

## **Amélioration de l'activité antivirale**

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

L'amélioration de l'activité biologique d'un composé peut passer par des modifications structurales ponctuelles. Dans le cas des antiviraux nucléosidiques, cela peut concerner la modification du lien glycosidique (*C*-nucléosides), des modifications sur le sucre (en position 1' ou 2') ou encore des fonctionnalisations sur l'hétérocycle. Une autre voie pour l'amélioration de l'activité d'un nucléoside est sa délivrance *via* différents systèmes : des prodrogues, des nanovecteurs ou des conjugués avec des adresseurs.

### 1. *C*-nucléoside et stabilité

Les *C*-nucléosides sont des analogues de nucléosides dont la fonction aminal (avec le lien C-N en position anomère entre le sucre et la base) a été remplacée par une fonction éther (Figure 10).

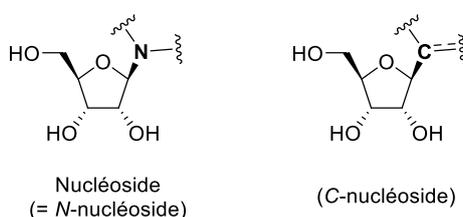


Figure 10: *N*- et *C*-nucléosides

Il existe quelques exemples de *C*-nucléosides naturels : la pseudouridine, isolée de l'ARN de transfert, ou encore les formycines A et B, ainsi que la showdomycine (Figure 11).<sup>32</sup>

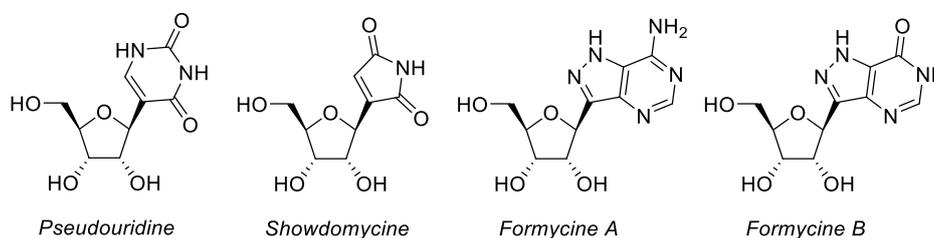
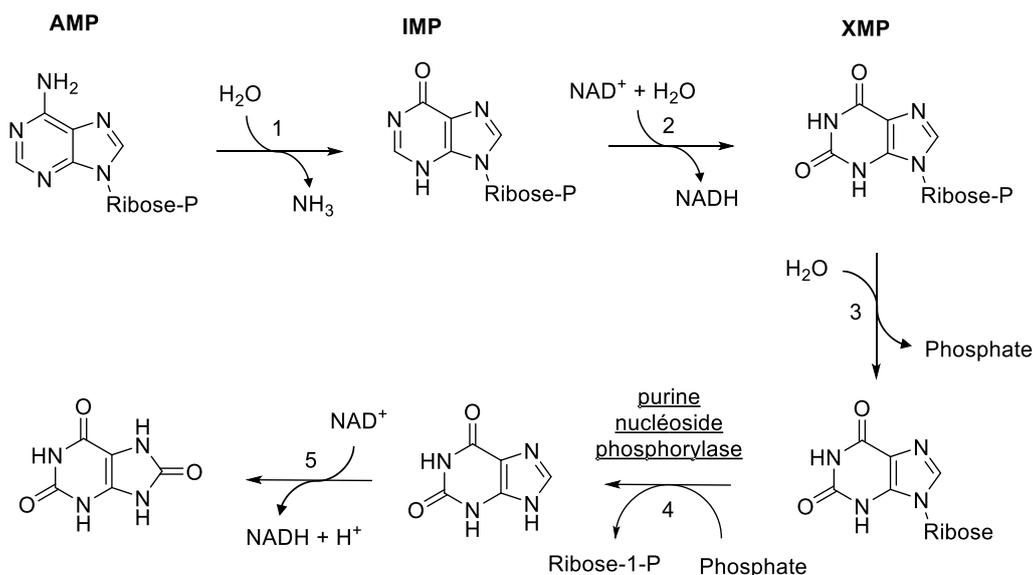


Figure 11: *C*-nucléosides isolés de sources naturelles

Outre des activités biologiques détaillées plus loin, les *C*-nucléosides présentent l'avantage d'être stables à l'hydrolyse acide et enzymatique contrairement à leurs homologues azotés. Ils sont ainsi résistants à la dégradation par les phosphorylases coupant le lien *N*-glycosidique entre le sucre et la base correspondante (Etape 4 du cycle de dégradation de l'adénosine, Schéma 1).

<sup>32</sup> Townsend, L. B. *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Springer US: Boston, MA 1994.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale



**Schéma 1 : Cycle de dégradation de l'adénosine**

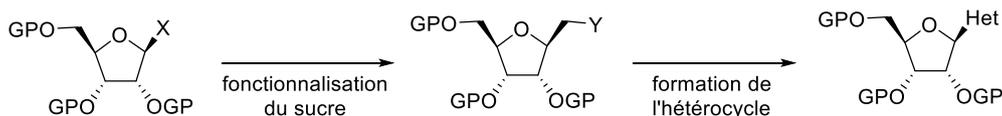
Les différentes réactions sont catalysées par les enzymes suivantes : AMP désaminase (1), IMP déshydrogénase (2), 5'-nucléotidase (3), purine nucléoside phosphorylase (4), et xanthine déshydrogénase/oxydase (5).

AMP = adénosine monophosphate ; IMP = inosine monophosphate ; XMP = xanthine monophosphate ; NAD = nicotinamide adénine dinucléotide

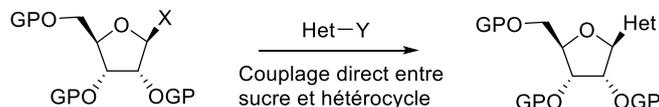
### 1.1. Synthèse des C-nucléosides

La synthèse des C-nucléosides passe par la formation d'un lien C-C entre un sucre, principalement le ribose sous sa forme protégée, et un hétérocycle analogue d'une base. Trois stratégies principales peuvent ainsi être envisagées : (i) la création du lien C-C à partir d'un sucre puis la formation de l'hétérocycle, (ii) un couplage direct entre le sucre et l'hétérocycle, et enfin (iii) la fonctionnalisation d'un hétérocycle suivie de la construction du sucre (Schéma 2).<sup>33</sup>

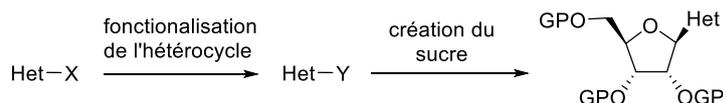
#### Méthode 1:



#### Méthode 2:



#### Méthode 3:



**Schéma 2 : Schéma des différentes méthodes de préparation des C-nucléosides**

<sup>33</sup> Boutureira, O.; Matheu, M. I.; Díaz, Y.; Castellón, S. In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; 263–316.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 1.1.1. Synthèse à partir du sucre

Il existe de nombreuses méthodes permettant la création d'une liaison C-C en position anomère d'un sucre. L'une des stratégies les plus simples consiste à réaliser une substitution nucléophile en position anomère à partir de 1-*O*-acétyl-, 1-chloro- ou encore 1-séloglycosides dans le cas de réactions radicalaires. Ces réactions permettent d'accéder aux composés 1-cyano-, 1-carboxy- (Schéma 3), 1-alcényl- ou 1-alcynylglycoside *via* des réactions avec des organométalliques (Schéma 4).

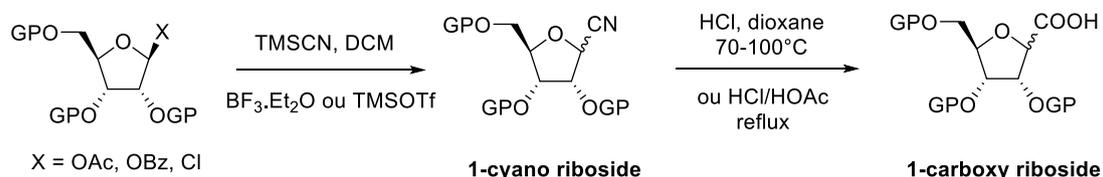


Schéma 3 : Formation des 1-cyano et 1-carboxyglycosides

Ces fonctionnalisations serviront ensuite de base pour la formation d'hétérocycles par différents aménagements fonctionnels.

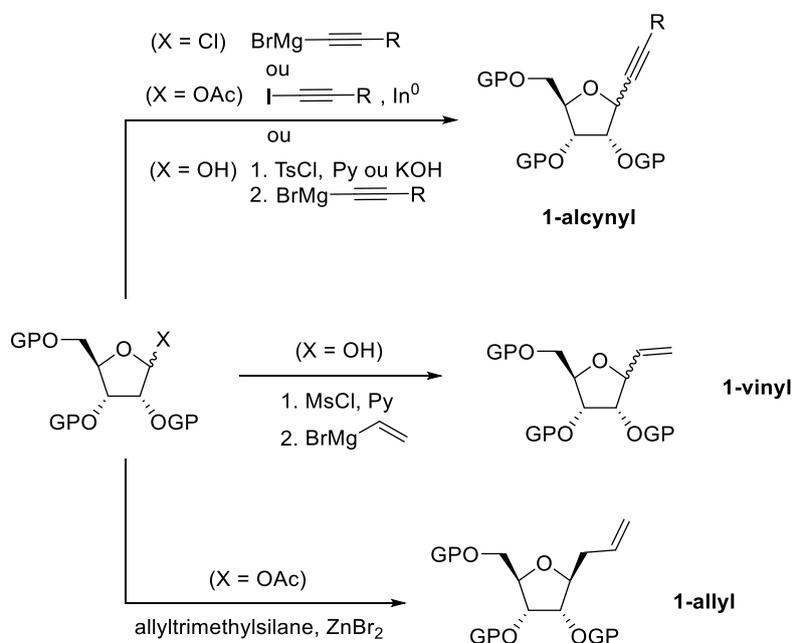


Schéma 4 : Synthèse des 1-alcényl- et 1-alcynylglycosides

Ramasamy *et al.*<sup>34</sup> ont ainsi rapporté la synthèse de la tiazofurine, un C-nucléoside présentant une activité antitumorale, à partir d'un 1-cyanoribofuranose et du chlorhydrate de l'ester éthylique de la cystéine (Schéma 5).

<sup>34</sup> Ramasamy, K. S.; Bandaru, R.; Averett, D. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (18), 5849–5851.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

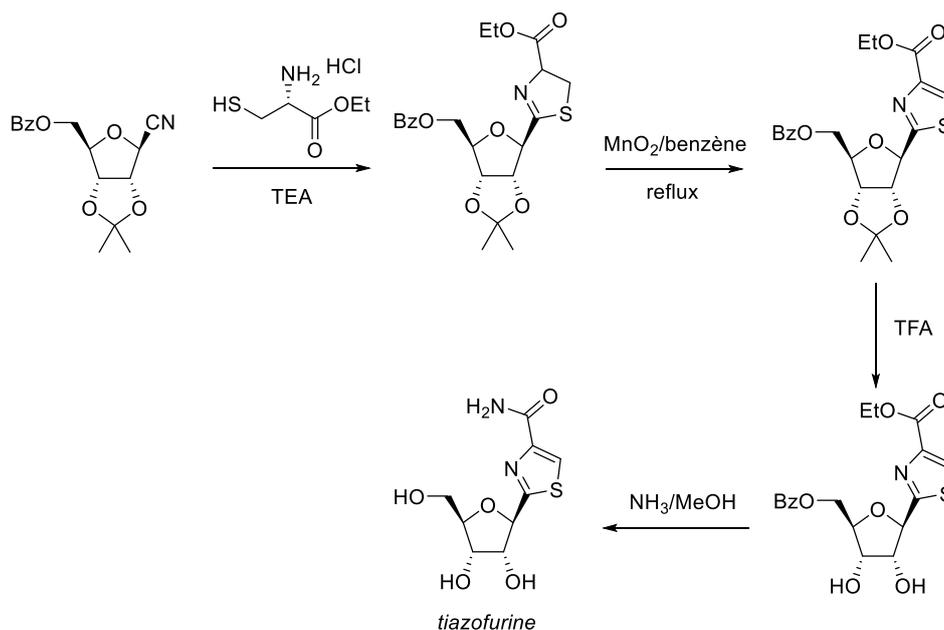


Schéma 5 : Synthèse de la tiazaofurine à partir d'un 1-cyanoribofuranose

La deuxième principale stratégie utilisée pour créer un lien C-C sur la position anomère d'un glycoside est une réaction avec la fonction aldéhyde du sucre. Il est ainsi possible de faire intervenir l'aldéhyde dans une réaction multicomposante de type cyclocondensation aldolique comme la synthèse de Hantzsch permettant la formation des 1,4-dihydropyridines,<sup>35</sup> ou la réaction de Biginelli donnant accès aux dihydropyrimidinones (Schéma 6).<sup>36</sup>

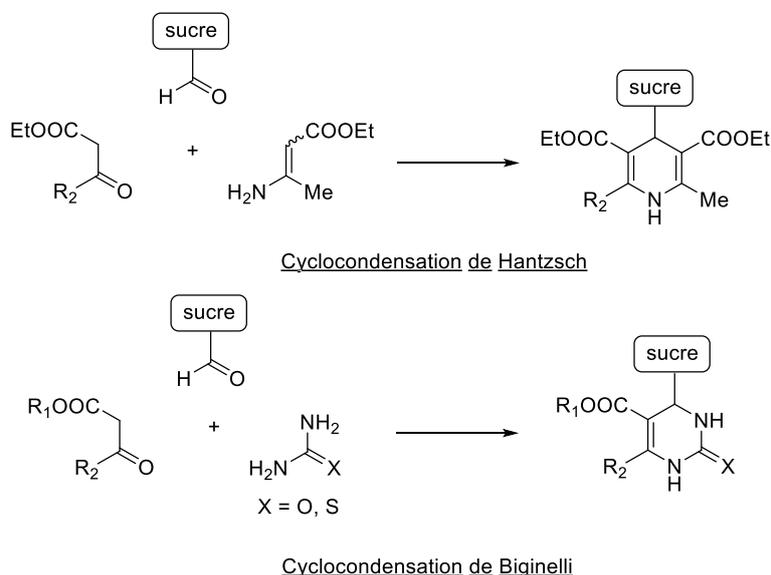


Schéma 6 : Synthèse d'un C-nucléoside par réaction multicomposante à partir de la forme aldéhyde d'un sucre

La fonction aldéhyde d'un sucre peut également réagir selon des réactions d'oléfinations de Wittig comme la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons ou une réaction tandem Wittig-Michael. Comme les réactions de substitution en position anomère, les oléfinations permettent d'accéder à des

<sup>35</sup> Dondoni, A.; Massi, A.; Aldhoun, M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (20), 7677–7687.

<sup>36</sup> Dondoni, A.; Massi, A.; Sabbatini, S.; Bertolasi, V. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (20), 6979–6994.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

1-alcényl-*C*-glycosides qui peuvent ensuite subir diverses modifications afin de créer un hétérocycle pour obtenir le *C*-nucléoside final.

Butora *et al.*<sup>37</sup> ont ainsi synthétisé la 9-déaza-2'-*C*-méthyladénosine en faisant réagir un 2'-*C*-ribose protégé avec le cyanométhylphosphonate de diéthyle par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons, suivie d'une addition intramoléculaire pour former le *C*-glycoside. Le cycle pyrrolique a ensuite été construit par une réaction de Claisen avec le formiate de méthyle, puis une cyclisation de Kirsch en présence de DBU (Schéma 7).

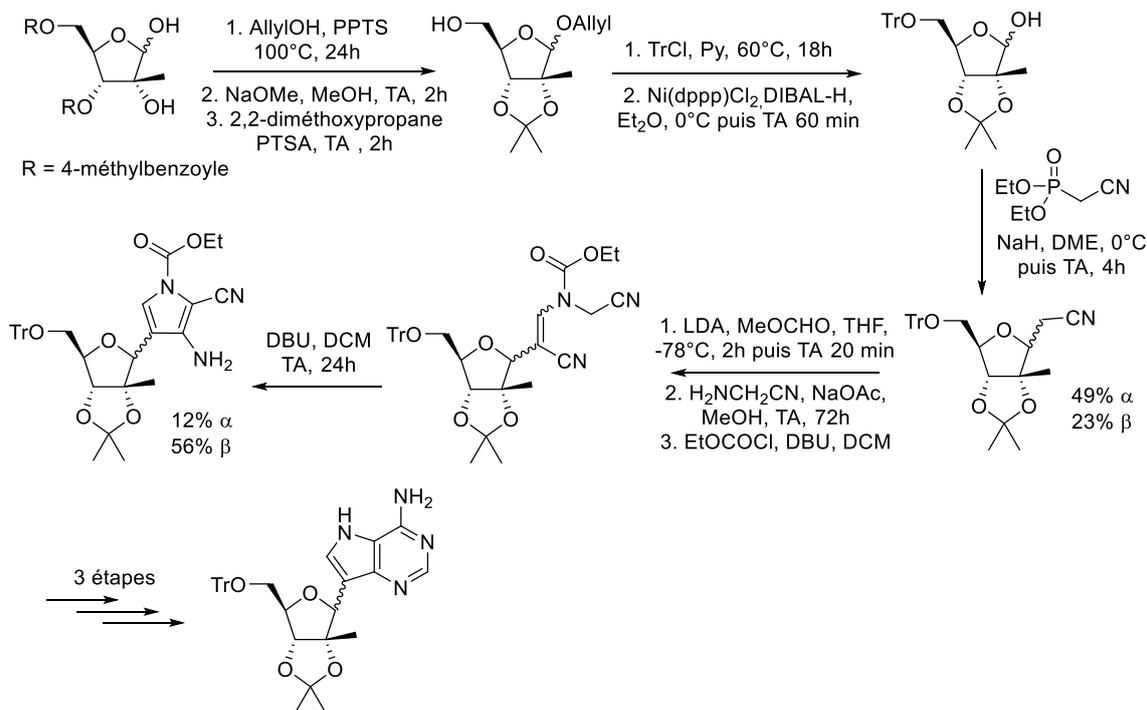


Schéma 7 : Synthèse de la 9-déaza-2'-*C*-méthyladénosine

### 1.1.2. Synthèse par couplage entre le sucre et l'hétérocycle

La deuxième stratégie pour la synthèse des *C*-nucléosides consiste à réaliser une réaction de couplage entre le sucre protégé et un hétérocycle déjà fonctionnalisé.

Le lien C-C peut, par exemple, être créé en effectuant des réactions faisant intervenir des réactifs organométalliques telles que des substitutions sur des halofuranoses,<sup>38</sup> des additions sur la fonction aldéhyde de furanose<sup>39,40</sup> ou encore sur la fonction lactone de furanone<sup>39,41</sup> (Schéma 8).

<sup>37</sup> Butora, G.; Olsen, D. B.; Carroll, S. S.; McMasters, D. R.; Schmitt, C.; Leone, J. F.; Stahlhut, M.; Burlein, C.; MacCoss, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (15), 5219–5229.

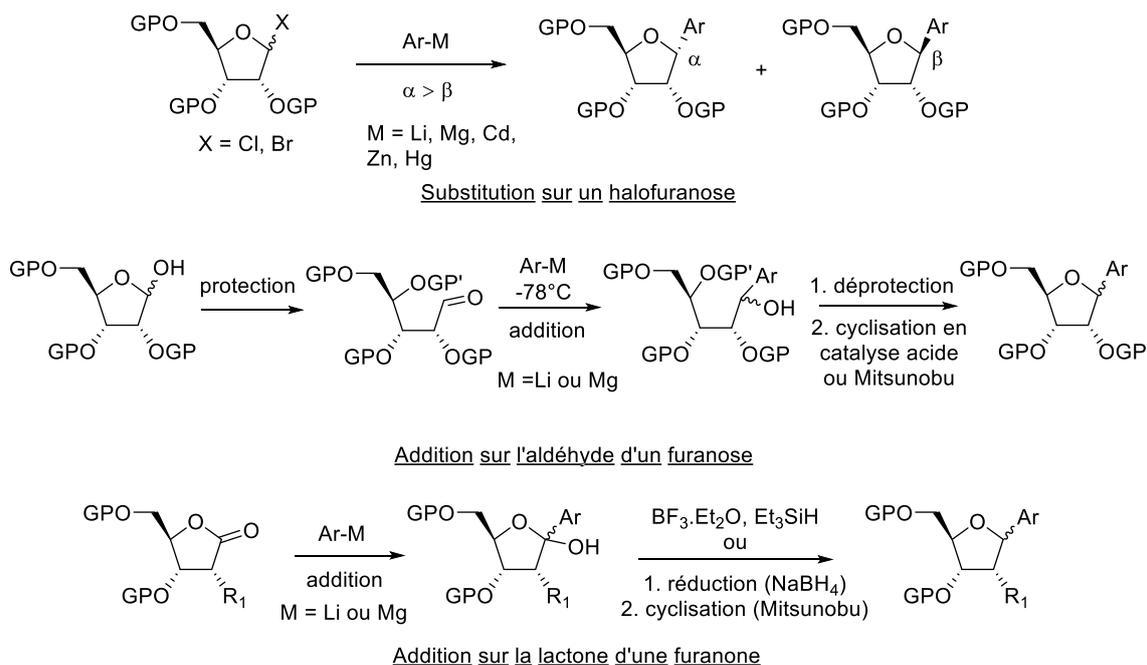
<sup>38</sup> Hocek, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 9914–9921.

<sup>39</sup> Krohn, K.; Heins, H.; Wielckens, K. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (3), 511–517.

<sup>40</sup> Harusawa, S.; Murai, Y.; Moriyama, H.; Imazu, T.; Ohishi, H.; Yoneda, R.; Kurihara, T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (13), 4405–4411.

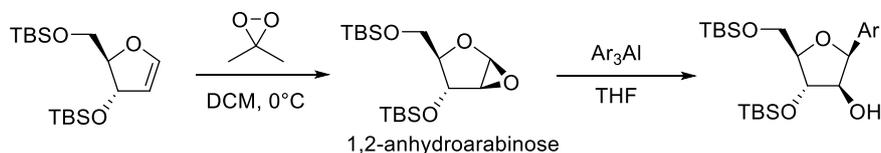
<sup>41</sup> Hildbrand, S.; Blaser, A.; Parel, S. P.; Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (24), 5499–5511.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale



**Schéma 8 : Couplage entre un sucre et un hétérocycle faisant intervenir des organométalliques**

Le couplage entre un glycoside et un hétérocycle peut également être effectué en utilisant un époxyde, lui-même obtenu à partir du glycal correspondant. Néanmoins, l'époxydation de furanoglycals s'effectuant préférentiellement en *anti* du substituant en position 3, cette méthode ne permet d'obtenir que des 1,2-anhydroarabinoses (Schéma 9).<sup>42</sup>



**Schéma 9 : Synthèse d'un C-arabino-furanoside passant par un intermédiaire époxyde**

Les réactions de substitution allylique catalysée au palladium, molybdène, tungstène, ruthénium, rhodium ou encore iridium, sont également d'excellents moyens d'obtenir des C-nucléosides. En effet, les réactions pallado-catalysées développées par Trost<sup>43,44</sup> sont des outils permettant la synthèse de différents nucléosides avec une excellente énantiosélectivité. La L-showdomycine a ainsi été synthétisée à partir du 2,5-dibenzoyloxy-2,5-dihydrofurane en utilisant une réaction de substitution allylique (Schéma 10).<sup>45</sup>

<sup>42</sup> Singh, I.; Seitz, O. *Org. Lett.* **2006**, 8 (19), 4319–4322.

<sup>43</sup> Trost, B. M. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 5813–5837.

<sup>44</sup> Trost, B. M.; Machacek, M. R.; Aponick, A. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39 (10), 747–760.

<sup>45</sup> Trost, B. M.; Kallander, L. S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (15), 5427–5435.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

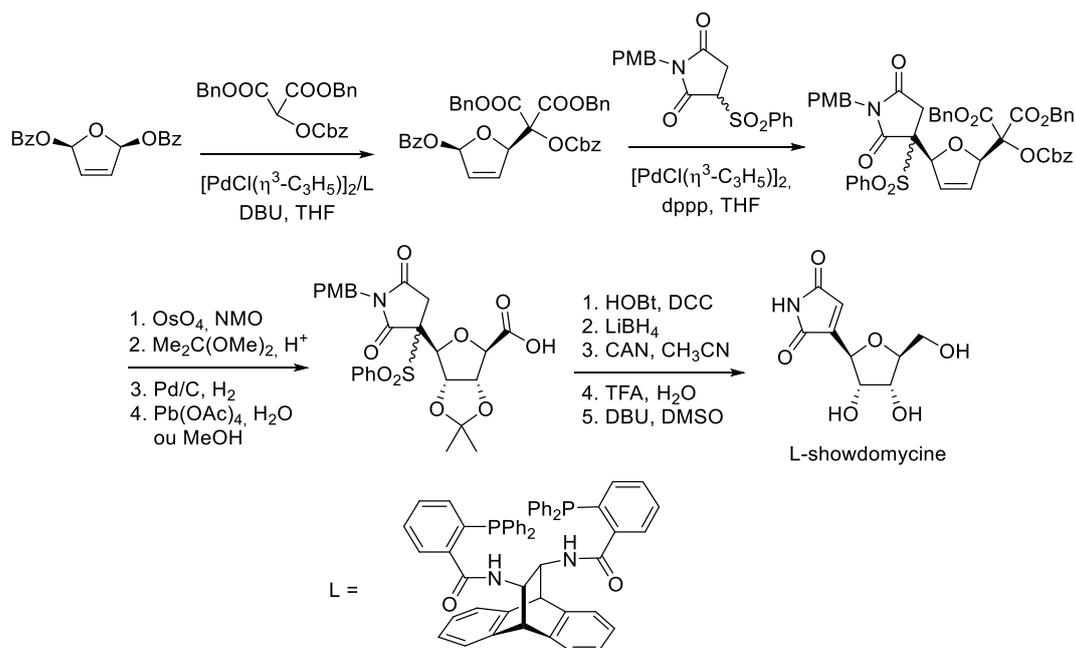


Schéma 10 : Synthèse de la L-showdomycine utilisant une substitution allylique pallado-catalysée

La création d'un lien C-C entre le sucre et un hétérocycle peut également être réalisée par couplage pallado-catalysé. Un couplage de Heck entre un glycal et un composé haloaromatique permet ainsi d'obtenir des 2'-désoxy-C-nucléosides.

Zhang *et al.*<sup>46</sup> ont ainsi synthétisé la 2'-désoxypseudouridine à partir d'un furanoglycal et de 5-iodouracile en présence de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{AsPh}_3$  suivi d'un traitement par le fluorure de tétrabutylammonium et de triacétoxyborohydrure de sodium (Schéma 11).

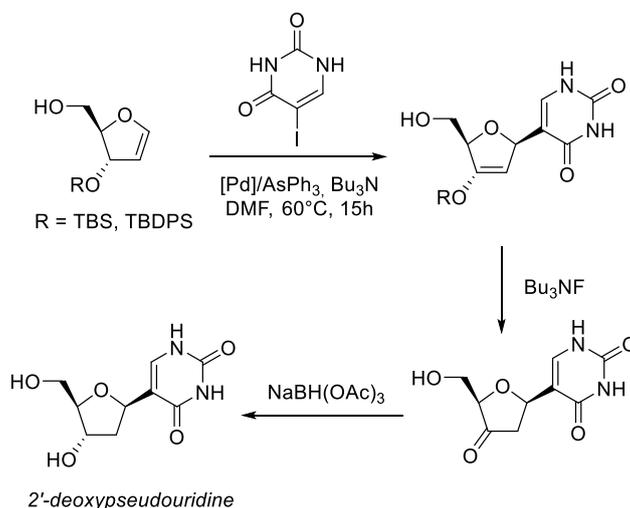


Schéma 11 : Synthèse de la 2'-désoxypseudouridine en utilisant un couplage de Heck

Enfin, les réactions de couplage catalysées par des acides de Lewis telles que la réaction de Friedel-Crafts constituent aussi une approche simple pour la préparation des C-nucléosides, particulièrement dans le cas des sucres activés grâce à la formation d'oxonium (Schéma 12). Néanmoins ces réactions ont généralement un rendement moyen de l'ordre de 40 % et ne sont pas toujours diastéréosélectives.

<sup>46</sup> Zhang, H. C.; Daves, G. D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (17), 4690–4696.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

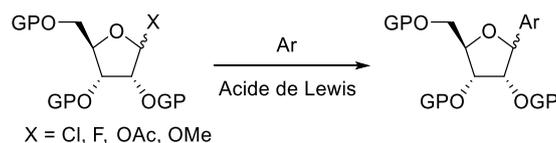


Schéma 12 : Préparation de C-nucléosides par réaction de Friedel-Crafts

### 1.1.3. Synthèse à partir de l'hétérocycle

La dernière méthode de préparation des C-nucléosides consiste à fonctionnaliser un hétérocycle puis à créer la partie glycosidique. Cette méthode est certainement la plus difficile à réaliser puisqu'elle nécessite la création de plusieurs centres stéréogènes.

Son et Fu<sup>47</sup> ont ainsi développé la synthèse de 2'-désoxy-C-nucléoside par une cycloaddition [4+1] catalysée au cuivre, entre des énones et des diazoesters (Schéma 13). Les 2,3-dihydrofuranes ainsi formés sont obtenus avec un bon rendement et une bonne stéréosélectivité. Une hydrogénation suivie d'une réduction de l'ester et une déprotection du groupement triméthylsilyléthyle donne finalement le désoxy-C-nucléoside.

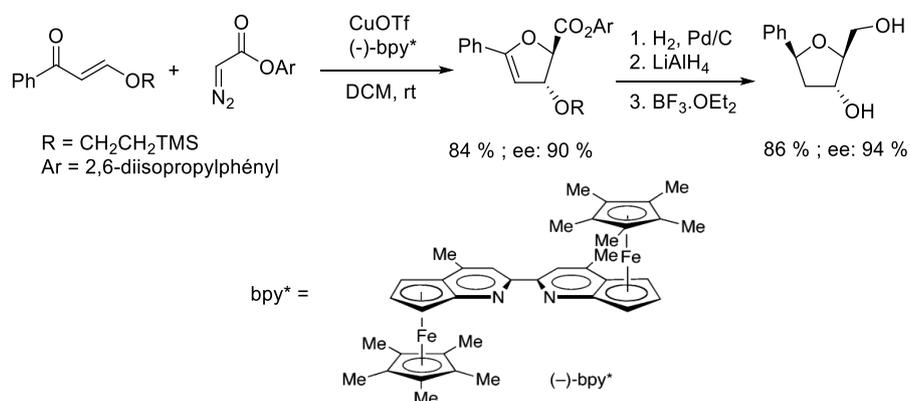


Schéma 13 : Cycloaddition [4+1] catalysée au cuivre donnant des 2'-désoxy-C-nucléosides

## 1.2. Activité biologique des C-nucléosides

Les C-nucléosides ont reçu un intérêt important pour leur synthèse, mais peu d'études portent sur leurs activités biologiques. En effet, si un nombre grandissant de C-nucléosides fait l'objet d'études cliniques,<sup>48,49</sup> aucun n'a encore été commercialisé pour ses activités antivirales ou antitumorales contrairement aux N-nucléosides. Pourtant, outre leur meilleure stabilité à l'hydrolyse acide et enzymatique, les C-nucléosides sont capables de mimer les nucléosides naturels, tout comme les N-nucléosides non naturels. Tout comme les N-nucléosides, les C-nucléosides peuvent subir une ou plusieurs phosphorylations, leur permettant ensuite d'inhiber des enzymes virales (protéases, polymérases), des enzymes nécessaires à la réplication de virus ou tout simplement à la survie cellulaire (Figure 12).<sup>50</sup>

<sup>47</sup> Son, S.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1046–1047.

<sup>48</sup> A Phase 1 Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of BCX4430 - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02319772> (accessed Sep2,2017).

<sup>49</sup> GS-5734 to Assess the Antiviral Activity, Longer-Term Clearance of Ebola Virus, and Safety in Male Ebola Survivors With Evidence of Ebola Virus Persistence in Semen <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610606678> (accessed Sep2,2017).

<sup>50</sup> De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2301–2311.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

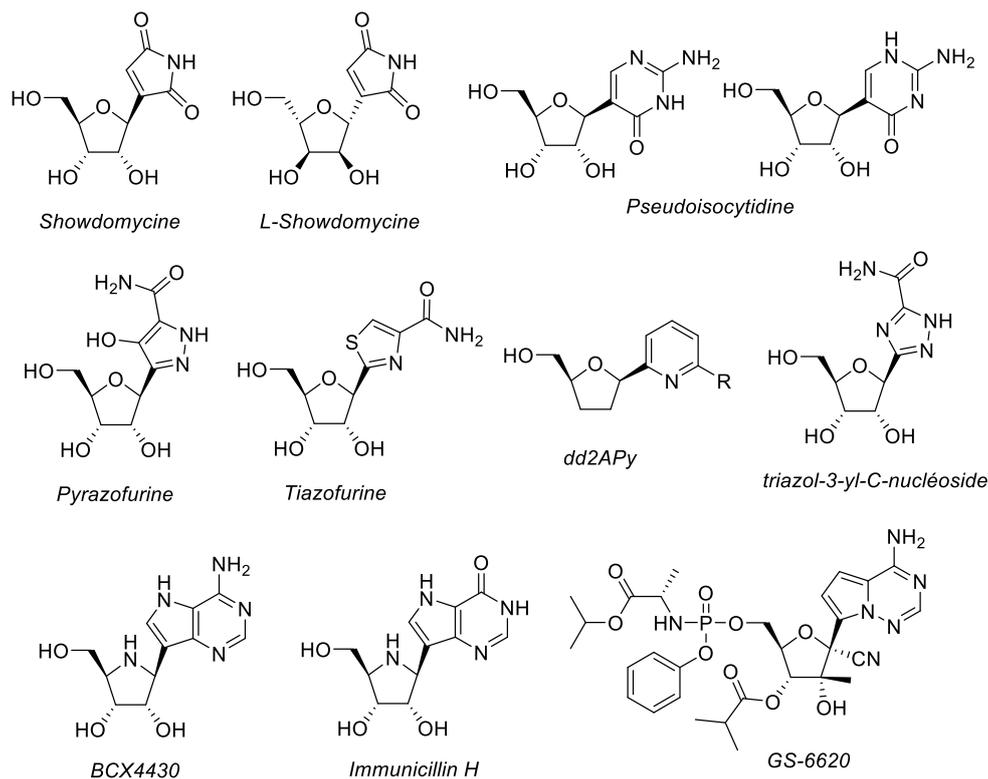


Figure 12: Exemples de C-nucléosides biologiquement actifs

Ainsi, des C-nucléosides tels que la showdomycine, son énantiomère la L-showdomycine ou encore la formycine sont des composés cytotoxiques pouvant potentiellement être utilisés dans des chimiothérapies. En effet, les showdomycines peuvent fonctionner comme des agents alkylants du fait de leur hétérocycle maléimide.

La pseudoisocytidine, existant sous la forme de deux tautomères, a été rapportée comme un agent anti-leucémique potentiel ( $IC_{50} = 0,04-3,8 \mu\text{g/mL}$ )<sup>51</sup>, tout comme les triazol-3-yl-C-nucléosides.

La pyrazofurine a été développée en 1975 par Gutowski *et al.*,<sup>52</sup> initialement en tant qu'agent antitumoral. Ce composé a montré une inhibition du développement tumoral, apparemment due à l'inhibition de la synthèse *de novo* des nucléosides pyrimidiques (inhibition de plus de 50 % de différentes tumeurs chez la souris et le rat).<sup>53</sup> Par la suite, il a été montré que le dérivé pyrazofurine monophosphate était capable d'inhiber l'orotidine monophosphate (OMP) décarboxylase et ainsi d'empêcher la conversion de l'OMP en uridine monophosphate (UMP). L'UMP étant l'un des éléments constitutifs de l'ARN, la diminution de sa concentration intracellulaire entraîne alors l'arrêt de la transcription. Par ailleurs, l'OMP décarboxylase a été identifiée comme une cible thérapeutique pertinente pour stopper les infections par le *P. falciparum* responsable de la malaria. Ceci renforce le potentiel thérapeutique de la pyrazofurine. De plus, ce C-nucléoside est également un antiviral à spectre large notamment contre le virus de la stomatite vésiculaire et le virus Ebola, dont l'activité antivirale pourrait dépasser celle de la ribavirine (RBV).

<sup>51</sup> Burchenal, J. H.; Ciovacco, K.; Kalaher, K.; Kietner, R.; Dowling, M. D.; Chu, C. K.; Watanabe, K. A.; Wempen, I.; Fox, J. J. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1520–1523.

<sup>52</sup> Gutowski, G. E.; Sweeney, M. J.; DeLong, D. C.; Hamill, R. L.; Gerzon, K.; Dyke, R. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 544–551.

<sup>53</sup> Sweeney, M. J.; Davis, F. A.; Gutowski, G. E.; Marnili, R. L.; Hoffman, D. H.; Poore, G. A. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 2619–2623.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

La tiazofurine a également été identifiée comme agent antitumoral puisque ce composé est capable d'inhiber la croissance de nombreuses tumeurs notamment le carcinome pulmonaire de Lewis, qui pourtant est insensible à la plupart des traitements. Ainsi, l'utilisation de tiazofurine a permis d'atteindre jusqu'à 90 % de survie chez des souris atteintes du carcinome pulmonaire après 60 jours.<sup>54</sup> Le mode d'action de la tiazofurine passe par la formation de son dérivé monophosphate qui est ensuite métabolisé en dinucléotide, le thiazole-4-carboxamide adénine dinucléotide. Ce dernier peut alors inhiber l'IMPDH entraînant, comme pour la RBV, une diminution de la quantité de GTP.

Le 2',3'-didésoxy-C-nucléoside dd2APy a, quant à lui, été identifié comme inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH.

Plus récemment, l'imino-C-nucléoside BCX4430 a montré une activité antivirale contre l'infection au filovirus (Marbug) avec une IC<sub>90</sub> de 5,4 µM. Ce composé serait triphosphorylé et inhiberait par la suite l'ARN polymérase.<sup>55</sup> Par ailleurs, BCX4430 s'est montré efficace pour le traitement de la fièvre jaune chez le hamster. Son produit de désamination par l'adénosine déaminase est l'immucilline H, un puissant inhibiteur de la purine nucléoside phosphorylase, ralentissant ainsi la prolifération de lymphocytes T humains. Cette propriété en fait un bon candidat pour le traitement de leucémies et de lymphomes, mais également d'autres pathologies caractérisées par des réponses activées par les lymphocytes T (maladies auto-immunes, greffes d'organe).

Enfin, Cho *et al.*<sup>56</sup> ont montré que le composé GS-6620, une prodrogue phosphoramidate de C-nucléoside, était capable d'inhiber la polymérase du VHC (EC<sub>50</sub> 68-427 nM) lançant ainsi l'intérêt de l'utilisation de ces composés pour leur potentiel antiviral. Ce composé est d'ailleurs le premier C-nucléoside à entrer en développement clinique.

### 1.3. Travaux antérieurs : SRO91

Dans l'optique de développer des C-nucléosides analogues de la RBV, l'équipe de glycochimie du laboratoire s'est intéressée à la synthèse de C-ribosyl-1,2,3-triazoles en réalisant une réaction d'alcynylation médiée à l'indium en position anomère d'un ribose suivie d'une cycloaddition 1,3-dipolaire (Schéma 14).<sup>57</sup>

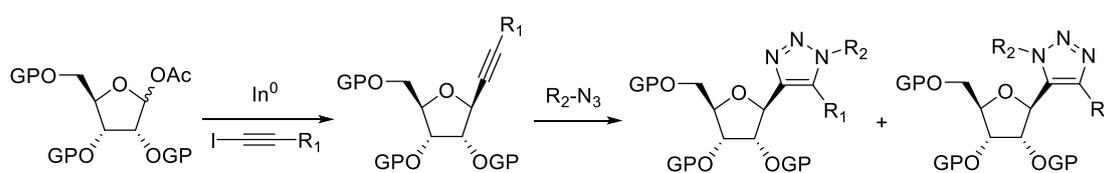


Schéma 14 : Synthèse des C-ribosyl-1,2,3-triazoles analogues de la RBV

Les composés ainsi obtenus (Figure 13) ont été testés pour leurs activités biologiques, notamment contre le VHC. Parmi eux, le composé SRO91 s'est montré le plus prometteur.

<sup>54</sup> Robins, R. K.; Srivastava, P. C.; Narayanan, V. L.; Plowman, J.; Paull, K. D. *J. Med. Chem.* **1982**, 25 (2), 107–108.

<sup>55</sup> Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. *Nature* **2014**, 508 (7496), 402–405.

<sup>56</sup> Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Lee, R.; Butler, T.; Metobo, S.; Aktoudianakis, V.; Lew, W.; Ye, H.; Clarke, M.; Doerffler, E.; Byun, D.; Wang, T.; Babusis, D.; Carey, A. C.; German, P.; Sauer, D.; Zhong, W.; Rossi, S.; Fenaux, M.; McHutchison, J. G.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1812–1825.

<sup>57</sup> Lubin-Germain, N.; Baltaze, J.-P.; Coste, A.; Hallonet, A.; Laurenno, H.; Legrave, G.; Uziel, J.; Augé, J. *Org. Lett.* **2008**, 10 (5), 725–728.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

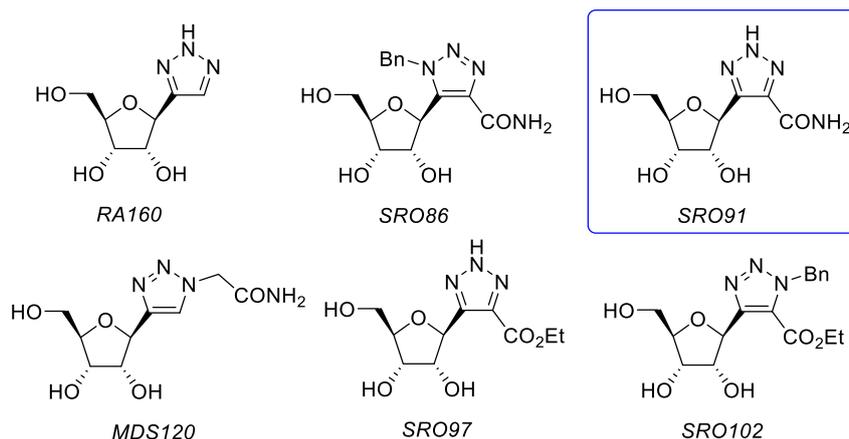


Figure 13: C-ribose-1,2,3-triazoles analogues de la RBV synthésés au laboratoire

### 1.3.1. Synthèse de SRO91

Le C-nucléoside SRO91 a donc été synthésé selon une méthode développée au laboratoire (Schéma 15).

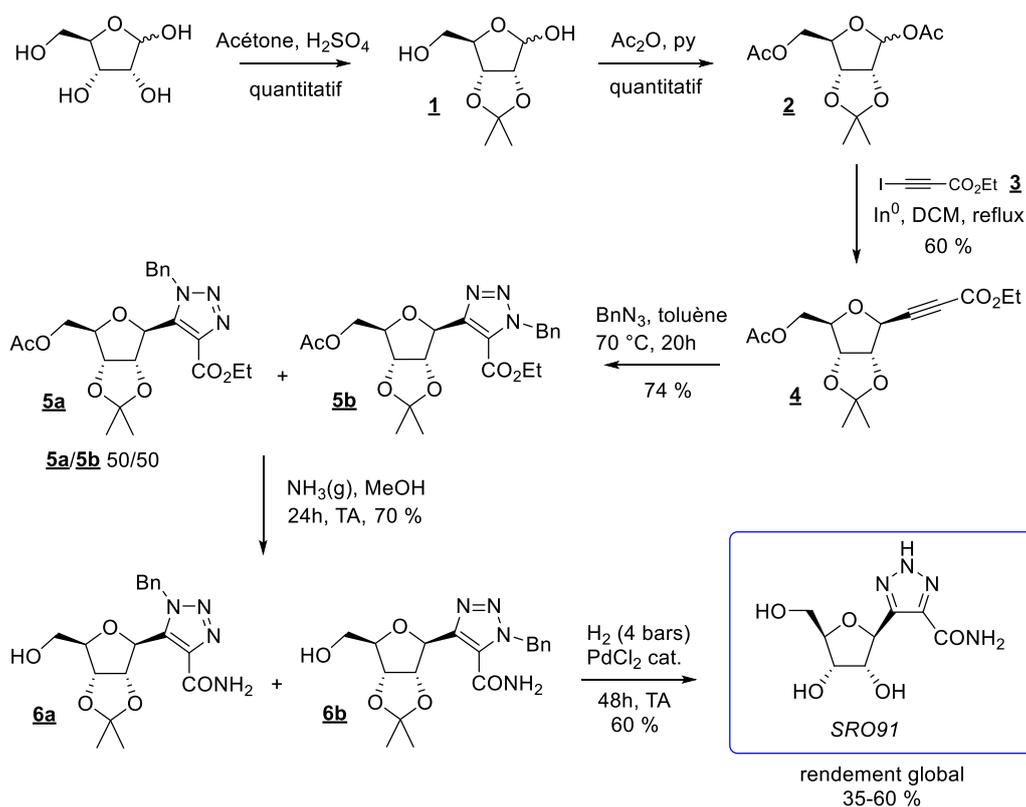


Schéma 15 : Synthèse de SRO91 développée au laboratoire

Pour réaliser la synthèse de SRO91, le D-ribose est protégé en position 2 et 3 par un isopropylidène puis en position 1 et 5 sous forme d'acétate pour donner le composé **2**. Ce dernier est soumis à une réaction d'alcynylation médiée à l'indium(0) dans le DCM à 60 °C pendant 2 à 3 jours pour donner sélectivement le β-C-ribofuranoside **4** avec un rendement allant de 35 à 60 %. La cycloaddition 1,3-dipolaire en présence d'azoture de benzyle permet alors d'obtenir le mélange d'isomères **5a** et **5b** (ratio 50/50) avec un rendement de 74 %. Il est à noter que l'utilisation d'une catalyse par un

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

surfactant glycosylé permet d'obtenir un des isomères avec une meilleure sélectivité.<sup>58</sup> Ces composés sont alors soumis à une aminolyse en présence d'ammoniac dans le MeOH pour donner les isomères **6a** et **6b** avec un rendement de 70 %. Enfin, la déprotection des benzyles par hydrogénolyse en présence de chlorure de palladium permet également de déprotéger les positions 2 et 3 du sucre grâce au HCl généré par le catalyseur, permettant d'obtenir l'unique produit final SRO91 avec un rendement de 60 %. La synthèse de SRO91 est ainsi réalisée en 6 étapes avec un rendement global allant de 8 à 23 %.

Il est à noter que la séparation des diastéréoisomères **5a/5b** ou **6a/6b** n'est pas nécessaire puisque la déprotection finale donne un unique composé. Cela a été confirmé par la structure de SRO91 obtenue par diffraction aux rayons X (réalisées par le Dr. Régis Guillot de l'ICMMO de l'Université de Paris Sud) où l'on peut constater que l'atome d'hydrogène est porté par l'azote central du triazole (Figure 14).<sup>59</sup> Suite à la débenzylation, il y a donc un équilibre tautomérique au niveau de l'hétérocycle ce qui permet d'obtenir une unique molécule.

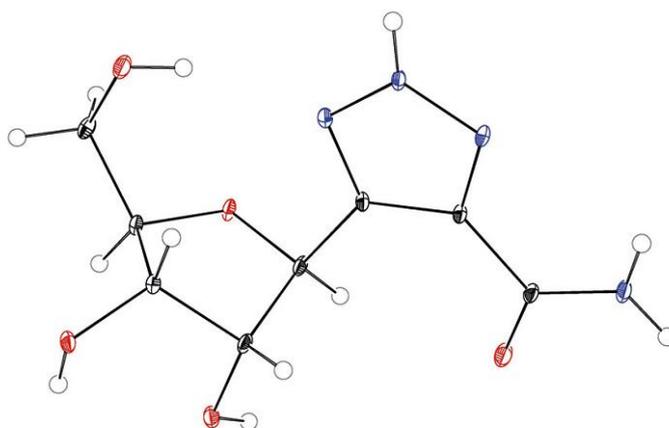


Figure 14: Structure cristalline de SRO91 obtenue par diffraction aux rayons X

### 1.3.2. Activité biologique de SRO91

L'activité antivirale de SRO91 contre le VHC a été étudiée par l'équipe du Pr. Amilcar Tanuri de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro. Pour cela, des tests *in vitro* ont été réalisés sur des lignées cellulaires Huh7-ET qui contiennent un réplicon de l'ARN du VHC ainsi qu'un rapporteur de type luciférase. Lors de ces essais, l'activité du gène rapporteur est directement proportionnelle au niveau d'ARN du VHC. L'activité antivirale peut ainsi être évaluée en observant la diminution du signal de luciférase. SRO91 a ainsi montré une activité intéressante contre le VHC avec une  $IC_{50}$  de 25  $\mu$ M similaire à celle de la RBV d'environ 50  $\mu$ M (Figure 15), tout en ayant une cytotoxicité peu importante (seuil de cytotoxicité supérieur à 100  $\mu$ M).

<sup>58</sup> Aït-Youcef, R.; Dos Santos, M.; Roussel, S.; Baltaze, J.-P.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (11), 4318–4323.

<sup>59</sup> Solarte, C.; Dos Santos, M.; Gonzalez, S.; Miranda, L. S. M.; Guillot, R.; Ferry, A.; Gallier, F.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Synthesis* **2017**, *49*, 1993–2002.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

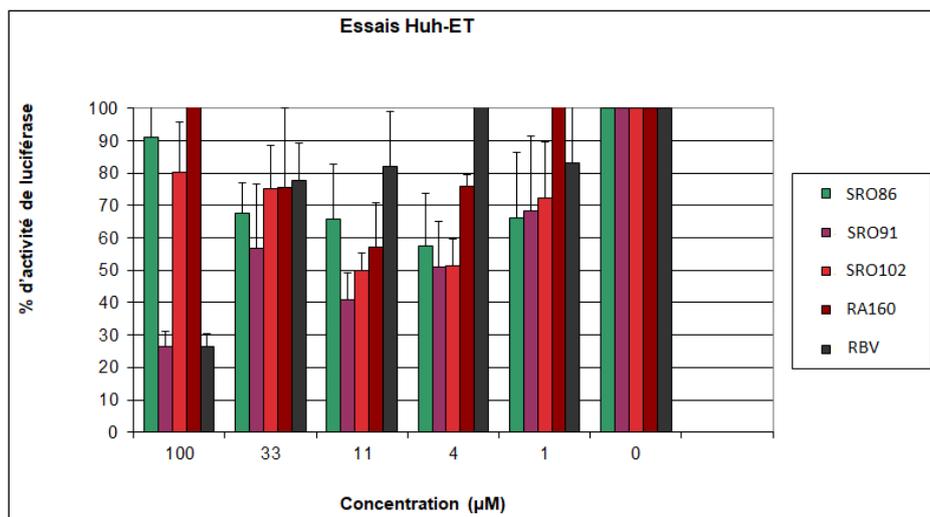


Figure 15: Essais HuH7-ET des différents C-nucléosides et RBV

Les affinités pour le site actif de l'ARN polymérase du VHC des triphosphates de SRO91 et de la RBV ont également été calculées par le Dr. Nelilma Correia Romeiro de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (données non publiées). Là encore, SRO91 apparaît comme un antiviral très prometteur, son dérivé triphosphate présentant une meilleure affinité que celui de la RBV (environ 92 % d'adéquation pour le triphosphate de SRO91 contre 86 % pour le RTP). En effet, la modélisation montre que le triphosphate de SRO91 s'insère dans le site catalytique de l'enzyme en effectuant 6 liaisons H avec différents acides aminés (Figure 16).

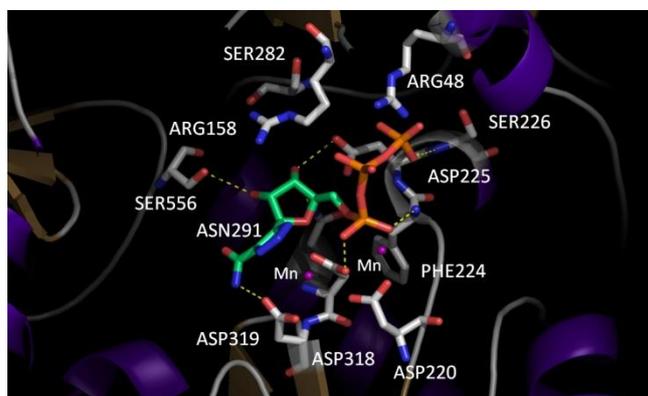


Figure 16: Modélisation du site actif de l'ARN polymérase du VHC en présence de SRO91

Enfin, des études plus récentes (données confidentielles) menées grâce à différentes collaborations ont montré que SRO91 et ses dérivés sont également actifs contre d'autres virus et possèdent des propriétés antitumorales. Ces résultats laissent ainsi penser que, comme la RBV, SRO91 pourrait présenter un profil antiviral à spectre large.

### 2. Modifications structurales

Une première stratégie permettant d'améliorer l'activité antivirale d'un N- ou C-nucléoside consiste à lui apporter des modifications structurales. Ces dernières peuvent stabiliser le complexe nucléoside/enzyme en renforçant certaines interactions, apporter des conformations particulières, ou encore améliorer la stabilité du composé en milieu biologique. On peut ainsi retrouver différentes

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

modifications, les principales pour les nucléosides étant : l'ajout d'un substituant en position 1', l'ajout ou la modification de substituants en position 2' et la modification de l'hétérocycle.

### 2.1. Modification en position 1' du ribose

Il existe assez peu de nucléosides comportant une modification structurale en position 1' du sucre. En effet, ces composés sont généralement instables et sont très vite dégradés.<sup>60,61</sup> On peut néanmoins citer les travaux de Cho *et al.*<sup>56</sup> portant sur un 1'-cyano-C-nucléoside (Schéma 16). Ces composés développés par Gilead Sciences se sont révélés aussi actifs sur la polymérase du VHC que le nucléoside non modifié en position 1'. De plus, leur prodrogue phosphoramidate (GS-6620) a montré une excellente activité (EC<sub>50</sub> d'environ 100-500 nM).

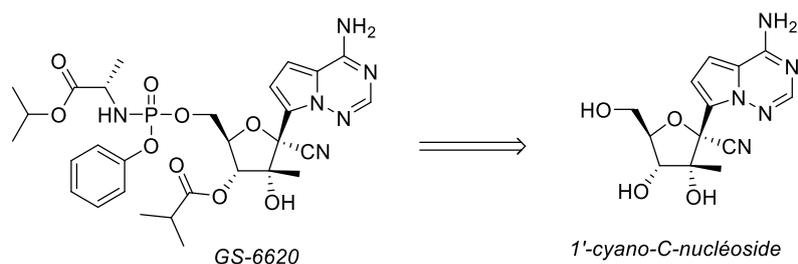


Schéma 16 : 1'-cyano-C-nucléosides développés par Gilead Sciences

En 2015, Kirschberg *et al.*<sup>62</sup> ont également rapporté la synthèse de 1'-C-cyano-2'-fluoro-2'-C-méthylpyrimidines (Figure 17). Des études d'activité anti-VHC ont ainsi montré que l'ajout du groupement cyano en position 1' augmentait le potentiel antiviral du nucléoside.

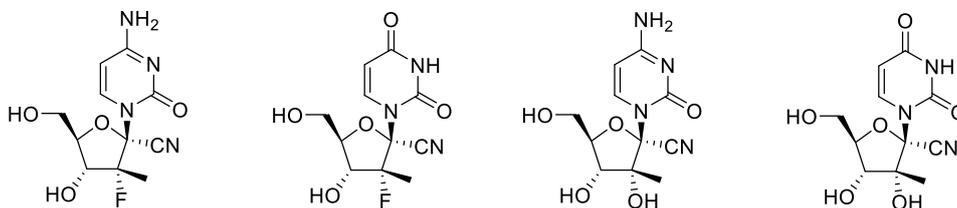


Figure 17: 1'-cyanonucléosides développés par Kirschberg *et al.*

### 2.2. Modification en position 2' du ribose

Les modifications structurales apportées en position 2' d'un nucléoside sont beaucoup plus courantes. On trouve ainsi de nombreux exemples dans la littérature mais également plusieurs composés déjà commercialisés pour leur activité thérapeutique.

L'une des modifications les plus répandues en position 2' est l'introduction d'un groupement méthyle ce qui a généralement pour effet d'augmenter l'activité antivirale du composé. Stuyver *et al.*<sup>63</sup> ont ainsi rapporté en 2003 que la 2'-C-méthylcytidine et la 2'-C-méthyladénosine sont capables de réduire

<sup>60</sup> Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Vita, P.; Jayaram, H. N.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Grifantini, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (15), 4983–4989.

<sup>61</sup> Damont, A.; Dukhan, D.; Gosselin, G.; Peyronnet, J.; Storer, R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26* (10–12), 1431–1434.

<sup>62</sup> Kirschberg, T. A.; Mish, M. R.; Zhang, L.; Squires, N. H.; Wang, K. Y.; Cho, A.; Feng, J. Y.; Fenaux, M.; Babusis, D.; Park, Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (5), 1040–1043.

<sup>63</sup> Stuyver, L. J.; McBrayer, T. R.; Tharnish, P. M.; Hassan, A. E. A.; Chu, C. K.; Pankiewicz, K. W.; Watanabe, K. A.; Schinazi, R. F.; Otto, M. J. *J. Virol.* **2003**, *77* (19), 10689–10694.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

le taux d'ARN du VHC tout en ayant très peu d'effet sur la prolifération cellulaire ( $EC_{90}$  de 10,4 et 1,4  $\mu\text{M}$  respectivement). De plus, Carroll *et al.*<sup>64</sup> ont montré que la 2'-C-méthyladénosine est capable d'inhiber la polymérase virale NS5B du VHC du fait de la capacité de son dérivé triphosphate à s'intégrer dans le site catalytique de l'enzyme ( $IC_{50}$  de 1,9  $\mu\text{M}$ ). La présence du groupement méthyle apporte alors une gêne stérique suffisante pour empêcher l'enzyme d'assembler le nucléotide suivant, ce qui met un terme à la réplication de l'ARN viral. Différents 2'-méthyl-C-nucléosides analogues de SRO91 ont également été synthétisés au laboratoire mais leurs activités biologiques, notamment anti-VHC, ne sont encore connues (Figure 18).<sup>65</sup>

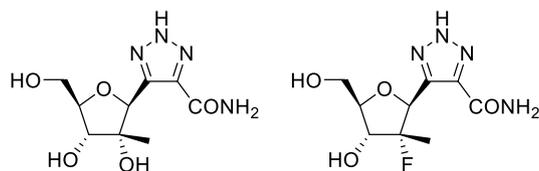


Figure 18: 2'-méthyl-C-nucléosides synthétisés au laboratoire

Parmi les modifications possiblement introduites en position 2', on retrouve les 2'-désoxy-2',2'-difluoro-nucléosides dont l'exemple le plus important est la gemcitabine (Figure 19) synthétisée pour la première fois par Hertel *et al.* en 1988.<sup>66</sup> Ce composé est utilisé en tant que traitement de première intention pour certains cancers et des tests d'inhibition d'un réplicon d'ARN du VHC lui ont également attribué une excellente activité ( $IC_{50} = 0,07 \mu\text{M}$ ).<sup>67</sup>

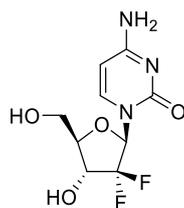


Figure 19: Structure de la gemcitabine

Les composés 2'-désoxy sont des dérivés de nucléoside ayant reçu une attention particulière depuis les années 1960.<sup>68</sup> Parmi eux, on retrouve des antiviraux tels que la lamivudine (anti-VIH et anti-VHB) ou la telbivudine (anti-VHB) ainsi que des antitumoraux tels que la decitabine (traitement de la leucémie myéloïde aigüe).

<sup>64</sup> Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A. B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A. L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C. A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L. C.; MacCoss, M.; Olsen, D. B. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (14), 11979–11984.

<sup>65</sup> Cosson, F.; Faroux, A.; Baltaze, J.; Farjon, J.; Guillot, R.; Uziel, J.; Lubin-Germain, N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 755–761.

<sup>66</sup> Hertel, L. W.; Kroin, J. S.; Misner, J. W.; Tustin, J. M. *J. Org. Chem.* **1988**, 53 (11), 2406–2409.

<sup>67</sup> Devos, R.; Dymock, B. W.; Hobbs, C. J.; Jiang, W.; Martin, J. A.; Merrett, J. H.; Najera, I.; Shimma, N.; Tsukuda, T. Anti-HCV nucleoside derivatives.20040110718, June 10, 2004.

<sup>68</sup> Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12 (6), 447–464.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

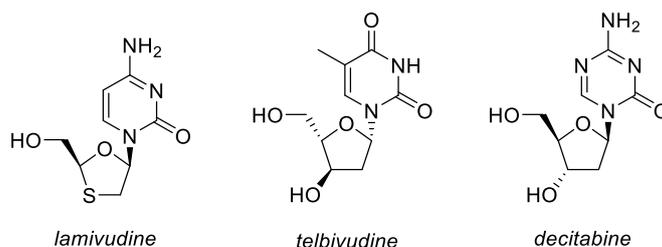


Figure 20: Exemples de 2'-désoxynucléosides présentant des activités biologiques

Enfin, les composés 2'-désoxy-2'-méthyl-2'-fluoro ont beaucoup été développés pour les traitements contre le VHC. En effet, ces composés sont généralement des inhibiteurs de polymérase et la présence d'un groupement méthyle ainsi que celle d'un atome de fluor, bioisostère de la fonction hydroxyle, permet une meilleure occupation du site actif de l'enzyme et donc une meilleure incorporation dans l'ARN viral. Le composé PSI-6130 développé par Clark *et al.*<sup>69</sup> a ainsi montré une meilleure activité sur des réplicons du VHC ( $EC_{90} = 5,4 \mu\text{M}$ ) que son homologue non fluoré ( $19 \mu\text{M}$ ). On peut également citer l'exemple du sofosbuvir, qui est à l'heure actuelle, le composé le plus utilisé dans les traitements contre le VHC (Figure 21).

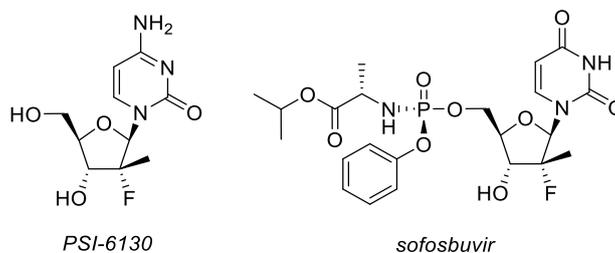


Figure 21: Exemples de 2'-désoxy-2'-méthyl-2'-fluoronucléosides actifs contre le VHC

### 2.3. Modification sur l'hétérocycle

Une autre modification structurale apportée sur les nucléosides est le changement ou l'ajout de différentes fonctionnalisations sur l'hétérocycle.

Dans le cas des analogues de la ribavirine, une des modifications les plus rencontrées porte sur la fonction carboxamide. Ce dernier peut être remplacé par une fonction acide ou encore fonctionnalisé par différentes amines pour donner une nouvelle série de composés, et permettre d'autres interactions avec les cibles thérapeutiques. La fonction carboxamide de SRO91 a ainsi été modifiée au laboratoire pour donner plusieurs composés dont l'activité anti-VHC n'est pas encore connue (Figure 22).<sup>59</sup>

<sup>69</sup> Clark, J. L.; Hollecker, L.; Mason, J. C.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; Lostia, S.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Furman, P. A.; Stec, W. J.; Patterson, S. E.; Pankiewicz, K. W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (17), 5504–5508.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

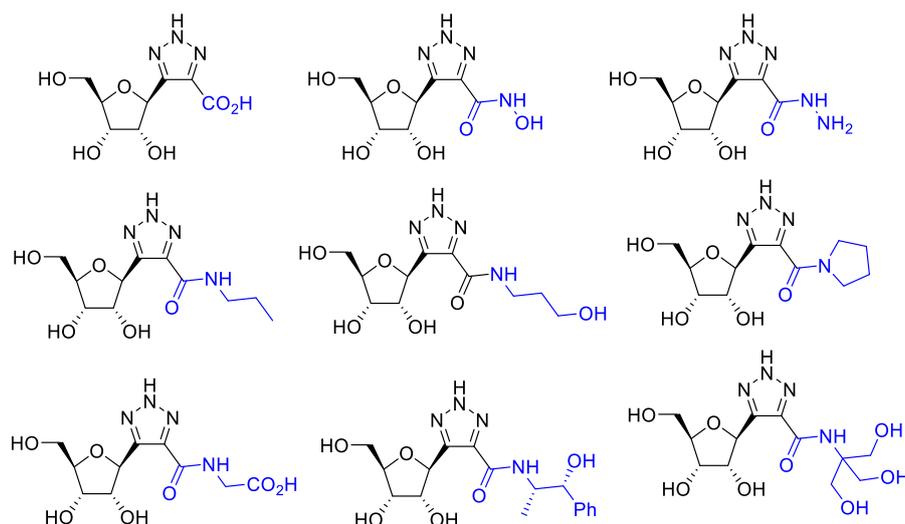


Figure 22: Dérivés carboxamides de SRO91

Toujours pour les analogues de la RBV tels que SRO91, il est également possible d'apporter des modifications sur le triazole, soit en modifiant l'hétérocycle en lui-même (SRO91 est un 1,2,3-triazole alors que la RBV est un 1,2,4-triazole) soit en le fonctionnalisant. Il est ainsi possible d'obtenir des dérivés de SRO91 portant la fonction carboxamide sur un atome d'azote du triazole,<sup>59</sup> ou encore différents cycles aromatiques sur le  $N^2$  par des couplages pallado-catalysés (Figure 23).<sup>70</sup>

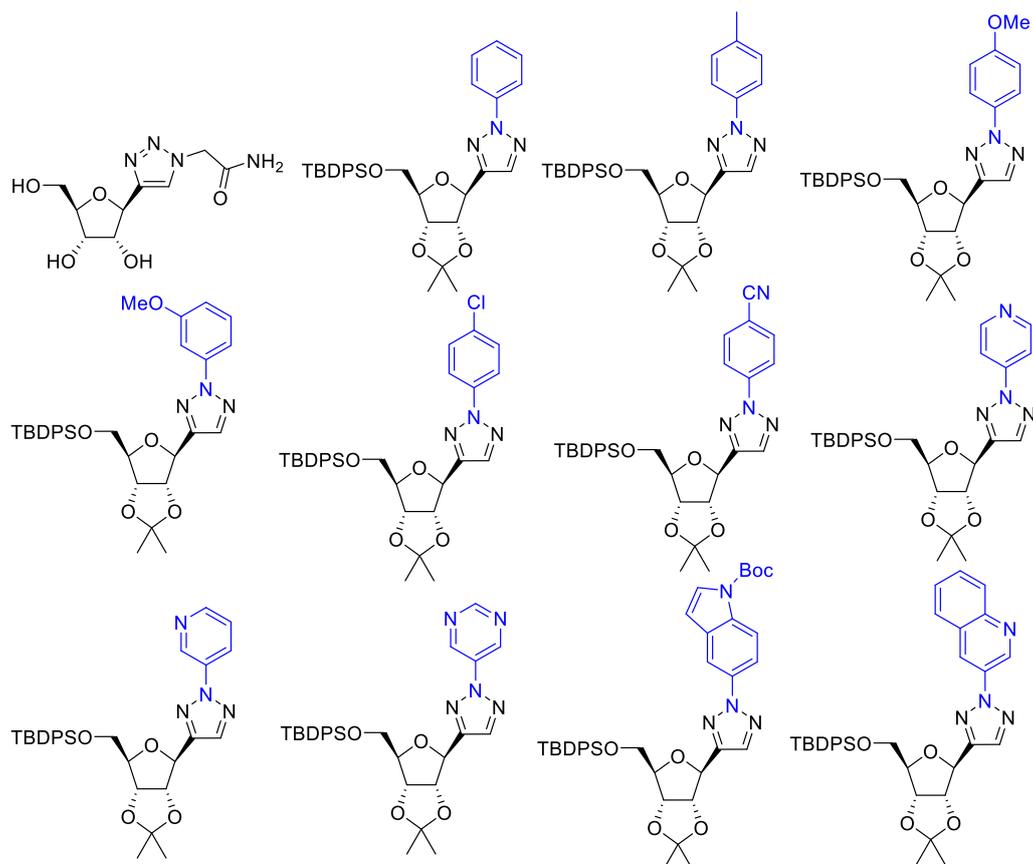


Figure 23: Dérivés de SRO91 fonctionnalisés sur le triazole

<sup>70</sup> Lopes, A. B.; Wagner, P.; Octavio, R.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Bourguignon, J.-J.; Schmitt, M.; Miranda, L. S. M. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4540–4549.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 3. Stratégie prodrogue

### 3.1. Généralités

Les prodrogues sont des dérivés ou des précurseurs de molécules bioactives, mais qui ne présentent pas d'effet thérapeutique en elle-même. La bioconversion des prodrogues en molécules actives se fait *in vivo*, par des processus biochimiques comme l'hydrolyse ou tout autre activité enzymatique, pouvant être spécifique ou non. L'utilisation d'une prodrogue peut alors permettre d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques d'un composé : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Élimination (ADME). Par exemple, les prodrogues peuvent améliorer la solubilité aqueuse d'un composé, augmenter son absorption du système digestif au système sanguin, faciliter sa pénétration cellulaire ou encore diminuer sa cytotoxicité.

Il existe deux types de prodrogues, qui diffèrent par leur modes de bioconversion (Schéma 17) :<sup>71</sup>

- Les prodrogues à « activation » ou « bioprécurseurs » subissent *in vivo* des modifications chimiques leur donnant une activité biologique. Ces modifications peuvent également correspondre à des conjugaisons telles que des phosphorylations dans le cas d'analogues de nucléosides.
- Les prodrogues à « dégradation » qui correspondent à des conjugués de la molécule active. La bioconversion implique alors l'élimination d'un agent « masquant » ou « promoiety » afin de reformer les fonctions nécessaires à l'activité biologique.

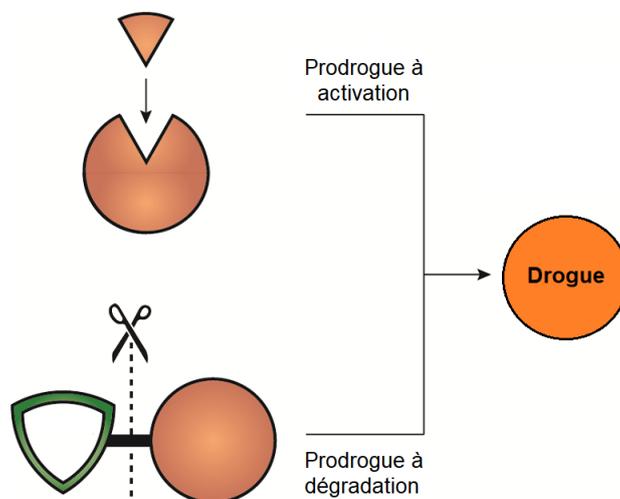


Schéma 17 : Deux types de prodrogues: à activation et à dégradation<sup>71</sup>

### 3.2. Prodrogues de type esters

Les prodrogues de type ester sont des composés se basant sur l'hydrolyse d'un lien ester par des estérases (Schéma 18). Les nombreux composés thérapeutiques possédant une fonction alcool ou acide carboxylique peuvent ainsi être protégés et libérés *in vivo* par les estérases, très présentes dans notre métabolisme. Par ailleurs, les prodrogues de type ester représentent environ la moitié des prodrogues actuellement commercialisées.

<sup>71</sup> Walther, R.; Rautio, J.; Zelikin, A. N. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 10.1016/j.addr.2017.06.013.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

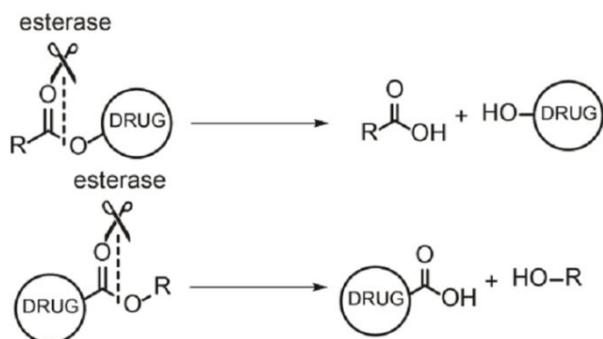


Schéma 18 : Bioconversion des prodrogues esters par les estérases<sup>71</sup>

Les antibiotiques tels que les dérivés de la pénicilline comme la pivampicilline et la bacampicilline possèdent une fonction acide carboxylique qui peut être protégée sous forme de prodrogue de type ester. La fonction acide carboxylique étant une fonction très polaire, chargée au pH physiologique, l'utilisation d'une stratégie prodrogue permet d'augmenter la solubilité de ces antibiotiques ainsi que leur absorption par voie orale. Le Tamiflu est également un exemple de succès dans l'utilisation d'une stratégie prodrogue pour un composé thérapeutique déjà commercialisé. En effet, le principe actif du Tamiflu, le carboxylate d'oseltamivir, est un inhibiteur sélectif de la neuramidase des virus influenza A et B. Si la forme carboxylate ne possède qu'une biodisponibilité orale de 5% chez l'Homme, sa forme ester éthylique (Tamiflu), plus lipophile, est rapidement absorbée par voie orale (au moins 80 %).<sup>72</sup> Après absorption, l'oseltamivir est métabolisé en sa forme active carboxylate principalement par la carboxylestérase-1 dans le foie (Schéma 19).

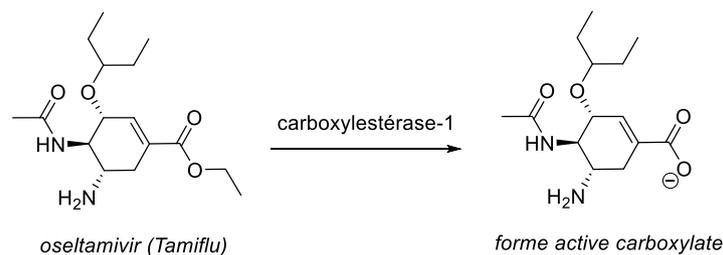


Schéma 19 : Transformation du Tamiflu en son métabolite actif

Les composés contenant des groupements hydroxyle peuvent également être utilisés sous forme de prodrogue ester après acylation avec des acides carboxyliques aliphatiques ou aromatiques, ce qui augmente leur lipophilie et donc améliore potentiellement leur pénétration cellulaire. Ainsi, le famciclovir est une prodrogue diacylée d'un agent antiviral dont la biodisponibilité orale passe de 4% pour la molécule parente à 75 % (Schéma 20).<sup>73</sup>

De plus, les composés comportant des groupements alcool peuvent également être acylés avec des acides aminés. De telles prodrogues peuvent alors devenir des substrats de transporteurs de peptides endogènes tels que PepT1. Ces modifications ont ainsi permis d'améliorer la biodisponibilité orale de l'acyclovir et du ganciclovir par 3 et 10 fois respectivement.

<sup>72</sup> Bardsley-Elliot, A.; Noble, S. *Drugs* **1999**, 58 (5), 851–860.

<sup>73</sup> Jarvest, R. L.; Sutton, D.; Vere Hodge, R. A. *Pharm. Biotechnol.* **1998**, 11, 313–343.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

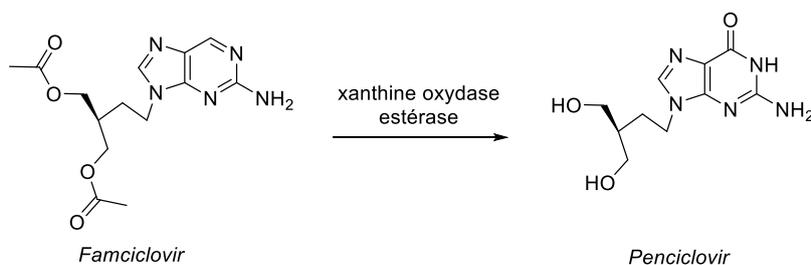


Schéma 20 : Transformation du famciclovir en sa forme active, le penciclovir

### 3.3. Prodrogues phosphate

Certaines molécules particulièrement peu solubles peuvent être délivrées sous forme de phosphate. Néanmoins, même si la forte polarité et les charges de ce groupement améliorent la solubilité, cela diminue également la pénétration cellulaire du composé. Cette stratégie ne peut donc être utilisée que dans le cas de molécules dont la cible est extracellulaire. Après l'administration, la dégradation de la prodrogue se fait par des phosphatases alcalines, des estérases non-spécifiques présentes dans l'ensemble du corps (Schéma 21).

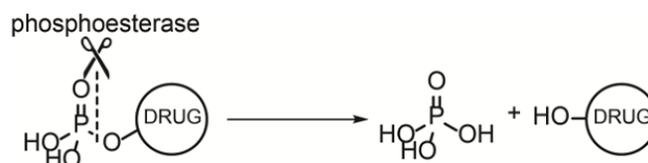


Schéma 21 : Dégradation des prodrogues phosphate<sup>71</sup>

L'utilisation de prodrogues phosphate est une stratégie qui a amené à la commercialisation de plusieurs composés, notamment le fosamprenavir, prodrogue de l'amprenavir. Ce dernier est un composé anti-VIH agissant en tant qu'inhibiteur de protéase. Cette molécule très peu soluble voit sa solubilité aqueuse augmenter d'un facteur 10 lorsque l'alcool secondaire est fonctionnalisé sous forme de phosphoester (Schéma 22).<sup>74</sup>

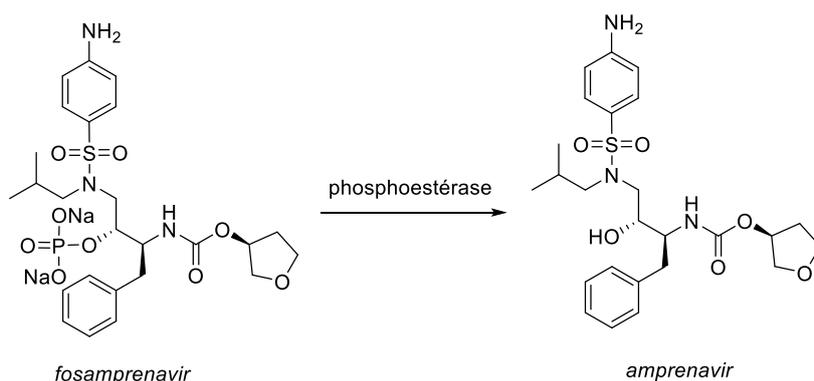


Schéma 22 : Transformation du fosamprenavir en sa forme active, l'amprenavir

<sup>74</sup> Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 677–694.

# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

## 3.4. Prodrogues de groupements phosphate et phosphonate

Les groupements phosphate et phosphonate sont parmi les sites de modifications les plus importants dans les stratégies prodrogues, notamment dans le cas des nucléosides antiviraux. En effet, certains dérivés triphosphates de nucléosides sont capables d'inhiber les polymérases virales. Pour cela, le nucléoside va subir, *in vivo*, trois phosphorylations catalysées par des phosphokinases dont la première est généralement l'étape limitante. Afin d'améliorer l'activité de ces nucléosides, l'utilisation des nucléosides monophosphate permet de s'affranchir de cette limitation. Néanmoins, le groupement phosphate étant chargé au pH physiologique, le composé ainsi obtenu présente des problèmes de pénétration cellulaire. Différentes stratégies prodrogues des dérivés monophosphate ont ainsi vu le jour, notamment *via* la formation de phosphoesters et phosphoramidates.<sup>75,76</sup>

### 3.4.1. Esters d'acyloxyalkyle

Alors que les phosphoesters d'alkyle simples ne sont pas utilisés dans des stratégies prodrogues du fait de leur trop grande stabilité, les esters d'acyloxyalkyle sont nombreux. Dans ce cas, l'hydrolyse enzymatique du carboxylate ou du carbonate par une estérase génère un intermédiaire hydroxyméthyle qui, rapidement, se dégrade en perdant une molécule de formaldéhyde pour donner le monoester. Ce dernier est alors métabolisé de la même manière ou directement par une phosphodiéstérase. Un des groupements les plus utilisés dans cette stratégie est certainement le pivaloyloxyméthyle (POM, Schéma 23).

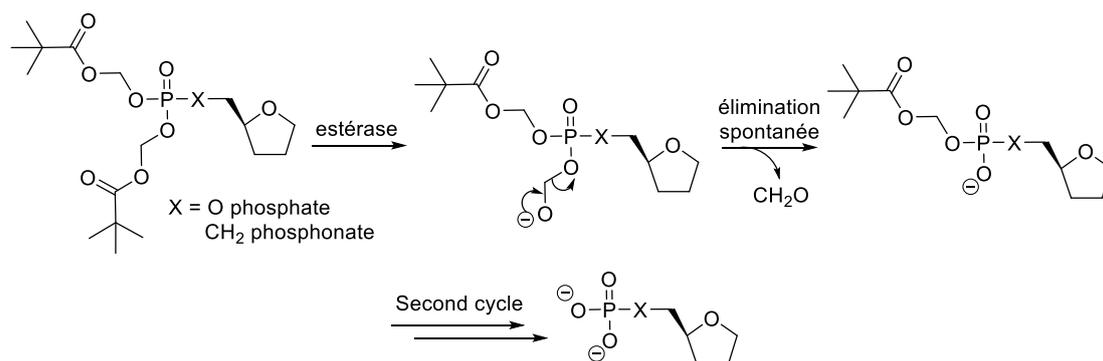


Schéma 23 : Métabolisme des prodrogues bisPOM

Cette stratégie employée par Farquhar *et al.*<sup>77</sup>, avec la bis(POM) 2'-désoxy-5-fluorouridine 5'-monophosphate (FdUMP), se concrétise avec la commercialisation de l'adefovir dipivoxil (Figure 24) comme traitement du VIH. Ainsi, la biodisponibilité orale chez le rat a été augmentée avec l'utilisation de prodrogue, passant de 7,8 à 17,3 %. De même, des tests *in vitro* ont montré une amélioration de l'activité avec une IC<sub>50</sub> de 0,6 µM contre 119 µM pour la 9-[2-(phosphonométhoxy)éthoxy]adénine (PMEA).<sup>78</sup>

Son équivalent carbonate, l'isopropoxyloxyméthylcarbonate (POC) a également été utilisé avec succès avec le tenofovir disoproxil (Figure 24) pour le traitement du VHB (IC<sub>50</sub> de 3 nM). Dans le cas du groupement POC, le carbonate est hydrolysé par une estérase donnant un carboxylate qui, étant

<sup>75</sup> Hecker, S. J.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328–2345.

<sup>76</sup> Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10400–10410.

<sup>77</sup> Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (23), 3902–3909.

<sup>78</sup> Starrett, J. E. J.; Tortolani, D. R.; Russell, J.; Hitchcock, M. J. M.; Whiterock, V.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (12), 1857–1864.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

instable, subit deux dégradations successives à savoir une décarboxylation puis l'élimination d'une molécule de formaldéhyde.

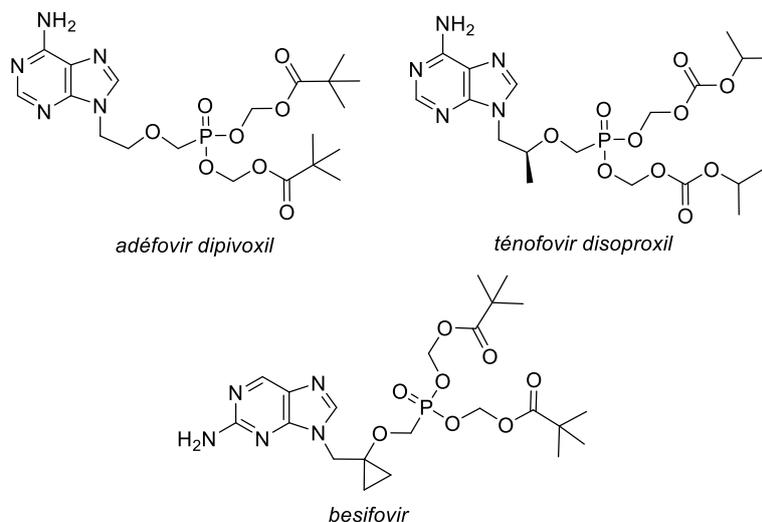


Figure 24: BisPOM ou bisPOC commercialisés ou en développement

Le besifovir est un autre exemple de prodrogue de phosphonate de nucléotide de type bisPOM qui présente une activité contre le VHB (Figure 24).<sup>79</sup> Le Besifovir est absorbé et rapidement dégradé en phosphonate de nucléotide qui est ensuite oxydé en position C6 par des enzymes comme la xanthine oxydase. Le dérivé triphosphate du métabolite oxydé est alors capable d'inhiber la réplication de l'ADN viral.

### 3.4.2. S-acylthioesters

Tout comme les esters d'acyloxyalkyle, les prodrogues S-acylthioesters (SATE) ont beaucoup d'applications dans la délivrance de drogues phosphates ou phosphonates. Leur dégradation est effectuée par des estérases donnant un ester de thioéthyle intermédiaire qui se décompose par élimination de thiirane (Schéma 24).

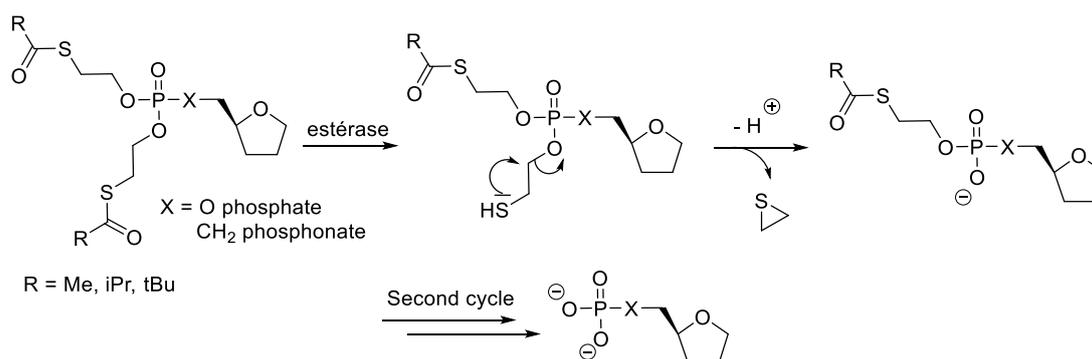


Schéma 24 : Activation des SATE

<sup>79</sup> Choi, J.-R.; Cho, D.-G.; Roh, K. Y.; Hwang, J.-T.; Ahn, S.; Jang, H. S.; Cho, W.-Y.; Kim, K. W.; Cho, Y.-G.; Kim, J.; Kim, Y.-Z. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (11), 2864–2869.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

L'équipe de Jean-Louis Imbach est à l'origine de cette stratégie de protection des nucléosides monophosphate et leurs analogues.<sup>80</sup> Il a été démontré que le groupement SATE est relativement stable dans le milieu extracellulaire mais se décompose rapidement dans les cellules étudiées, en faisant un excellent candidat pour la délivrance de molécules actives dans le milieu intracellulaire.

Les prodrogues SATE ont été largement appliquées aux monophosphates de didésoxyuridine, didésoxyadénine, azidothymidine, acyclovir et d'autres.<sup>81</sup>

Ainsi, des prodrogues SATE de la 2',3'-didésoxyadénosine (ddA) ont montré une activité antivirale dans des cellules infectées par le VIH ou le VIS.<sup>82</sup> Cette stratégie a même montré son efficacité *in vivo*, puisqu'une prodrogue bis(*t*BuSATE) de l'acyclovir (ACV) a montré une meilleure activité anti-VHB que son nucléoside parent sur des poussins, après administration par voie orale ou intrapéritonéale (IC<sub>50</sub> de 0,6 nM contre 100 nM).<sup>83</sup> Cette stratégie a ensuite été perfectionnée par l'introduction d'un groupement hydroxyle sur la chaîne acyle de *t*BuSATE. Cette modification permet de diminuer le taux d'hydrolyse du phosphotriester dans le milieu biologique. Ainsi, le bis(*HOt*BuSATE) phosphotriester de l'azidothymidine (AZT) s'est montré capable de traverser la membrane de cellules Caco-2, généralement employée comme modèle d'absorption intestinale. Cette propriété indique que cette protection serait compatible avec une administration par voie orale (Figure 25).<sup>84</sup>

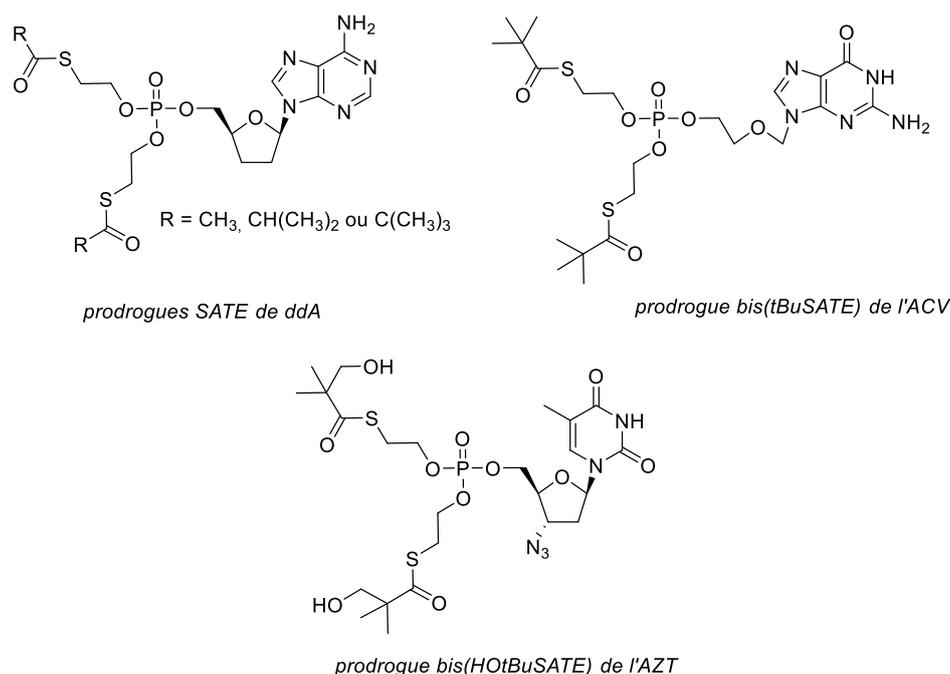


Figure 25: Exemples de prodrogues bis(SATE) de nucléosides

<sup>80</sup> Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3 (12), 2521–2526.

<sup>81</sup> Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Périgaud, C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, 4 (4), 395–408.

<sup>82</sup> Shirasaka, T.; Chokekijchai, S.; Yamada, A.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Mitsuya, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39 (11), 2555–2559.

<sup>83</sup> Hantz, O.; Périgaud, C.; Borel, C.; Jamard, C.; Zoulim, F.; Trépo, C.; Imbach, J. L.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **1999**, 40 (3), 179–187.

<sup>84</sup> Shafiee, M.; Deferme, S.; Villard, A. L.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Lioux, T.; Pompon, A.; Varray, S.; Aubertin, A. M.; van Den Mooter, G.; Kinget, R.; Périgaud, C.; Augustijns, P. *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90 (4), 448–463.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

Par la suite, Peyrottes *et al.*<sup>85</sup> ont développé des dérivés *S*-acyl-2-thioéthyl aryl phosphotriesters de l'AZT en utilisant un groupement *t*BuSATE et un ester de L-tyrosine. Afin d'éviter que la forme zwitterionique (carboxylate et ammonium) de l'acide aminé, n'empêche la pénétration cellulaire, les deux fonctions ont été modifiées : réduction en alcool ou amidification pour le carboxylate; protection de l'amine sous forme d'un carbamate (Figure 26).

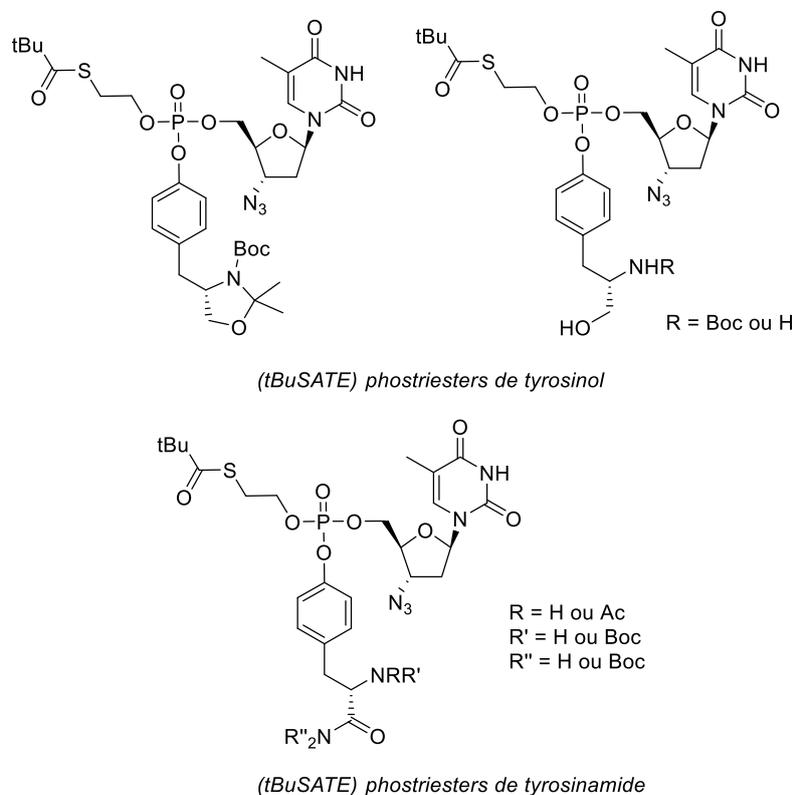


Figure 26: *S*-acyl-2-thioéthyl aryl phosphotriesters de l'AZT développés par Peyrottes *et al.*

Ces composés ont montré une activité anti-VIH significative (EC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire) sur des cellules CEM/TK<sup>-</sup> contrairement au nucléoside parent, l'AZT. Le mécanisme proposé pour la dégradation de ces prodrogues fait intervenir successivement une estérase et une hydrolyse catalysée par une phosphodiesterase.

### 3.4.3. Esters d'aryle

Dans l'optique de s'affranchir de la formation de sous-produits tels que le formaldéhyde ou le thiirane, la communauté scientifique s'est attachée à développer de nouvelles prodrogues de phosphate ou phosphonate. Un premier composé possédant un phosphonate protégé par deux esters de phényle a ainsi été rapporté.<sup>86</sup> Ce dernier a montré une activité en tant qu'inhibiteur d'endopeptidase et l'utilisation d'esters de phényle a permis d'améliorer la biodisponibilité orale tout en assurant la bioconversion en composé actif *in vivo*. Il est à noter que, lors de l'administration orale chez le rat, la prodrogue possédant des aromatiques non substitués a donné des niveaux importants de composé actif dans le plasma, issus de sa dégradation précoce. Ces niveaux ont diminué lors de l'utilisation d'aromatiques possédant des groupements électrodonneurs (9,5 nM pour des groupements *m*-

<sup>85</sup> Peyrottes, S.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Périgaud, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 782–793.

<sup>86</sup> De Lombaert, S.; Erion, M. D.; Tan, J.; Blanchard, L.; El-Chehabi, L.; Ghai, R. D.; Sakane, Y.; Berry, C.; Trapani, A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (4), 498–511.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

méthoxyphényle contre 427,5 nM pour des phényles non-substitués, après administration par voie orale de 30 mg/kg chez le rat).

D'autres groupes ont rapporté l'application d'esters de diaryle comme des dérivés de PMEAs dont le diposphoester a montré une biodisponibilité orale supérieure au nucléoside parent (Figure 27) (passant de 0 % pour la PMEAs à 10 % pour sa prodrogue).<sup>87</sup>

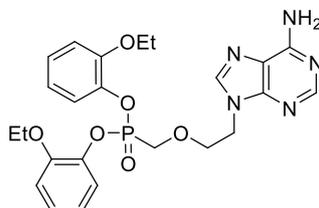


Figure 27: Structure du bis(*O*-éthoxyphényl) PMEAs

### 3.4.4. Phosphoramidates et phosphonamidates d'aryle

L'utilisation de prodrogues phosphoramidates d'aryle est certainement la stratégie prodrogue la plus employée à l'heure actuelle pour délivrer des dérivés monophosphate de nucléosides. Cette technologie, appelée ProTide pour Prodrogue de nucléoTide, a été développée par l'équipe du Pr. McGuigan dans les années 1990.<sup>88,89</sup> Cette stratégie repose sur la protection du groupement phosphate ou phosphonate sous la forme d'un ester arylique et d'un phosphoramidate formé à partir d'un acide  $\alpha$ -aminé protégé sous forme d'ester.

Le mécanisme de dégradation de la prodrogue fait intervenir une estérase (cathepsine) libérant la fonction carboxylate de l'acide  $\alpha$ -aminé. Le composé ainsi obtenu subit une cyclisation intramoléculaire avec élimination de phénol, donnant un intermédiaire cyclique à cinq chaînons. Cet intermédiaire est spontanément hydrolysé pour donner un acide phosphoramidique. Le phosphoramidate est alors hydrolysé (catalyse enzymatique par une phosphoramidase ou simple hydrolyse acide) pour donner la forme monophosphate du nucléoside (Schéma 25).<sup>76</sup>

Des études de relation structure-activité ont démontré que bien que la L-alanine soit préférée en tant qu'acide aminé, l' $\alpha,\alpha$ -diméthylglycine et d'autres acides aminés non-naturels entraînent également la dégradation de la prodrogue en dérivé monophosphate. Des modifications sur le groupement aryle ont aussi été investiguées montrant que les composés les plus lipophiles possèdent une meilleure activité dans des tests *in vitro*, probablement due à une amélioration de la pénétration cellulaire.<sup>75</sup>

<sup>87</sup> Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (8), 1372–1379.

<sup>88</sup> McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J. *Antiviral Res.* **1992**, *17* (4), 311–321.

<sup>89</sup> McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; de Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048–1052.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

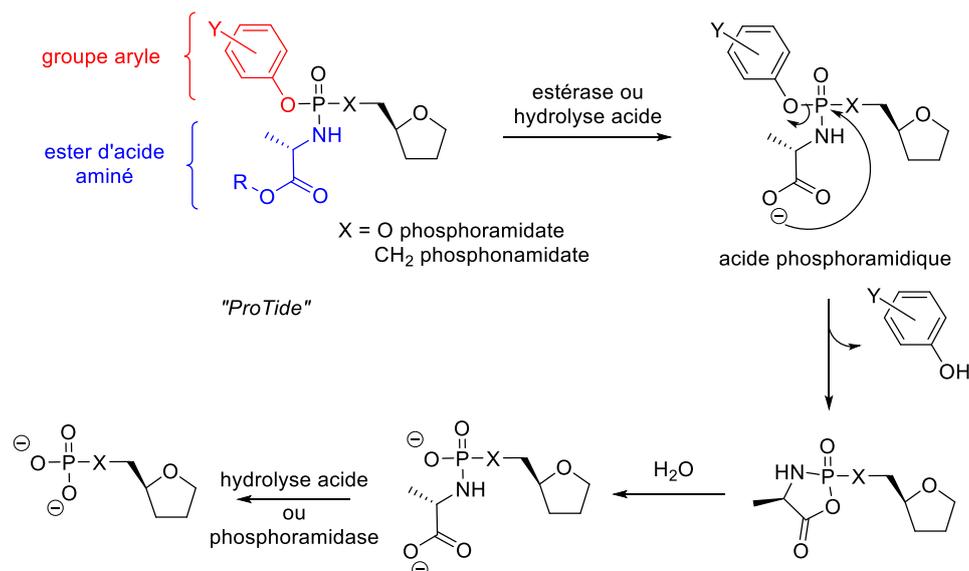


Schéma 25 : Mécanisme suppose de dégradation *in vivo* des ProTides

Si l'étude initiale menée par McGuigan *et al.* portait uniquement sur un dérivé de l'AZT, beaucoup d'autres composés ont ensuite été développés dont des dérivés de didésoxythymidine d4T (stampidine)<sup>90</sup> ou de la 4'-azidouridine. Cette stratégie a mené à de nombreuses applications puisque plusieurs dérivés monophosphate de nucléosides utilisant la technologie ProTide sont en étude clinique ou déjà commercialisés tels que le sofosbuvir, traitement de référence actuel des infections au VHC (Figure 28).<sup>91</sup>

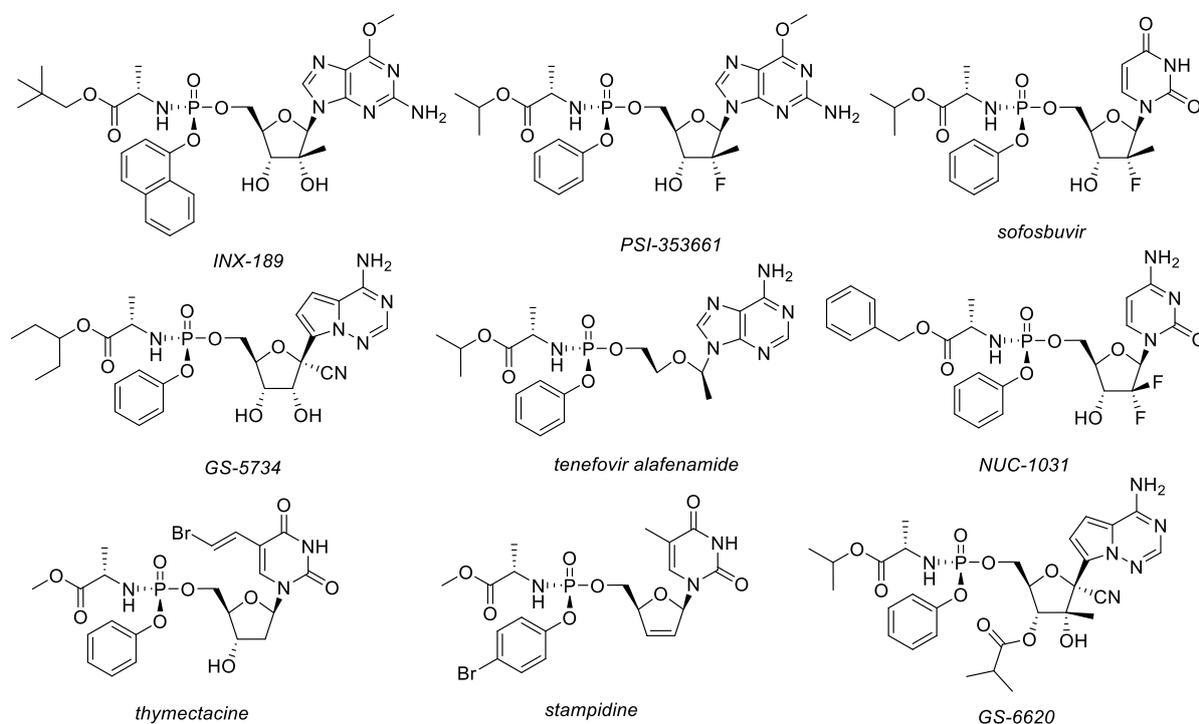


Figure 28: Exemples de ProTides étudiés en phase clinique ou commercialisés

<sup>90</sup> McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (8), 1748–1753.

<sup>91</sup> Mehellou, Y. *ChemMedChem* **2016**, 1114–1116.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 3.4.5. Phosphoesters cycliques de 1-aryl-1,3-propanyle

Les prodrogues de phosphate ou phosphonate sous forme d'esters cycliques de 1-aryl-1,3-propanyle sont des prodrogues initialement développées pour se dégrader uniquement dans le foie. Cette technologie, appelée HepDirect, a été pensée pour apporter une bonne biodisponibilité orale, une dégradation rapide par une unique enzyme présente dans le foie, une bonne stabilité dans l'eau, le sang et les tissus non-hépatiques ainsi qu'une faible toxicité induite par de possibles sous-produits.<sup>92</sup>

En effet, la dégradation des prodrogues HepDirect se fait grâce au cytochrome P<sub>450</sub> (CYP450), enzyme présente uniquement dans le foie, capable d'oxyder un carbone benzylique en  $\alpha$  de l'oxygène du phosph(on)ate. L'action du CYP450 va donc générer un hémiacétal cyclique qui subit spontanément une ouverture de cycle suivie d'une  $\beta$ -élimination pour donner le dérivé monophosph(on)ate (Schéma 26).<sup>75</sup>

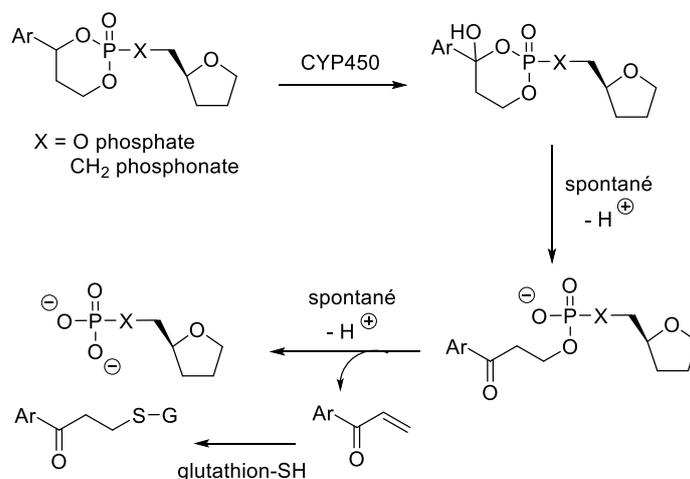


Schéma 26 : Dégradation des prodrogues HepDirect par CYP450

Bien que le produit de  $\beta$ -élimination, une aryl-vinyl-cétone, puisse présenter une certaine toxicité, le glutathion présent dans le foie permet de l'éliminer par conjugaison.

A l'heure actuelle, deux prodrogues HepDirect de nucléosides sont entrés en phase clinique : le pradefovir et le MB07133 (Figure 29).<sup>76</sup>

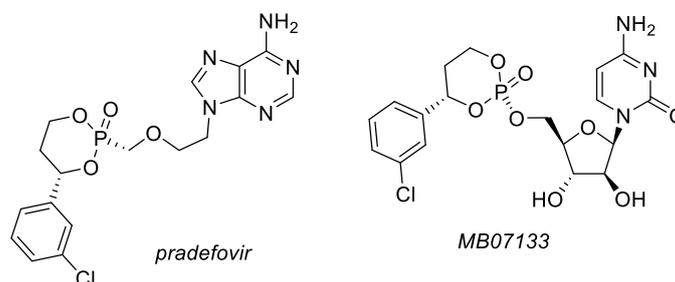


Figure 29: Structures de deux prodrogues HepDirect en phase clinique

Le pradefovir est une prodrogue HepDirect du phosphonate de l'adefovir, composé anti-VHB. L'utilisation de la technologie HepDirect permet ainsi de cibler l'action du composé au niveau du foie et de s'affranchir de certains effets secondaires notamment dus à la néphrotoxicité du composé. En

<sup>92</sup> Erion, M. D.; Reddy, K. R.; Boyer, S. H.; Matelich, M. C.; Gomez-Galeno, J.; Lemus, R. H.; Ugarkar, B. G.; Colby, T. J.; Schanzer, J.; van Poelje, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (16), 5154–5163.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

effet, dans une étude chez le rat, il a été montré que, grâce à l'utilisation de la prodrogue HepDirect, l'accumulation d'adefovir dans le foie a augmenté d'un facteur 12 alors que celle dans les reins a diminué.<sup>93</sup> De plus la biodisponibilité de l'adefovir est améliorée, passant de 31 % à 42 % dans le cas du pradefovir.

### 3.5. Prodrogues à enzymes ciblées

Les prodrogues à enzymes ciblées sont des composés utilisés dans une stratégie prodrogue particulière (Enzyme Prodrug Therapy ou EPT). Dans cette stratégie, les prodrogues sont imaginées de manière à ce que leur bioconversion soit effectuée par une enzyme spécifique, localisée principalement où le composé exerce son activité biologique. De cette manière, la drogue est libérée spécifiquement proche de sa cible. Contrairement aux prodrogues « classiques », l'EPT présente une libération de composé actif moins importante mais qui reste site-spécifique.

Afin de garder une bonne spécificité, les enzymes ciblées sont des enzymes faiblement présentes dans le corps humain ou encore des enzymes exogènes, elles-mêmes introduites par l'action d'anticorps spécifiques (antibody-directed-enzyme-prodrug-therapy ou ADEPT) ou suite à l'expression d'un gène introduit par transfection (gene-directed-enzyme-prodrug-therapy GDEPT ou thérapie par gène suicide).

Une cible intéressante pour une stratégie EPT est la thymidine kinase virale. En effet, les nombreux nucléosides antiviraux agissant sous leur forme triphosphate sont d'excellents substrats de cette enzyme qui va catalyser la première phosphorylation. L'acyclovir, par exemple, est phosphorylé par la thymidine kinase du virus de l'herpès introduite dans les cellules par le virus (Schéma 27). L'enzyme virale étant beaucoup plus active que son homologue humaine, les niveaux d'acyclovir triphosphate sont plus importants dans les cellules infectées que dans les cellules saines. La très forte activité de la thymidine kinase virale ainsi que l'existence de nombreux nucléosides nécessitant cette enzyme pour agir en tant qu'agent antiviral en font une excellente candidate pour des stratégies GDEPT.<sup>71</sup>

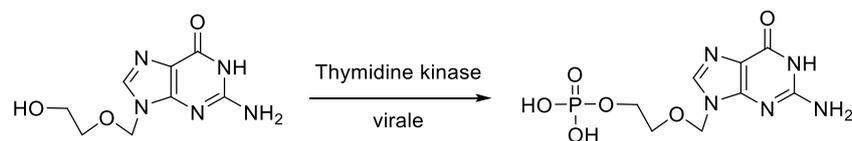


Schéma 27 : Bioconversion de l'acyclovir en acyclovir monophosphate par la thymidine kinase virale

Le système le plus approprié pour l'EPT est probablement l'utilisation de prodrogues glucuroniques et leur enzyme correspondante, la  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Gluc). L'ajout d'un motif glucosidique à une drogue diminue généralement sa pénétration cellulaire du fait de la forte polarité du sucre (Schéma 28). Néanmoins, la faible concentration en  $\beta$ -Gluc dans le corps humain (présente dans les lysosomes) fait que son utilisation diminue fortement la toxicité d'un composé (l'amélioration de l'IC<sub>50</sub> allant jusqu'à un facteur 1000).<sup>71</sup>

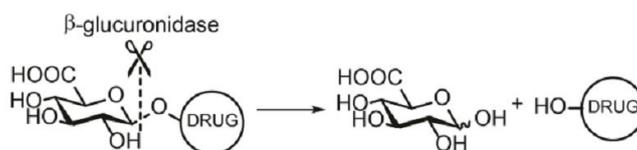


Schéma 28 : Bioconversion de prodrogue comportant un motif glucuronique<sup>71</sup>

<sup>93</sup> Reddy, K. R.; Matelich, M. C.; Ugarkar, B. G.; Gómez-Galeno, J. E.; DaRe, J.; Ollis, K.; Sun, Z.; Craigo, W.; Colby, T. J.; Fujitaki, J. M.; Boyer, S. H.; van Poelje, P. D.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 666–676.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

De la même manière, des composés peuvent être fonctionnalisés sous forme de glucosides ou galactosides (Schéma 29). L'enzyme ciblée par la stratégie EPT est alors une  $\beta$ -glucosidase ou  $\beta$ -galactosidase, très abondantes dans le foie, la rate, les cellules intestinales et les lymphocytes. Les prodrogues glycosidiques présentent une meilleure pénétration cellulaire que leurs homologues glucuroniques et sont capables de cibler sélectivement des tumeurs. En effet, ces prodrogues sont capables d'interagir avec des transporteurs de glucose insulino-dépendants (GLUT-1) surexprimés à la surface des cellules cancéreuses du fait de la forte demande énergétique de ces cellules en prolifération rapide.

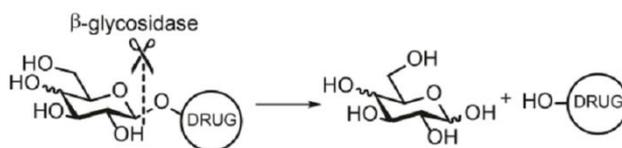


Schéma 29 : Bioconversion de prodrogues glycosidiques<sup>71</sup>

### 4. Stratégie de vectorisation

La vectorisation est une stratégie qui consiste à modifier un composé actif pour le délivrer de manière plus efficace et plus sûre. Le but est donc généralement d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques du composé (ADME) tout en le protégeant de la dégradation induite par le métabolisme. Il est ainsi possible d'utiliser des vecteurs nanoparticules (liposomes, polymères) ou de conjuguer la molécule active à des biomolécules particulières (peptides, glycosides, protéines).

Les stratégies de vectorisation sont préférentiellement appliquées à des biomolécules de taille importante tels que les oligonucléotides. Dans le cas des nucléosides, bien qu'une stratégie prodrogue soit généralement privilégiée, il existe quelques exemples traitant de ces applications. En effet, les propriétés communes entre ces deux types de composés telles que la présence de groupements phosphate chargés négativement, permettent d'envisager l'utilisation de vecteurs ou de bioconjugués pour la délivrance de nucléosides.

#### 4.1. Vecteurs d'oligonucléotides

Les oligonucléotides (ONs) sont des composés largement développés comme agents thérapeutiques dans de nombreuses pathologies notamment dans des traitements anticancéreux. Il existe plusieurs types d'ONs : les oligonucléotides antisens (asON), les petits ARN interférents (siRNA) et les micro-ARN (miRNA).<sup>94</sup> Les asONs agissent sur l'ARN messager par la formation de duplex, ce qui a pour effet d'activer la ribonucléase H (catalysant la dégradation de l'ARN) ou l'arrêt de la traduction et donc de la répllication cellulaire. Les siRNA, quant à eux, interagissent avec la protéine Argonaute-2 pour former un complexe protéique RISC (pour *RNA-induced silencing complex*) qui va couper l'ARN messager ciblé.

Ces composés étant des oligomères de nucléotides, ils sont fortement chargés au pH physiologique du fait des groupements phosphate et ont ainsi une très mauvaise pénétration cellulaire. De plus, leur sensibilité à certaines enzymes telles que les nucléases minimise fortement leur biodisponibilité. Ces limitations ainsi que le fait que les cibles des ONs soient intracellulaires, en font d'excellents candidats pour des stratégies de vectorisation, généralement basées sur des nanoparticules de deux types : les liposomes et les polymères.

<sup>94</sup> Yu, B.; Zhao, X.; Lee, L. J.; Lee, R. J. *AAPS J.* **2009**, *11* (1), 195–203.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 4.1.1. Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques (NPLs) sont des complexes formés entre des ONs anioniques et des lipides cationiques (Figure 30). Ce type de vecteur est certainement le plus utilisé dans le cas des ONs mais si leur action est très bénéfique *in vitro*, leurs interactions avec les opsonines (protéines se liant à des antigènes entraînant leur phagocytose) et leur élimination rapide par les phagocytes du système réticulo-endothélial rendent leur utilisation *in vivo* difficile.<sup>95</sup> L'utilisation *in vivo* des NPLs nécessite donc une fonctionnalisation par un polymère neutre tel que les polyéthylène glycols (PEG) pour minimiser l'élimination du vecteur par les phagocytes.

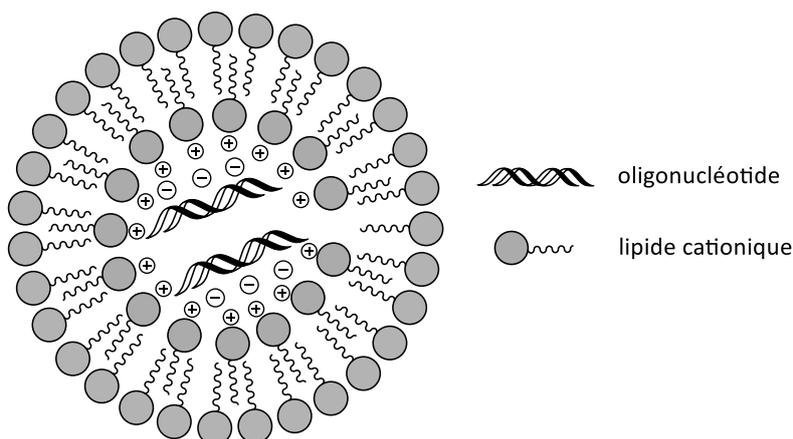


Figure 30: Structure de nanoparticule lipidique complexée par un ON

Du fait de leur taille (100-200 nm), les NPLs ne peuvent être absorbés qu'aux sites où la barrière endothéliale est plus perméable, à savoir le foie, la rate ainsi que certaines tumeurs.<sup>95</sup> Par conséquent, la plupart des études portant sur des ONs délivrés par des NPLs portent sur des maladies du foie dont l'amylose de la transthyrétine, la thrombophilie, le cancer du foie et les troubles du métabolisme des lipides.

L'action des NPLs fait intervenir une pénétration cellulaire par endocytose. Une fois dans les endosomes, les lipides cationiques interagissent avec les lipides anioniques de la membrane et modifient sa structure en formant une phase lipidique appelée phase hexagonale inverse. Cela entraîne la perméabilisation de la membrane ainsi que la dissolution de la particule, libérant ainsi l'ON dans le cytosol. Il convient de noter que si l'interaction lipides cationiques/anioniques est responsable de la libération du composé, elle induit parfois une toxicité.

De nombreux siRNA utilisant des NPLs sont actuellement en développement clinique. Ainsi, l'utilisation de NPLs de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane (DOTAP, Figure 31) de siRNA sur des tumeurs *in vivo* a permis d'observer une efficacité jusqu'à 10 fois supérieure à l'injection d'ON seuls.<sup>96</sup>

<sup>95</sup> Juliano, R. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (14), 6518–6548.

<sup>96</sup> Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 108–119.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

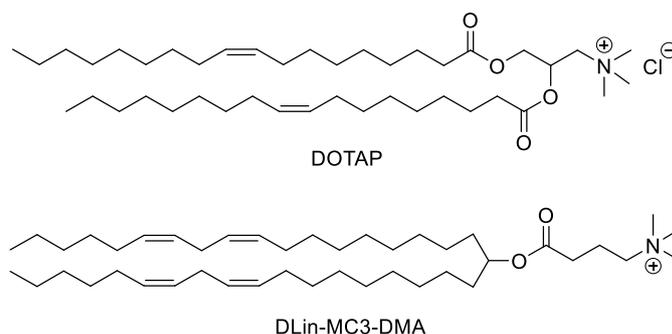


Figure 31: Structure du DOTAP et DLin-MC3-DMA

La deuxième génération de NPLs a permis d'apporter une meilleure efficacité tout en diminuant la toxicité du vecteur. Utilisant des NPLs à base de DLin-MC3-DMA, le vecteur ALN-TTR02 (aussi appelé patisiran) cible la transthyréline (TTR) et a été étudié pour le traitement de la neuropathie amyloïde. En phase clinique, l'administration par injections intraveineuses de l'ALN-TTR02 a permis de réduire la présence de TTR dans le sérum de 85 %.<sup>97</sup>

### 4.1.2. Nanovecteurs polymères

De nombreux vecteurs polymères sont également utilisés pour la délivrance d'oligonucléotides. Il convient d'ailleurs de noter que la première utilisation de siRNA pour le traitement du cancer impliquait une nanoparticule de poly-cyclodextrine.<sup>95</sup>

D'autres nanovecteurs polymères ont ensuite été développés tels que le poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA). Bien que PLGA soit un polymère anionique, il est possible de fonctionnaliser ses chaînes latérales par des groupements cationiques capables de complexer des ONs.

Les micelles polymériques ou nanoparticules « core-shell » sont également un système courant de délivrance des ONs. Ces structures sont formées par auto-assemblage de polymères amphiphiles en milieu aqueux. Généralement, un copolymère à 3 blocs est utilisé, incluant une portion hydrophobe pour l'auto-assemblage, une partie cationique pour complexer les ONs et un polymère neutre comme le PEG pour protéger le vecteur du métabolisme. Ainsi, des études récentes font état d'un nanovecteur hybride composé d'un « cœur » PLGA et d'une enveloppe lipidique pegylée. L'utilisation de ce système a montré d'excellents résultats quant à la délivrance de siRNA dans des tumeurs xénogreffées chez le rat (Figure 32).<sup>98</sup>

<sup>97</sup> Wittrup, A.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (9), 543–552.

<sup>98</sup> Zhu, X.; Xu, Y.; Solis, L. M.; Tao, W.; Wang, L.; Behrens, C.; Xu, X.; Zhao, L.; Liu, D.; Wu, J.; Zhang, N.; Wistuba, I. I.; Farokhzad, O. C.; Zetter, B. R.; Shi, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (25), 7779–7784.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

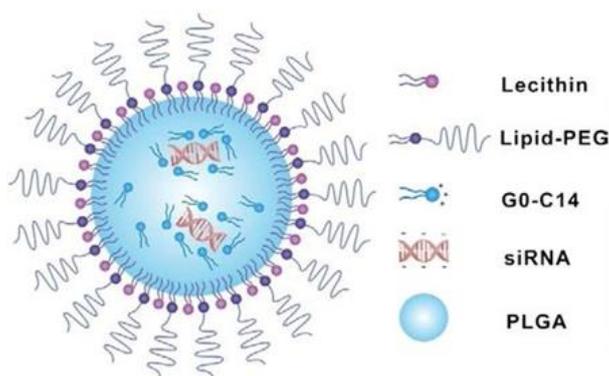


Figure 32: Nanoparticule hybride PLGA/lipides pegylés permettant la délivrance de siRNA<sup>98</sup>

Les nanohydrogels sont un autre type de vecteurs d'ONs. Ces nanoparticules comportent un réseau polymérique piégeant des molécules d'eau et où les ONs peuvent facilement être incorporés (Figure 33). Il est intéressant de noter qu'il est possible de moduler la cinétique de délivrance de l'ON en jouant sur le degré de branchement du réseau. Ainsi, un copolymère poly(méthacrylate de pentafluorophényle)-poly[méthacrylate de *O*-méthyltri(éthylène glycol)] étudié par Nuhn *et al.*,<sup>99</sup> est capable de s'auto-assembler puis d'incorporer des siRNA dans son réseau polymérique. Des expériences par microscopie à fluorescence ont également pu mettre en évidence la pénétration cellulaire du composé (sur cellules RBE4).

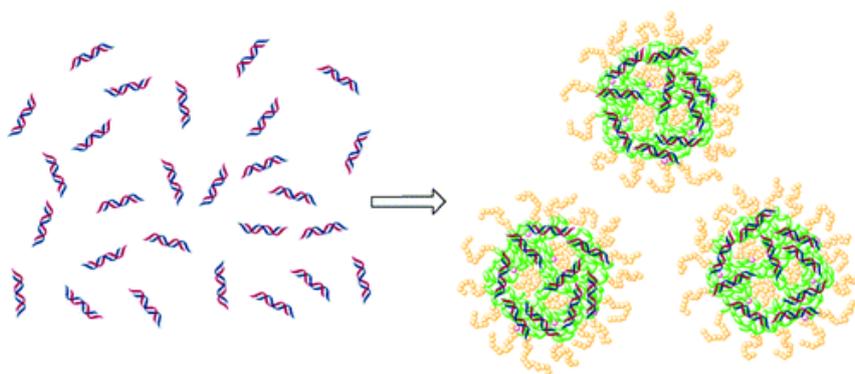


Figure 33: Incorporation de siRNA dans le réseau polymérique d'un nanohydrogel<sup>99</sup>

D'autres systèmes utilisent un complexe entre un ON et les polyéthylène-imines (PEI). Les PEI sont des polymères linéaires ou branchés comportant des fonctions amine pouvant complexer facilement les ON (Figure 34). La présence de ces amines permet également au polymère d'exercer un effet de « pompe à protons ». En effet, ces fonctions sont capables, à pH acide, de se protoner dans l'endosome ou le lysosome, ce qui nécessite un transport accru de protons et de chlorures par la V-ATPase entraînant l'accumulation d'eau, le gonflement et enfin la rupture de l'organite. Si cette propriété fait des vecteurs PEI un système de délivrance des ONs efficace, leur inconvénient majeur reste leur faible biodégradation.

<sup>99</sup> Nuhn, L.; Hirsch, M.; Krieg, B.; Koynov, K.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Helm, M.; Zentel, R. *ACS Nano* **2012**, 6 (3), 2198–2214.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

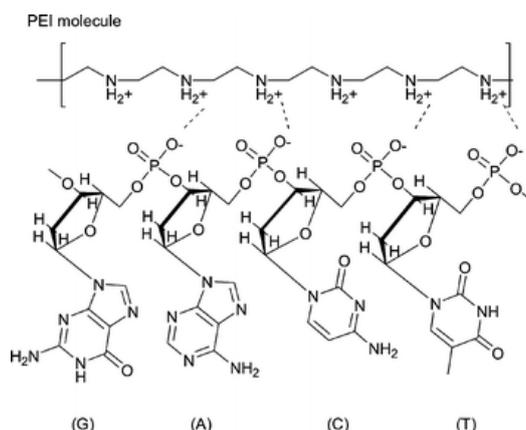


Figure 34: Interaction entre ONs et polymère linéaire de PEI<sup>100</sup>

Enfin, les dendrimères sont des polymères branchés qui peuvent également être utilisés pour la délivrance de composés biologiquement actifs. En contrôlant le degré de branchement, il est possible de préparer différentes « générations » de dendrimères présentant des tailles et un nombre de fonctions réactives différents. Les poly(amidoamines) (PAMAMs) sont probablement les dendrimères les plus utilisés pour la délivrance d'ONs (Figure 35). Comme les PEI, elles sont capables d'exercer un effet « pompe à protons » important, facilitant la délivrance d'ONs dans le cytosol. Néanmoins, leur faible biodégradation ainsi que leurs interactions non-spécifiques avec des protéines induisent une certaine toxicité lors de l'utilisation *in vivo*.

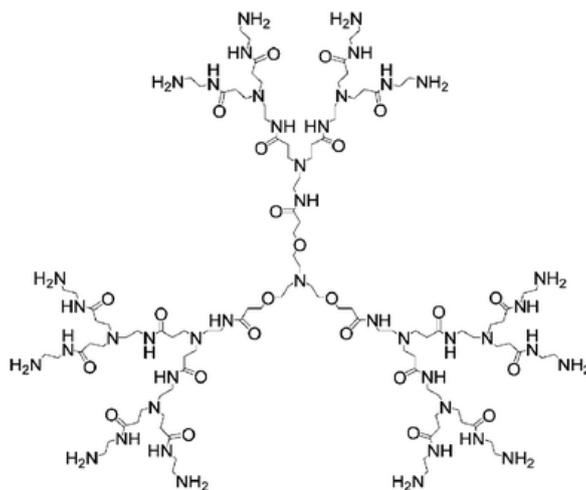


Figure 35: Structure d'un dendrimère PAMAM de deuxième génération comportant un cœur triéthanolamine<sup>101</sup>

### 4.2. Vecteurs de nucléosides

Bien qu'il existe moins d'exemples dans la littérature que pour les oligonucléotides, les nucléosides et leurs analogues peuvent également être délivrés par des nanovecteurs. Comme pour la stratégie prodrogue, l'utilisation de tels systèmes permet de s'assurer d'une meilleure disponibilité et d'une toxicité réduite à la fois pour les nucléosides et pour leur forme triphosphate généralement active.<sup>102</sup>

<sup>100</sup> McBain, S. C.; Yiu, H. H. P.; El Haj, A.; Dobson, J. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2561–2565.

<sup>101</sup> Zhou, J.; Wu, J.; Hafdi, N.; Behr, J.-P.; Erbacher, P.; Peng, L. *Chem. Commun.* **2006**, *0* (22), 2362–2364.

<sup>102</sup> Hillaireau, H.; Le Doan, T.; Couvreur, P. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (9/10), 2608–2617.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

### 4.2.1. Nanoparticules poly(alkylcyanoacrylate)

Les poly(alkylcyanoacrylates) (PACA) sont parmi les polymères biodégradables les plus utilisés comme nanovecteurs (Figure 36). Des nanosphères de PACA peuvent ainsi être préparées par polymérisation en émulsion avec l'addition de monomère cyanoacrylate à une solution acide de drogue et de surfactant/agent stabilisant. La polymérisation est alors initiée par attaque nucléophile (polymérisation anionique ou cationique) et continue spontanément. De cette manière, le composé actif est incorporé dans le réseau polymérique. Néanmoins, dans certains cas, l'association de nucléosides ou de leurs analogues et de nanoparticules de PACA entraîne l'inactivation du composé due à la création de liaison covalente entre la drogue et le polymère.

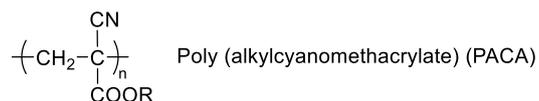


Figure 36: Structure chimique des PACA

Lors d'injections intraveineuses, les nanoparticules de PACA sont généralement absorbées par le foie, la rate et la moelle osseuse. Dans ces tissus, le nanovecteur est généralement éliminé *via* les macrophages du système réticulo-endothélial. De fait, leur potentiel en tant que nanovecteur ciblant les macrophages pour la délivrance d'agent anti-VIH a suscité beaucoup d'intérêt. Ainsi, Löbenberg *et al.*<sup>103</sup> ont étudié la distribution de l'AZT délivrée par des nanoparticules de PACA. Des nanosphères de poly(hexylcyanoacrylate) (PHCA) incorporant de l'AZT (50 % d'efficacité d'incorporation) ont été préparées puis injectées par voie intraveineuse à des rats. Il a alors été montré que la concentration en AZT était plus importante dans les organes appartenant au système réticulo-endothélial, tels que le foie où la concentration en drogue était 18 fois plus importante que lors de l'utilisation d'une solution d'AZT seule.

Une autre étude menée par Dembri *et al.* a montré le potentiel des nanoparticules PACA pour cibler et concentrer l'AZT dans l'appareil digestif. En effet, après administration orale chez le rat, l'utilisation du nanovecteur a permis de concentrer l'AZT au moins 5,9 fois plus que lors de l'administration de la drogue seule. La concentration de nucléoside dans le tissu a même atteint 30-45  $\mu\text{M}$ , bien supérieure à l' $\text{IC}_{50}$  (0,06-1,36  $\mu\text{M}$ ) du composé.

### 4.2.2. Nanoparticules polyesters

Bien que moins utilisées du fait d'un faible taux d'incorporation, les nanoparticules polyesters peuvent également être un moyen de délivrance de nucléosides et de leurs analogues (Figure 37). Ces nanovecteurs sont généralement préparés à partir de polymères préformés évitant ainsi la formation de liaisons covalentes entre la drogue et le polymère lors de la polymérisation. Ils sont formés par ajout d'une solution de polymère dans une phase aqueuse, suivie d'une évaporation du solvant (nanoprécipitation).

<sup>103</sup> Löbenberg, R.; Araujo, L.; von Briesen, H.; Rodgers, E.; Kreuter, J. *J. Control. Release* **1998**, *50* (1-3), 21-30.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

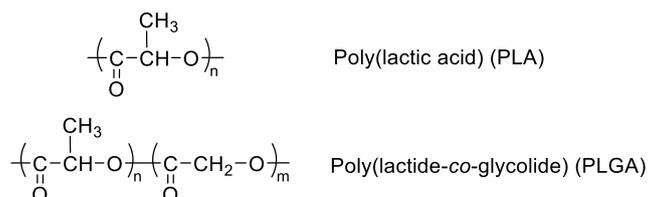


Figure 37: Structure des polymères polyesters utilisés pour la délivrance de nucléosides

Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur l'incorporation de 5-fluorouracile (5-FU) à des nanoparticules de poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA). Malheureusement, le composé est généralement peu piégé (efficacité de 1 à 5 %) et est rapidement libéré (« burst effect »). Ces observations ont été attribuées au fait que la majeure partie de 5-FU est adsorbée sur la surface de la nanoparticule au lieu d'être incorporée en son « cœur ».

Par la suite, Lo *et al.* ont développé des nanoparticules de poly(lactic acid)-*graft*-poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-methacrylic acid) ayant un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile. La 5-FU a ainsi été incorporée bien plus efficacement (jusqu'à 20 %).<sup>104</sup> Il est également intéressant de noter que la délivrance de 5-FU est alors pH dépendante : 80 % à pH 5 mais seulement 15 % à pH 7,4 après 4 jours. Cette propriété pourrait être intéressante pour la délivrance dans le milieu intracellulaire puisque le pH diminue dans les endosomes formés après internalisation du vecteur.

Enfin, des nanoparticules de poly(lactic acid) PLA fonctionnalisées par des PEG ont été développées pour l'administration oculaire d'acyclovir. Même si le taux d'incorporation reste faible (3 à 5 %), l'utilisation de ce système administré par voie oculaire chez le lapin, a permis d'augmenter la biodisponibilité du composé d'un facteur 1,8 et 12,6 comparativement aux nanoparticules sans PEG et au composé seul respectivement.<sup>105</sup>

### 4.2.3. Nanogels et délivrance de nucléoside triphosphate

Comme décrit précédemment, la forme active des nucléosides et leurs homologues est généralement la forme triphosphate. L'administration directe de nucléosides triphosphates est fortement limitée par la faible stabilité de ces composés et surtout par leur hydrophilie diminuant drastiquement leur pénétration cellulaire, d'où l'intérêt de l'utilisation de vecteurs. Néanmoins, le caractère hydrophobe des polymères utilisés pour les nucléosides (PACA et polyesters) défavorise l'incorporation des triphosphates. Vinogradov *et al.* ont ainsi suggéré l'utilisation de nanogels pour la délivrance de nucléosides triphosphate. Ces nanoparticules sont composées d'un réseau hydrophile de poly(éthylène glycol) et poly(éthylène imine) (PEG-PEI) branchés.<sup>106</sup>

Ainsi, la fludarabine 5'-triphosphate (FA-TP), forme active d'un nucléoside anticancéreux, peut être incorporée de manière efficace (jusqu'à 30 %) dans ce type de nanogels. En effet, de la même manière que pour les oligonucléotides, ce sont les interactions ioniques entre les fonctions ammonium du PEI et les phosphates du nucléoside qui permettent son incorporation (Figure 38). Ce système a montré une délivrance continue, une protection de la dégradation enzymatique ainsi qu'une meilleure cytotoxicité sur des cellules cancéreuses humaines MCF-7 *in vitro*.<sup>106</sup>

<sup>104</sup> Lo, C.-L.; Lin, K.-M.; Hsiue, G.-H. *J. Control. Release* **2005**, *104* (3), 477–488.

<sup>105</sup> Fresta, M.; Fontana, G.; Bucolo, C.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Puglisi, G. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (3), 288–297.

<sup>106</sup> Vinogradov, S. V.; Zeman, A. D.; Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. *J. Control. Release* **2005**, *107* (1), 143–157.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

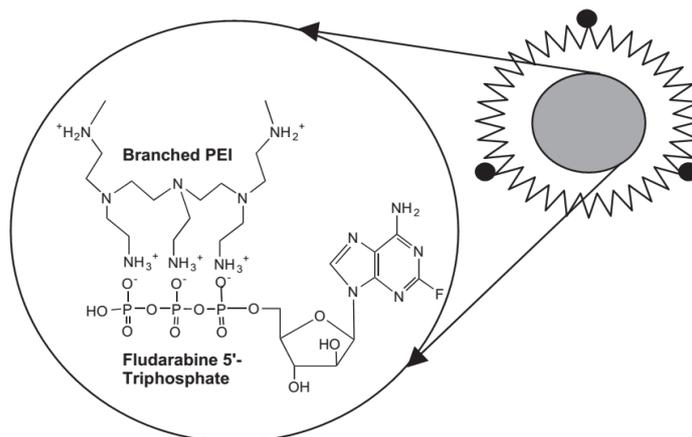


Figure 38: Schéma de la nanoparticule Nanogel incorporant la FA-TP<sup>106</sup>

La même équipe de recherche a également travaillé sur l'utilisation des Nanogels pour l'incorporation d'AZT trisphosphate. Ces nanovecteurs ont montré une bonne incorporation du nucléoside (30 %) et leur utilisation *in vitro* sur des cellules cancéreuses humaines MCF-7 s'est révélée efficace, avec une IC<sub>50</sub> 130 à 200 fois plus faible que l'AZT seul.

### 4.3. Vectorisation et adressage par conjugaison

Que ce soit pour les oligonucléotides ou pour les nucléosides, un intérêt grandissant est porté à l'utilisation de conjugués avec différentes biomolécules pour la délivrance de ces composés. En effet, ces « vecteurs moléculaires » présentent plusieurs avantages par rapport aux nanovecteurs.<sup>95</sup> Tout d'abord, ce sont des composés bien définis qui peuvent être caractérisés par des techniques d'analyse conventionnelles comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectrométrie de masse, contrairement aux nanoparticules qui sont généralement hétérogènes en taille et en nature chimique. Ensuite, ces conjugués présentent généralement une large biodistribution puisqu'ils sont capables de traverser l'endothélium capillaire comme les ONs. De plus, du fait de leur composition relativement simple et l'absence de forte densité de charge positive, ils semblent générer moins de toxicité non-spécifique que les nanovecteurs. Enfin, la biomolécule conjuguée peut être utilisée comme ligand pour cibler spécifiquement un récepteur afin d'adresser le composé actif vers l'organe ou les tissus où il exercera son activité biologique. Même si cela est également possible avec les nanovecteurs (généralement par fonctionnalisation de surface), cela s'accompagne généralement d'interaction non-spécifique.

Néanmoins, ces conjugués présentent également des désavantages dont les plus importants sont leur élimination rapide par les reins du fait de leur petite taille, et leur « charge bioactive » qui est bien moins importante que celle des nanovecteurs. En effet, là où un nanovecteur va entraîner la délivrance de centaines ou milliers de molécules, chaque internalisation de conjugués n'amènera qu'une seule molécule active.

#### 4.3.1. Conjugués avec adressage

Il existe de nombreux conjugués d'ONs ou nucléosides avec des ligands permettant de cibler certains récepteurs ou antigènes (Figure 39). Ces conjugués ont reçu un intérêt croissant ces dernières années du fait de la présence de certaines cibles surexprimées à la surface ou dans l'environnement de cellules cancéreuses.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

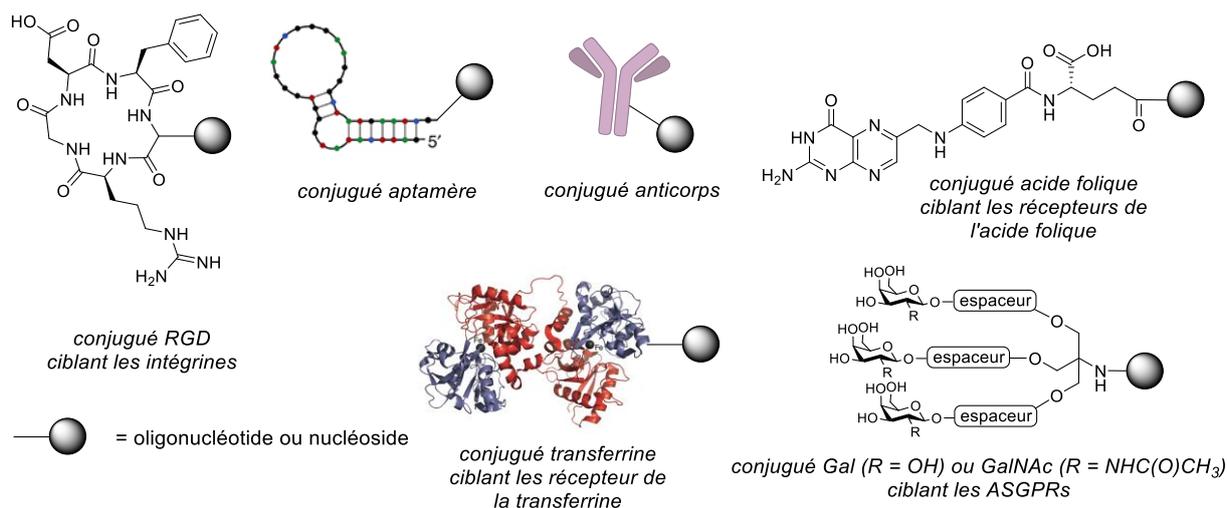


Figure 39: Exemples de conjugués avec adressage

Certains conjugués utilisent ainsi des peptides comme le peptide cyclique Arg-Gly-Asp (RGD) capable de se lier aux intégrines. Liu *et al.*<sup>107</sup> ont ainsi utilisé un conjugué RGD-siRNA pour réduire l'expression du récepteur VEGF-2 essentiel pour l'angiogenèse des cellules tumorales. Le peptide RGD agissant comme un ligand de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  surexprimée à la surface des cellules endothéliales en angiogenèse, le conjugué a permis la délivrance du siRNA par un mécanisme récepteur-spécifique et ainsi de réduire l'expression du VEGF-2 chez la souris.

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont de puissants outils pour l'adressage de composé actif. Le premier conjugué mAb-siRNA a été décrit par Lieberman *et al.*<sup>108</sup> Dans cette étude, un anticorps chimérique a été créé afin de cibler la protéine gp160 du VIH. L'utilisation d'un tel conjugué a montré une activité sur des cellules cancéreuses à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les aptamères sont des acides nucléiques formant des structures tridimensionnelles par appariement intramoléculaire de bases et sont également des composés permettant la délivrance ciblée de drogues (Figure 39). En effet, ces composés présentent de très grandes affinités pour certains antigènes et récepteurs. L'utilisation de conjugués aptamères-siRNA a été développée par Sullenger *et al.*<sup>109</sup> en utilisant un aptamère se liant à un récepteur spécifiquement exprimé à la surface des cellules de la prostate, le PSMA (*prostate-specific membrane antigen*). Le conjugué ainsi obtenu s'est révélé capable de tuer les cellules cancéreuses exprimant le récepteur mais pas les cellules qui ne l'expriment pas, traduisant une excellente sélectivité. Les avantages des aptamères par rapport à d'autres ligands tels que les anticorps sont leur faible immunogénicité et leur synthèse relativement simple permettant d'accéder à une très grande variété de composés.

Enfin, les conjugués les plus étudiés et les plus utilisés sont certainement les glycoconjugués. L'utilisation d'un ou plusieurs motifs galactoside (Gal) ou *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) permet ainsi d'interagir avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs pour *asialoglycoprotein receptors*). Ce système est très efficace pour la délivrance de composés vers le foie puisque les

<sup>107</sup> Liu, X.; Wang, W.; Samarsky, D.; Liu, L.; Xu, Q.; Zhang, W.; Zhu, G.; Wu, P.; Zuo, X.; Deng, H.; Zhang, J.; Wu, Z.; Chen, X.; Zhao, L.; Qiu, Z.; Zhang, Z.; Zeng, Q.; Yang, W.; Zhang, B.; Ji, A. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (18), 11805–11817.

<sup>108</sup> Song, E.; Zhu, P.; Lee, S.-K.; Chowdhury, D.; Kussman, S.; Dykxhoorn, D. M.; Feng, Y.; Palliser, D.; Weiner, D. B.; Shankar, P.; Marasco, W. A.; Lieberman, J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (6), 709–717.

<sup>109</sup> McNamara, J. O.; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (8), 1005–1015.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

ASGPRs sont exprimées en grand nombre à la surface des hépatocytes et entraîne une internalisation rapide du conjugué par endocytose. De plus, des études ont démontré l'affinité de ces ligands pour les ASGPRs à la surface d'hépatocytes avec des  $IC_{50}$  allant d'environ 100  $\mu$ M au nanomolaire suivant la nature du glycoside, de l'espaceur et la multivalence utilisée. Alnylam Pharmaceuticals a ainsi développé un conjugué multivalent GalNAc-siRNA qui a montré une bonne pénétration cellulaire et activité sur des hépatocytes de souris.<sup>110</sup>

Fiume *et al.* ont également effectué une conjugaison avec de l'albumine humaine lactosylée pour délivrer un analogue de nucléotide anti-VHB, l'adénine arabinose monophosphate (ara-AMP).<sup>111</sup> Des études cliniques ont alors montré que l'administration du vecteur à des patients infectés par le VHB pendant 28 jours a un effet antiviral similaire au nucléotide seul, tout en éliminant des effets-secondaires tels que la neurotoxicité.

Oishi *et al.* ont développé un conjugué siRNA-PEG lactosylé en utilisant un espaceur acido-labile. Après internalisation par endocytose du fait de l'interaction avec les ASGPRs, ce lien se rompt dans le milieu légèrement acide de l'endosome, libérant ainsi efficacement le siRNA seul dans les cellules étudiées (Huh7).<sup>112</sup>

Bien que l'effet et la toxicité des glycoconjugués ne soient pas encore totalement définis, cette approche représente, à l'heure actuelle, la meilleure alternative pour la délivrance et l'adressage de composés vers le foie.

### 4.3.2. Conjugués sans adressage

Les conjugués permettant une délivrance d'oligonucléotides ou de nucléosides sans adressage font partie des premières études portant sur des conjugaisons pour de la vectorisation.<sup>95</sup> Ces ligands sont utilisés pour améliorer la pénétration cellulaire du vecteur mais n'apportent pas de sélectivité vis-à-vis des cellules touchées. Les exemples les plus importants sont des conjugaisons avec le cholestérol et avec des peptides de pénétration cellulaire (CPPs pour *cell-penetrating peptides*) (Figure 40).

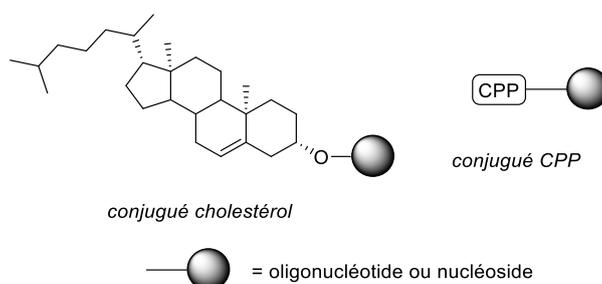


Figure 40: Exemples de conjugués sans adressage

Les conjugués avec le cholestérol comptent parmi les premiers succès des stratégies de vectorisation. L'utilisation de ces conjugués avec des siRNA a permis d'améliorer la pénétration cellulaire dans les hépatocytes de manière significative et d'entraîner l'extinction de certains gènes hépatiques.

<sup>110</sup> Nair, J. K.; Willoughby, J. L. S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; van der Sluis, R.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K.; Manoharan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958–16961.

<sup>111</sup> Fiume, L.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Bonino, F.; Torrani-Cerenzia, M.; Verme, G.; Rapicetta, M.; Bertini, M.; Gervasi, G. B. *J. Viral Hepat.* **1997**, *4* (6), 363–370.

<sup>112</sup> Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1624–1625.

## Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

Les CPPs sont généralement des petites séquences peptidiques chargées positivement et capables de traverser la membrane cellulaire. Leur conjugaison à des composés passant difficilement la membrane tels que les ONs ou les nucléosides permet d'améliorer leur pénétration et donc leur activité. Cette conjugaison se fait de manière covalente le plus souvent, mais peut également être effectuée par la formation de complexes dans le cas de certains siRNA, du fait des charges positives portées par les CPPs. Bien que très étudié, leur mécanisme de pénétration cellulaire est encore discuté puisqu'il semble dépendre des conditions expérimentales ainsi que de la nature de la séquence utilisée et du conjugué. Chiu *et al.* ont ainsi conjugué le peptide Tat (YGRKKRRQRRR) à un siRNA qui a alors été internalisé rapidement par les cellules et qui a entraîné l'extinction des gènes ciblés.<sup>94</sup>

Plus récemment, des conjugués entre des ONs et des dérivés de la pénétратine (RQIKIWFQNRRMKWK) incorporant des résidus arginine espacés par des séquences hydrophobes ont été étudiés pour corriger la sous-expression de la dystrophine, qui est la cause de la myopathie de Duchenne. Plusieurs conjugués ont ainsi entraîné une augmentation de l'expression de dystrophine dans les muscles et le cœur.<sup>113</sup>

### 4.4. Stratégie envisagée

Ainsi, différentes stratégies peuvent être mises en place dans le but d'améliorer l'activité thérapeutique d'un nucléoside. Les C-nucléosides semblent être des analogues prometteurs puisque leur lien « glycosidique » C-C renforce leur stabilité dans le métabolisme. Des modifications structurales introduites en position 2', 3' ou sur l'hétérocycle sont également très développées dans l'optique d'améliorer l'efficacité pure du composé. Si ces modifications permettent généralement d'augmenter l'affinité pour la cible, elles ne permettent pas toujours d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques ou la sélectivité. Afin de dépasser ces limitations, les prodrogues ou des stratégies de vectorisation peuvent être envisagées. Ces dernières permettent d'améliorer l'activité en augmentant la biodisponibilité, en diminuant la toxicité ou encore en permettant une délivrance spécifique vers les cellules ou les tissus où l'action du composé est nécessaire.

SRO91 est un C-nucléoside analogue de la ribavirine développé au laboratoire, qui a montré une activité antivirale à spectre large, notamment contre le VHC ( $IC_{50} = 25 \mu M$  sur des réplicons de VHC dans Huh7). Si aucune toxicité n'a été observée *in vitro* (jusqu'à  $100 \mu M$ ), le composé seul ne semble pas présenter de sélectivité pour les hépatocytes.

Comme indiqué précédemment, SRO91 présente une similarité structurale à la Ribavirine, qui laisse présager des activités biologiques et un comportement *in vivo* semblables. Or celle-ci entraîne des effets indésirables à cause de son accumulation dans les globules rouges. Il est donc possible que SRO91 présente la même accumulation. D'autre part, les deux molécules présentent une activité antivirale large spectre, mais faible. Pour ces raisons, l'adressage et la vectorisation semble une stratégie pertinente pour ces deux molécules.

Ce projet a ainsi pour but d'améliorer l'activité anti-VHC de SRO91 tout en diminuant ses potentiels effets secondaires, en utilisant une stratégie de vectorisation.

---

<sup>113</sup> Boisguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; O'Donovan, L.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 52–67.



# Chapitre I : Amélioration de l'activité antivirale

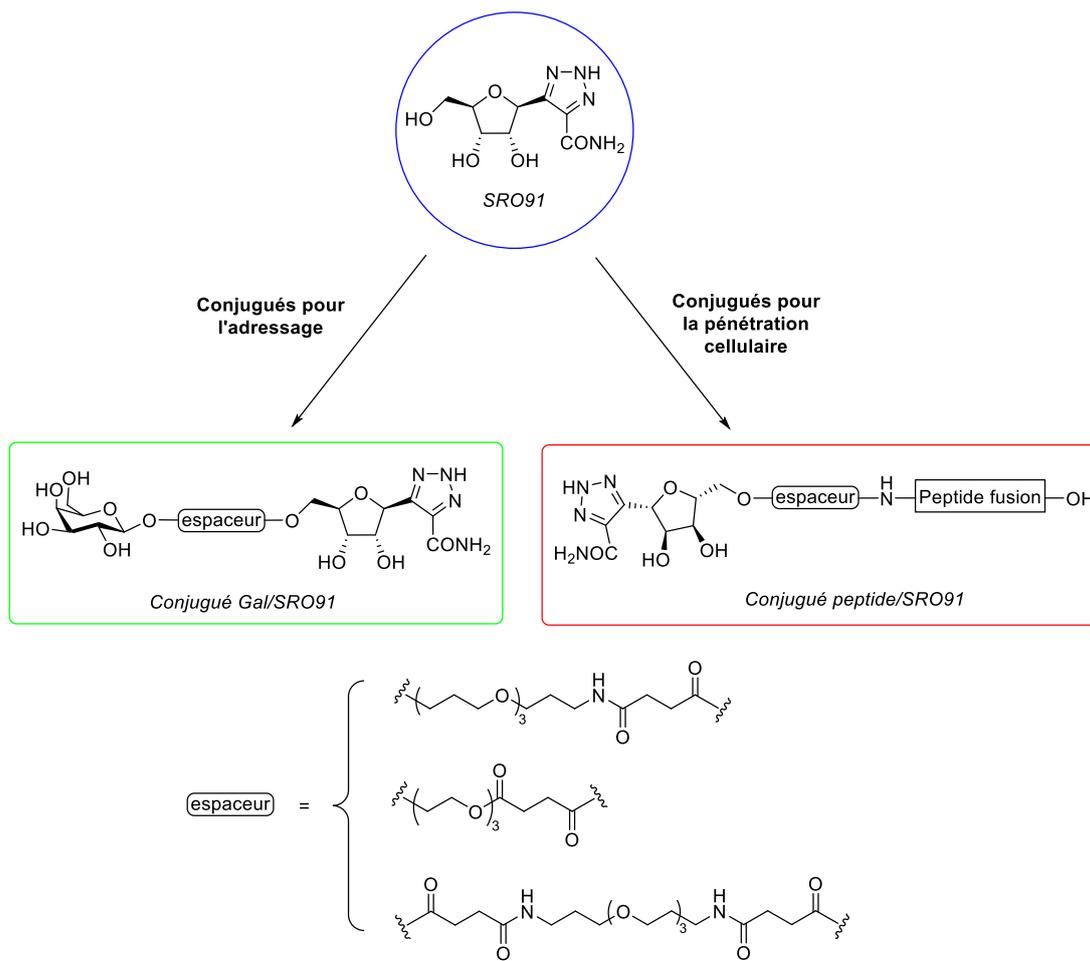


Schéma 30 : Structure des conjugués ciblés dans ce projet

