and H. Shinkai, Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1506–1508.
- [113] C. Liao, C. Marchand, T. R. Burke Jr, Y. Pommier and M. C. Nicklaus, Authentic HIV-1 integrase inhibitors, *Future Med. Chem.*, **2010**, *2*, 1107–1122.
- [114] D. J. Hazuda, P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, C. Blau and M. D. Miller, Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells., *Science*, **2000**, *287*, 646–650.
- [115] J. S. Wai, M. S. Egbertson, L. S. Payne, T. E. Fisher, M. W. Embrey, L. O. Tran, J. Y. Melamed, H. M. Langford, Guare James P., L. Zhuang, V. E. Grey, J. P. Vacca, M. K. Holloway, A. M. Naylor-Olsen, D. J. Hazuda, P. J. Felock, A. L. Wolfe, K. A. Stillmock, W. A. Schleif, L. J. Gabryelski and S. D. Young, 4-Aryl-2,4-dioxobutanoic acid inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 4923–4926.
- [116] J. A. Grobler, K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. S. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca and D. J. Hazuda, Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes, *PNAS*, **2002**, *99*, 6661–6666.
- [117] V. Summa, A. Petrocchi, V. G. Matassa, M. Taliani, R. Laufer, R. De Francesco, S. Altamura and P. Pace, HCV NS5b RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitors: From α,γ -Diketoacids to 4,5-Dihydroxypyrimidine- or 3-Methyl-5- hydroxypyrimidinonecarboxylic Acids. Design and Synthesis, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5336–5339.
- [118] V. Summa, A. Petrocchi, V. G. Matassa, C. Gardelli, E. Muraglia, M. Rowley, O. G. Paz, R. Laufer, E. Monteagudo and P. Pace, *J. Med. Chem.*, 4,5-Dihydroxypyrimidine Carboxamides and N-Alkyl-5-hydroxypyrimidinone Carboxamides Are Potent, Selective HIV Integrase Inhibitors with Good Pharmacokinetic Profiles in Preclinical Species, **2006**, *49*, 6646–6649.
- [119] S. Hare, A. M. Vos, R. F. Clayton, J. W. Thuring, M. D. Cummings and P. Cherepanov, Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance, *PNAS, Sciences*, **2010**, *107*, 20057–20062.
- [120] J. Tomassini, H. Selnick, M. E. Davies, M. E. Armstrong, J. Baldwin, M. Bourgeois, J. Hastings, D. Hazuda, J. Lewis and W. McClements, Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2, 4-dioxobutanoic acid compounds, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, *38*, 2827–2837.
- [121] H.G. Selnick, J.J. Baldwin, G. S. Ponticello, J.E. Tomassini, Dioxobutanoic acid derivatives as inhibitors of influenza endonuclease, **1997**, US005618830A.
- [122] J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski and J. E. Tomassini, A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 1304–1307.
- [123] A. Stevaert, R. Dalocchio, A. Dessi, N. Pala, D. Rogolino, M. Sechi and L. Naesens, Mutational Analysis of the Binding Pockets of the Diketo Acid Inhibitor L-742,001 in the Influenza Virus PA Endonuclease, *J. Virol.*, **2013**, *87*, 10524–10538.
- [124] B. M. Baughman, P. Jake Slavish, R. M. DuBois, V. A. Boyd, S. W. White and T. R. Webb, Identification of Influenza Endonuclease Inhibitors Using a Novel Fluorescence Polarization Assay, *ACS Chem. Biol.*, **2012**, *7*, 526–534.
- [125] P. Yuan, M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao and Y. Liu, Crystal structure of an avian influenza polymerase PA-N reveals an endonuclease active site, *Nature*, **2009**, *458*, 909–913.
- [126] R. M. Dubois, P. J. Slavish, B. M. Baughman, M.-K. Yun, J. Bao, R. J. Webby, T. R. Webb and S. W. White, Structural and Biochemical Basis for Development of Influenza Virus Inhibitors Targeting the PA Endonuclease, *PLoS Pathog.*, **2012**, *8*, e1002830.

- [127] D. E. Koshland, Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *PNAS*, **1958**, **44**, 98–104.
- [128] E. Yekwa, J. Khourieh, B. Canard, N. Papageorgiou and F. Ferron, Activity inhibition and crystal polymorphism induced by active-site metal swapping, *Acta Cryst.*, **2017**, **73**, 641–649.
- [129] A. Stevaert, S. Nurra, N. Pala, M. Carcelli, D. Rogolino, C. Shepard, R. A. Domaaol, B. Kim, M. Alfonso-Prieto, S. A. E. Marras, M. Sechi and L. Naesens, An Integrated Biological Approach to Guide the Development of Metal-Chelating Inhibitors of Influenza Virus PA Endonuclease, *Mol. Pharmacol.*, **2015**, **87**, 323–337.
- [130] S. Nahm and S. M. Weinreb, N-methoxy-N-methylamides as effective acylating agents, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, **22**, 3815–3818.
- [131] L. Brecker, M. Pogorevc, H. Griengl, W. Steiner, T. Kappe and D. W. Ribbons, Synthesis of 2,4-diketoacids and their aqueous solution structures, *New J. Chem.*, **1999**, **23**, 437–446.
- [132] T. Verbic, B. Drakulic, M. Zloh, J. Pecelj, G. Popovic and I. Juranic, An LFER study of the protolytic equilibria of 4-aryl-2,4-dioxobutanoic acids in aqueous solutions, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2007**, **72**, 1201–1216.
- [133] Bromme, L. Claisen, *Ber.*, **1937**, **21**, 1131–1146
- [134] U. Pradere. Synthèse métallo-catalysée d’analogues de nucléosides et d’oxazolo[4,5-d]pyrimidines à visée thérapeutique [en ligne]. Chimie Organique. Université d’Orléans, **2009**, 256 pages.
- [135] M. J. Drysdale, S. L. Hind, M. Jansen and J. F. Reinhard, Synthesis and SAR of 4-Aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic Acids and Esters and 2-Amino-4-aryl-4-oxobut-2-enoic Acids and Esters: Potent Inhibitors of Kynurenine-3-hydroxylase as Potential Neuroprotective Agents, *J. Med. Chem.*, **2000**, **43**, 123–127.
- [136] R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, G. Miele, G. Cuzzucoli Crucitti, A. Iacovo, F. Rosi, A. Lavecchia, L. Marinelli, C. Di Giovanni, E. Novellino, L. Palmisano, M. Andreotti, R. Amici, C. Maria Galluzzo, L. Nencioni, A.T. Palamara, Y. Pommier, and C. Marchand, Novel Quinolinonyl Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Activities, *J. Med. Chem.*, **2008**, **51**, 4744–4750.
- [137] S. Liu, L.-F. Zeng, L. Wu, X. Yu, T. Xue, A. M. Gunawan, Y.-Q. Long and Z.-Y. Zhang, Targeting Inactive Enzyme Conformation: Aryl Diketoacid Derivatives as a New Class of PTP1B Inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, **130**, 17075–17084.
- [138] J.-A. Jiang, W.-B. Huang, J.-J. Zhai, H.-W. Liu, Q. Cai, L.-X. Xu, W. Wang and Y.-F. Ji, ‘One-pot’ synthesis of 4-substituted 1,5-diaryl-1H-pyrazole-3-carboxylates via lithium tert-butoxide-mediated sterically hindered Claisen condensation and Knorr reaction, *Tetrahedron*, **2013**, **69**, 627–635.
- [139] A. B. Sannigrahi, T. Kar, B. G. Niyogi, P. Hobza and P. v. R. Schleyer, The lithium bond reexamined, *Chem. Rev.*, **1990**, **90**, 1061–1076.
- [140] U. Olsher, R. M. Izatt, J. S. Bradshaw and N. K. Dalley, Coordination chemistry of lithium ion: a crystal and molecular structure review, *Chem. Rev.*, **1991**, **91**, 137–164.
- [141] O. Sari, V. Roy, M. Métifiot, C. Marchand, Y. Pommier, S. Bourg, P. Bonnet, R. F. Schinazi and L. A. Agrofoglio, Synthesis of dihydropyrimidine α,γ -diketobutanoic acid derivatives targeting HIV integrase, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, **104**, 127–138.
- [142] G. C. G. Pais, X. Zhang, C. Marchand, N. Neamati, K. Cowansage, E. S. Svarovskaia, V. K. Pathak, Y. Tang, M. Nicklaus, Y. Pommier and T. R. Burke, Structure Activity of 3-Aryl-1,3-diketo-Containing Compounds as HIV-1 Integrase Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2002**, **45**, 3184–3194.
- [143] A. K. Sharma, U. H. Sk, M. A. Gimbor, J. A. Hengst, X. Wang, J. Yun and S. Amin, Synthesis and bioactivity of sphingosine kinase inhibitors and their novel aspirinyl conjugated analogs, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, **45**, 4149–4156.
- [144] K.-W. Huang, K.-C. Hsu, L.-Y. Chu, J.-M. Yang, H. S. Yuan and Y.-Y. Hsiao, Identification of Inhibitors for the DEDDh Family of Exonucleases and a Unique Inhibition Mechanism by Crystal Structure Analysis of CRN-4 Bound with 2-Morpholin-4-ylethanesulfonate (MES), *J. Med. Chem.*, **2016**, **59**, 8019–8029.
- [145] A. K. Ghosh and M. Brindisi, Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.*, **2015**, **58**, 2895–2940.
- [146] J. Drews, Drug Discovery: A Historical Perspective, *Science*, **2000**, **287**, 1960–1964.
- [147] C. T. Supuran, A. Scozzafava and A. Casini, Carbonic anhydrase inhibitors, *Med. Res. Rev.*, **2003**, **23**, 146–189.
- [148] A. E. Boyd, Sulfonylurea Receptors, Ion Channels, and Fruit Flies, *Diabetes*, **1988**, **37**, 847–850.
- [149] S. Hwang, S. Y. Choi, J. H. Lee, S. Kim, J. In, S. K. Ha, E. Lee, T.-Y. Kim, S. Y. Kim, S. Choi and S. Kim, Identification of a potent and noncytotoxic inhibitor of melanin production, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, **18**, 5602–5609.

- [150] X.-H. Jiang, L.-D. Song and Y.-Q. Long, Highly Efficient Preparation of Aryl β -Diketo Acids with tert-Butyl Methyl Oxalate, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7555–7558.
- [151] C. Maurin, F. Bailly and P. Cotelte, Improved preparation and structural investigation of 4-aryl-4-oxo-2-hydroxy-2-butenic acids and methyl esters, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6479–6486.
- [152] Y.-S. Xu, C.-C. Zeng, X.-M. Li, R.-G. Zhong and Y. Zeng, Design, Synthesis and Cu²⁺ Recognition of β -Diketoacid and Quinoxalone Derivatives Bearing Caffeyl or Galloyl Moieties Linked by Arylamide as Potential HIV Integrase Inhibitors, *Chin. J. Chem.*, **2006**, *24*, 1086–1094.
- [153] B. P. Reddy, V. M. Sharma, K. R. Reddy, M. P. Kumar, K. B. Reddy, M. Narsingam, M. Venkati, L. VL. Subrahmanyam, R. M. Reddy, Novel betulinic derivatives as HIV inhibitors, **2015**, US2015/0119373A1.
- [154] C. O. Kappe and A. Stadler, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry: KAPPE:MICROWAVES O-BK*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, **2005**.
- [155] C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827–10852.
- [156] Y. Ju and R. S. Varma, Aqueous N-alkylation of amines using alkyl halides: direct generation of tertiary amines under microwave irradiation, *Green Chem.*, **2004**, *6*, 219.
- [157] M. I. Escudero, L. D. Kremenchuzky, I. A. Perillo, H. Cerecetto and M. M. Blanco, Efficient Cesium Carbonate Promoted N-Alkylations of Aromatic Cyclic Imides Under Microwave Irradiation, *Synthesis*, **2011**, 571–576
- [158] W.R. Bowman, D.R. Coghlan, A facile method for the N-alkylation of alpha-amino esters, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 15787-15798
- [159] N.P. Link, J.E. Diaz, L.R. Orelli, An Efficient Synthesis of N-Arylputrescines and Cadaverines, *Synlett*, **2009**, 751-754.
- [160] N. Yasmin, J.K. Ray, A Simple One-Pot Synthesis of 2-Aryl-5-alkyl-Substituted Oxazoles by Cs₂CO₃-Mediated Reactions of Aromatic Primary Amides with 2,3-Dibromopropene, *Synlett*, **2008**, 751
- [161] Y.R. Jorapur, J.M. Jeong, D.Y. Chi, Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids, *Tetrahedron Lett*, **2006**, *47*, 2435.
- [162] C. H. Alves Esteves, C. J. J. Hall, P. D. Smith and T. J. Donohoe, Pyruvate Enolate Arylation and Alkylation: OBO Ester Protected Pyruvates as Useful Reagents in Organic Synthesis, *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 5248-5251.
- [163] E. J. Corey, N. Raju, A new general synthetic route to bridged carboxylic ortho esters, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5571-5574
- [164] A. Burger, Isosterism and bioisosterism in drug design, *Prog. Drug. Res.*, **1991**, *37*, 287-371
- [165] T.B. Fulton, Lecture, Diffusion and Transport Across Cell Membranes
- [166] M. Sato., T. Motomura, H. Aramaki., T. Matsuda, M. Yamashita, Y. Ito, H. Kawakami, Y. Matsuzaki, W. Watanabe, K. Yamataka, S. Ikeda, E. Kodama, M. Matsuoka and H. Shinkai, Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1506–1508.
- [167] D. J. Hazuda, N. J. Anthony, R. P. Gomez, S. M. Jolly, J. S. Wai, L. Zhuang, T. E. Fisher, M. Embrey, J. P. Guare, M. S. Egbertson, J. P. Vacca, J. R. Huff, P. J. Felock, M. V. Witmer, K. A. Stillmock, R. Danovich, J. Grobler, M. D. Miller, A. S. Espeseth, L. Jin, I.-W. Chen, J. H. Lin, K. Kassahun, J. D. Ellis, B. K. Wong, W. Xu, P. G. Pearson, W. A. Schleif, R. Cortese, E. Emini, V. Summa, M. K. Holloway and S. D. Young, A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase, *PNAS*, **2004**, *101*, 11233–11238.
- [168] S. K. Figdor and M. Schach. von Wittenau, Metabolism of 5-(3-Pyridyl)tetrazole, *J. Med. Chem.*, **1967**, *10*, 1158-1159
- [169] N. Neamati, Patented small molecule inhibitors of HIV-1 integrase: a 10-year saga, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2002**, *12*, 709–724.
- [170] S. Akihiko, Y. Tomokazu, F. Toshio, Heteroaromatic derivatives having an inhibitory activity against hiv integrase , **2000**, CA2353961A1
- [171] S. Shimizu, T. Endo, K. Izumi and H. Mikamiyama, Development of HIV-Integrase Inhibitor S-1360: Selection of the Protecting Group on the 1,2,4-Triazole Ring, *Org. Process Res. Dev.*, **2007**, *11*, 1055–1058.
- [172] M. Maccoss, D.J. Cameron, Facile detritylation of nucleoside derivatives by using trifluoroacetic acid, *Carbohydr. Res.* **1978**, *60*, 206-209.
- [173] Y.M. Choy, A.M. Unrau, Simple, unambiguous syntheses of 2,3,6- and 2,4,6-tri-O-methyl-d-mannose., *Carbohydr. Res.*, **1971**, *17*, 439-443.
- [174] A. Ichihara, M. Ubukata, S. Sakamura, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *18*, 3473.
- [175] B. Narayana, K.K Vijaya Raj, B.V. Ashalatha, N. Suchetha Kumari, B.K Sarojini, Synthesis of some new 5-(2-substituted-1,3-thiazol-5-yl)-2-hydroxy benzamides and their 2-alkoxy derivatives as possible antifungal agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, *39*, 867–872.

- [176] A. Kling, K. Jantos, H. Mack, W. Hornberger, K. Drescher, V. Nimmrich, A. Relo, K. Wicke, C. W. Hutchins, Y. Lao, K. Marsh and A. Moeller, Discovery of Novel and Highly Selective Inhibitors of Calpain for the Treatment of Alzheimer's Disease: 2-(3-Phenyl-1H-pyrazol-1-yl)-nicotinamides, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 7123–7138.
- [177] H. Lossen, *Liebigs Ann. Chem.* **1869**, *150*, 314–322
- [178] E. M. F. Muri, M. J. Nieto, R. D. Sindelar and J. S. Williamson, Hydroxamic acids as pharmacological agents, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 1631–1653.
- [179] T. Bugg, Hydroxamic Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities. Edited by Satya P. Gupta., *ChemBioChem*, **2013**, *15*, 2467–2467.
- [180] Martell and Smith, **1982**
- [181] C. Cianci, T. D. Y. Chung, N. Meanwell, H. Putz, M. Hagen, R. J. Colonno and M. Krystal, Identification of N-Hydroxamic Acid and N-Hydroxyimide Compounds that Inhibit the Influenza Virus Polymerase, *Antivir. Chem. Chemother.*, **1996**, *7*, 353–360.
- [182] R. Ovadia. Réaction multicomposants pour la synthèse de dimères de PNA ciblant la réplication du virus de l'hépatite C [en ligne]. Chimie Organique. Université d'Aix-Marseille, **2014**, 276 pages.
- [183] A. Khalafi-Nezhad, B. Mokhtari and M. N. Soltani Rad, Direct preparation of primary amides from carboxylic acids and urea using imidazole under microwave irradiation, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 7325–7328.
- [184] N. Ohtsuka, M. Okuno, Y. Hoshino and K. Honda, A base-mediated self-propagative Lossen rearrangement of hydroxamic acids for the efficient and facile synthesis of aromatic and aliphatic primary amines, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 9046–9054.
- [185] A. Massaro, A. Mordini, G. Reginato, F. Russo and M. Taddei, Microwave-Assisted Transformation of Esters into Hydroxamic Acids, *Synthesis*, **2007**, *2007*, 3201–3204.
- [186] A. Beillard, Y. Bhurruth-Alcor, C. Bouix-Peter, K. Bouquet, S. Chambon, L. Clary, C. S. Harris, C. Millois, G. Mouis, G. Ouvry, R. Pierre, A. Reitz and L. Tomas, A facile and rapid preparation of hydroxamic acids by hydroxylaminolysis using DBU as base, *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 2165–2170.
- [187] N. Quan, X.-X. Shi, L.-D. Nie, J. Dong and R.-H. Zhu, A Green Chemistry Method for the Regeneration of Carbonyl Compounds from Oximes by Using Cupric Chloride Dihydrate as a Recoverable Promoter for Hydrolysis, *Synlett*, **2011**, *2011*, 1028–1032.
- [188] C. Lu, B. Kirsch, C. K. Maurer, J. C. de Jong, A. Braunshausen, A. Steinbach and R. W. Hartmann, Optimization of anti-virulence PqsR antagonists regarding aqueous solubility and biological properties resulting in new insights in structure–activity relationships, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *79*, 173–183.
- [189] E.J. Dexter, K.W. Filed, *J. Chem. Educ.*, **1976**, *53*, 392–393
- [190] M. Rubiralta, E. Giralt and A. Diez, Eds., 3 - ¹H NMR Properties of Piperidine Derivatives, *Studies in Org. Chem.*, **1991**, *43*, 34–87.
- [191] J. B. Lambert and R.G. Keske, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 620–622.
- [192] P. J. Crowley, M. J. T. Robinson and M. G. Ward, Conformational equilibrium in N-methylpiperidine, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1974**, 825–826.
- [193] L. Carballeira and I. Pérez-Juste, Influence of calculation level and effect of methylation on axial/equatorial equilibria in piperidines, *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 961–976.
- [194] F. A. L. Anet and I. Yavari, Nitrogen inversion in piperidine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 2794–2796.
- [195] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane and F. R. Salemme, High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery, *J. Biomol. Screen.*, **2001**, *6*, 429–440.
- [196] F. H. Niesen, H. Berglund and M. Vedadi, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nature Protocols*, **2007**, *2*, 2212–2221.
- [197] C. J. Layton and H. W. Hellinga, Thermodynamic Analysis of Ligand-Induced Changes in Protein Thermal Unfolding Applied to High-Throughput Determination of Ligand Affinities with Extrinsic Fluorescent Dyes, *Biochemistry*, **2010**, *49*, 10831–10841.
- [198] M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, *Assay and Drug Development Technology*, **2011**, *9*, 342–353
- [199] Alexa dyes [en ligne]. Disponible sur <<http://www.atdbio.com/content/34/Alexa-dyes#Properties-and-structures>> (12.2017)
- [200] P.D Bragg, C Hou., *Eur. J. Biochem.*, **1975**, *106*, 495–503
- [201] W. Xing, O. Barauskas, T. Kirschberg, A. Niedziela-Majka, M. Clarke, G. Birkus, P. Weissburg, X. Liu, B. E. Schultz, R. Sakowicz, H. Kwon and J. Y. Feng, Biochemical characterization of recombinant influenza A

- polymerase heterotrimer complex: Endonuclease activity and evaluation of inhibitors *PLOS one*, **2017**, **12**, e0181969.
- [202] J.B. Mccornick, *New. Engl. J. Med.*, **1986**, **314**, 20-26
- [203] M. Mendenhall, A. Russel, T. Juelich, E.L. Messina, D.F. Smee, A.N. Freiberg, M.R Holbrook, Y. Fututa, J.C. de la Torre, J.H. Nunberg, and B.B. Gowen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, **55**, 782-787.
- [204] L. Martínez-Sobrido, B. Y. H. Cheng and J. C. de la Torre, *Methods Mol. Biol.*, **2016**, **1403**, 313–351.
- [205] V. Nair, M. Okello, Integrase Inhibitor Prodrugs: Approaches to Enhancing the Anti-HIV Activity of β -Diketo Acids, *Molecules*, **2015**, **20**, 12623-12651
- [206] M. J. C. Rosemond, L. St. John-Williams, T. Yamaguchi, T. Fujishita and J. S. Walsh, Enzymology of a carbonyl reduction clearance pathway for the HIV integrase inhibitor, S-1360: role of human liver cytosolic aldo-keto reductases, *Chem. Biol. Interact.*, **2004**, **147**, 129–139.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

Chemistry

TLC was performed on Merck silica coated plates 60F₂₅₄. Compounds were revealed on UV light (254 nm). Column chromatography was performed on silica gel Merck G60 230-240 mesh. Flash chromatography was performed on a Biotage SP4 using silica gel column with an elution profile adapted to the crude. All moisture sensitive reactions were carried out under anhydrous conditions using dry glassware, anhydrous solvents and argon atmosphere. Methyl ketones **126**, **157**, **162**, **163** and all anhydrous solvents were purchased from Aldrich. Microwave-promoted syntheses were performed on a Biotage initiator using sealed vessels and the reaction temperature was monitored using an external IR sensor.

NMR experiments were acquired on a JEOL 400 MHz (Luminy, Marseille) or a BRUKER Avance III nanobay - 400 MHz (St Jérôme University, Marseille) or Bruker Avance III HD – 400 MHz, Avance III – 500 MHz and Avance III – 600 MHz (University of Montpellier). Samples were prepared directly by dissolving compounds in deuterated solvents purchased from Eurisotop. Spectra were internally referenced according to the solvent residual peak (in DMSO: $\delta^{13}\text{C}$ 39.5 ppm; $\delta^1\text{H}$ 2.50 ppm; in CDCl_3 : $\delta^{13}\text{C}$ 77.2 ppm; $\delta^1\text{H}$ 7.26 ppm). Chemical shifts are expressed in ppm (parts per million) and coupling constants J are given in hertz. Signal splitting patterns are described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q) and multiplet (m).

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Q-ToF mass analyzer under electrospray ionization (ESI) in positive or negative ionization mode detection. LCMS spectra were recorded on an Accela 600 Thermofisher (HPLC) with a Cortecs C18 (2.7 μm , 2.1 x 100 mm) column and Finnigan survey MSQ (MS) under atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or electrospray ionisation (ESI) in positive and negative ionization mode detection. Compounds were eluted with gradient A of a solution of 5 to 100% of 0,01% formic acid in acetonitrile solution with a 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate. High-pressure liquid chromatography (HPLC) spectra were recorded on a Waters Alliance 2695 apparatus. Analytical purity analyses and stability studies were performed on XBridge C18 (10 μm , 4.6 x 150 mm) column provided with a pre-column XBridge (3.5 μm , 100 Å, 4.6 x 20 mm). Compounds were eluted using either gradient B, C, or D. Preparative HPLC purifications were performed on XBridge C18 (5 μm , 10 x 250 mm) column provided with a pre-column XBridge (5 μm , 20 x 20 mm). Compounds were eluted using gradient E.

List of gradients (LCMS and HPLC):

Gradient A: LCMS routine methodBuffer A: H₂O + 0.1 % Formic acid

Buffer B: MeCN + 0.1 % Formic acid.

t (min)	%A	%B
0.00	95	5
6.00	0	100
9.00	0	100
9.30	95	5
13.00	95	5

Gradient C: Analytical HPLCBuffer A: TEAC 25 mM pH 7, 100 % H₂OBuffer B: TEAC 25 mM pH 7, 80 % MeCN - 20% H₂O

t (min)	%A	%B	%C
0.00	90	10	0
10	38	62	0
40	0	100	0
45	0	0	100
50	90	10	0
52	90	10	0
72	90	10	0

Gradient E: Reversed-phase preparative HPLCBuffer A: 100 % H₂O Buffer B: 100 % MeCN

t (min)	%A	%B
0.00	90	10
10	50	50
40	0	100
50	0	100
52	90	10
72	90	10

Gradient B: Analytical HPLCBuffer A: H₂O + 0.1 % Formic acid

Buffer B: MeCN + 0.1 % Formic acid.

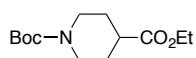
t (min)	%A	%B
0.00	90	10
10	50	50
40	0	100
50	0	100
52	90	10
72	90	10

Gradient D: Analytical HPLCBuffer A: Ammonium bicarbonate pH 8.5 10 mM, 100 % H₂OBuffer B: Ammonium bicarbonate pH 8.5 10 mM, 80 % MeCN - 20% H₂O

t (min)	%A	%B
0.00	100	0
5	100	0
45	0	100
50	0	100
52	100	0
72	100	0

Procedure A: Boc protection

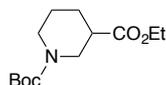
To a stirred solution of ethyl piperidine-4-carboxylate or ethyl piperidine-3-carboxylate (127.2 mmol) in DCM (200 mL) Et₃N (254.4 mmol, 2 eq.) and (Boc)₂O (152.6 mmol, 1.2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. TLC indicated starting material was consumed by using a stain reagent (Ceric stain). The reaction mixture was diluted with water. The aqueous layer was extracted with DCM. Combined organic layers were washed with HCl 1M, dried over Na₂SO₄ filtered and evaporated under reduced pressure. The crude residue was used for next step without further purification.

1-(tert-butyl) 4-ethyl piperidine-1,4-dicarboxylate 110

(33.26 g, 100%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.03 - 3.96 (m, 2H, H_{eq}), 2.86 - 2.76 (m, 2H, H_{ax}), 2.45 - 2.36 (m, 1H, CH), 1.88 - 1.81 (m, 2H, H_{eq}), 1.66 - 1.64 (m, 2H, H_{ax}), 1.45 (s, 9H, t-Bu), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.7 (C), 154.9 (C), 79.6 (C), 60.6 (CH₂), 45.9 (2 CH₂), 43.2 (CH), 28.5 (3 CH₃), 28.1 (2 CH₂), 14.3 (CH₃).

1-(tert-butyl) 3-ethyl piperidine-1,3-dicarboxylate 110m

(5.84 g, 92%)

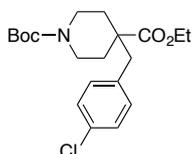
¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.90 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.95 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.79 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.41 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.02 (m, 1H, H_{ax/eq}), 1.71 - 1.63 (m, 1H, H_{ax/eq}), 1.62 - 1.54 (m, 1H, H_{ax/eq}), 1.45 (s, 9H, t-Bu), 1.39 - 1.49 (m, 2H, H_{ax/eq}) 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.6 (C), 154.8 (C), 79.8 (C), 60.6 (CH₂), 45.8 (CH₂), 44.1 (CH), 41.6 (CH₂), 28.5 (3 CH₃), 27.5 (CH₂), 24.4 (CH₂), 14.3 (CH₃).

Procedure B: C-alkylation

A solution of compound **110** or **110m** (6.2 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added carefully to a 1M solution of lithium bis(trimethylsilyl)amide in THF (9.3 mmol, 1.5 eq.) at -78°C. The solution was stirred at -78°C for 15 minutes at which time a 4-chlorobenzyl chloride (6.2 mmol, 1 eq.) solution in THF (8 mL) was added. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature. Completion was monitored by TLC until conversion. After 4h, the solution was diluted with water and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with 1N HCl, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The obtained orange oil was purified by silica gel column chromatography eluting with Cyclohexane/EtOAc to provide a colorless oil.

1-(tert-butyl) 4-ethyl 4-(4-chlorobenzyl)piperidine-1,4-dicarboxylate **111**



(7.45 g, 72%)

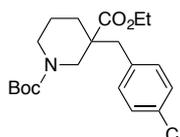
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 – 7.20 (d, 2H, H_{Ar}), 6.99 – 6.94 (d, 2H, H_{Ar}), 4.10 (q, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.97 - 3.89 (m, 2H, H_{eq}), 2.84 – 2.75 (m, 2H, H_{ax}), 2.77 (s, 2H, CH₂), 2.10 - 2.04 (m, 2H, H_{eq}), 1.43 (s, 9H, t-Bu), 1.44 - 1.36 (m, 2H, H_{ax}), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 174.8 (C), 154.9 (C), 134.9 (C), 132.9 (C), 131.3 (2 CH), 128.4 (2 CH), 79.7 (C), 60.8 (CH₂), 47.3 (C), 46.1 (CH₂), 41.4 (2 CH₂), 33.4 (2 CH₂), 28.6 (3 CH₃), 14.3 (CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 28.91 min

LCMS (m/z): t_R = 6.07 min (Gradient A), (APCI +) 382.13 [M+H]

1-(tert-butyl) 3-ethyl 3-(4-chlorobenzyl)piperidine-1,3-dicarboxylate **111m**



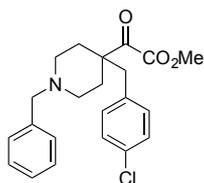
(4.36 g, 52%)

¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 - 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.04 - 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.04 (bq, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.99 - 3.87 (m, 1H, H_{ax/eq}), 3.58 - 3.50 (m, 1H, H_{ax/eq}), 3.26 - 3.06 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.90 (d, J = 13.5 Hz, 1H, H_{ax/eq}), 2.71 (d, J = 13.5 Hz, 1H, H_{ax/eq}), 2.03 - 1.95 (m, 1H, H_{ax/eq}), 1.63 - 1.49 (m, 2H, H_{ax/eq}), 1.45 (s, 9H, t-Bu), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.2 (C), 154.7 (C), 135.1 (C), 132.8 (C), 131.3 (2 CH), 128.4 (2 CH), 79.8 (C), 60.7 (CH₂), 47.8 (CH₂), 41.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 28.5 (3 CH₃), 27.1 (CH₂), 22.2 (CH₂), 14.2 (CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 28.12 min

LCMS (m/z): t_R = 7.26 min (Gradient A), (APCI +) 382.17 [M+H]

Ethyl 1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidine-4-carboxylate 224

(0.275 mg, 95%)

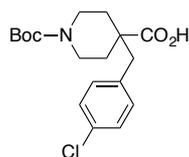
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.46 – 7.41 (m, 2H, HAr), 7.34 – 7.28 (m, 3H, HAr), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.76 (s, 2H, CH_2), 3.17 - 3.09 (m, 2H, H_{ax}), 2.80 (s, 2H, CH_2), 2.47 - 2.36 (m, 2H, H_{eq}), 2.19 - 2.04 (m, 4H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 175.2 (C), 135.4 (C), 132.7 (C), 131.3 (2 CH), 129.5 (2 CH), 129.4 (C), 128.4 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.3 (CH), 63.3 (CH_2), 51.2 (2 CH_2), 48.8 (C), 47.0 (CH_2), 33.4 (2 CH_2), 14.3 (CH_3).

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 2.24$ min (Gradient A), (APCI +) 372.07 [M+H]

Procedure C: Ester hydrolysis

Compound **111**, or **111m** (3.3 mmol) was dissolved in iPrOH (3 mL) and THF (3 mL) and treated with 10N NaOH (5.2 mL, 16 eq.). The mixture was heated under microwave irradiation at 120°C during 5h. The reaction was cooled to room temperature and carefully neutralized by adding 6N HCl until pH 3. The mixture was then extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated at reduced pressure to give the expected product used without further purification.

1-(tert-butoxycarbonyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidine-4-carboxylic acid 112

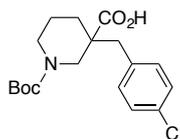
(4.80 g, 90%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, HAr), 7.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, HAr), 4.00 - 3.90 (m, 2H, H_{eq}), 2.92 – 2.87 (m, 2H, H_{ax}), 2.84 (s, 2H, CH_2), 2.10 - 2.01 (m, 2H, H_{eq}), 1.51 – 1.38 (m, 2H, H_{ax}), 1.45 (s, 9H, t-Bu).

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 179.9 (C), 155.3 (C), 134.5 (C), 133.1 (C), 131.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 79.9 (C), 47.3 (C), 45.6 (CH_2), 41.4 (2 CH_2), 33.1 (2 CH_2), 28.6 (3 CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 20.23$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 5.99$ min (Gradient A), (APCI +) 354.10 [M+H], (APCI -) 352.14 [M - H]

1-(tert-butoxycarbonyl)-3-(4-chlorobenzyl)piperidine-3-carboxylic acid 112m

(2.89 g, 75%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.25 - 7.21 (m, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.09 - 7.04 (m, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 4.01 - 3.90 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 3.61 - 3.54 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 3.31 - 3.09 (m, 2H, CH_2), 2.92 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.76 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{eq/ax}}$), 2.04 - 1.98 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.63 (m, 2H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.51 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.45 (s, 9H, t-Bu).

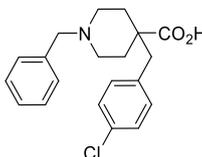
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 179.6 (C), 155.1 (C), 134.6 (C), 132.9 (C), 131.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 80.2 (C), 49.8 (C), 47.9 (CH_2), 43.9 (CH_2), 41.5 (CH_2), 31.7 (CH_2), 28.5 (3 CH_3), 22.1 (CH_2).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 19.98$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 5.95$ min (Gradient A), (APCI +) 354.11 [M+H], (APCI -) 352.07 [M - H]

Procedure D: hydrolysis shortened pathway

Compound **224** (3.3 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL) and THF (3 mL) and treated with 3N NaOH (5.2 mL, 16 eq.). The mixture was heated under microwave irradiation at 150°C during 5h. The reaction was cooled to room temperature and carefully neutralized by adding 6N HCl until pH 3. The mixture was then extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated at reduced pressure to give the expected product.

1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidine-4-carboxylic acid 225

(35 mg, 77%)

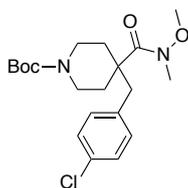
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.63 - 7.57 (m, 2H, HAr), 7.46 - 7.39 (m, 3H, HAr), 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, HAr), 7.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 4.07 (s, 2H, CH_2), 3.42 - 3.28 (m, 2H, H_{eq}), 2.87 (s, 2H, CH_2), 2.83 - 2.70 (m, 2H, H_{ax}), 2.39 - 2.25 (m, 2H, H_{eq}), 2.24 - 2.14 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 175.6 (C), 134.1 (C), 133.2 (C), 131.4 (C), 131.3 (2 CH), 130.4 (2 CH), 129.5 (2 CH), 128.6 (2 CH), 128.4 (CH), 61.0 (CH_2), 50.3 (2 CH_2), 45.6 (CH_2), 30.7 (2 CH_2).

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 3.51$ min (Gradient A), (APCI +) 343.91 [M+H], (APCI -) 342.07 [M - H]

Procedure E: Weinreb amide synthesis

A solution of compound **112**, **112m**, or **225** (88 mmol), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (158.0 mmol, 1.8 eq.), N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (158.0 mmol), and Et₃N (175.5 mmol, 2 eq.) in anhydrous DCM (400 mL) was stirred at room temperature for 24h under argon atmosphere. DCM was removed under reduced pressure, and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The organic phase was washed subsequently with HCl 1N and sat. K₂CO₃. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography using Cyclohexane/EtOAc to afford the product.

Tert-butyl 4-(4-chlorobenzyl)-4-(methoxy(methyl)carbamoyl)piperidine-1-carboxylate **113**

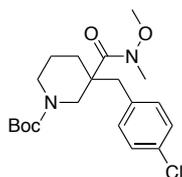
(3.72 g, 72%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (d, J = 7.2 Hz, 2H, HAr), 7.00 (d, J = 7.9 Hz, 2H, HAr), 3.94 - 3.76 (m, 2H, H_{eq}), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.05 - 2.95 (m, 2H, H_{ax}), 2.93 (s, 2H, CH₂), 2.25 - 2.15 (m, 2H, H_{eq}), 1.40 - 1.47 (m, 2H, H_{ax}) 1.45 (s, 9H, t-Bu).

¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 175.1 (C), 155.1 (C), 135.6 (C), 132.7 (C), 131.4 (2 CH), 128.4 (2 CH), 79.6 (C), 60.7 (CH₃), 47.9 (CH₂), 47.1 (C), 45.7 (CH₂), 42.8 (2 CH₂), 34.2 (2 CH₂), 33.9 (CH₃), 28.6 (3 CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 24.04 min

LCMS (m/z): t_R = 5.36 min (Gradient A), (APCI +) 397.21 [M+H]

Tert-butyl 3-(4-chlorobenzyl)-3-(methoxy(methyl)carbamoyl)piperidine-1-carboxylate **113m**

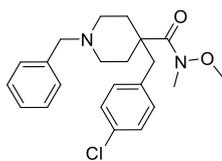
(1.78 g, 60%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.22 - 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 7.11 - 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 3.75 (s, 2H, CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (m, 1H, H_{eq/ax}), 3.08 (s, 3H, NCH₃), 2.89 (m, 1H, H_{eq/ax}), 1.87 (m, 2H, H_{eq/ax}), 1.64 (m, 2H, H_{eq/ax}), 1.47 (s, 9H, t-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.09 (C), 155.39 (C), 136.12 (C), 132.50 (C), 131.30 (2 CH), 128.35 (2 CH), 79.88 (C), 60.89 (CH₃), 49.29 (CH₂), 48.07 (CH₂), 43.82 (CH₂), 33.98 (CH₃), 31.77 (CH₂), 28.58 (3 CH₃), 21.65 (CH₂).

HPLC Gradient B t_R = 22.04 min

LCMS (m/z): t_R = 6.63 min (Gradient A), (APCI +) 397.25 [M+H]

1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)-N-methoxy-N-methylpiperidine-4-carboxamide 226

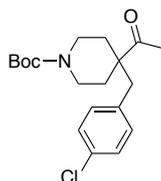
(83 mg, 37%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 - 7.29 (m, 5H, HAr), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.00 - 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.48 (s, 2H, CH_2), 3.18 (s, 3H, NCH_3), 2.94 (s, 2H, CH_2), 2.83 - 2.73 (m, 2H, H_{eq}), 2.30 - 2.16 (m, 4H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.65 (m, 2H, H_{ax}).

LCMS (m/z): $t_R = 3.46$ min (Gradient A), (APCI +) 387.05 [M+H]

Procedure F: Weinreb amide reduction

To a solution of compound **113**, **113m** ou **226** (0.8 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was added 3M methylmagnesium bromide solution in Et_2O (1.3 mL, 3.8 mmol). The mixture was stirred at 50°C during 4 hours under nitrogen atmosphere. After diluting with saturated aqueous sodium bicarbonate, the mixture was filtered and the filtrate was extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated in vacuum to give a sticky oil, which was purified by silica gel column chromatography using Cyclohexane/ EtOAc to give a pale yellow solid.

Tert-butyl 4-acetyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidine-1-carboxylate 114

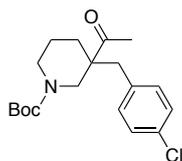
(757 mg, 85%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.91 - 3.71 (m, 2H, H_{eq}), 2.91 - 2.80 (m, 2H, H_{ax}), 2.77 (s, 2H, CH_2), 2.10 (s, 3H, CH_3), 2.07 - 2.00 (m, 2H, H_{eq}), 1.53 - 1.45 (m, 2H, H_{ax}), 1.43 (s, 9H, t-Bu).

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 211.4 (C), 154.9 (C), 134.5 (C), 132.9 (C), 131.3 (2 CH), 128.6 (2 CH), 79.7 (C), 52.0 (C), 44.4 (2 CH_2), 41.0 (CH_2), 32.5 (2 CH_2), 28.5 (3 CH_3), 26.8 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_R = 23.66$ min

LCMS (m/z): $t_R = 5.42$ min (Gradient A), (APCI +) 352.00 [M+H]

Tert-butyl 3-acetyl-3-(4-chlorobenzyl)piperidine-1-carboxylate **114m**

(1.06 g, 65%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.24 - 7.21 (m, 2H, HAr), 7.01 - 6.95 (m, 2H, HAr), 3.75 (s, 2H, CH_2), 3.14 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.89 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.87 (m, 2H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.64 (m, 2H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.47 (s, 9H, t-Bu).

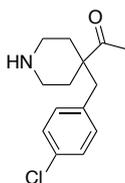
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 211.99 (C), 154.84 (C), 134.46 (C), 132.94 (C), 131.30 (2 CH), 128.57 (2 CH), 80.15 (C), 52.53 (C), 44.35 (CH_2), 42.20 (CH_2), 31.65 (CH_2), 28.48 (3 CH_3), 27.02 (CH_2), 26.91 (CH_3), 22.22 (CH_2).

HPLC Gradient B t_{R} = 22.08 min

LCMS (m/z): t_{R} = 6.70 min (Gradient A), (APCI +) 352.09 [M+H]

Procedure G: Boc deprotection

Compound **114** or **114m** (2.2 mmol) was dissolved in a 1 :1 mixture of TFA/DCM (5 mL, 5 mL). The mixture was stirred at room temperature during 1 hour. Afterwards, the crude was evaporated *in vacuo*. To the crude was added a 1:1 solution of sat. $\text{NaHCO}_3/\text{EtOAc}$. The organic layer was extracted three times. The combined organic phases were dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to afford the desired compound.

1-(4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **115**

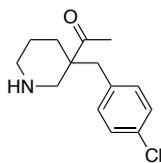
(531 mg, 98%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.42 (s, 1H, NH), 7.25 - 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 6.91 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 3.11 - 3.04 (m, 2H, H_{eq}), 2.79 (s, 2H, CH_2), 2.70 - 2.60 (m, 2H, H_{ax}), 2.17 - 2.08 (m, 2H, H_{eq}), 2.10 (s, 3H, CH_3), 1.67 - 1.57 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 211.3 (C), 134.2 (C), 133.1 (C), 131.3 (2 CH), 128.6 (2 CH), 51.7 (C), 44.8 (2 CH_2), 42.9 (CH_2), 32.0 (2 CH_2), 26.6 (CH_3).

HPLC Gradient B t_{R} = 10.79 min

LCMS (m/z): t_{R} = 1.00 min (Gradient A), (APCI +) 252.08 [M+H]

1-(3-(4-chlorobenzyl)piperidin-3-yl)ethan-1-one **115m**

(661 mg, 87%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 3.42 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, CH_2), 3.11 - 3.04 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.86 - 2.73 (m, 2H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.72 - 2.61 (m, 2H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.23 - 2.17 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.16 (s, 3H, CH_3), 1.77 - 1.71 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.59 - 1.46 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$).

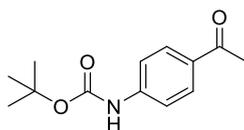
^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6) δ 211.8 (C), 133.9 (C), 133.2 (C), 131.2 (2 CH), 128.7 (2 CH), 52.2 (CH_2), 50.9 (C), 45.4 (CH_2), 42.9 (CH_2), 31.8 (CH_2), 26.4 (CH_3), 22.4 (CH_2).

HPLC Gradient B $t_R = 6.51$ min

LCMS (m/z): $t_R = 3.09$ min (Gradient A), (APCI +) 252.16 [M+H]

Procedure H: Synthesis of methyl ketones 158-160

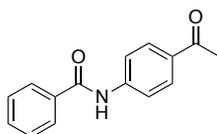
To a solution of 4-aminoacetophenone (5.9 mmol) in DCM (14 mL) was added the corresponding acyl chloride (8.8 mmol), Et_3N (11.8 mmol), and DMAP (1.2 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5h. After completion, water was added and the solution was extracted three times with DCM followed by a washing step with sat. NaCl. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. Compound was purified by silica gel column chromatography eluting with a gradient of EtOAc/DCM adapted to the R_f of the compound.

Tert-butyl (4-acetylphenyl)carbamate **157**

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, 2H, HAr), 7.45 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, HAr), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.53 (s, 9H, t-Bu).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 195.3 (C), 153.3 (C), 138.9 (C), 130.9 (C), 129.7 (2 CH), 117.2 (2 CH), 81.6 (C), 28.1 (3 CH_3), 26.5 (CH_3)

HPLC Gradient D $t_R = 32.97$ min

N-(4-acetylphenyl)benzamide **158**

(1.28 g, 50%)

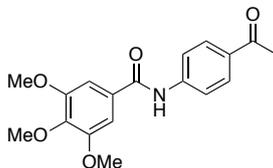
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.56 (s, 1H, NH), 8.01 - 7.93 (m, 6H, HAr), 7.62 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, HAr), 7.55 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, HAr), 2.55 (s, 3H, Me).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 196.6 (C), 166.0 (C), 143.6 (C), 134.6 (C), 132.0 (C), 131.9 (CH), 129.3 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.8 (2 CH), 119.4 (2 CH), 26.5 (CH_3).

HPLC Gradient B t_R = 18.19 min

LCMS (m/z): t_R = 3.63 min (Gradient A), (ESI -) 238.00 [M - H]

N-(4-acetylphenyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide **159**



(1.07 g, 83%)

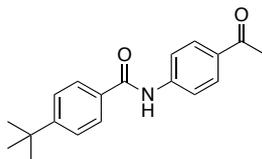
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.52 (s, 1H, NH), 7.96 (q, J = 8.9 Hz, 4H, HAR), 7.32 (s, 2H, HAR), 3.88 (s, 6H, 2 OMe), 3.74 (s, 3H, OMe), 2.55 (s, 3H, Me).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 196.7 (C), 165.4 (C), 152.8 (2 C), 143.5 (C), 140.5 (C), 132.0 (C), 129.7 (C), 129.3 (2 CH), 119.7 (2 CH), 105.4 (2 CH), 60.2 (CH_3), 56.2 (2 CH_3), 26.5 (CH_3).

HPLC Gradient B t_R = 13.17 min

LCMS (m/z): t_R = 3.73 min (Gradient A), (APCI +) 329.98 [M+H], (APCI -) 327.97 [M - H]

N-(4-acetylphenyl)-4-(*tert*-butyl)benzamide **160**



(880 mg, 58%)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.49 (s, 1H, NH), 7.97 (m, 4H, HAR), 7.92 (d, J = 8.4, 2H, HAR), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAR), 2.55 (s, 3H, Me), 1.32 (s, 9H, *t*-Bu).

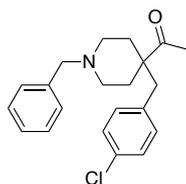
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 196.6 (C), 165.9 (C), 154.8 (C), 143.7 (2 C), 131.9 (C), 129.3 (2 CH), 127.7 (2 CH), 125.2 (2 CH), 119.3 (2 CH), 34.7 (C), 30.9 (3 CH_3), 26.5 (CH_3).

HPLC Gradient B t_R = 18.66 min

LCMS (m/z): t_R = 4.80 min (Gradient A), (APCI +) 296.92 [M+H], (APCI -) 295.96 [M - H]

Procedure I: Nucleophilic substitution

To a solution of compound **115** or **115m** (2.0 mmol) in absolute EtOH (2 mL), was added the corresponding alkyl chloride (2.0 mmol) and potassium carbonate (3.4 mmol). The reaction mixture was stirred for 40 min at 80°C under microwave irradiation. Subsequently, the solvent was distilled off. The residue was dissolved in water, extracted 4 times with Et₂O and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄. The solvent was removed and the crude was purified by silica gel column chromatography eluting with EtOAc/Cyclohexane to afford the expected compound.

1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 116

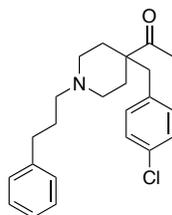
(231 mg, 60%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26 – 7.14 (m, 7H, HAr), 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.37 (s, 2H, CH_2), 2.70 (s, 2H, CH_2), 2.68 – 2.61 (m, 2H, H_{eq}), 2.04 (m, 2H, H_{ax}), 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.00 – 1.92 (m, 2H, H_{eq}), 1.60 – 1.50 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.4 (C), 138.4 (C), 135.1 (C), 132.8 (C), 131.4 (2 CH), 129.3 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.2 (CH), 63.4 (CH_2), 51.9 (C), 51.0 (2 CH_2), 44.6 (CH_2), 32.8 (2 CH_2), 27.0 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 24.35$ min

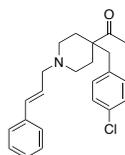
LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 3.74$ min (Gradient A), (APCI +) 342.16 [M+H]

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3-phenylpropyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 182

(235 mg, 53%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 – 7.14 (m, 7H, HAr), 6.96 – 6.92 (d, 2H, HAr), 2.75 (s, 2H, CH_2), 2.74 – 2.68 (m, 2H, H_{eq}), 2.67 – 2.62 (m, 2H, CH_2), 2.38 – 2.32 (m, 2H, CH_2), 2.17 - 2.10 (m, 2H, H_{ax}), 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.07 - 1.99 (m, 2H, H_{eq}), 1.88 - 1.79 (m, 2H, CH_2), 1.66 – 1.56 (m, 2H, H_{ax}).

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 3.24$ min (Gradient A), (APCI +) 370.17 [M+H]

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-cinnamylpiperidin-4-yl)ethan-1-one 183

(236 mg, 32%)

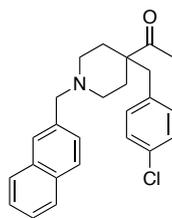
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 - 7.34 (m, 2H, HAr), 7.33 - 7.28 (m, 2H, HAr), 7.25 - 7.20 (m, 3H, HAr), 6.94 (d, $J = 8.4$, 2H, HAr), 6.48 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, Hethylene), 6.24 (dt, $J = 15.8, 6.8$ Hz, 1H, Hethylene), 3.11 (bq, 2H, CH_2), 2.82 (m, 2H, H_{eq}), 2.77 (s, 2H, CH_2), 2.18 - 2.00 (m, 2H, H_{ax}), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.07 - 2.00 (m, 2H, H_{eq}), 1.71 - 1.61 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.1 (C), 136.9 (C), 134.8 (C), 133.7 (C), 132.9 (CH), 131.4 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.8 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (2 CH), 61.3 (CH_2), 51.8 (C), 51.0 (2 CH_2), 44.6 (CH_2), 32.6 (2 CH_2), 26.9 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 12.46$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 3.82$ min (Gradient A), (APCI +) 368.12 [M+H]

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 184



(203 mg, 44%)

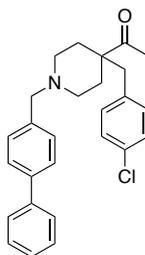
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85 – 7.77 (m, 3H, HAr), 7.69 (s, 1H, HAr), 7.49 – 7.41 (m, 3H, HAr), 7.24 – 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.97 – 6.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.59 (s, 2H, CH_2), 2.76 (s, 2H, CH_2), 2.76 – 2.71 (m, 2H, H_{eq}), 2.13 – 2.07 (m, 2H, H_{ax}), 2.08 – 2.04 (m, 2H, H_{eq}), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.68 – 1.58 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.4 (C), 136.0 (C), 135.1 (C), 133.4 (C), 132.9 (C), 132.8 (C), 131.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 127.8 (2 CH), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 125.7 (CH), 63.6 (CH_2), 51.9 (C), 51.1 (2 CH_2), 44.6 (CH_2), 32.8 (2 CH_2), 27.0 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 12.35$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 4.11$ min (Gradient A), (APCI +) 392.13 [M+H]

1-(1-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **185**



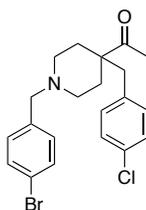
(410 mg, 48%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.61 – 7.57 (m, 2H, HAr), 7.56 – 7.51 (m, 2H, HAr), 7.46 – 7.41 (m, 2H, HAr), 7.37 – 7.31 (m, 3H, HAr), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 3.47 (s, 2H, CH_2), 2.78 (s, 2H, CH_2), 2.78 – 2.71 (m, 2H, H_{eq}), 2.08 (m, 4H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 2.07 (s, 3H, CH_3), 1.68 – 1.59 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.4 (C), 141.1 (C), 140.2 (C), 137.5 (C), 135.1 (C), 132.8 (C), 131.4 (2 CH), 129.7 (2 CH), 128.9 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.3 (CH), 127.2 (2 CH), 127.1 (2 CH), 63.1 (CH_2), 51.9 (C), 51.1 (2 CH_2), 44.6 (CH_2), 32.8 (2 CH_2), 27.0 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 14.18$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 4.50$ min (Gradient A), (APCI +) 418.22 [M+H]

1-(1-(4-bromobenzyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 186

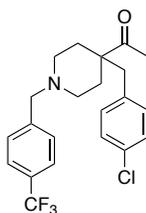
(504 mg, 61%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, HAr), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, HAr), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, HAr), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, HAr), 3.34 (s, 2H, CH₂), 2.79 (s, 2H, CH₂), 2.62 - 2.55 (m, 2H, H_{eq}), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.00 - 1.92 (m, 2H, H_{ax}), 1.91 - 1.83 (m, 2H, H_{eq}), 1.52 - 1.42 (m, 2H, H_{ax}).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 211.3 (C), 138.0 (C), 135.7 (C), 131.7 (2 CH), 131.1 (C), 130.9 (2 CH), 130.8 (2 CH), 127.8 (2 CH), 119.8 (C), 61.3 (CH₂), 51.1 (C), 50.2 (2 CH₂), 42.8 (CH₂), 31.8 (2 CH₂), 26.1 (CH₃).

HPLC Gradient B *t*_R = 11.96 min

LCMS (*m/z*): *t*_R = 3.73 min (Gradient A), (APCI +) 422.10 [M+H]

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 187

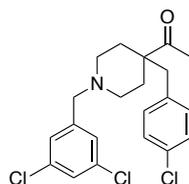
(142 mg, 58%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, HAr), 7.46 - 7.39 (m, 2H, HAr), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, HAr), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, HAr), 3.48 (s, 2H, CH₂), 2.76 (s, 2H, CH₂), 2.75 - 2.63 (m, 2H, H_{eq}), 2.11 - 2.08 (m, 2H, H_{ax}), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.04 (m, 2H, H_{eq}), 1.71 - 1.54 (m, 2H, H_{ax}).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 212.2 (C), 142.6 (C), 134.8 (C), 132.8 (C), 131.3 (2 CH), 129.7 (C), 129.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 125.3 (bq, CF₃ + 2 CH), 62.7 (CH₂), 51.8 (C), 51.1 (2 CH₂), 44.6 (CH₂), 32.7 (2 CH₂), 26.9 (CH₃).

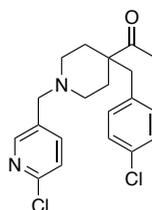
HPLC Gradient B *t*_R = 11.97 min

LCMS (*m/z*): *t*_R = 3.04 min (Gradient A), (APCI +) 410.04 [M+H]

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,5-dichlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **188**

(149 mg, 61%)

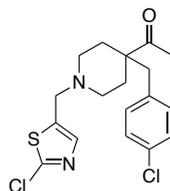
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.25 – 7.19 (m, 5H, HAr), 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 3.39 (bs, 2H, CH_2), 2.78 (s, 2H, CH_2), 2.75 - 2.62 (m, 2H, H_{eq}), 2.16 - 2.09 (m, 2H, H_{ax}), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.07 - 2.99 (m, 2H, H_{eq}), 1.75 - 1.63 (m, 2H, H_{ax}).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 13.19$ minLCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 3.87$ min (Gradient A), (APCI +) 410.10 [M+H]1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **189**

(131 mg, 58%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.27 (s, 1H, HAr_{py}), 7.73 (dd $J = 8.1$, 1H, HAr_{py}), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, HAr_{py}), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, HAr), 7.05 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, HAr), 3.40 (s, 2H, CH_2), 2.79 (s, 2H, CH_2), 2.64 - 2.55 (m, 2H, H_{eq}), 2.14 (s, 3H, CH_3), 2.00 - 1.84 (m, 4H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 1.52 - 1.42 (m, 2H, H_{ax}).

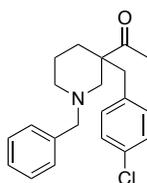
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 211.3 (C), 149.9 (C), 148.8 (CH), 140.1 (C), 135.7 (CH), 133.6 (C), 131.8 (2 CH), 131.2 (C), 127.8 (2 CH), 123.9 (CH), 58.3 (CH_2), 51.1 (C), 50.2 (2 CH_2), 42.8 (CH_2), 31.8 (2 CH_2), 26.2 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 11.14$ minLCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 2.82$ min (Gradient A), (APCI +) 376.97 [M+H]1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((2-chlorothiazol-5-yl)methyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **190**

(111 mg, 32%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (bs, 1H, HAr), 7.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 3.59 (s, 2H, CH_2), 2.80 - 2.65 (m, 2H, H_{eq}), 2.76 (s, 2H, CH_2), 2.18 - 2.09 (m, 4H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$), 2.08 (s, 3H, CH_3), 1.71 - 1.50 (m, 2H, H_{ax}).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 11.37$ minLCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 2.63$ min (Gradient A), (APCI +) 383.03 [M+H]

1-(1-benzyl-3-(4-chlorobenzyl)piperidin-3-yl)ethan-1-one **191**

(383 mg, 60%)

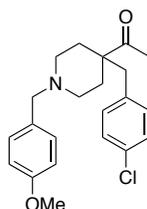
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 - 7.27 (m, 5H, HAr), 7.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 6.91 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 3.45 (q, $J = 13.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.04 - 2.90 (m, 1H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 2.80 - 2.64 (m, 2H, CH_2), 2.65 - 2.61 (m, 1H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 2.21 - 2.13 (m, 1H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 2.09 - 1.99 (m, 2H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 1.96 (s, 3H, CH_3), 1.62 - 1.48 (m, 2H, $\text{H}_{\text{ax/eq}}$), 1.25 - 1.11 (m, 1H, $\text{H}_{\text{eq/ax}}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.4 (C), 138.3 (C), 135.1 (C), 132.6 (C), 131.3 (2 CH), 129.3 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.3 (CH), 63.5 (CH_2), 60.6 (CH_2), 54.1 (CH_2), 53.1 (C), 42.8 (CH_2), 31.5 (CH_2), 26.9 (CH_3), 22.7 (CH_2).

HPLC Gradient B $t_R = 10.16$ minLCMS (m/z): $t_R = 3.62$ min (Gradient A), (APCI +) 342.13 [M+H]

Procedure J: N-alkylation of p-methoxybenzyl chloride

Compound **115** (1.6 mmol) was dissolved in DCM under inert atmosphere. p-methoxybenzyl chloride (1.6 mmol, 1 eq.) and DIEA (1.8 mmol, 1.1 eq.) were added and the mixture was allowed to stir overnight at room temperature. After completion, the mixture was evaporated and subsequently extracted with EtOAc, washed with HCl 1N, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by silica gel column chromatography eluting with EtOAc/Cyclohexane.

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **193**

(260 mg, 44%)

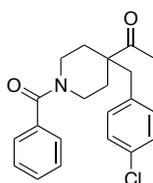
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, HAr), 7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 6.80 - 6.78 (d, $J = 8.4$, 2H, HAr), 6.76 - 6.74 (d, $J = 8.63$ Hz, 2H, HAr), 3.71 (s, 2H, CH_2), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.12 - 3.03 (m, 2H, H_{eq}), 2.70 (s, 2H, CH_2), 2.31 - 2.20 (m, 2H, CH_{ax}), 2.05 (m, 2H, H_{eq}), 2.02 (s, 3H, CH_3), 1.93 - 1.82 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 210.8 (C), 160.4 (C), 133.8 (C), 133.2 (C), 132.0 (2 CH), 131.1 (2 CH), 128.7 (2 CH), 122.8 (C), 114.1 (2 CH), 61.0 (CH_2), 55.4 (2 CH_2), 51.1 (CH_3), 49.8 (CH_2), 44.4 (C), 30.5 (2 CH_2), 26.3 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_R = 10.92$ minLCMS (m/z): $t_R = 3.92$ min (Gradient A), (APCI +) 372.13 [M+H]

Procedure K: N-acylation on the piperidine ring

Compound **115** (1.6 mmol) was dissolved in DCM (4 mL) with Et₃N (1.8 mmol, 1.1 eq.). The flask was cooled down to 0°C and 1.6 mmol (1 eq.) of the corresponding acyl chloride was added dropwise. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Thereafter, water was added and the product was extracted three times with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Compounds were further purified by silica gel column chromatography eluting with (MeOH/DCM) with a gradient adapted to the R_f of the product.

1-(1-benzoyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 194

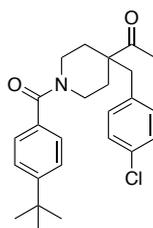
(285 mg, 50%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 - 7.33 (m, 5H, HAr), 7.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, HAr), 6.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, HAr), 3.67 - 3.52 (m, 2H, H_{eq}), 3.14 - 2.89 (m, 2H, H_{ax}), 2.80 (s, 2H, CH₂), 2.23 - 1.99 (m, 2H, H_{eq}), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.73 - 1.57 (m, 2H, H_{ax}).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 211.0 (C), 170.5 (C), 135.9 (C), 134.1 (C), 133.1 (C), 131.2 (CH), 129.8 (2 CH), 128.6 (2 CH), 128.6 (2 CH), 126.9 (2 CH), 52.3 (C), 45.1 (CH₂), 44.5 (2 CH₂), 32.8 (2 CH₂), 26.6 (CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 18.58 min

LCMS (m/z): t_R = 5.72 min (Gradient A), (APCI +) 356.11 [M+H]

1-(1-(4-(tert-butyl)benzoyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 195

(468 mg, 71%)

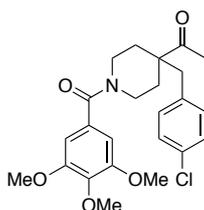
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, HAr), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, HAr), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, HAr), 3.78 - 3.55 (m, 2H, H_{eq}), 3.14 - 2.88 (m, 2H, H_{ax}), 2.81 (s, 2H, CH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.21 - 1.99 (m, 2H, H_{eq}), 1.74 - 1.55 (m, 2H, H_{ax}), 1.31 (s, 9H, t-Bu).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 211.2 (C), 170.7 (C), 153.1 (C), 134.2 (C), 133.1 (C), 132.8 (C), 131.2 (2 CH), 128.8 (2 CH), 126.9 (2 CH), 125.5 (2 CH), 52.4 (C), 44.6 (2 CH₂), 34.9 (CH₂), 32.9 (2 CH₂), 31.3 (3 CH₃), 26.7 (CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 25.74 min

LCMS (m/z): t_R = 5.98 min (Gradient A), (APCI +) 412.18 [M+H]

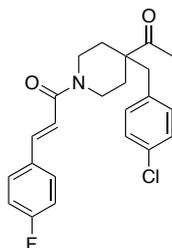
1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one 196



(393 mg, 55%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.55 (s, 2H, HAr), 4.39 (m, 2H, CH_2), 3.83 (s, 9H, OCH_3), 3.75 - 3.57 (m, 2H, H_{eq}), 3.15 - 2.87 (m, 2H, H_{ax}), 2.80 (s, 1H, CH_2), 2.20 - 1.99 (m, 2H, H_{eq}), 2.15 (s, 3H, CH_3), 1.66 - 1.38 (m, 2H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 211.1 (C), 170.2 (C), 153.4 (2 C), 139.4 (C), 134.1 (C), 133.2 (C), 131.3 (2 CH), 128.4 (2 CH), 104.4 (2 CH), 60.9 (CH_3), 56.4 (2 CH_3), 52.3 (C), 44.5 (CH_2), 39.9 (2 CH_2), 32.7 (2 CH_2), 26.6 (CH_3).

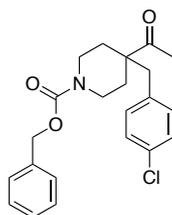
HPLC Gradient D $t_{\text{R}} = 26.23$ minLCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 5.53$ min (Gradient A), (APCI +) 446.21 [M+H]*(E)*-1-(4-acetyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-1-yl)-3-(4-fluorophenyl)prop-2-en-1-one 197

(263 mg, 83%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H_{cis}), 7.61 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, H_{trans}), 7.52 - 7.46 (m, 2H, HAr), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.06 (dd, $J = 15.2, 6.7$ Hz, 2H, HAr), 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 6.76 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, H_{trans}), 6.38 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H_{cis}), 4.53 - 4.38 (m, 1H, H_{eq}), 3.96 - 3.84 (m, 1H, H_{eq}), 3.28 - 3.13 (m, 1H, H_{ax}), 2.80 (m, 3H, $\text{CH}_2 + \text{H}_{\text{ax/eq}}$), 2.17 (s + m, 5H, $\text{CH}_3 + \text{H}_{\text{ax/eq}}$), 1.68 - 1.55 (s, 1H, H_{ax}), 1.51 - 1.39 (m, 1H, H_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 211.2 (C), 165.4 (C), 162.4 (C), 141.8 (CH), 134.2 (C), 133.2 (C), 131.3 (2 CH), 129.7 (2 CH), 129.6 (C), 128.7 (2 CH), 116.1 (2 CH), 115.9 (CH), 52.4 (C), 44.6 (2 CH_2), 43.4 (CH_2), 32.8 (2 CH_2), 26.6 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 21.08$ minLCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 6.08$ min (Gradient A), (APCI +) 400.08 [M+H]

benzyl 4-acetyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidine-1-carboxylate **198**

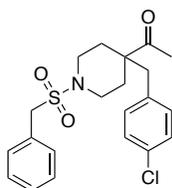
(254 mg, 55%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 - 7.31 (m, 5H, HAr), 7.25 - 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, HAr), 5.10 (s, 2H, CH_2), 3.99 - 3.87 (m, 2H, H_{eq}), 2.97 - 2.86 (m, 2H, CH_{ax}), 2.77 (s, 2H, CH_2), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.07 - 2.04 (m, 2H, H_{eq}), 1.55 - 1.43 (m, 2H, CH_{ax}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 211.4 (C), 155.3 (C), 136.8 (C), 134.3 (C), 133.1 (C), 131.3 (2 CH), 128.6 (4 CH), 128.2 (CH), 128.0 (2 CH), 67.3 (CH_2), 52.0 (C), 44.5 (CH_2), 41.4 (2 CH_2), 32.4 (2 CH_2), 26.8 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 23.90$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 6.59$ min (Gradient A), (APCI +) 386.03 [M+H]

1-(1-(benzylsulfonyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **199**

(524 mg, 65%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.35 (bs, 5H, HAr), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, HAr), 7.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, HAr), 4.35 (s, 2H, CH_2), 3.43 - 3.34 (m, 2H, H_{eq}), 2.83 (s, 2H, CH_2), 2.68 (t, $J = 10.9$ Hz, 2H, H_{ax}), 2.17 (s, 3H, CH_3), 1.97 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H, H_{eq}), 1.50 - 1.38 (m, 2H, H_{ax}).

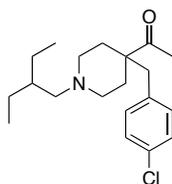
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 210.66 (C), 135.20 (C), 131.73 (2 CH), 131.30 (C), 130.79 (2 CH), 129.52 (C), 128.26 (2 CH), 128.07 (CH), 127.89 (2 CH), 54.33 (CH_2), 50.76 (C), 42.72 (2 CH_2), 42.17 (CH_2), 31.40 (2 CH_2), 26.08 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 21.58$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 6.25$ min (Gradient A), (APCI +) 406.21 [M+H]

Procedure L: N-alkylation of 3-(chloromethyl)pentane

A mixture of compound **115** (1.6 mmol), Cs_2CO_3 (1.8 mmol, 1.1 eq), NaI (1.6 mmol, 1 eq.), and 3-(chloromethyl)pentane (1.6 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF in a microwave vial. The reaction mixture was subjected to microwave irradiation at 100°C for 1h. Water was added and the mixture was extracted with DCM, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by silica gel column chromatography eluting with EtOAc/Cyclohexane in a 1:1 mixture.

1-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(2-ethylbutyl)piperidin-4-yl)ethan-1-one **204**

(235 mg, 44%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (m, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 2.75 (s, 2H, CH_2), 2.68 – 2.60 (m, 2H, H_{eq}), 2.09 - 2.05 (m, 2H, H_{ax}), 2.05 (s, 2H, CH_2), 2.04 (s, 3H, CH_3), 1.99 - 1.90 (m, 2H, H_{eq}), 1.63 - 1.55 (m, 2H, H_{ax}), 1.40 - 1.20 (m, 6H, 2 x CH_2 and CH), 0.83 (t, 6H, CH_3).

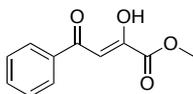
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 212.6 (C), 135.2 (C), 132.7 (C), 131.3 (2 CH), 128.5 (2 CH), 62.9 (CH_2), 52.0 (C), 51.6 (2 CH_2), 44.5 (CH_2), 37.9 (CH), 32.9 (2 CH_2), 27.1 (CH_3), 24.3 (2 CH_2), 10.9 (2 CH_3).

HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 9.95$ min

LCMS (m/z): $t_{\text{R}} = 4.00$ min (Gradient A), (APCI +) 336.17 [M+H]

Procedure M: Diketo-ester synthesis

An oven-dried vial equipped with a stirring bar was charged with a mixture of lithium *tert*-butoxide (6.5 mmol) and dimethyl, diethyl or di-*tert*-butyloxalate (6.0 mmol) in anhydrous THF (10 mL), and the mixture was then stirred at 0°C under argon atmosphere. Ten minutes later, a solution of methyl ketone (5.0 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added dropwise to the mixture, and the resulting mixture was allowed to stir at room temperature for approximately 4h. After completion of the reaction as monitored by TLC, the mixture was quenched by acidification to pH 4-5 with a 1M HCl solution. The resulting mixture was extracted three times with EtOAc, followed by sat. NaCl. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was then purified by silica gel column chromatography eluting with a gradient of MeOH/DCM adapted to the R_{f} of the compound.

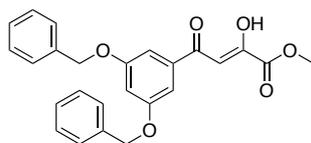
Methyl (Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-phenylbut-2-enoate **131**

(150 mg, 80%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.08 (bd, 2H, HAr), 7.70 (m, 1H, HAr), 7.59 (m, 2H, HAr), 7.13 (s, 1H, H_{enol}), 4.61 (s, 2H, H_{keto}), 3.86 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 190.2 (C), 168.7 (C), 162.1 (C), 134.3 (CH), 134.2 (C), 129.1 (2 CH), 127.9 (2 CH), 98.1 (CH), 53.1 (CH_3).

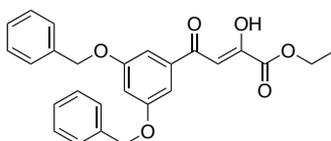
HPLC Gradient B $t_{\text{R}} = 18.50$ min

Methyl (Z)-4-(3,5-bis(benzyloxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 164

(117 mg, 46%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.47 - 7.43 (m, 4H, HAr), 7.41 - 7.37 (m, 4H, HAr), 7.35 - 7.31 (m, 2H, HAr), 7.02 (d, J = 2.2 Hz, 2H, HAr), 6.78 (m, 1H, HAr), 6.35 (s, 1H, Henol), 5.13 (s, 4H, 2 CH₂), 5.10 (s, 2H, Hketo), 3.69 (s, 1H, OMe).

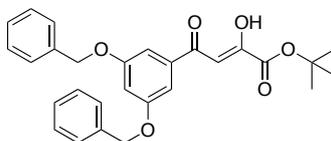
^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 184.7 (C), 172.1 (C), 166.9 (C), 159.4 (2C), 143.2 (C), 137.0 (2C), 128.46 (4 CH), 127.9 (2 CH), 127.7 (4 CH), 105.7 (2 CH), 104.1 (CH), 92.9 (CH), 69.4 (2 CH₂), 51.7 (CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 31.72 minLCMS (m/z): t_R = 7.18 min (Gradient A), (APCI +) 419.23 [M+H], (APCI -) 417.13 [M - H]*Ethyl (Z)-4-(3,5-bis(benzyloxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 165*

(211 mg, 81%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.47 - 7.43 (m, 4H, HAr), 7.42 - 7.37 (m, 4H, HAr), 7.35 - 7.31 (m, 2H, HAr), 7.25 (bs, 2H, HAr), 7.06 (bs, 1H, HAr), 7.00 (s, 1H, Henol), 5.18 (s, 4H, 2 CH₂), 4.28 (bq, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 189.8 (C), 169.2 (C), 159.8 (2 C), 136.7 (2 C), 128.5 (4 CH), 128.0 (2 CH), 127.8 (4 CH), 107.6 (CH), 106.7 (2 CH), 98.4 (CH), 69.7 (2 CH₂), 62.2 (CH₂), 13.9 (CH₃).

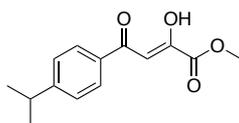
HPLC Gradient B t_R = 31.53 minLCMS (m/z): t_R = 6.13 min (Gradient A) (ESI +) 432.99 [M+H], (ESI -) 430.93 [M - H]*Tert-butyl (Z)-4-(3,5-bis(benzyloxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 166*

(228 mg, 82%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.49 - 7.44 (m, 4H, HAr), 7.42 - 7.38 (m, 4H, HAr), 7.36 - 7.33 (m, 2H, HAr), 7.25 (s, 2H, HAr), 7.01 (m, 2H, HAr + Henol), 5.19 (s, 4H, 2 CH₂), 1.53 (s, 9H, t-Bu).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.8 (C), 159.8 (2 C), 136.7 (2 C), 128.5 (4 CH), 128.0 (2 CH), 127.8 (4 CH), 107.6 (CH), 106.6 (2 CH), 83.4 (C), 69.7 (2 CH₂), 27.5 (3 CH₃).

HPLC Gradient B t_R = 32.95 minLCMS (m/z): t_R = 6.48 min (Gradient A) (ESI -) 458.96 [M - H]

Methyl (Z)-2-hydroxy-4-(4-isopropylphenyl)-4-oxobut-2-enoate 167

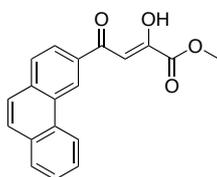
(272 mg, 72%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.91 - 7.84 (m, 1H, HAr), 7.78 (bd, $J = 7.6$ Hz, 1H, HAr), 7.36 - 7.40 (m, 1H, HAr), 7.31 (bd, $J = 8.0$ Hz, 1H, HAr), 5.92 (s, 1H, Henol), 3.50 (s, 1H, OMe), 2.94 (m, 1H, CH), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 165.1 (C), 128.5 (2 CH), 126.7 (2 CH), 33.5 (CH), 23.7 (2 CH_3).

HPLC Gradient B $t_R = 23.56$ min

LCMS (m/z): (ESI -) 247.01 [M - H]

Methyl (Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(phenanthren-3-yl)but-2-enoate 168

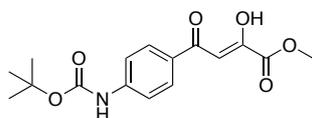
(167 mg, 60%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.43 (s, 1H, HAr), 9.04 (bd, $J = 7.3$ Hz, 1H, HAr), 8.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, HAr), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, HAr), 8.06 - 8.00 (m, 2H, HAr), 7.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, HAr), 7.78 (t, $J = 7.1$, 1H, HAr), 7.72 (t, $J = 7.3$, 1H, HAr), 7.39 (s, 1H, Henol), 3.88 (s, 3H, OMe).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 184.6 (C), 171.2 (C), 167.8 (C), 140.6 (C), 132.6 (C), 131.8 (C), 130.0 (C), 129.1 (C), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (CH), 127.2 (CH), 127.0 (CH), 126.5 (CH), 125.2 (CH), 122.5 (CH), 120.8 (CH), 92.4 (CH), 51.5 (CH_3).

HPLC Gradient B $t_R = 30.86$ min

LCMS (m/z): $t_R = 6.19$ min (Gradient A), no mass signal.

Methyl (Z)-4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 169

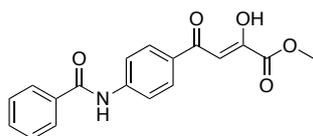
(290 mg, 75%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.95 (s, 1H, NH), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, HAr), 7.63 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.09 (s, 1H, Henol), 3.85 (s, 3H, CH_3), 1.49 (s, 1H, t-Bu).

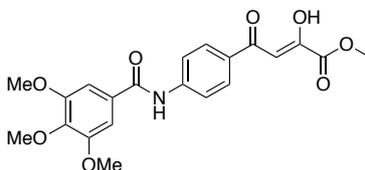
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 189.9 (C), 167.5 (C), 162.3 (C), 152.4 (C), 145.5 (C), 129.6 (2 CH), 117.6 (2 CH), 97.8 (CH), 80.0 (C), 53.0 (CH_3), 28.0 (t-Bu).

HPLC Gradient B $t_R = 21.26$ min

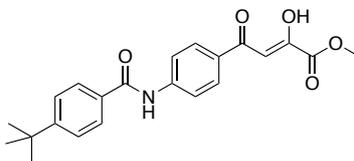
LCMS (m/z): $t_R = 4.81$ min (Gradient A), (ESI -) 319.94 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-benzamidophenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 170

(210 mg, 52%)

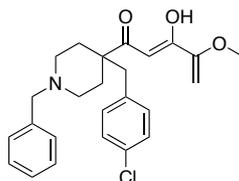
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.68 (s, 1H, NH), 8.10 (bs, 2H, HAr), 8.06 – 7.94 (m, 4H, HAr), 7.63 (t, J = 7.3 Hz, 1H, HAr), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, HAr), 7.12 (s, 1H, Henol), 3.85 (s, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.6 (C), 163.6 (C), 135.0 (C), 132.5 (C), 129.6 (2 CH), 129.0 (2 CH), 128.4 (2 CH), 120.2 (2 CH), 53.4 (CH₃).HPLC Gradient B t_R = 21.76 minHRMS (ESI +) calculated for C₁₈H₁₆NO₅⁺ [M+H]⁺ 326.1023, found 326.1024LCMS (m/z): t_R = 4.45 min (Gradient A), (APCI -) 325.04 [M - H]*Methyl (Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(4-(3,4,5-trimethoxybenzamido)phenyl)but-2-enoate 171*

(147 mg, 58%)

 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.52 (s, 1H, NH), 8.18 - 8.13 (m, 2H, HAr), 8.01 - 7.97 (m, 2H, HAr), 7.30 (bd, 2H, HAr), 7.15 (bs, 1H, Henol), 3.88 (t, J = 5.0 Hz, 9H, 3 x OCH₃), 3.74 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 184.3 (C), 170.4 (C), 167.7 (C), 165.0 (C), 152.6 (2 C), 140.7 (C), 140.4 (C), 129.9 (C), 129.3 (C), 127.3 (2 CH), 119.7 (2 CH), 105.3 (2 CH), 91.7 (CH), 60.2 (CH₃), 56.1 (2 CH₃), 51.5 (CH₃).HPLC Gradient B t_R = 17.15 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₁H₂₂NO₈⁺ [M+H]⁺ 416.1340, found 416.1339LCMS (m/z): t_R = 4.42 min (Gradient A), (ESI -) 415.03 [M-H]*Methyl (Z)-4-(4-(4-(tert-butyl)benzamido)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate 172*

(124 mg, 48%)

 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.60 (s, 1H, NH), 8.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H, HAr), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H, HAr), 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 3H, HAr), 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 3H, HAr), 7.14 (s, 1H, Henol), 3.87 (s, 3H, OMe), 1.33 (s, 9H, t-Bu). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.8 (C), 154.6 (C), 132.1 (2 CH), 127.6 (2 CH), 125.2 (2 CH), 119.4 (2 CH), 51.8 (CH₃), 34.7 (C), 31.0 (t-Bu).HPLC Gradient B t_R = 23.61 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₂H₂₄NO₅⁺ [M+H]⁺ 382.1649, found 382.1649LCMS (m/z): t_R = 5.50 min (Gradient A), (APCI -) 381.10 [M - H]

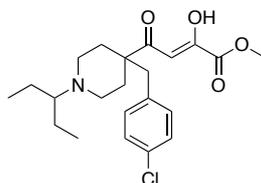
(Z)-1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-3-hydroxy-4-methoxypenta-2,4-dien-1-one **205**

(207 mg, 86%)

HPLC Gradient B t_R = 13.86 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{24}H_{27}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 428.1623, found 428.1624

LCMS (m/z): t_R = 3.72 min (Gradient A), (APCI +) 428.15 [M+H], (APCI -) 427.08 [M-H]

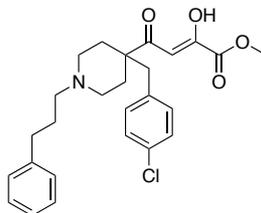
Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(pentan-3-yl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **206**

(85 mg, 29%)

HPLC Gradient B t_R = 14.80 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{23}H_{33}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 422.2093, found 422.2093

LCMS (m/z): t_R = 4.33 min (Gradient A), (APCI +) 422.27 [M+H], (APCI -) 420.22 [M - H]

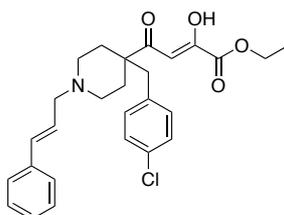
Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3-phenylpropyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **207**

(290 mg, 99%)

HPLC Gradient B t_R = 13.279 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{26}H_{31}ClNO_4$ $[M+H]^+$ 456.1936, found 456.1937

LCMS (m/z): t_R = 3.51 min (Gradient A), (APCI +) 456.12 [M+H], (APCI -) 455.24 [M-H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-cinnamylpiperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **208**

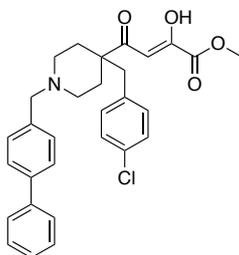
(217 mg, 53%)

HPLC Gradient B t_R = 5.00 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{27}H_{31}NO_4Cl^+$ [M+H]⁺ 468.1936, found 468.1937

LCMS (m/z): $t_R = 4.16$ min (Gradient A), (APCI +) 468.09 [M+H], (APCI -) 466.25 [M - H]

Methyl (Z)-4-(1-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **209**



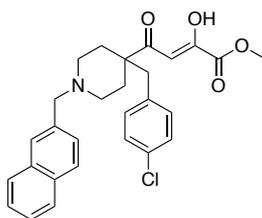
(262 mg, 54%)

HPLC Gradient B $t_R = 20.66$ min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{30}H_{31}ClNO_4^+$ [M+H]⁺ 504.1936, found 504.1939

LCMS (m/z): $t_R = 3.92$ min (Gradient A), (APCI +) 504.00 [M+H], (APCI -) 503.19 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **210**

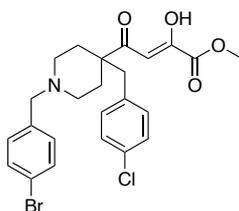


(115 mg, 46%)

HRMS (ESI +) calculated for $C_{28}H_{29}ClNO_4^+$ [M+H]⁺ 478.1780, found 478.1780

LCMS (m/z): $t_R = 3.71$ min (Gradient A), (APCI +) 478.14 [M+H]

Methyl (Z)-4-(1-(4-bromobenzyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **211**



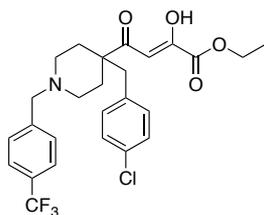
(260 mg, 50%)

HPLC Gradient B $t_R = 16.70$ min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{25}H_{28}NO_4BrCl^+$ [M+H]⁺ 520.0885, found 520.0885

LCMS (m/z): $t_R = 4.62$ min (Gradient A), (APCI +) 522.06 [M+H], (APCI -) 518.09 [M - H]

Ethyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **212**



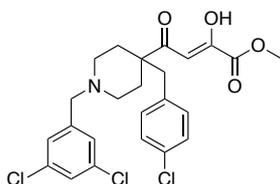
(361 mg, 80%)

HPLC Gradient B t_R = 15.70 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{26}H_{28}ClF_3NO_4^+$ [M+H]⁺ 510.1653, found 510.1656

LCMS (m/z): t_R = 4.31 min (Gradient A), (APCI +) 510.07 [M+H], (APCI -) 508.18 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,5-dichlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **213**



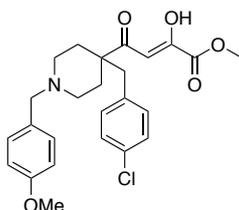
(180 mg, 97%)

HPLC Gradient B t_R = 15.88 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{24}H_{25}Cl_3NO_4^+$ [M+H]⁺ 496.0844, found 496.0842

LCMS (m/z): t_R = 3.91 min (Gradient A), (APCI +) 497.98 [M+H], (APCI -) 494.10 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **214**



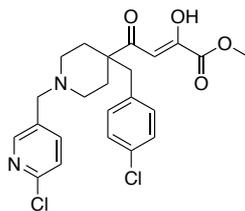
(163 mg, 51%)

HPLC Gradient B t_R = 14.78 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{25}H_{29}ClNO_5^+$ [M+H]⁺ 458.1729, found 458.1727

LCMS (m/z): t_R = 4.25 min (Gradient A), (APCI +) 458.18 [M+H], (APCI -) 456.09 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **215**



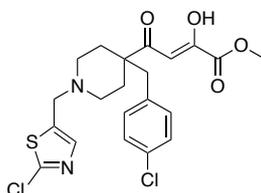
(113 mg, 70%)

HPLC Gradient B t_R = 10.60 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{23}H_{25}Cl_2N_2O_4^+$ [M+H]⁺ 463.1186, found 463.1182

LCMS (m/z): t_R = 2.89 min (Gradient A), (APCI +) 462.92 [M + H], (APCI -) 460.94 [M - H]

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((2-chlorothiazol-5-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **216**



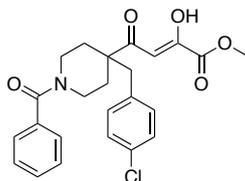
(76 mg, 56%)

HPLC Gradient B t_R = 11.91 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{21}H_{23}Cl_2N_2O_4S^+$ [M+H]⁺ 469.0750, found 469.0746

LCMS (m/z): t_R = 2.88 min (Gradient A), (APCI -) 468.88 [M - H]

Methyl (Z)-4-(1-benzoyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **217**



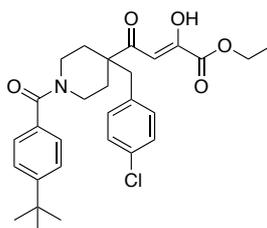
(200 mg, 67%)

HPLC Gradient B t_R = 20.91 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{24}H_{25}ClNO_5^+$ [M+H]⁺ 442.1416, found 442.1417

LCMS (m/z): t_R = 6.04 min (Gradient A), (APCI +) 442.06 [M+H], (APCI -) 439.96 [M - H]

Ethyl (Z)-4-(1-(4-(tert-butyl)benzoyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **218**



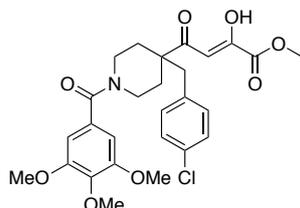
(364 mg, 80%)

HPLC Gradient B t_R = 34.23 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{29}H_{35}ClNO_5$ $[M+H]^+$ 512.2198, found 512.2201

LCMS (m/z): t_R = 7.22 min (Gradient A), (APCI +) 512.14 $[M+H]$, (APCI -) 510.19 $[M - H]$

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **219**



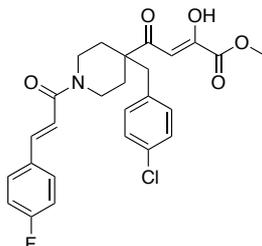
(182 mg, 41%)

HPLC Gradient B t_R = 17.90 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{27}H_{31}ClNO_8$ $[M+H]^+$ 532.1733, found 532.1733

LCMS (m/z): t_R = 5.15 min (Gradient A), (APCI +) 532.20 $[M+H]$, (APCI -) 530.28 $[M - H]$

Methyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((E)-3-(4-fluorophenyl)acryloyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **220**



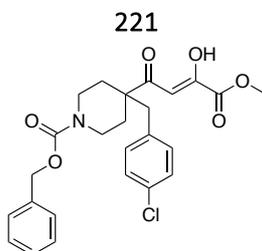
(200 mg, 65%)

HPLC Gradient B t_R = 21.45 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{26}H_{26}NO_5FCl$ $[M+H]^+$ 486.1478, found 486.1482

LCMS (m/z): t_R = 6.35 min (Gradient A), (APCI +) 486.18 $[M+H]$, (APCI -) 484.14 $[M - H]$

Benzyl (Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-4-(3-hydroxy-4-methoxy-4-oxobut-2-enoyl)piperidine-1-carboxylate **221**

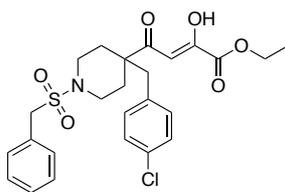


(200 mg, 70%)

HPLC Gradient B t_R = 26.54 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{25}H_{27}NO_6Cl$ $[M+H]^+$ 472.1521, found 472.1522

LCMS (m/z): t_R = 6.74 min (Gradient A), (APCI +) 472.07 $[M+H]$, (APCI -) 470.20 $[M - H]$

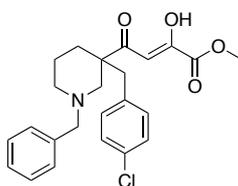
Methyl (Z)-4-(1-(benzylsulfonyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **222**

(462 mg, 73%)

HPLC Gradient B t_R = 25.34 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{25}H_{32}N_2O_6SCl^+$ $[M+NH_4]^+$ 523.1664, found 523.1667

LCMS (m/z): t_R = 6.62 min (Gradient A), (APCI +) 506.11 $[M+H]$, (APCI -) 504.03 $[M - H]$

Methyl (Z)-4-(1-benzyl-3-(4-chlorobenzyl)piperidin-3-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoate **223**

(363 mg, 81%)

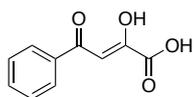
HPLC Gradient B t_R = 14.17 min

HRMS (ESI +) calculated for $C_{24}H_{27}ClNO_4^+$ $[M+H]^+$ 428.1623, found 428.1620

LCMS (m/z): t_R = 4.16 min (Gradient A), (APCI +) 428.08 $[M+H]$, (APCI -) 426.07 $[M - H]$

Procedure N: Diketo-acid synthesis

To a suspension of diketo ester (5.0 mmol), in THF/MeOH (1:1) was added dropwise 1M aqueous NaOH (4 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature for about 0.5h. The reaction was monitored by TLC and LCMS. After completion, the aqueous layer was extracted with Et₂O to remove the regenerated methyl ketone. The aqueous layer was subsequently acidified with 1M HCl to pH 1-2. The resulting mixture was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to afford the dicéto acid. For some compounds, a reversed phase column chromatography was performed by preparative HPLC eluting with H₂O/MeCN.

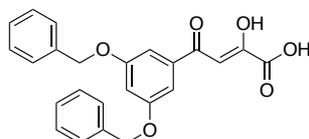
(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-phenylbut-2-enoic acid **58**

(298 mg, 80%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 – 8.04 (bq, 2H, HAr), 7.70 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, HAr), 7.57 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, HAr), 7.10 (s, 1H, Henol), 4.56 (s, 2H, Hketo).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190.4 (C), 170.2 (C), 163.2 (C), 134.6 (C), 134.1 (CH), 129.2 (2 CH), 127.9 (2CH), 97.9 (CH).

HPLC Gradient C $t_R = 17.46$ min

(Z)-4-(3,5-bis(benzyloxy)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **173**

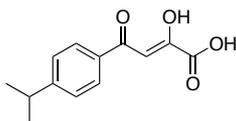
(118 mg, 70%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.49 - 7.45 (m, 4H, HAr), 7.43 - 7.38 (m, 4H, HAr), 7.36 – 7.31 (m, 2H, HAr), 7.26 (d, 2H, HAr), 7.09 (s, 1H, Henol), 6.99 (bt, 1H, HAr), 5.19 (s, 4H, CH₂), 5.16 (s, 2H, Hketo).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190.0 (C), 170.2 (C), 163.2 (C), 159.9 (2 C), 136.8 (2 C), 136.7 (C), 128.5 (4 CH), 128.0 (2 CH), 127.8 (4 CH), 107.6 (CH), 106.6 (2 CH), 98.2 (CH), 69.7 (2 CH₂).

HPLC Gradient B $t_R = 27.61$ min

LCMS (m/z): $t_R = 6.47$ min (Gradient A), (APCI +) 405.14 [M+H], (APCI -) 403.15 [M - H]

(Z)-2-hydroxy-4-(4-isopropylphenyl)-4-oxobut-2-enoic acid **174**

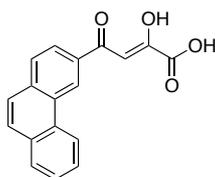
(215 mg, 99%)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, HAr), 7.15 (s, 1H, Henol), 3.00 (dt, $J = 13.8, 6.9$ Hz, 1H, CH), 1.29 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2 x CH₃).

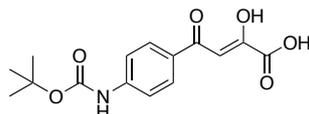
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190.4 (C), 169.8 (C), 163.2 (C), 155.3 (C), 132.4 (C), 128.2 (2 CH), 127.2 (2 CH), 97.7 (CH), 33.6 (CH), 23.4 (2 CH₃).

HPLC Gradient B $t_R = 25.58$ min

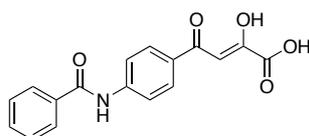
LCMS (m/z): $t_R = 3.77$ min (Gradient A), (APCI +) 235.17 [M+H], (APCI -) 233.07 [M - H]

(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(phenanthren-3-yl)but-2-enoic acid **175**

(264 mg, 90%)

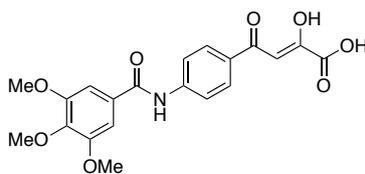
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.37 (bs, 1H, HAr), 9.01 (bd, 1H, HAr), 8.23 – 7.87 (m, 5H), 7.73 (m, 2H, HAr), 6.95 (s, 1H, Henol), 4.74 (s, 1H, Hketo).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 187.6 (C), 174.6 (C), 164.2 (C), 134.0 (C), 131.8 (CH), 130.0 (C), 129.4 (C), 129.1 (CH), 128.7 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 126.3 (CH), 124.9 (CH), 123.3 (CH), 122.5 (CH), 99.2 (CH).HPLC Gradient B t_R = 27.72 minLCMS (m/z): t_R = 5.87 min (Gradient A), (ESI +) 292.96 [M+H], (ESI -) 290.94 [M - H]*(Z)*-4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **176**

(21 mg, 46%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.8, 2H), 7.11 (s, 1H), 1.54 (s, 9H).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) 189.9 (C), 167.5 (C), 162.3 (C), 152.4 (C), 145.5 (C), 129.6 (2 CH), 117.6 (2 CH), 97.8 (CH), 80.1 (C), 28.0 (t-Bu).HPLC Gradient D t_R = 24.01 minLCMS (m/z): t_R = 5.09 min (Gradient A), no mass signal.*(Z)*-4-(4-benzamidophenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **177**

(74 mg, 95%)

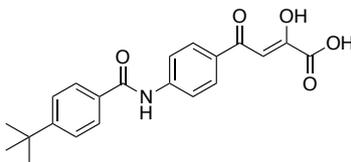
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.68 (s, 1H, NH), 8.12 (d, J = 8.8 Hz, 2H, HAr), 8.04-7.96 (m, 4H, HAr), 7.63 (m, 1H, HAr), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, HAr), 7.10 (s, 1H, Henol).¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 170.2 (C), 167.09 (C), 164.0 (C), 161.2 (C), 144.9 (CH), 134.7 (CH), 132.8 (C), 130.2 (CH), 129.7 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.3 (2 CH), 120.6 (2 CH), 98.2 (CH).HPLC Gradient D t_R = 22.39 minHRMS (ESI +) calculated for C₁₇H₁₄NO₅⁺ [M+H]⁺ 312.0866, found 312.0866LCMS (m/z): t_R = 3.54 min (Gradient A), (APCI -) 310.97 [M - H]

(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(4-(3,4,5-trimethoxybenzamido)phenyl)but-2-enoic acid **178**

(95 mg, 99%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.13 (d, J = 8.8 Hz, 2H, HAr), 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H, HAr), 7.29 (s, 2H, HAr), 7.12 (s, 1H, Henol), 3.88 (s, 6H, 2 x OMe), 3.74 (s, 3H, OMe).

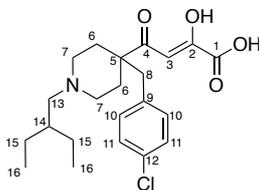
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190.0 (C), 170.2 (C), 166.3 (C), 164.0 (C), 153.1 (2 C), 144.4 (C), 141.0 (C), 130.1 (C), 129.9 (C), 129.6 (2 C), 120.8 (2 C), 105.8 (2 CH), 98.1 (CH), 60.8 (CH₃), 56.6 (2 CH₃).

HPLC Gradient D t_R = 23.16 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₀H₂₀NO₈⁺ [M+H]⁺ 402.1183, found 402.1183LCMS (m/z): t_R = 3.56 min (Gradient A), (APCI -) 400.96 [M - H]*(Z)*-4-(4-(4-(tert-butyl)benzamido)phenyl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **179**

(18 mg, 20%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.58 (s, 1H, NH), 8.10 (d, J = 8.6 Hz, 2H, HAr), 7.98 (m, 2H, HAr), 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 7.08 (s, 1H, Henol), 1.33 (s, 9H, tBu).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 189.8 (C), 166.9 (C), 163.9 (C), 158.9 (C), 155.9 (C), 141.9 (C), 139.4 (C), 138.5 (C), 129.5 (2 CH), 128.1 (2 CH), 125.9 (2 CH), 120.7 (2 CH), 98.0 (CH), 35.2 (CH), 31.3 (3 CH₃).

HPLC Gradient D t_R = 30.27 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₁H₂₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 368.1492, found 368.1491LCMS (m/z): t_R = 4.16 min (Gradient A), (APCI -) 367.08 [M - H]*(Z)*-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(2-ethylbutyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **137**

(52 mg, 71%)

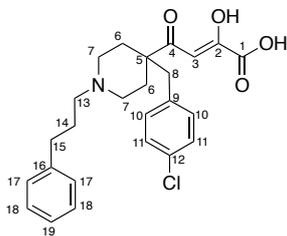
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 363 K) δ 7.31 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H₁₁), 7.10 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H₁₀), 6.38 (bs, 1H, H₃), 3.33 (bd, 2H, H_{7e}), 2.93 (bs, 2H, H₈), 2.86 (bs, 4H, H₁₃ & H_{7a}), 2.23 (bd, 2H, H_{6e}), 1.94 (bt, 2H, H_{6a}), 1.67 (sept, 1H, J = 6.3 Hz, H₁₄), 1.38 (m, 4H, H₁₅), 0.86 (t, 6H, J = 7.4 Hz, H₁₆).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 363 K) δ 209.4 (C₄, C), 134.1 (C₉, C), 131.3 (C₁₀, CH), 127.5 (C₁₁, CH), 98.6 (C₃, CH), 59.5 (C₁₃, CH₂), 49.3 (C₇, CH₂), 34.9 (C₁₄, CH), 28.3 (C₆, CH₂), 22.8 (C₁₅, CH₂), 9.6 (C₁₆, CH₃).

HPLC Gradient D t_R = 30.55 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₂H₃₁ClNO₄⁺ [M+H]⁺ 408.1936, found 408.1938

LCMS (m/z): $t_R = 4.05$ min (Gradient A), (APCI +) 408.09 [M+H], (APCI -) 406.15 [M - H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3-phenylpropyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **138**



(90 mg, 36%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 343 K) δ 10.26 (bs, 1H, NH^+), 7.31 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{11}), 7.29 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H_{18}), 7.22 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H_{17}), 7.20 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz, H_{19}), 7.07 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{10}), 6.52 (bs, 1H, H_3), 3.37 (bs, 2H, H_{7e}), 3.00 (bs, 2H, H_{13}), 2.93 (bs, 2H, H_8), 2.63 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, H_{15}), 2.23 (bs, 2H, H_6), 2.00 (bs, 2H, H_{14}), 1.91 (td, 2H, H_6).

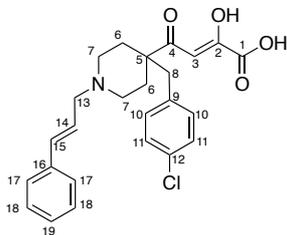
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 343 K) δ 167.6 & 162.7 (C_1 , C & C_2 , C), 140.1 (C_{16} , C), 134.2 (C_9 , C), 131.4 (C_{10} , CH), 128.8 (C_{18} , CH), 127.8 (C_{17} , CH), 127.7 (C_{11} , CH), 125.7 (C_{19} , CH), 98.8 (C_3 , CH), 54.9 (C_{13} , CH_2), 48.7 (C_7 , CH_2), 47.1 (C_5 , C), 40.0 (C_8 , CH_2), 31.8 (C_{15} , CH_2), 28.5 (C_6 , CH_2), 24.5 (C_{14} , CH_2).

HPLC Gradient D $t_R = 30.17$ min

HRMS (ESI +) calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{Cl}^+$ [M+H] $^+$ 442.1780, found 442.1777

LCMS (m/z): $t_R = 3.34$ min (Gradient A), (APCI +) 442.10 [M+H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-cinnamylpiperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **139**



(160 mg, 95%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 363K) δ 7.47 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H_{17}), 7.38 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H_{18}), 7.32 (t, 1H, H_{19}), 7.31 (d, 2H, H_{11}), 7.10 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{10}), 6.81 (d, 1H, $J_{trans} = 15.8$ Hz, H_{15}), 6.47 (bs, 1H, H_3), 6.32 (dt, 1H, $J = 15.8$ & 7.2 Hz, H_{14}), 3.79 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H_{13}), 3.38 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz, H_{7e}), 2.94 (s, 2H, H_8), 2.92 (bs, 2H, H_{7e}), 2.25 (d, 2H, $J = 15$ Hz, H_{6e}), 1.86 (t, 2H, $J = 12$ Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 363 K) δ 162.8 (C_1 , C or C_2 , C), 137.8 (C_{15} , CH), 135.1 (C_{16} , C), 134.2 (C_9 , C), 131.3 (C_{10} , CH), 128.2 (C_{18} , CH), 128.0 (C_{19} , CH), 127.5 (C_{11} , CH), 126.2 (C_{17} , CH), 118.2 (C_{14} , CH), 98.6 (C_3 , CH), 57.0 (C_{13} , CH_2), 48.1 (C_7 , CH_2), 28.6 (C_6 , CH_2).

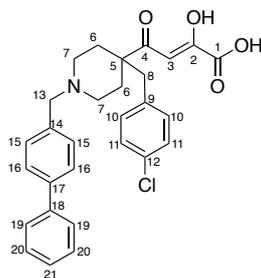
HPLC Gradient D $t_R = 30.65$ min

HRMS (ESI +) calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Cl}^+$ [M+H] $^+$ 440.1621, found 440.1623

LCMS (m/z): $t_R = 4.13$ min (Gradient A), (APCI +) 440.08 [M+H], (APCI -) 438.12 [M-H]

(Z)-4-(1-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid

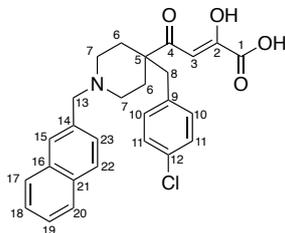
140



(191 mg, 76%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 363 K) δ 7.72 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{16}), 7.68 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{19}), 7.65 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{15}), 7.48 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_{20}), 7.39 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz, H_{21}), 7.30 (d, 2H, $J = 8.1$, H_{11}), 7.08 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{10}), 6.51 (s, 1H, H_3), 4.26 (s, 2H, H_{13}), 3.30 (d, 2H, $J = 12.6$ Hz, H_{7e}), 2.94 (s, 2H, H_8), 2.92 (bs, 2H, H_{7a}), 2.26 (d, 2H, $J = 14.2$ Hz, H_{6e}), 1.95 (t, 2H, $J = 12.5$ Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 363 K) δ 140.8 (C_{17} , C), 139.0 (C_{18} , C), 134.8 (C_9 , C), 131.2 (C_{10} , CH), 131.1 (C_{15} , CH), 128.7 (C_{14} , C), 128.3 (C_{20} , CH), 127.5 (C_{11} , CH), 127.2 (C_{21} , CH), 126.3 (C_{16} , CH), 126.1 (C_{19} , CH), 98.5 (C_3 , CH), 58.2 (C_{13} , CH_2), 48.2 (C_7 , CH_2), 46.8 (C_5 , C), 28.2 (C_6 , CH_2).

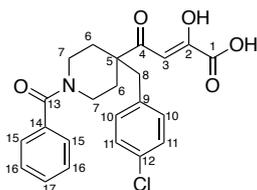
HPLC Gradient D $t_R = 34.02$ minHRMS (ESI +) calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 490.1780, found 490.1781LCMS (m/z): $t_R = 4.44$ min (Gradient A), (APCI +) 490.18 [M+H], (APCI -) 488.13 [M - H]*(Z)*-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(naphthalen-2-ylmethyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid 141

(21 mg, 45%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 353 K) δ 8.00-7.80 (m, 4H, $\text{H}_{\text{naphthalene}}$), 7.60-7.53 (m, 3H, $\text{H}_{\text{naphthalene}}$), 7.28 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{11}), 7.08 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{10}), 6.13 (bs, 1H, H_3), 4.13 (s, 2H, H_{13}), 3.11 (bd, 2H, H_{7e}), 2.88 (s, 2H, H_8), 2.70 (bt, 2H, H_{7a}), 2.15 (bd, 2H, $J = 14.4$ Hz, H_{6e}), 1.77 (bt, 2H, $J = 11.5$ Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , 353 K) δ 132.4-125.9 ($\text{C}_{\text{naphthalene}}$), 134.7 (C_9 , Cq), 131.3 (C_{10} , CH), 127.4 (C_{11} , CH), 98.7 (C_3 , CH), 59.9 (C_{13} , CH_2), 49.0 (C_7 , CH_2), 46.4 (C_5 , Cq), 43.2 (C_8 , CH_2), 29.8 (C_6 , CH_2).

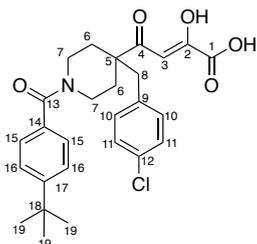
HPLC Gradient D $t_R = 32.73$ minHRMS (ESI +) calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 464.1623, found 464.1621LCMS (m/z): $t_R = 3.50$ min (Gradient A), (APCI +) 464.07 [M+H], (APCI -) 462.19 [M - H]

(Z)-4-(1-benzoyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **142**

(165 mg, 86%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 14.00 (bs, 1H, OH₁), 7.43 (m, 3H, H₁₆ & H₁₇), 7.36 (m, 2H, H₁₅), 7.29 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₁), 7.04 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₀), 6.55 (s, 1H, H₃), 3.05 (bt, 2H, $J=11.4$ Hz, H_{7a}), 2.95 (s, 2H, H₈), 2.02 (bd, 2H, H_{6e}), 1.60 (bt, 2H, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 205.7 (C₄, C), 168.8 (C, C₁₃), 166.8 & 162.9 (C₂, C & C₁, C), 136.0 (C₁₄, C), 134.8 (C₉, C), 131.5 (C₁₀, CH), 131.2 (C₁₂, C), 129.1 (C₁₇, CH), 128.1 (C₁₆, CH), 127.7 (C₁₁, CH), 126.5 (C₁₅, CH), 99.2 (C₃, CH), 49.2 (C₅, C), 43.0 (C₈, CH₂), 31.7 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 26.63 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₃ClNO₅⁺ [M+H]⁺ 428.1259, found 428.1259LCMS (m/z): t_R = 5.33 min (Gradient A), (APCI +) 428.17 [M+H], (APCI -) 426.11 [M - H]*(Z)*-4-(1-(4-(tert-butyl)benzoyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **143**

(290 mg, 98%)

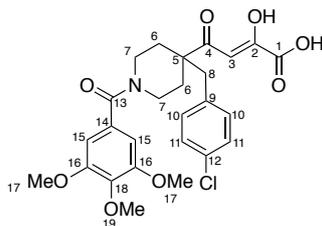
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 14.07 (bs, 1H, OH₁), 7.44 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₆), 7.30 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₅), 7.28 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₁), 7.04 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, H₁₀), 6.55 (s, 1H, H₃), 3.05 (bt, 2H, $J=11$ Hz, H_{7a}), 2.94 (s, 2H, H₈), 2.02 (bs, 2H, H_{6e}), 1.59 (bt, 2H, $J=11$ Hz, H_{6a}), 1.30 (s, 9H, Me₁₉).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 205.7 (C₄, C), 168.9 (C₁₃, C), 166.8 & 162.9 (C₂, C & C₁, C), 151.9 (C₁₇, C), 134.8 (C₉, C), 133.1 (C₁₄, C), 131.5 (C₁₀, CH), 131.2 (C₁₂, C), 127.7 (C₁₁, CH), 126.5 (C₁₅, CH), 124.8 (C₁₆, CH), 99.2 (C₃, CH), 49.2 (C₅, C), 43.0 (C₈, CH₂), 34.3 (C₁₈, C), 31.7 (C₆, CH₂), 30.8 (C₁₉, CH₃).

HPLC Gradient D t_R = 33.26 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₇H₃₁ClNO₅⁺ [M+H]⁺ 484.1885, found 484.1885LCMS (m/z): t_R = 6.32 min (Gradient A), (APCI +) 484.18 [M+H], (APCI -) 482.23 [M - H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid

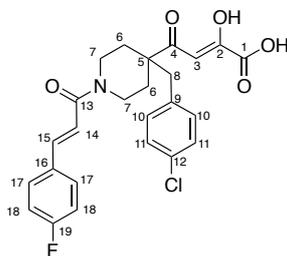
144



(154 mg, 87%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 7.29 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H₁₁), 7.05 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H₁₀), 6.64 (s, 2H, H₁₅), 6.54 (s, 1H, H₃), 3.79 (s, 6H, Me₁₇), 3.71 (s, 3H, Me₁₉), 3.06 (t, 2H, $J = 11.2$ Hz, H_{7a}), 2.94 (s, 2H, H₈), 2.04 (bd, 2H, $J = 12.0$ Hz, H_{6e}), 1.60 (t, 2H, $J = 12$ Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 205.9 (C₄, C), 168.4 (C, C₁₃), 166.7 & 162.9 (C₂, C & C₁, C), 152.6 (C₁₆, C), 138.4 (C₁₈, C), 134.8 (C₉, C), 131.5 (C₁₀, CH), 131.3 (C₁₂, C & C₁₄, C), 127.7 (C₁₁, CH), 104.4 (C₁₅, CH), 99.2 (C₃, CH), 59.9 (C₁₉, CH₃), 56.0 (C₁₇, CH₃), 49.2 (C₅, C), 43.1 (C₈, CH₂), 31.6 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D $t_R = 27.05$ minHRMS (ESI +) calculated for C₂₆H₂₇ClNO₈⁻ [M-H]⁻ 516.1431, found 516.1431LCMS (m/z): $t_R = 5.13$ min (Gradient A), (APCI +) 518.13 [M+H], (APCI -) 516.13 [M - H]*(Z)*-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((E)-3-(4-fluorophenyl)acryloyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid 145

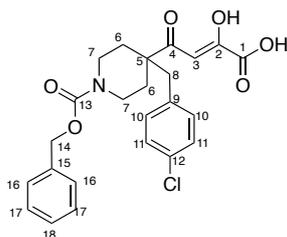
Compound was purified by reversed phase HPLC using gradient E.

(59 mg, 30%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) δ 14,15 (bs, 1H, OH), 7.78 (dd, 2H, $^3J_{17-18} = 8.7$ Hz, $^4J_{17-F} = 5.6$ Hz, H₁₇), 7.45 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H₁₅), 7.30 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H₁₁), 7.23 (t, 2H, $^3J_{17-18} \approx ^3J_{18-F} = 8.8$ Hz, H₁₈), 7.20 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H₁₄), 7.05 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H₁₀), 6.66 (s, 1H, H₃), 4.18 (d, 1H, $J = 13$ Hz, H_{7e}), 4.10 (d, 1H, $J = 14$ Hz, H_{7e}), 3.18 (t, 1H, $J = 12$ Hz, H_{7a}), 2.94 (s, 2H, H₈), 2.85 (t, 1H, $J = 12$ Hz, H_{7a}), 2.04 (bd, 2H, H_{6e} & H_{6'e}), 1.54 (t, 1H, H_{6'a}), 1.52 (t, 1H, H_{6'a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) δ 206.9 (C₄, C), 166.1 (C₁, C or C₂, C), 164.2 (C₁₃, C), 163.2 (C₁, C or C₂, C), 162.7 (C₁₉, C, d, $^1J_{19-F} = 245$ Hz), 140.2 (C₁₅, CH), 135.0 (C₉, C), 131.8 (C₁₆, C), 131.7 (C₁₀, CH), 131.4 (C₁₂, C), 130.2 (C₁₇, CH), 127.9 (C₁₁, CH), 118.2 (C₁₄, CH), 115.6 (C₁₈, CH, d, $^2J_{18-F} = 21$ Hz), 99.5 (C₃, CH), 49.6 (C₅, C), 43.2 (C₈, CH₂), 42.3 (C₇, CH₂), 39.1 (C₇, CH₂), 32.5 & 31.8 (C₆ & C_{6'}, CH₂).

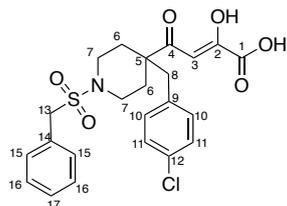
HPLC Gradient D $t_R = 30.71$ minHRMS (ESI +) calculated for C₂₅H₂₄NO₅FCI⁺ [M+H]⁺ 472.1322, found 472.1322LCMS (m/z): $t_R = 5.71$ min (Gradient A), (APCI +) 472.02 [M+H], (APCI -) 470.20 [M - H]

(Z)-4-(1-((benzyloxy)carbonyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **146**

(145 mg, 75%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 333 K) δ 7.38-7.31 (m, 5H, H₁₆, H₁₇ & H₁₈), 7.29 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₁₁), 7.03 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₁₀), 6.53 (s, 1H, H₃), 5.06 (s, 2H, H₁₄), 3.80 (dt, 2H, J = 13.9 & 4.3 Hz, H_{7e}), 2.97 (t, 2H, J = 11.7 Hz, H_{7a}), 2.91 (s, 2H, H₈), 2.00 (d, 2H, J = 13.4 Hz, H_{6e}), 1.54 (ddd, 2H, J = 13.9, 10.7 & 4.1 Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 333 K) δ 205.5 (C₄, C), 166.9 & 162.8 (C₂, C & C₁, C), 154.2 (C₁₃, C), 136.7 (C₁₅, C), 134.7 (C₉, C), 131.4 (C₁₀, CH), 131.2 (C₁₂, C), 128.1 (C₁₇, CH), 127.6 (C₁₁, CH), 127.4 (C₁₈, CH), 127.1 (C₁₆, CH), 99.1 (C₃, CH), 65.9 (C₁₄, CH₂), 48.7 (C₅, C), 43.0 (C₈, CH₂), 40.4 (C₇, CH₂), 31.3 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 30.98 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₄H₂₅ClNO₆⁺ [M+H]⁺ 458.1365, found 458.1363LCMS (m/z): t_R = 6.15 min (Gradient A), (APCI +) 458.12 [M+H], (APCI -) 457.91 [M - H]*(Z)*-4-(1-(benzylsulfonyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **147**

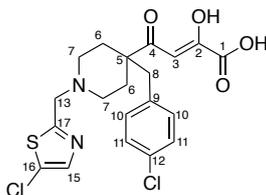
(300 mg, 80%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) δ 14,17 (bs, 1H, OH₁), 7.34-7.30 (m, 7H, H₁₅, H₁₆, H₁₇ & H₁₁), 7.03 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₁₀), 6.58 (s, 1H, H₃), 4.37 (s, 2H, H₁₃), 3.41 (dt, 2H, H_{7e}), 2.87 (s, 2H, H₈), 2.67 (td, 2H, H_{7a}), 2.04 (bd, 2H, H_{6e}), 1.52 (m, 2H, H_{6a}).

^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , 298 K) 206.5 (C₄, C), 166.2 & 163.2 (C₂, C & C₁, C), 134.8 (C₉, C), 131.7 (C₁₀, CH), 131.4 (C₁₂, C), 130.8 (C₁₅, CH), 129.5 (C₁₄, C), 128.2 & 127.9 (C₁₆, CH & C₁₁, CH), 128.1 (C₁₇, CH), 99.5 (C₃, CH), 54.3 (C₁₃, CH₂), 48.7 (C₅, C), 43.2 (C₈, CH₂), 42.7 (C₇, CH₂), 31.5 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 29.18 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₈N₂O₆SCl⁺ [M+NH₄]⁺ 495.1351, found 495.1351LCMS (m/z): t_R = 5.69 min (Gradient A), (APCI +) 478.09 [M+H], (APCI -) 476.06 [M - H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((5-chlorothiazol-2-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **148**



(24 mg, 33%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 343 K) δ 7.58 (s, 1H, H₁₅), 7.29 (d, 2H, H₁₁), 7.06 (d, 2H, H₁₀), 6.46 (bs, 1H, H₃), 3.95 (s, 2H, H₁₃), 2.94 (bs, 2H, H_{7e}), 2.88 (s, 2H, H₈), 2.38 (bs, 2H, H_{7a}), 2.10 (d, 2H, H_{6e}), 1.67 (td, 2H, $J \approx 12.0$ & 4.0 Hz, H_{6a}).

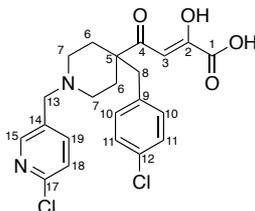
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , 343 K) δ 204.4 (C₄, C), 140.7 (C₁₅, CH), 134.6 (C₉, C), 131.3 (C₁₀, CH), 127.5 (C₁₁, CH), 136.3 (C₁₄, C), 98.8 (C₃, CH), 52.0 (C₁₃, CH₂), 47.7 (C₅, Cq), 48.9 (C₇, CH₂), 43.1 (C₈, CH₂), 30.5 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient B t_R = 20.37 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₀H₂₁N₂O₄SCl₂⁺ [M+H]⁺ 455.0594, found 455.0591

LCMS (m/z): t_R = 2.90 min (Gradient A), (APCI +) 454.89 [M+H], (APCI -) 452.89 [M - H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **149**



(60 mg, 56%)

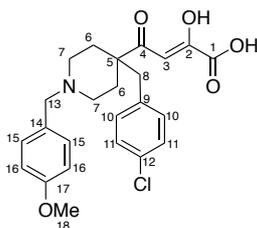
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 353 K) δ 8.50 (bs, 1H, H₁₅), 8.02 (bd, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₁₉), 7.55 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₁₈), 7.30 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H₁₁), 7.07 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H₁₀), 6.51 (s, 1H, H₃), 4.15 (bs, 2H, H₁₃), 3.19 (bd, 2H, H_{7e}), 2.92 (s, 2H, H₈), 2.77 (bs, 2H, H_{7a}), 2.21 (d, 2H, $J = 13.9$ Hz, H_{6e}), 1.85 (t, 2H, $J = 12.4$ Hz, H_{6a}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 353 K) δ 162.6 (C₂, C or C₁, C), 151.4 (C₁₅, CH), 150.6 (C₁₇, C), 141.6 (C₁₉, CH), 134.2 (C₉, C), 131.3 (C₁₀, CH), 127.6 (C₁₁, CH), 126.5 (C₁₄, C), 123.7 (C₁₈, CH), 98.7 (C₃, CH), 55.4 (C₁₃, CH₂), 47.1 (C₅, C), 48.5 (C₇, CH₂), 28.8 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 28.03 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₂H₂₃N₂O₄Cl₂⁺ [M+H]⁺ 449.1029, found 449.1028

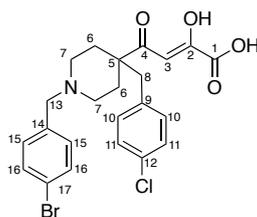
LCMS (m/z): t_R = 2.89 min (Gradient A), (APCI +) 448.83 [M+H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **150**

(100 mg, 62%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 338 K) δ 7.43 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H₁₅), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H₁₁), 7.08 (m, 2H, H₁₀), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H₁₆), 6.19 (bs, 1H, H₃), 4.11 (s, 2H, H₁₃), 3.78 (s, 3H, Me₁₈), 3.20 (bs, 2H, H_{7e}), 2.88 (bs, 2H, H₈), 2.82 (bs, 2H, H_{7a}), 2.17 (bs, 2H, H_{6e}), 1.81 (bt, 2H, H_{6a})

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 338 K) δ 166.2 & 161.6 (C₂, C & C₁, C), 159.7 (C₁₇, C), 134.5 (C₉, C), 132.5 (C₁₅, CH), 131.5 (C₁₀, CH), 131.3 (C₁₂, C), 127.6 (C₁₁, CH), 122.0 (C₁₄, C), 113.9 (C₁₆, CH), 98.7 (C₃, CH), 58.2 (C₁₃, CH₂), 55.0 (C₁₈, CH₃), 48.2 (C₇, CH₂), 28.6 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D *t*_R = 28.56 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₄H₂₇ClNO₅⁺ [M+H]⁺ 444.1573, found 444.1573LCMS (m/z): *t*_R = 3.93 min (Gradient A), (APCI +) 444.20 [M+H], (APCI -) 442.18 [M - H]*(Z)*-4-(1-(4-bromobenzyl)-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **151**

(200 mg, 98%)

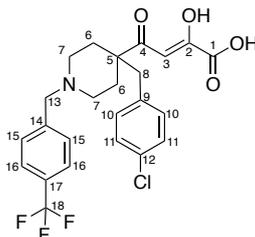
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 343 K) δ 7.62 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H₁₆), 7.53 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H₁₅), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H₁₁), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H₁₀), 6.52 (bs, 1H, H₃), 4.19 (s, 2H, H₁₃), 3.24 (bd, 2H, *J* = 12.4 Hz, H_{7e}), 2.93 (s, 2H, H₈), 2.85 (bs, 2H, H_{7a}), 2.23 (d, 2H, H_{6e}), 1.93 (bt, 2H, *J* = 12.4 Hz, H_{6a}).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 338 K) δ 203.3 (C₄, C), 167.7 & 162.5 (C₁ & C₂), 134.1 (C₉, C), 132.9 (C₁₅, CH), 131.3 & 131.2 (C₁₀ & C₁₆, CH), 129.2 (C₁₄, C), 127.6 (C₁₁, CH), 122.5 (C₁₇, C), 98.7 (C₃, CH), 57.7 (C₁₃, CH₂), 48.2 (C₇, CH₂), 47.1 (C₅, C), 28.2 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D *t*_R = 32.67 minHRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₄BrClNO₄⁺ [M+H]⁺ 492.0572, found 492.0574LCMS (m/z): *t*_R = 4.17 min (Gradient A), (APCI +) 494.10 [M+H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid

152



(170 mg, 62%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 7.79 (s, 4H, H₁₅ & H₁₆), 7.31 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H₁₁), 7.06 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H₁₀), 6.55 (bs, 1H, H₃), 4.29 (s, 2H, H₁₃), 3.23 (bd, 2H, H_{7e}), 2.91 (s, 2H, H₈), 2.85 (bs, 2H, H_{7a}), 2.22 (bd, 2H, H_{6e}), 1.87 (t, 2H, J = 12.3 Hz, H_{6a}).

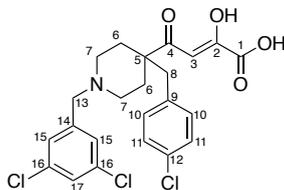
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 162.6 (C₂, C or C₁, C), 134.8 (C₁₄, C), 134.1 (C₉, C), 131.6 & 131.4 (C₁₀, CH & C₁₅, CH), 127.7 (C₁₁, CH), 125.1 (C₁₆, CH), 98.7 (C₃, CH), 57.8 (C₁₃, CH₂), 48.5 (C₇, CH₂), 47.1 (C₅, C), 43.4 (C₈, CH₂), 28.4 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 33.38 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₄H₂₄NO₄F₃Cl⁺ [M+H]⁺ 482.1340, found 482.1340

LCMS (m/z): t_R = 4.24 min (Gradient A), (APCI +) 482.13 [M+H], (APCI -) 480.05 [M - H]

(Z)-4-(4-(4-chlorobenzyl)-1-(3,5-dichlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid 153



(51 mg, 35%)

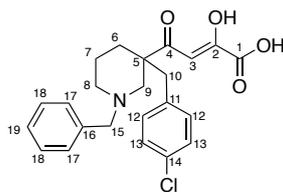
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 7.70 (bs, 1H, H₁₇), 7.62 (bs, 2H, H₁₅), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₁₁), 7.07 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₁₀), 6.63 (bs, 1H, H₃), 4.19 (s, 2H, H₁₃), 3.28 – 3.18 (m, 2H, H_{7e}), 2.90 (s, 2H, H₈), 2.80 (bs, 2H, H_{7a}), 2.21 (bd, 2H, H_{6e}), 1.80 (bd, 2H, H_{6a})

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6 , 323 K) δ 163.3 & 161.4 (C₂, C or C₁, C), 134.6 (C₁₄, C), 134.2 (C₉, C), 131.9 & 131.6 (C₁₀, CH & C₁₆, CH), 129.9 (C₁₇, CH), 128.9 (C₁₁, CH), 128.1 (C₁₅, CH), 99.4 (C₃, CH), 57.3 (C₁₃, CH₂), 48.9 (C₇, CH₂), 28.6 (C₆, CH₂).

HPLC Gradient D t_R = 35.39 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₃NO₄Cl₃⁺ [M+H]⁺ 482.0687, found 482.0685

LCMS (m/z): t_R = 3.88 min (Gradient A), (APCI +) 481.94 [M+H]

(Z)-4-(1-benzyl-3-(4-chlorobenzyl)piperidin-3-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid **62**

Compound **62** was purified by reversed phase HPLC.

(18.7 mg, 6%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 353 K) δ 7.35-7.25 (m, 5H, H₁₇, H₁₈ & H₁₉), 7.23 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H₁₃), 7.00 (bd, 2H, H₁₂), 6.21 (bs, 1H, H₃), 3.58 (s, 2H, H₁₅), 2.95 (bs, 1H, H₉), 2.85 (ABq, 2H, H₁₀), 2.62 (bs, 1H, H₈), 2.33 (d, 1H, J = 12.0 Hz, H₉), 2.26 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H₈), 1.92 (m, 1H, H₆), 1.63 (m, 1H, H₇), 1.50 (m, 1H, H₇), 1.39 (m, 1H, H₆).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , 353 K) δ 136.6 (C₁₆, C), 134.9 (C₁₁, C), 131.1 (C₁₂, C), 128.6 & 127.6 & 127.3 (C₁₃, C₁₇ & C₁₈, CH), 126.7 (C₁₉, CH), 61.8 (C₁₅, CH₂), 58.5 (C₉, CH₂), 52.6 (C₈, CH₂), 49.2 (C₅, C), 41.3 (C₁₀, CH₂), 30.2 (C₆, CH₂), 21.3 (C₇, CH₂).

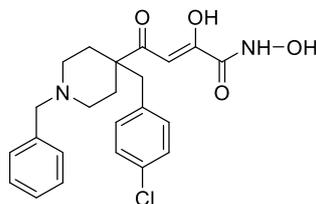
HPLC Gradient D t_R = 30.51 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₅ClNO₄⁺ [M+H]⁺ 414.1467, found 414.1466

LCMS (m/z): t_R = 3.87 min (Gradient A), (APCI +) 414.08 [M+H], (APCI -) 412.08 [M - H]

Procedure O: Hydroxamic acid - peptide coupling

Compound **35** (0.2 mmol) was dissolved in 4 mL of DMF. To this solution was added DCI (0.4 mmol, 2 eq.), NMM (2 mmol, 10 eq.), and hydroxylamine hydrochloride (2 mmol, 10 eq.). The mixture was stirred at room temperature and the reaction was monitored by TLC and LCMS. After reaction, HCl 1N was added and the crude was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by reversed-phase chromatography using gradient Gradient E.

(Z)-4-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-*N*,2-dihydroxy-4-oxobut-2-enamide **272**

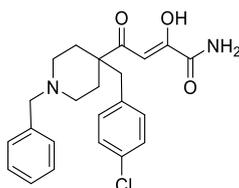
(2 mg, 2%)

HRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₆ClN₂O₄⁺ [M+H]⁺ 429.1576, found 429.1575

LCMS (m/z): t_R = 3.62 min (Gradient A), (APCI -) 427.20 [M - H]

Procedure P: diketo-carboxamide synthesis

Compound **35** (0.1 mmol) was dissolved in 1 mL of isopropanol in a microwave vial. Imidazole (0.48 mmol, 2 eq.) and Urea (0.2 mmol, 1 eq.) were added to the reaction mixture. The tube was sealed and put under microwave irradiation for 1h at 130°C. After reaction, water was added and the crude was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by reversed-phase chromatography using gradient Gradient E.

(Z)-4-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enamide **264**

The compound was purified by reversed phase chromatography using Gradient E.

(3 mg, 3%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 353 K) δ 9.10 (bs, 1H, OH or NH), 7.32-7.20 (m, 5H, H₁₅, H₁₆, H₁₇), 7.21 (d, 7H, J = 8.4 Hz, H₁₁), 7.01 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₁₀), 5.91 (s, 1H, H₃), 3.49 (s, 2H, H₁₃), 2.66 (t, 2H, H_{7e}), 2.75 (s, 2H, H₈), 2.66 (m, 2H, H_{7e}), 2.19 (d, 2H, H_{7a}), 2.00 (bd, 2H, H_{6e}), 1.49 (m, 2H, H_{6a}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 353 K) δ 200.5 (C₄, C), 163.9 (C₁, C), 137.1 (C₁₄, C), 136.1 (C₉, C), 131.2 (C₁₀, CH), 128.4 & 127.5 (C₁₅ & C₁₆, CH), 127.0 (C₁₁, CH), 126.4 (C₁₇, CH), 89.9 (C₃, CH), 61.6 (C₁₃, CH₂), 49.8 (C₇, CH), 48.0 (C₅, C), 44.2 (C₈, CH₂), 32.0 (C₆, CH₂).

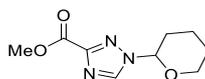
HPLC Gradient D t_R = 27.66 min

HRMS (ESI +) calculated for C₂₃H₂₆ClN₂O₃⁺ [M+H]⁺ 413.1626, found 413.1627

LCMS (m/z): t_R = 3.81 min (Gradient A), (APCI +) 413.22 [M+H], (APCI -) 411.22 [M-H]

Procedure Q: Protection of methyl 1H-1,2,4-triazole-5-carboxylate and ethyl 1H-tetrazole-5-carboxylate

To a stirred slurry of methyl 1H-1,2,4-triazole-5-carboxylate or ethyl 1H-tetrazole-5-carboxylate (1.6 mmol) was added *p*-Toluenesulfonic acid monohydrate (2%mol) and dry THF (1 mL) was added 3,4-dihydropyran (1.7 mmol, 0.16 mL) dropwise. The reaction was heated at 45°C for 1h. After completion, water was added and the crude was extracted with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by silica gel column chromatography using a gradient from 0 to 100% EtOAc in Cyclohexane.

Methyl 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxylate **250**

(330 mg, quantitative)

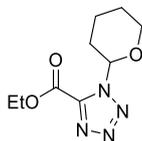
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H, H Triazole), 5.51 (dd, J = 9.1, 2.8 Hz, 1H, H DHP), 4.09 - 4.03 (m, 1H, H_{ax/eq}), 3.97 (s, 3H, CH₃), 3.74 - 3.66 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.23 - 2.16 (m, 1H, H_{ax/eq}), 2.06 - 1.94 (m, 2H, H_{ax/eq}), 1.74 - 1.59 (m, 3H, H_{ax/eq}).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 160.2 (C), 154.5 (C), 143.3 (CH), 87.1 (CH), 67.9 (CH_2), 52.9 (CH_3), 30.9 (CH_2), 24.7 (CH_2), 21.6 (CH_2).

HPLC Gradient B t_R = 6.95 min

LCMS (m/z): t_R = 3.27 min (Gradient A), (APCI +) 212.09 [M+H]

Ethyl 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-tetrazole-5-carboxylate **252**



(233 mg, 73%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.11 (dd, J = 7.3, 2.9 Hz, 1H, H DHP-N), 4.53 (q, J = Hz, 2H, CH_2), 4.02 - 3.95 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 3.78 - 3.83 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 2.52 - 2.41 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 2.22 - 2.08 (m, 2H, $H_{ax/eq}$), 1.84 - 1.70 (m, 3H, $H_{ax/eq}$), 1.45 (m, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 157.9 (C), 157.7 (C), 88.8 (CH), 66.9 (CH_2), 62.8 (CH_2), 29.0 (CH_2), 24.4 (CH_2), 20.5 (CH_2), 14.3 (CH_3).

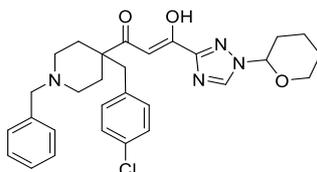
HPLC Gradient t_R = 12.73 min

LCMS (m/z): t_R = 4.64 min (Gradient A), (APCI -) 225.05 [M-H]

Procedure R: Claisen condensation

An oven-dried vial equipped with a stirring bar was charged with a mixture of lithium *tert*-butoxide (6.5 mmol) and compound **250** or **252** (6.0 mmol) in anhydrous THF (10 mL), and the mixture was then stirred at 0°C under argon atmosphere. Ten minutes later, a solution of compound **116** (5.0 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added dropwise to the mixture, and the resulting mixture was allowed to stir at room temperature for approximately 4h. After completion of the reaction as monitored by TLC, the mixture was quenched by acidification to pH 4-5 with a 1M HCl solution. The resulting mixture was extracted three times with EtOAc, followed by sat. NaCl. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was then purified by silica gel column chromatography eluting with a gradient of MeOH/DCM adapted to the R_f of the compound.

(Z)-1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-3-hydroxy-3-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl)prop-2-en-1-one **253**



(282 mg, 40%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.42 (bs, 1H, OH), 8.37 (s, 1H, CH), 7.66 - 7.59 (m, 2H, HAr), 7.44 - 7.39 (m, 3H, HAr), 7.15 (d, J = 8.2 Hz, 2H, HAr), 6.92 (d, J = 8.2 Hz, 2H, HAr), 6.59 (s, 1H, H_{enol}), 5.54 (bq, 1H, CH), 5.17 (s, 1H, H_{keto}), 4.16 - 4.08 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 4.04 (s, 2H, CH_2), 3.79 - 3.68 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 3.41 - 3.34 (m,

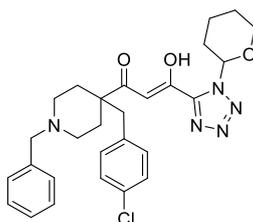
2H, $H_{ax/eq}$), 2.93 (s, 2H, CH_2), 2.69 - 2.57 (m, 2H, $H_{ax/eq}$), 2.55 - 2.44 (m, 2H, $H_{ax/eq}$), 2.31 - 2.19 (m, 3H, $H_{ax/eq}$), 2.10 - 1.99 (m, 2H, $H_{ax/eq}$), 1.78 - 1.66 (m, 3H, $H_{ax/eq}$).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 200.1 (C), 173.8 (C), 157.7 (C), 143.5 (CH), 133.4 (C), 133.2 (C), 131.4 (2 CH), 131.2 (2 CH), 130.3 (C), 129.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.1 (CH), 96.5 (CH), 87.1 (CH), 68.1 (CH_2), 61.3 (CH_2), 50.1 (2 CH_2), 46.4 (CH_2), 30.9 (2 CH_2), 30.1 (CH_2), 24.7 (CH_2), 21.7 (CH_2).

HPLC Gradient B t_R = 14.48 min

LCMS (m/z): t_R = 4.37 min (Gradient A), (APCI +) 521.19 [M+H]

(Z)-1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-3-hydroxy-3-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-tetrazol-5-yl)prop-2-en-1-one **254**



(92 mg, 30%)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.31 - 7.27 (m, 5H, HAr), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H, HAr), 6.63 (s, 1H, Henol), 6.10 (dd, J = 7.5, 3.1 Hz, 1H, H-DPH), 4.03 - 3.96 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 3.85 - 3.78 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 3.51 (s, 2H, CH_2), 2.86 (s, 2H, CH_2), 2.85 - 2.76 (m, 2H, $H_{ax/eq}$), 2.53 - 2.43 (m, 1H, $H_{ax/eq}$), 2.25 - 2.10 (m, 5H, $H_{ax/eq}$), 1.87 - 1.69 (m, 5H), 1.56 - 1.48 (m, 1H, $H_{ax/eq}$).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 202.4 (C), 171.3 (C), 161.3 (C), 134.6 (C), 132.8 (C), 131.4 (2 CH), 129.5 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.5 (CH), 98.2 (CH), 88.7 (C), 67.0 (CH_2), 63.0 (CH_2), 50.6 (2 CH_2), 48.0 (CH_2), 32.5 (2 CH_2), 29.1 (CH_2), 24.5 (CH_2), 20.6 (CH_2).

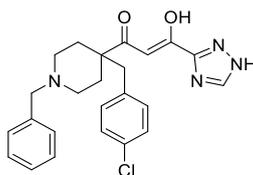
HPLC Gradient B t_R = 12.25 min

LCMS (m/z): t_R = 4.62 min (Gradient A), (APCI +) 522.23 [M+H]

Procedure R: Triazole/Tetrazole deprotection

Compound **253** or **255** (0.5 mmol) was dissolved in isopropanol (3.5 mL). HCl 6N (5 eq., 0.43 mL) was added and the mixture was warmed at 60°C for 2h. After completion, the crude was extracted with EtOAc, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was further purified by preparative reversed phase HPLC (Gradient E).

(Z)-1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-3-hydroxy-3-(1H-1,2,4-triazol-3-yl)prop-2-en-1-one **242**



The compound was purified by reversed phase chromatography using Gradient E.

(18 mg, 18%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 11.90 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, CH triazole), 7.59 (s, 2H, HAr), 7.38 (s, 3H, HAr), 7.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, HAr), 6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, HAr), 6.55 (s, 1H, Henol), 4.08 (s, 2H, CH_2), 3.47 (d, 2H, Piperidine), 2.89 (s, 2H, CH_2), 2.70 (m, 2H, Piperidine), 2.51 (bt, 2H, Piperidine), 2.25 (d, 2H, Piperidine).

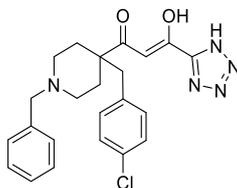
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 199.12 (C), 175.06 (C), 156.79 (C), 146.30 (CH), 133.90 (C), 133.07 (C), 131.33 (2 CH), 130.61 (2 CH), 129.31 (CH), 129.06 (2 CH), 128.47 (2 CH), 96.72 (CH), 61.93 (CH_2), 50.30 (2 CH_2), 46.99 (C), 45.95 (CH_2) 31.02 (2 CH_2).

HPLC Gradient D $t_R = 33.90$ min

HRMS (ESI +) calculated for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 437.1739, found 437.1740

LCMS (m/z): $t_R = 3.57$ min (Gradient A), (APCI +) 437.24 $[\text{M}+\text{H}]$, (APCI -) 435.22 $[\text{M} - \text{H}]$

(Z)-1-(1-benzyl-4-(4-chlorobenzyl)piperidin-4-yl)-3-hydroxy-3-(1H-tetrazol-5-yl)prop-2-en-1-one 255



The compound was purified by reversed phase chromatography using Gradient E.

(6 mg, 8%)

^1H (500 MHz, DMSO-d_6 , 363 K) δ 7.46-7.42 (m, 5H, H_{15} ; H_{16} & H_{17}), 7.29 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{11}), 7.14 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{10}), 6.64 (s, 1H, H_3), 4.21 (s, 2H, H_{13}), 3.28 (bd, 2H, H_{7e}), 2.93 (s, 2H, H_8), 2.24 (d, 2H, $J = 14.7$ Hz, H_{6e}), 1.79 (t, 2H, $J = 12.1$ Hz, H_{6e}).

^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6 , 363 K) δ 195.2 (C_4 , C), 176.9 (C_2 , C), 157.7 (C_1 , C), 134.4 (C_9 , C), 131.3 (C_{10} , CH), 130.1 (C_{15} , CH), 128.5 (C_{17} , CH), 118.1 (C_{16} , CH), 127.3 (C_{11} , CH), 96.0 (C_3 , CH), 59.2 (C_{13} , CH_2), 48.7 (C_7 , CH_2), 44.9 (C_5 , C), 43.3 (C_8 , CH_2), 29.0 (C_6 , CH_2).

HPLC Gradient B $t_R = 12.62$ min

HRMS (ESI +) calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 438.1691, found 438.1690

LCMS (m/z): $t_R = 4.06$ min (Gradient A), (APCI +) 438.15 $[\text{M}+\text{H}]$, (APCI -) 436.11 $[\text{M} - \text{H}]$

Protein expression and purification of endonuclease domain of LCMV

Wild-type endonuclease domain was cloned into pDEST14 with a N-terminal hexahistidine tag and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS cells at 17°C in TB medium overnight after induction with 500 mM IPTG. Cell pellets from harvested cultures were resuspended in 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol. Lysozyme (0.25 mg/mL), DNase (10 µg/mL) and EDTA-free protease-inhibitor cocktail (Roche) were added before sonication. Immobilized metal-ion chromatography of the clarified lysates was performed on a 5 mL HisPrep column (AKTExpress FPLC system, GE Healthcare) eluted His-tagged fraction was diluted and purified on a HiTrap Q Sepharose 1 mL column (GE Healthcare). Proteins were eluted using a linear gradient from 50 mM to 1 M NaCl in 10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM DTT. Size-exclusion chromatography was performed on a preparative Superdex 200 column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 10 mM HEPES pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM DTT. Protein was concentrated to 25 mg/mL.

Protein expression and purification of protein L

L protein from LCMV strain Armstrong was expressed in Hi5 insect cells using the Bac-to-Bac expression system with a pFastBac vector. Cells were collected after by centrifugation 3 days postinfection, resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, glycerol 5%, TCEP 2 mM, PMSF 1mM and imidazole pH 7.5 10 mM) incubated for 30 minutes at 4°C with agitation and lysed by sonication. Cell lysate was clarified by centrifugation for 30 minutes at 20,000 g and purified by IMAC in a HisTrap FF crude column (GE Healthcare) to purify the hexahistidine (His₆)-tagged target proteins. The column was eluted with a gradient of imidazole (10–300 mM) and the purified eluates were pooled and diluted in lysis buffer without NaCl to reduce the salt concentration to 100 mM. Subsequently, the sample was applied into a Hitrap Heparin HP column (GE Healthcare), and eluted with a NaCl gradient from 100 mM to 1,5 M. The elutions with the purified L protein were pooled and finally applied into a size exclusion column (Superose 6, GE Helathcare). Protein fractions were collected and protein purity was determined on SDS-PAGE, fractions of highest purity were combined and concentrated to 6 mg/mL.

Protein expression and purification of exonuclease domain of MOPV

cDNA corresponding to the exonuclease domain of NP (residues 365-570; UniProt P19239) was cloned by recombination (Gateway, Invitrogen) into pETG-20A expression vector, which adds a cleavable N-terminal thioredoxin-hexahistidine tag. The protein was overexpressed in *Escherichia coli* strain C2566 (NEB) grown in LB medium (AthenaES) overnight at 17°C in the presence of 100 µM ZnCl₂. The bacteria were pelleted, frozen, and stored at -80°C. The exonuclease was purified by metal-affinity chromatography using a 2 mL HisPur cobalt column (Thermo Scientific) equilibrated with 20 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole. The tag was removed by cleavage with TEV protease followed

by purification on a second cobalt affinity chromatography column. Protein was treated with 2 mM EDTA in order to chelate any metal ions that might have been picked up during expression. Protein was further purified by gel filtration using a Superdex 75 column (GE Healthcare) in 20 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% glycerol.

Thermal Shift Assay (TSA)

Melting temperature (T_m) values of proteins were determined by a thermofluorescence-based assay.

Endonuclease

In 96-well thin-walled PCR plates, endonuclease (final concentration 10 μ M) was added to ligand (final concentration of 500 μ M or 100 μ M) for a total volume of 21.5 μ L in HEPES 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, 5% DMSO. Finally, 3.5 μ L of the fluorescent dye SYPRO Orange was added (715-fold diluted in H₂O); Molecular Probes). The thermal denaturation of protein was followed by measuring the fluorescence emission at 575 nm (with excitation at 490 nm) using a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The denaturation midpoints of proteins were calculated with the Boltzmann equation using GraphPad Prism. All measurements were performed in triplicate.

Exonuclease

In 96-well thin-walled PCR plates, exonuclease (final concentration 70 μ M) was added to ligand (final concentration of 500 μ M) for a total volume of 21.5 μ L in HEPES 20 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, MnCl₂ 5 mM, Glycerol 5%, 5% DMSO. Finally, 3.5 μ L of the fluorescent dye SYPRO Orange was added (715-fold diluted in H₂O); Molecular Probes). The thermal denaturation of protein was followed by measuring the fluorescence emission at 575 nm (with excitation at 490 nm) using a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The denaturation midpoints of proteins were calculated with the Boltzmann equation using GraphPad Prism. All measurements were performed in triplicate.

Microscale thermophoresis (MST)

Protein was labelled with the red-fluorescent dye NT-647 using the Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies). Concentration of labeled protein was kept constant at 100 nM, while the concentration of the compound was varied. Diluted protein was centrifuged for 5 min at 13 000 rpm to remove potential aggregates. The supernatant was mixed to a 15-step twofold dilution series beginning at 500, 250, or 125 μ M finally to yield 16 different concentrations of ligands. Experiments were carried out in HEPES pH 8 100 mM, NaCl 100 mM, DTT, 1 mM, Tween 20 0.05%, MgCl₂ 0.25 mM, MnCl₂ 0.25 mM, 5% DMSO.

The different wells were loaded into standard treated MST-grade glass capillaries (NanoTemper Technologies). After 5 min of incubation the MST was measured with 80% LED power and 80% infra-red laser power. K_d values were determined using the NanoTemper analysis software. All experiments were performed in triplicates.

***In vitro* endonuclease activity**

Endonuclease activity was measured in a reaction mixture (10 μ L) containing Tris HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 500mM, TCEP 2 mM, glycerol 5% and 2 mM of either $MgCl_2$ or $MnCl_2$. As a negative control the reaction was performed in absence of metal ions and in presence of EDTA 10 mM. The RNA substrate consist of a 13-mer with the following sequence: GAUGAAGAUUAAG, it was used at 7.5 μ M and the L protein at 15 μ M (molar ratio Enzyme:RNA, 2:1). The ligands were used at the indicated concentration (100, 50 and 10 μ M) and 5% DMSO was added to the reaction buffer. The samples were incubated at 30 °C for 2 h. After the reaction, the samples were analyzed by electrophoresis in 20% polyacrylamide gel in the presence of 7 M urea and the RNAs were visualized by methylene blue staining.

***In vitro* exonuclease activity**

Reactions were carried out in a buffer consisting of 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM $MnCl_2$, 5 mM DTT. Standard reactions contained 0.25 μ M protein and 1.25 μ M radiolabelledH4 dsRNA substrate. After incubation at 37°C, reactions were quenched after intervals of between 0 and 60 min by the addition of an equal volume of loading buffer (formamide containing 10 mM EDTA). Products were heated at 70°C for 5 min and rapidly cooled on ice for 3 min, followed by separation in a 20% polyacrylamide gel containing 8M urea and buffered with 0.5x Tris-borate-EDTA. The gels were exposed to a phosphor screen overnight and then visualized using a phosphoimager. (FLA-3000, Fuji).

Cell viability assay

BHK-21 cells were seeded at 1.5×10^4 per well (in a 96 well plate) the day before exposing them to the inhibitors. The next day the inhibitors were added to the culture media at the indicated concentration and cell viability was assayed at 24, 48 and 72 hours using the PrestoBlue cell viability reagent according to manufacturer instructions. Briefly, cells and media in a total volume of 90 μ L are mixed with 10 μ L of PrestoBlue reagent and incubated for 1 hour at 37°C. Then the Fluorescence was measured using an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm. The results were normalized using the fluorescence values of cells in presence of DMSO 0.5% as 100% viable cells. Each condition was tested in triplicate.

LCMV mini-genome assay

Baby hamster kidney (BHK-21) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1% GlutaMAX (Thermo Fisher) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher). All cell lines were grown at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. For the minigenome assay, BHK-21 cells were co-transfected using 2.5 µL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per µg of plasmids in 96 well plates with plasmids expressing LCMV NP (100ng/well) and L (125 ng/well) proteins and the minigenome (100 ng/well). The plasmid expressing the minigenome was kindly provided by JC de la Torre and expressed a LCMV S segment where the viral genes GPC and NP were replaced by *Gaussia* Luciferase and eGFP genes, respectively. Five hours post-transfection, cell supernatants were removed and replaced by fresh medium containing the tested molecules at indicated concentrations. All tested molecules, including Ribavirin **1** (Sigma), were diluted in DMEM 1% GlutaMAX supplemented with 2% FBS and 1% DMSO (Thermoscientific). Reporter gene expression was monitored 2 days post-transfection either using an inverted fluorescence microscope or with the *Gaussia* luciferase assay kit (New England Biolabs). BHK-21 cells viability for each molecule concentration was assayed using PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen).

Stability studies

Media and preparation of cell extracts. BHK-21 cells extract were prepared as follow. Briefly, exponentially growing BHK-21 were recovered by trypsinization followed with centrifugation (500 g), washed with PBS, and resuspended in ice-cold 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM KCl, at the concentration of 30 x 10⁶ cells/mL. Cells were lyzed on ice by ultrasonic treatment (3 x 30 second pulses) and cellular debris were removed by centrifugation (10 000 g, 20 min, 4°C). The supernatant containing soluble proteins (8.5 mg/mL) was aliquoted and stored at -80°C.

HPLC analysis. Stability of compound **35**, **143** and **149** was measured at 37°C (a) in non-enzymatic medium (DMEM), (b) in culture medium (DMEM containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum), and (c) in total cell extract (BHK-21 cells) to mimic antiviral assay conditions. For each conditions, the compound solution was diluted with a freshly thawed aliquot of the considered medium to obtain a final concentration of 100 µM and the mixture was incubated at 37°C. At the desired time (0, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h and 72h), an aliquot (200 µL) was removed and immediately frozen at -80°C for further HPLC analysis.

Compound **35** and **149** were directly injected by HPLC using the on-line filtration system for medium removal. Compounds were eluted using Ammonium Bicarbonate 10 mM pH 8.5 in water (eluent A) and Ammonium Bicarbonate 10 mM pH 8.5 in water/acetonitrile 80:20 (eluent B), with a flow rate of 1

mL/min and detection at 260 nm. Compounds were eluted after 5 min at 100% eluent A with an increase to 100% eluent B in 35 min and kept constant for 5 min.

All compounds could be accurately UV-detected (260 nm) and quantified. The nature of metabolites was confirmed by injection of authentic samples and reference compounds. Having assigned the various HPLC signals, half-lives were deduced from experimental data following the disappearance of the peak area of the starting compound.

Assays on clinical isolates

Virus yield reduction assay.

The amount of each virus and the duration of the assay have been calibrated by trial so that the replication is still in log phase of growth at the time of readout and the Ct standard deviations of qRT-PCR quantification (quaduplicate) is below 0.5. Approximate multiplicity of infection (MOI) range from 0,001 to 0,1 depending on the strain.

One day prior to infection 5×10^4 Vero E6 cells were seeded in 100 μ L of medium (with 2.5 % FCS) in each wells of a 96-well titer plates. The next day, 8 two-fold serial dilutions of the compounds (beginning at 20 μ M final concentration, down to 0.16 μ M), in triplicates or quadruplicates, were added to the cells (25 μ L/well, in 2.5 % FCS containing medium). Four Virus Control (VC) wells (per virus) were supplemented with 25 μ L medium containing 0.1 % DMSO and four cells control wells were supplemented with 50 μ L of medium. Fifteen minutes later, 25 μ L of a virus mix containing the appropriate amount of viral stock diluted in medium (2.5 % FCS) was added to the 96-well plates.

Cells were cultivated for 2 to 4 days after which 100 μ L of the supernatant were collected for viral RNA purification. The infected supernatants were transferred to 96 wells S-Bloc from QIAgen preloaded with VXL mix and extract by the Cador Pathogen 96 QIAcube HT kit run on QIAcube HT automat according to Qiagen protocol. Purified RNAs were eluted in 80 μ L of water.

Viral RNAs were then quantified by real time one step RT-PCR to determine viral RNA yield (SuperScript III Platinum one-step RT-PCR from Invitrogen, or GoTaq Probe 1-step RT-PCR system from Promega), using 7.5 μ L of RNA and 12,5 μ L of RT-PCR mix using standard cycling parameters. The four control wells were replaced by four 2 log dilutions of an appropriate T7-generated RNA standards of known quantities for each viral genome (100 copies to 100 millions copies).

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) and IC₉₀ (90% inhibitory concentration determination).

Mean inhibition of virus yield is equal to $100 \times (\text{mean quantities of viral RNA in VC quadruplicates} - \text{mean quantities of viral RNA in drug treated triplicates}) / \text{mean quantities of viral RNA in VC}$. The inhibition

values (expressed as percent inhibition, in linear scale) obtained for each drug concentration (expressed in μM , in log scale) are plotted using Kaleidagraph plotting software (Synergy Software) and the best sigmoidal curve, fitting the mean values, is determined by a macro in the software: (Inhibition, Y is given by $Y = 100/1+(m0/m1)^{m2}$). This macro allows to determine the best curve fit and the m1 and m2 parameters, where m1 corresponds to IC_{50} . The reverse equation $x = M1 \cdot ((100/y)-1)^{1/m2}$ allows to calculate x: IC_{90} concentration for $Y = 0.9$.

Cytotoxicity assay

One day prior to the assay 5×10^4 Vero E6 cells (or 10^5 HEK 293 cells) were seeded in 100 μL of medium (with 2.5 % FCS) in each wells of a 96-well titer plates. The next day, two-fold serial dilutions of the compounds (beginning at 200 μM final concentration, down to 6.2 μM), in triplicates, were added to the cells (25 μL /well, in 2.5 % FCS containing medium). Six cell control (CC) wells were supplemented with 25 μL medium containing two-fold serial dilution of an equivalent amount of DMSO. Eight wells were not seeded by cells and served as background control of fluorescence for the plates.

Cells were cultivated for 3 (HEK 293) or 4 (Vero E6) days after which the supernatant was removed and replaced with 70 μL of medium containing CellTiter-Blue reagent (Promega) and further incubated for 90 min at 37 ° C. Fluorescence of the plates were then read on a TECAN Infinite M 200 Pro reader. The cell viabilities, in percent, were calculated as $100 \times (\text{mean value of X} - \text{Background without cells}) / (\text{CC} - \text{background})$.

Annexes

Participation à des congrès

Journée de la chimiothèque nationale

Date : 27/05/2017

Lieu : Marseille

Participation : flash présentation (3 min) + poster

Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT)

Date : du 05/07/2017 au 07/07/2017

Lieu : Toulouse

Participation : poster

Journées des Jeunes Chercheurs en Chimie thérapeutique (JJCT)

Date : du 08/02/2017 au 10/02/2017

Lieu : Châtenay-Malabry

Participation : flash présentation (3min) + poster (prix du meilleur poster)

Rencontres en Chimie Organique Biologique (RECOB)

Date : du 18/03/2018 au 22/03/2018

Lieu : Aussois

Participation : communication orale (20 min)

Journées Francophones de Virologie (JFV)

Date : du 30/03/2017 au 31/03/2017

Lieu : Paris

Participation : communication orale (10 min)

Journées scientifiques de l'ED250

Date : du 05/06/2018 au 06/06/2018

Lieu : Marseille

Participation : communication orale (10 min)

Journées scientifiques de l'ED250

Date : du 26/04/2017 au 27/04/2017

Lieu : Marseille

Participation : flash présentation (3 min) + poster

Formations doctorales suivies

- Formation à la gestion de projet par l'association OTECI
- Culture et médiation scientifique – Participation au concours « Ma thèse en 180 secondes » : <https://youtu.be/VFiM9bOlxtI>
- Connaissance du milieu professionnel – secteurs de la chimie et de la santé

Autres

- 3 séminaires annuels au laboratoire AFMB (30 min)
- 1 séminaire dans le cadre d'un workshop d'entreprise organisé par la société Nanotemper
- Encadrement de stagiaires (M2, L3)
- Représentante des doctorants au conseil du laboratoire
- Secrétaire de l'association des doctorants en chimie de Marseille (MODOCC)
 - > Création et gestion d'une page LinkedIn visant à partager les actualités sur le doctorat, les travaux de doctorants, et des offres d'emploi.
 - > Organisation d'un forum des anciens sous forme de conférence/tables rondes : *prise de contact avec les intervenants, demandes de financement, logistique, création de plaquettes et roll-up de l'association, modération des sessions...*

Publications

Title: Design, synthesis, and evaluation of 2,4-diketo acids targeting Arenavirus LCMV endonuclease

Journal : Journal of medicinal chemistry, *being draft*

Authors : Clémence Mondielli, Sergio Hernandez, Thi-Hong Van Nguyen, Rafik Kaci, Claudia Sepulveda, Cybel Garcia, François Ferron, Jean-Jacques Vasseur, Bruno Canard, Carine Baraguey, and Karine Alvarez.

Abstract : The *Arenaviridae* family comprises viruses transmitted by rodents responsible for several diseases such as hemorrhagic fevers among which Lassa fever infects 300,000 people each year. The current lack of effective vaccines and/or antivirals makes the development of therapeutic solutions of high priority. The genome of Arenaviruses encodes for an endonuclease domain bearing crucial function for virus survival. The L protein bears this domain, essential for viral replication through the cap-snatching mechanism. The endonuclease cleaves its ssRNA substrate *via* a metal-dependant (Mg^{2+}) strategy. This work intends to consider this enzyme as a novel Arenavirus therapeutic target and take over a preliminary screening of a 1st generation of ligands on an Arenavirus endonuclease. Diketo-acids (DKAs) have been discovered as potential inhibitors of its activity. To this end, a library of 2nd generation of 22 compounds was synthesized thanks to the development of an optimized synthesis pathway. Compounds were further evaluated by biophysical methods for their ability to bind the therapeutic target, as potential inhibitors in an *in vitro* assay and *in cellula* in a mini-genome assay. Some of them are active *in vitro* and *in cellula*

Title: Metal chelators for the inhibition of the lymphocytic choriomeningitis virus endonuclease domain

Journal : Antiviral research, *in review*

Authors : Magali Saez-Ayala, Elsie Laban Yekwa, Clémence Mondielli, Loïc Roux, Sergio Hernandez, Fabrice Bailly, Philippe Cotelle, Dominga Rogolino, Bruno Canard, François Ferron, and Karine Alvarez.

Abstract : Arenaviridae is a viral family whose members are associated with rodent-transmitted infections to humans responsible of severe diseases. The current lack of a vaccine and limited therapeutic options make the development of efficacious drugs of high priority. Since the cap-snatching mechanism of transcription of Arenavirus performed by the endonuclease domain of the L-protein is unique and essential, we developed a drug design program targeting the endonuclease activity of the prototypic Lymphocytic ChorioMeningitis Virus. Since the endonuclease activity is metal ion dependent, we designed a library of compounds bearing chelating motifs (Diketo Acids, polyphenols, and N-hydroxyisoquinoline-1,3-diones) able to block the catalytic center through the chelation of the critical metal ions, resulting in a functional impairment. We pre-screened 59 compounds by Differential Scanning Fluorimetry. Then, we characterized the binding affinity by Microscale Thermophoresis and evaluated potent compounds in *in vitro* and *in cellula* assays. We found several potent binders and inhibitors of endonuclease activity. This study validates the proof of concept that the endonuclease domain of Arenavirus can be used as a target for anti-arena-viral drug discovery and that both diketo-acids and N-hydroxyisoquinoline-1,3-diones can be considered as potential metal-chelating pharmacophores to be improved.

Title : Contribution to PNA–RNA Chimera Synthesis: One - Pot Microwave - Assisted Ugi Reaction to Obtain Dimeric Building Blocks

Journal : *European Journal of Organic Chemistry*, **2017**, **2017**, 469–475.

Authors : Reuben Ovadia, Clémence Mondielli, Jean-Jacques Vasseur, Carine Baraguey, Karine Alvarez

Abstract : We report a solution-phase synthesis of dimeric PNA–RNA (PNA = peptide nucleic acid) building blocks by using a microwave-assisted Ugi four-component reaction. A mixture of a functionalized amine, a carboxymethyl nucleobase, paraformaldehyde, and N⁴,2'-O,3'-O-tribenzoyl-5'-deoxy-5'-isocyanocytidine generates the dimeric chimeras in one step. The method is simple, and gives rapid access (5 min) to diversity, as exemplified by the products described here.

Title : Dimers of Peptide Nucleic Acid to inhibit viral HCV NS5B polymerase activity

Journal : *European Journal of Medicinal Chemistry*, *Submitted*

Authors : Reuben Ovadia, Barbara Seliskoa, Clémence Mondielli, Vincent Delauzun, Michel Ventura, Stéphane Priet, Gilles Querat, Pieter Leyssen, Jean-Jacques Vasseur, François Morvan, Bruno Canard, Carine Baraguey, and Karine Alvarez.

Abstract : Some phosphoramidate dinucleosides have been previously reported as hepatitis C virus (HCV) polymerase inhibitors. We applied this concept of “dimeric inhibitors” to Peptide Nucleic Acid series, in order to improve pharmacokinetics of such derivatives. We tested first their enzymatic stability in several physiological media. Their inhibitory effect was evaluated in HCV infected cells culture (LMTV strain – genotype 2a). Some derivatives display weak activity. Target compounds were then evaluated for *in vitro* activity against a broad panel of RNA viruses, but without success. Finally, to understand their mode of action, we tested our “dimeric inhibitors” *in vitro* using optimized *de novo* AC and GC initiation assays with JFH1 NS5B polymerase (genotype 2a).



ANTIVIRALS FIGHTING ARENAVIRUSES: A RATIONAL DRUG-DESIGN APPROACH



Clémence Mondelli^[a], Magali Saez-Ayala^[b], Elsie Yekwa^[a], Sébastien Emonet^[c], François Ferron^[a], and Karine Alvarez^[a]

Société Chimique de France

[a] Université Aix-Marseille, AFMB – UMR7257 CNRS – Case 932, 163 avenue de Luminy, Marseille CEDEX 09, 13288, FRANCE
[b] Université Aix-Marseille / Institut Paoli Calmettes, INSERM U 1068 / CNRS UMR 7258, 27 Boulevard Lei Roure - BP30059, Marseille CEDEX 09, 13273, France
[c] Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Ministère de la défense, D19, 91220 Brétigny-sur-Orge, France



ABSTRACT

Arenaviruses are human pathogens transmitted by rodents of significant clinical relevance mostly present in South Africa and South America. Lassa, Junin, Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) and Machupo viruses can cause central nervous system disease, congenital malformation, choriomeningitis, systemic and highly fatal infection in immuno-compromised patients. There is no vaccine and no antiviral treatment apart from the Ribavirin: a large spectrum nucleoside analog. Therapeutic solutions have to be developed in order to avoid a serious issue of public health. The purpose of this project was to develop a program of antiviral inhibitors by rational drug-design using multidisciplinary techniques. The LCMV endonuclease as the RNA dependent RNA polymerase essential to virus replication¹ represents a potential target to inhibit. The first aim was to fully characterize the structure and mechanism of action of the target². In a second part, preliminary screenings were performed. Afterwards, a hit-to-lead optimization program is being implemented.

ARENAVIRUSES

Viruses transmitted by rodents causing severe human diseases

Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)

Argentinean Hemorrhagic fever

Bolivian Hemorrhagic fever

Lassa Fever:

- Around 300 000 people infected per year
- 6000 deaths
- 80% mortality rate for pregnant women



GENOME ORGANIZATION

Bisegmented negative strand RNA genome



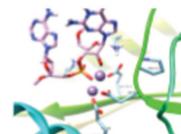
Endonuclease involved in cap-snatching mechanism → potential therapeutic target

THERAPEUTIC TARGET

METAL BINDING AS A STRATEGY IN DRUG DESIGN

Metal activated enzymes

- Role in many replications of viruses (HCV, HIV...)
- Interruption of enzyme function via active-site metal coordination for viral inhibition



LCMV ENDONUCLEASE

Metal-dependent activity
Two Mg²⁺ ions in the active site

TARGETED MOLECULES

- Metal chelating inhibitors

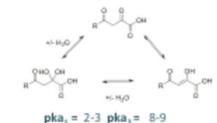


RATIONAL DRUG-DESIGN

DIKETO ACIDS

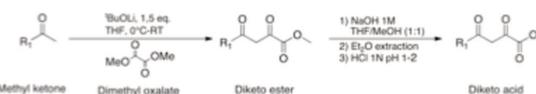
Two protonation states
Metal chelators → medicinal chemistry

Involved in the development of Raltegravir⁴ (Isentress)
→ Inhibition of HIV-integrase



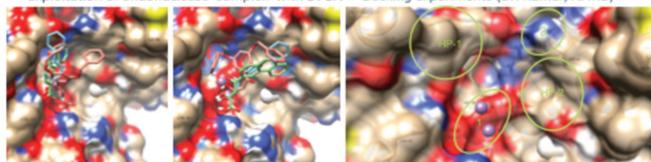
pKa₁ = 2-3 pKa₂ = 8-9

SYNTHESIS PATHWAY OPTIMIZATION



HIT-TO-LEAD OPTIMIZATION

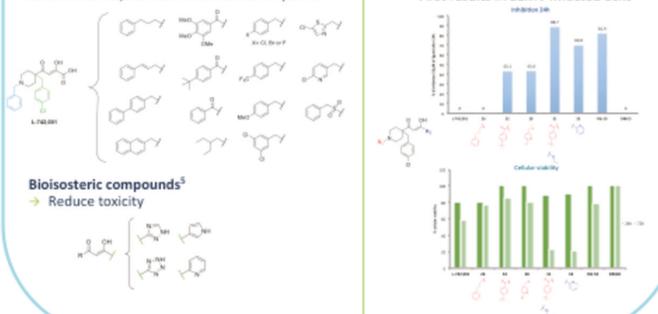
Exploitation of endonuclease complex with DPBA → Docking experiments (Dr. Kumar, AFMB)



Improve interactions with active-site residues → Enhance specificity, branched ligands
2nd GENERATION OF LIGANDS

Based on L-742,001 scaffold: two anchor points

First results in LCMV infected cells



Bioisosteric compounds⁵
→ Reduce toxicity

PRELIMINARY RESULTS

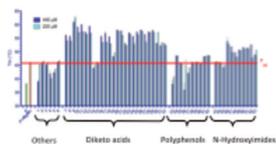
DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY

Thermal denaturation temperature Tm

Protein (de)stabilization by ligand fixation

Screening of 3 families of metal chelating molecules:

- Diketo acids
- N-Hydroxyimides
- Polyphenols

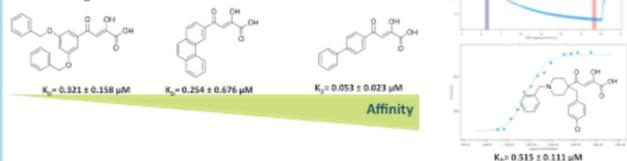


MICROSCALE THERMOPHORESIS

Binding affinity measurement: K_d determination

Change in fluorescence upon application of a temperature gradient

→ Screening of 24 DKAs



BIOCHEMICAL, STRUCTURAL, AND CELLULAR CHARACTERIZATION

Determination of inhibition capacity of selected ligands

Radiolabelled assay *in vitro* studying the cleavage of ³²P - RNA (19-mer) by the endonuclease

→ 11 compounds tested

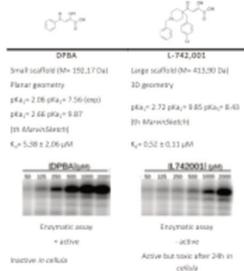
3D structural determination of enzyme complexes

- Complex with two Mg²⁺ ions
- Complex with 2,4-dioxo-4-phenylbutanoic acid (DPBA) and two Mg²⁺ ions
- Complex with L-742,001 and two Mn²⁺ ions known as inhibitor of influenza endonuclease³

Evaluation of efficacy on LCMV infected cell cultures

Toxicity evaluation, reduction of virus proliferation

→ 18 compounds tested



REFERENCES

- [1] Morin et al., *PLoS Pathog* 6, 2010, e1001038
- [2] Saez-Ayala et al., *In preparation for Antiviral Research*
- [3] Tomassini et al., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1994, 38, 2827-2837
- [4] Summa et al., *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 5843-5855
- [5] Sato et al., *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 1506-1508

CONCLUSION

The affinity of 50 ligands for the therapeutic target LCMV endonuclease was measured. 25 compounds displayed potent affinity. In particular, DKAs displayed submicromolar affinity, exhibited inhibition of endonuclease activity and showed a moderate activity *in cellula*. In parallel, X-Ray crystallographic studies afforded essential information for hit-to-lead optimization: the structural determination of two protein-ligand complexes with two manganese or magnesium ions, which confirmed the binding mode of ligands. These structural data represent the starting point of a rational drug-design program of antivirals against Arenaviruses.

WE WOULD LIKE TO THANK THE FRENCH CHEMICAL SOCIETY (SCF - SECTION MIDI-PYRÉNÉES) FOR THEIR FINANCIAL AID IN THIS PARTICIPATION OF RICT2017

DEVELOPPEMENT DE MOLECULES ANTIVIRALES CONTRE LES ARENAVIRUS

Clémence Mondielli

Résumé : La famille des *Arenaviridae* contient des virus transmis par les rongeurs responsables de maladies humaines notamment de graves fièvres hémorragiques dont la fièvre de Lassa qui infecte chaque année 300 000 personnes. L'absence actuelle de solutions thérapeutiques efficaces (vaccins et/ou antiviraux) en fait une priorité d'étude. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et des antiviraux spécifiques associés. Le génome des Arénavirus code pour deux nucléases possédant des fonctions cruciales pour la survie du virus. La protéine L possède un domaine endonucléase indispensable à la réplication virale réalisant le mécanisme de vol de coiffe. La protéine NP comporte un domaine exonucléase impliqué dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte infecté. Ces deux enzymes possèdent un mécanisme d'action commun de clivage de leur ARN substrat *via* des ions métalliques Mg^{2+} . Ce projet :

1) se propose d'apporter la preuve de concept que ces deux enzymes sont de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre les Arénavirus.

2) se base sur le criblage préalable d'une chimiothèque de 1^{ère} génération sur l'endonucléase d'un Arénavirus et la découverte d'une famille de dicéto-acides (DCAs) inhibitrice de son activité.

Au cours de ce travail de thèse, une chimiothèque de 2^{nde} génération de 22 composés a été synthétisée. Des voies de synthèses nouvelles et originales ont été développées. Les composés ont été évalués par des méthodes biophysiques pour leur capacité à se lier aux enzymes cibles, ont été évalués comme potentiels inhibiteurs dans des tests d'activité *in vitro*, et *in cellula* dans un test en mini-génome. Certains composés se sont montrés de bons ligands, actifs *in vitro* et *in cellula*.

Mots-clés : Arénavirus, Nucléases virales, Chélation de métaux, Dicéto-acides

Abstract : the *Arenaviridae* family comprises viruses transmitted by rodents responsible for several diseases such as hemorrhagic fevers among which Lassa fever infects 300,000 people each year. The current lack of effective vaccines and/or antivirals makes the development of therapeutic solutions of high priority. The genome of Arenaviruses encodes for two nucleases bearing crucial functions for virus survival. The L protein bears an endonuclease domain essential for viral replication through the cap-snatching mechanism. The NP protein has an exonuclease domain involved in anti-immune activity. Both enzymes share a common mode of action as they cleave their RNA substrate *via* a metal-dependant (Mg^{2+}) strategy.

This work intends to :

1) consider these two enzymes as novel Arénavirus therapeutic targets.

2) take over a preliminary screening of a 1st generation of ligands on an Arénavirus endonuclease. Diketo-acids (DKAs) have been discovered as potential inhibitors of its activity.

To this end, a library of 2nd generation of 22 compounds was synthesized thanks to the development of an optimized synthesis pathway. Compounds were further evaluated by biophysical methods for their ability to bind therapeutic targets, as potential inhibitors in an *in vitro* assay and *in cellula* in a mini-genome assay. Some of them are active *in vitro* and *in cellula*

Keywords : Arénavirus, Viral nucleases, Metal chelation, Diketo-acids