



HAL
open science

**INTERET THERAPEUTIQUE DE LA PROTEINE
A20 DES ORTHOPOXVIRUS COMME CIBLE
PERTINENTE D'APTAMERES PEPTIDIQUES ET
DE COMPOSES CHIMIQUES BLOQUANT SES
INTERACTIONS ESSENTIELLES A L'INTERIEUR
DU COMPLEXE DE REPLICATION VIRALE**

Laurent Saccucci

► **To cite this version:**

Laurent Saccucci. INTERET THERAPEUTIQUE DE LA PROTEINE A20 DES ORTHOPOXVIRUS COMME CIBLE PERTINENTE D'APTAMERES PEPTIDIQUES ET DE COMPOSES CHIMIQUES BLOQUANT SES INTERACTIONS ESSENTIELLES A L'INTERIEUR DU COMPLEXE DE REPLICATION VIRALE. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00440047

HAL Id: tel-00440047

<https://theses.hal.science/tel-00440047>

Submitted on 1 Jun 2010

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
- GRENOBLE I**

Ecole doctorale Chimie Sciences du Vivant

Spécialité Virologie Immunologie

Présentée par

Laurent SACCUCCI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

**INTERET THERAPEUTIQUE DE LA PROTEINE A20 DES
ORTHOPOXVIRUS COMME CIBLE PERTINENTE D'APTAMERES
PEPTIDIQUES ET DE COMPOSES CHIMIQUES BLOQUANT SES
INTERACTIONS ESSENTIELLES A L'INTERIEUR DU COMPLEXE
DE REPLICATION VIRALE**

Directeur de thèse : **Pr Daniel GARIN**

Travaux réalisés au laboratoire de virologie du
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
La Tronche

Soutenue le 10 septembre 2009 devant le jury composé de :

Rapporteurs : Dr Robert DRILLIEN
Pr Henri AGUT

Examineurs : Dr Pierre COLAS
Pr Jean-Marie SEIGNEURIN
Pr Daniel GARIN

« La science c'est comme faire l'amour : parfois quelque chose d'utile en sort mais ce n'est pas la raison pour laquelle nous le faisons. »

R.P. Feynmann

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est l'aboutissement de 3 années de travail effectué dans des conditions privilégiées. Je tiens donc à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mes recherches de doctorat.

Mes premiers remerciements vont bien entendu aux membres du jury :

-Messieurs les rapporteurs : Dr. Robert Drillien et Pr. Henri Agut. Je vous remercie très chaleureusement d'avoir accepté de juger ce travail.

-Messieurs les examinateurs :

Je remercie sincèrement le Pr. Daniel Garin pour son accueil au sein du laboratoire de virologie.

Pr. Jean-Marie Seigneurin, merci d'avoir accepté de porter fièrement le « calot » de président du jury.

Dr. Pierre Colas, un infini merci pour votre accueil dans les locaux d'Aptanomics, vos relectures attentives des articles, vos conseils pertinents et votre enthousiasme pour mettre sur pied ces deux projets ambitieux.

Enfin M. Tristan Rousselle, P.D.G. de PX' Therapeutics pour sa confiance et son soutien et pour m'avoir offert l'immense opportunité de travailler à ses côtés. J'ai une immense fierté à faire partie de cette entreprise, de nombreuses fois citée en exemple durant mes études. J'en profite au passage pour adresser mes remerciements à toute l'équipe de PX' Therapeutics en particulier Delphine, Selma, Claudie et Nicolas, Lucile et Vincent pour avoir facilité mon intégration dans le monde des salariés.

J'exprime mes remerciements au Dr Frédéric Iseni pour avoir initié ces projets et participé à l'élaboration des expérimentations et publications. En définitive c'est lui le responsable de ce qui suit dans ce manuscrit ! Je lui exprime toute ma reconnaissance pour le travail accompli

Je tiens à remercier vivement Sophie Duraffour pour ses précieux conseils, son aide pour les publications et pour le souffle de motivation qu'elle m'a apporté.

Un immense merci à toute l'équipe du laboratoire de virologie du CRSSA :

Au Dr Jean-Marc Crance pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son investissement dans la relecture du manuscrit et l'organisation de la soutenance.

A celles qui ont partagé le bureau... merci de n'avoir jamais porté plainte ! Je remercie donc Audrey pour son optimisme, Aude pour son enthousiasme et son fameux fondant au chocolat en part-individuelle-rien-que-pour-moi, Solenne pour sa patience et ses célèbres « ☠️🍷 Solennades™ ☠️🍷🍷 ».

A ceux qui ont partagé le bureau : merci à Julien Pepino pour cette justesse de voix et de sifflet à faire pâlir ténors et divas, et son sérieux, enfin plutôt ses sérieux aux happy hours. Merci à Stephane Richard : ménestrel moderne des laboratoires pour toutes ces discussions politiques contradictoires mais divertissantes.

A ceux des autres bureaux : un énorme merci à Danielle Gratier et Corinne Rosthlisberger pour leur écoute leur précieuse aide technique, leurs nombreux conseils et leur organisation incroyable. Je remercie également, Anne-Laure Favier (avec son joli treillis), Olivier Flusin, Henri Blanquaert et Marie-Ange Deydier qui ont aussi tous contribué au plaisir de venir tous les matins très tôt au laboratoire avec le sourire.

Un grand merci à toute l'équipe de Biologie Animale du CRSSA pour leur aide sur mes manip souris, en particulier David Bois.

Merci à M. François Miceli, Carinne Bardou et Jerome Pansanel pour leur accueil dans les locaux d'Imaxio, leurs conseils et pour tout le travail sur le criblage.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	8
RESUME	9
ABSTRACT	10
INTRODUCTION	11
I] LES ORTHOPOXVIRUS	12
A/ LES INFECTIONS A ORTHOPOXVIRUS	15
1- LA VARIOLE	15
a) Historique	15
b) Risque de réémergence et menace terroriste	17
c) Clinique	18
d) La vaccination	20
e) Les complications post-vaccinales	22
2- LES AUTRES INFECTIONS À ORTHOPOXVIRUS	24
a) L'infection par le virus de la vaccine	24
b) L'infection par le virus monkeypox	24
c) L'infection par le virus cowpox	25
B/ CARACTERISTIQUES DES ORTHOPOXVIRUS	26
1- ORGANISATION DU GENOME ET PHYLOGENIE	26
2- STRUCTURE DES VIRIONS	26
3- CYCLE DE REPLICATION	27
4- LES PROTEINES DU COMPLEXE DE REPLICATION	29
II] LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS À ORTHOPOXVIRUS :	32
A/ LES VACCINS ANTIVARIOLIQUES :	32
B/ LES IMMUNOGLOBULINES ANTI-VACCINE (VIG) :	34
C/ LES MOLECULES ANTIVIRALES :	35
1- LE CIDOFOVIR, INHIBITEUR DE L'ADN POLYMERASE VIRALE	35
2- LE ST-246, INHIBITEUR DE LA FORMATION DES PARTICULES VIRALES ENVELOPPEES	38
3- LES AUTRES MOLECULES ANTIVIRALES	39
III] LA TECHNOLOGIE DES APTAMERES PEPTIDIQUES	41
A/ DESCRIPTION	41
B/ LE DOUBLE HYBRIDE	42
C/ LES APPLICATIONS DES APTAMERES PEPTIDIQUES	45
D/ LES SUCCES DES CRIBLAGES D'APTAMERES PEPTIDIQUES	49

PARTIE EXPERIMENTALE	53
I] INHIBITION DE LA REPLICATION DU VIRUS DE LA VACCINE PAR DES APTAMERES PEPTIDIQUES	54
<i>A/ Introduction</i>	54
<i>B/ Publication n°1</i>	56
<i>C/ Discussion</i>	64
II] INHIBITION DE LA REPLICATION DES ORTHOPOXVIRUS PAR DES MOLECULES CHIMIQUES	67
<i>A/ Introduction</i>	67
<i>B/ Publication n°2</i>	71
<i>C/ Discussion</i>	98
DISCUSSION GENERALE	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANP	Nucléoside Phosphonate Acyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
CDC	Centers for disease control and prevention
CPXV	Cowpox virus
DBD	Domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain)
DICT	Dose infectieuse cytotoxique
ECP	Effet cytopathogène
EEV	Extracellular enveloped virus
GST	Glutathione-S-Transferase
HTS	Criblage à haut débit (High Throughput Screening)
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50%
IEV	Intracellular enveloped virus
IMV	Virus mature intracellulaire
i.n.	Intranasal
i.p.	Intrapéritonéal
kpb	Kilo paire de bases
MOI	Multiplicity of infection
MPXV	Monkeypox virus
MVA	Modified vaccinia Ankara
OMS/WHO	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	Plaque forming unit
p.i.	Post-infection
TrxA	Thioredoxine A
VACV	Vaccinia virus
VARV	Variola virus
VIG	Immunoglobulines anti-vaccine
vUNG	Uracile ADN Glycosylase virale

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE :

FIGURE 1 : EVOLUTION DE L'EXANTHEME CHEZ UN ENFANT ATTEINT PAR LA VARIOLE. (PAGE 15)

FIGURE 2 : LA VACCINATION « BRAS-A-BRAS » (PAGE 16)

FIGURE 3 : GENISSE CURETEE POUR RECUPERER LA PULPE VACCINALE. (PAGE 16)

FIGURE 4 : AIGUILLE BIFURQUEE (A GAUCHE) ET VACCINOSTYLE (A DROITE) UTILISES PENDANT LA CAMPAGNE DE VACCINATION. (PAGE 16)

FIGURE 5 : EVOLUTION DE LA LESION LIEE A LA PRIMO-VACCINATION. (PAGE 17)

FIGURE 6 : LES COMPLICATIONS POST-VACCINALES. (PAGE 18)

FIGURE 7 : PARTICULE VIRALE VISUALISEE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN VIRION MATURE INTRACELLULAIRE. (PAGE 22)

FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE VIRAL DU VIRUS DE LA VACCINE. (PAGE 24)

FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COMPLEXE DE REPLICATION DU VIRUS DE LA VACCINE. (PAGE 25)

FIGURE 10 : PRINCIPE DU CRIBLAGE D'APTAMERES SUR UNE PROTEINE CIBLE PAR DOUBLE-HYBRIDE EN LEVURE. (PAGE 40)

FIGURE 11 : LES APPLICATIONS DES APTAMERES PEPTIDIQUES EN RECHERCHE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE. (PAGE 44)

DISCUSSION PARTIE EXPERIMENTALE 1 :

FIGURE 12 : COMPLEMENT DE LA LOCALISATION DES INTERACTIONS DE L'APTAMERE 72 SUR LA PROTEINE A20. (PAGE 60)

FIGURE 13 : DETERMINATION DES COUPLES OPTIMAUX POUR LE CRIBLAGE HAUT DEBIT DE MOLECULES (PAGE 65)

FIGURE 14 : RESULTAT DU CRIBLAGE DES 27600 COMPOSES CHIMIQUES. (PAGE 66)

RESUME

La variole est l'un des pires fléaux qu'ait connus l'humanité jusqu'à son éradication en 1980. Il existe aujourd'hui une menace terroriste de réémergence du virus de la variole comme arme biologique. Le manque de moyens thérapeutiques, la faible immunité de la population mondiale depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique et les complications post-vaccinales liées à l'utilisation du vaccin répliatif historique ont conduit ces dernières années à une intensification des recherches pour lutter contre la variole et les autres virus du genre orthopoxvirus. En complément d'assurer la production d'un nouveau vaccin antivariolique répondant aux normes sanitaires actuelles, il est indispensable de développer des molécules antivirales efficaces aux modes d'actions différents, utilisables immédiatement en cas d'attaque terroriste et pour pallier les complications post-vaccinales.

L'objectif du travail de thèse est d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant plus particulièrement la réplication du virus de la vaccine, utilisé comme modèle substitutif au virus de la variole.

La première stratégie est l'utilisation d'aptamères peptidiques ciblant A20, une protéine centrale du complexe de réplication formant avec l'uracile ADN glycosylase D4 le facteur de processivité pour l'ADN polymérase virale. Ces peptides sont sélectionnés *in vivo* en double-hybride en levure pour interagir avec une cible protéique et potentiellement l'inhiber. Ainsi nous avons sélectionné un aptamère interagissant avec une région critique de la protéine cible A20 et capable d'inhiber significativement la réplication du virus de la vaccine en culture cellulaire.

La seconde stratégie est l'utilisation d'un criblage haut débit de molécules chimiques pour leur capacité à rompre les interactions entre notre cible de choix A20 et deux de ses interacteurs connus, la protéine D4 et la primase/hélicase D5, par une approche basée sur l'utilisation de deux rapporteurs luciférase en levure. Nous avons démontré que deux molécules issues du criblage permettaient l'inhibition significative et spécifique de la réplication de plusieurs orthopoxvirus, *in vitro*.

Ces travaux viennent compléter le faible arsenal thérapeutique disponible destiné à lutter contre les infections à orthopoxvirus.

ABSTRACT

Variola virus (VARV), the etiologic agent of smallpox was responsible of the most devastating infectious disease. Because of successful preventive measures by immunization, the World Health Organization (WHO) declared global eradication of smallpox in 1980. The subsequent discontinuation of vaccination has rendered all children and many adults virtually susceptible to smallpox infection. If variola virus was used in an act of terrorism or warfare it could cause a real catastrophe. So it is essential to develop new antiviral molecules with different mechanisms of action and usable immediately in case of terrorist attack. Here we report the use of two original strategies to identify new effective anti-orthopoxvirus agents targeting specifically the viral replication complex of vaccinia virus (VACV), a valuable surrogate for the smallpox virus.

First, through a yeast two-hybrid assay, we have selected peptide aptamers directed against the VACV A20 protein, a central component of the replication complex and shown to form, with the D4 protein, a processivity factor for the viral DNA polymerase. Peptide aptamers are combinatorial protein molecules designed to inhibit the function of target proteins in living cells. We have proved that one selected aptamer interacting with a central region of A20 was able to significantly inhibit viral DNA synthesis and viral production in cell culture.

Second, we have performed a high-throughput screening of small molecules to isolate compounds capable of disrupting A20 interaction with either D4, an uracil DNA glycosylase or D5, a DNA-independent nucleoside triphosphatase (NTPase) that contains a helicase domain. The screen is based on an automated dual-luciferase yeast two-hybrid assay, performed in 384-well plates. Among a collection of 27,600 compounds from diverse commercial chemical libraries we have identified two potential inhibitors that exhibit antipoxvirus effect on infected cell culture. These compounds were also found to specifically inhibit DNA replication.

Thus, the screening for inhibitors of protein-protein interactions within viral replication complex remains to be a promising strategy for identifying new compounds active against orthopoxvirus infections.



INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

La variole est l'un des pires fléaux qu'ait connu l'humanité jusqu'à son éradication en 1980. Il existe aujourd'hui une menace terroriste de réémergence du virus de la variole comme arme biologique. Le manque de moyens thérapeutiques, la faible immunité de la population mondiale depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique et les complications post-vaccinales liées à l'utilisation du vaccin répliatif historique ont conduit ces dernières années à une intensification des recherches pour lutter contre la variole et les autres virus du genre orthopoxvirus, hautement contagieux. En complément d'assurer la production d'un nouveau vaccin antivariolique répondant aux normes sanitaires actuelles, l'OMS a recommandé la mise au point d'au moins deux molécules antivirales aux modes d'actions différents disponibles immédiatement en cas d'attaque bioterroriste pour traiter les personnes infectées et pour traiter les complications post-vaccinales. Plusieurs antiviraux ont été développées pour lutter contre le virus de la variole. Les molécules les plus performantes dans les essais cliniques sont à ce jour des dérivés du cidofovir et la molécule ST-246, mais aucune n'est encore officiellement approuvée comme traitement spécifique.

L'objectif du travail de thèse était d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant plus particulièrement les interactions des protéines impliquées dans la réplication du virus de la vaccine, modèle substitutif au virus de la variole. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la protéine A20 qui est un composant clé dans l'assemblage du complexe de réplication et connue pour interagir physiquement avec 3 protéines virales essentielles à l'activité du complexe : l'ADN polymérase E9, la primase/hélicase D5 et l'uracile ADN glycosylase D4. A20 forme notamment avec l'uracile ADN glycosylase D4 le facteur de processivité pour l'ADN polymérase virale.

La première stratégie était de sélectionner des « aptamères peptidiques » interagissant spécifiquement avec la protéine A20 et capables d'inhiber son interaction avec les autres protéines virales. Les aptamères sont des peptides de 8 acides-aminés qui sont exposés à la surface d'une protéine présentatrice et, à partir d'une banque combinatoire de plusieurs dizaines de millions de peptides différents, sont sélectionnés *in vivo* en double-hybride en levure pour interagir avec une cible protéique et potentiellement l'inhiber.

Un tel criblage a donc été réalisé et après confirmation des interactions *in vitro* les aptamères interagissant spécifiquement avec la protéine A20 ont été exprimés de manière stable en culture cellulaire pour tester leur capacité à inhiber la réplication virale après infection par le virus de la vaccine. Nous avons prouvé qu'un des aptamères sélectionnés (Apt 72) interagissait avec une région centrale de la protéine A20 montrée comme critique pour la réplication de l'ADN viral. Remarquablement, cet aptamère, exprimé de façon stable en cellule était capable d'inhiber de manière reproductible et significative la production du virus *in vitro*. Le mode d'action de l'aptamère inhibiteur 72 dans les cellules reste cependant à démontrer pour s'assurer que l'inhibition virale est bien liée à l'interruption d'une interaction entre A20 et l'un de ses partenaires et causée par ce peptide. A ce jour cette sélection d'aptamères peptidiques reste la seule effectuée sur un virus du genre orthopoxvirus.

La seconde stratégie était l'utilisation d'un criblage haut débit original de molécules chimiques pour leur capacité à rompre les interactions entre notre cible de choix A20 et deux de ses interacteurs connus, la protéine D4 et la primase/hélicase D5, par une approche basée sur l'utilisation de deux rapporteurs luciférase (Firefly et Renilla) en double hybride en levure. Au total, 27 600 molécules ont été criblées. Elles sont issues des banques commerciales Prestwick, Nanosyn, Tripos et Chembridge et très diverses en terme de structure. 148 composés ont été sélectionnés, la majorité ciblant l'interaction A20-D5. Après une sélection des ces composés basée sur leurs propriétés physico-chimiques (stabilité, solubilité etc...), vingt-neuf molécules ont alors été testées individuellement pour leur capacité à diminuer l'effet cytopathogène (ECP) induit par le virus de la vaccine en culture cellulaire. Nous avons identifié deux molécules capables d'inhiber significativement et spécifiquement la réplication des virus de la vaccine et du virus cowpox en culture cellulaire par un mécanisme d'inhibition spécifique de la synthèse d'ADN viral. Les essais de traitement de souris, infectées par le virus cowpox, n'ont pas été concluants dans les conditions testées pour ces deux composés, directement issus du criblage. La synthèse d'analogues de ces molécules par des chimistes pourrait permettre le développement de dérivés au pouvoir inhibiteur amélioré. Différentes posologies de ces dérivés et plusieurs modes d'administration (*per os*, sous-cutanée...) devront alors être testés pour trouver les conditions optimales d'un effet protecteur *in vivo*. La suite des travaux consistera à prouver que ces deux molécules agissent au niveau de l'interaction A20/D5 *in vitro*.

Nous disposons maintenant non seulement de nouveaux inhibiteurs, dont le développement doit être poursuivi, mais également de nouveaux outils moléculaires pour l'étude de la réplication des orthopoxvirus. Par ces deux démarches et grâce aux résultats encourageants obtenus, nous avons renforcé l'idée que le criblage d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine dans le complexe de réplication viral est une stratégie prometteuse pour identifier de nouveaux composés actifs.

I] LES ORTHOPOXVIRUS

Les orthopoxvirus appartiennent à la famille des *Poxviridae*. Il s'agit de grands virus enveloppés à ADN, de structure complexe et se multipliant dans le cytoplasme des cellules hôtes. Le genre *Orthopoxvirus* comprend huit virus : le virus de la variole (VARV), le virus monkeypox (MPXV), le virus cowpox (CPXV), le virus de la vaccine (VACV), le virus rabbitpox, le virus horsepox, le virus camelpox et le virus de l'ectromélie. Les 4 premiers virus sont pathogènes chez l'homme.

A/ LES INFECTIONS A ORTHOPOXVIRUS

1- LA VARIOLE

a) Historique

La variole a été l'une des maladies les plus dévastatrices dans l'histoire de l'humanité pour avoir causé la mort de centaines de millions d'individus au fil des siècles.

La plus ancienne trace de présence de variole a été retrouvée sur des momies égyptiennes datées de 3000 ans avant J-C. Malgré le peu de fiabilité accordé aux textes anciens, il semblerait que la maladie se soit propagée en Inde où elle aurait persisté pendant plus de 2000 ans avant de se propager vers l'Europe. En l'an 100 après J-C, la dite « peste d'Antonius » qui éclata en Mésopotamie et qui se propagea à Rome est très certainement attribuable à la variole. Dès l'an 1000, la variole devient endémique dans les régions densément peuplées d'Europe et d'Asie et dans le pourtour méditerranéen, en partie à cause des déplacements liés aux Croisades. Par la suite, au cours des vagues successives d'exploration et de colonisation, la maladie devient endémique dans toute l'Afrique. Introduite dès 1507 aux Caraïbes et 1520 au Mexique, la variole a même été un facteur déterminant lors de la conquête des terres amérindiennes. Au 16^{ème} siècle, la maladie s'établit dans toute l'Europe, l'Asie, l'Inde et la Chine et représente une immense cause de mortalité tuant jusqu'à 30% des personnes infectées. Au 17^{ème} siècle, la variole tuait encore plus de 10% de la population mondiale.

Lors de la guerre franco-anglaise en Amérique du Nord (1754-1767) le virus va pour la première fois être utilisé comme arme biologique.

En effet, le Gouverneur Général des colonies britanniques d'Amérique du Nord, l'anglais Sir Geoffrey Amherst, fit distribuer aux tribus indiennes ennemies des couvertures contaminées par des individus varioleux. Effet radical dans la population indienne Iroquoise (Sherman 2008). C'est indubitablement la mort de personnages d'Etats en Europe qui à cette époque a influencé empires et royaumes européens à promouvoir la « variolisation ». Cette technique rapportée de Turquie par Madame Mary Montagu consistait en l'inoculation du virus issu d'une pustule par voie nasale ou cutanée chez les sujets sains. Cette méthode engendrait tout de même la mort dans 2,5% des cas. C'est en 1796 qu'apparaît un nouveau procédé de « vaccination » contre la variole découvert par Edward Jenner (le terme de vaccination, apparu bien plus tard, est un hommage de Louis Pasteur à Jenner). Ce dernier avait remarqué que les fermières devenaient réfractaires à la variole après avoir contracté la « variole de la vache » ou cowpox, maladie des pis de la vache, transmissible à l'homme (chez qui elle provoque une maladie bénigne). Il montre que des sujets inoculés avec le virus cowpox par scarification et exposés à la variole sont alors protégés. L'utilisation de cette technique sera alors généralisée avec succès à travers de vastes campagnes de vaccination dans le monde entier dès 1801. Malgré une baisse notable de son incidence, la variole resta un problème de santé publique jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle. Les politiques d'intensification de la vaccination et des rappels (augmentant significativement la protection) ont permis l'éradication de la maladie en Europe dans les années 60 (dernier cas en France en 1955). Disposant alors d'un vaccin lyophilisé efficace, l'OMS décide de la mise en place d'un programme intensif d'éradication globale de la variole (Fenner 1980), touchant encore jusqu'à 15 millions de personnes en Afrique, Asie et Amérique du Sud. Le dernier cas naturel fut diagnostiqué pour l'Europe en Yougoslavie en 1972 et pour le monde entier en Somalie en 1978.

Lors de sa 33^{ème} assemblée en 1980, l'OMS déclare l'éradication de la variole : “we declare solemnly that the world and its peoples have won freedom from smallpox...” (Fenner 1980). La primo vaccination antivariolique a été stoppée depuis 1979 (et en 1984 pour les rappels) en France.

b) Risque de réémergence et menace terroriste

Dès l'éradication de la variole proclamée en 1980, l'OMS a recommandé l'arrêt des recherches sur le virus et la destruction ou le regroupement de tous les stocks mondiaux dans deux centres de référence pour empêcher toute réapparition de la maladie. Les échantillons ont alors été envoyés soit au Center for Disease Control (CDC) à Atlanta (Etats-Unis) soit au State Center for Virology and Biotechnology à Koltsovo (Russie) (WHO 1999).

Mais ces dernières années en particulier après les attentats du 11 septembre 2001 à New York et l'épisode des courriers piégés au charbon (Anthrax), de nombreux gouvernements ont pris en considération le risque de l'utilisation du virus comme arme biologique par des groupes terroristes ou une puissance militaire (Alibek 1999). La variole est classée dans la catégorie A des agents potentiellement utilisables dans un contexte de bioterrorisme par le CDC, catégorie regroupant des agents responsables d'une mortalité élevée et posant des problèmes majeurs de dissémination et de transmission entre individus. Le virus est même en tête de liste car il est stable dans l'environnement, fortement transmissible par voie aérienne entre individus, très infectieux et mortel dans 30% des cas (Mahy 2003). Le risque de propagation étant d'autant plus fort que l'arrêt de la vaccination antivariolique depuis presque trente ans a engendré une constante augmentation du pourcentage de la population non immunisée contre le virus. La crainte terroriste a été renforcée par la découverte d'un programme soviétique secret de militarisation de la variole qui aurait rendu possible à la chute de l'Union Soviétique, le transfert de la souche hautement virulente « *India* » à des pays « potentiellement proliférants » ou même des groupes terroristes (Alibek 1999). L'OMS a donc décidé de ne pas détruire les derniers stocks de virus pour permettre la mise au point d'outils de diagnostic moléculaire, de vaccins plus sûrs et surtout de nouveaux antiviraux. Les recherches se sont intensifiées avec l'utilisation de modèles substitutifs du virus comme le virus de la vaccine, le virus cowpox et le virus monkeypox, pathogènes chez l'homme. En France, le « Plan National de Réponse à une menace Variole » prévoit et détermine les mesures pratiques à mettre en œuvre en cas de réémergence de la maladie. Il s'agit de mesures de prévention, de renforcement de surveillance, d'élaboration d'un diagnostic rapide et fiable, et de la constitution de stocks de vaccins et du matériel nécessaire à la vaccination de la population française.

c) Clinique

Le virus de la variole infecte l'homme uniquement, il n'existe pas de réservoir animal et les insectes ne jouent aucun rôle dans la transmission de cette maladie (Esposito and Fenner 2001). Le virus est transmis d'individu à individu essentiellement par voie aérienne par inhalation de gouttelettes émises par une personne infectée lors de la toux ou de l'éternuement. Il peut également être transmis après aérosolisation de particules virales issues de lésions cutanées contaminant toutes surfaces comme les vêtements ou la literie. La transmission placentaire du virus est possible et responsable de variole congénitale à l'origine d'avortement en début de grossesse.

La période d'incubation du virus est de 8 à 14 jours après l'infection et reste asymptomatique. La personne contaminée reste en bonne santé et n'est pas contagieuse. Pendant cette période le virus infecte les cellules des muqueuses respiratoires et les ganglions lymphatiques via les macrophages et se réplique activement (première virémie).

Le virus dissémine ensuite dans les différents organes internes (foie, rate, moelle osseuse et ganglions) et les réponses cellulaires immunitaires se mettent en place. Les organes lymphoïdes secondaires sont infectés entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour (seconde virémie). A la fin de l'incubation le virus via les leucocytes infecte les vaisseaux capillaires du derme et de l'oropharynx. Les premiers symptômes apparaissent vers le 13^{ème} ou 14^{ème} jour et sont similaires à ceux d'une grippe : maux de tête, fièvre, nausées, douleurs musculaires, convulsions. La fièvre, en maintenant le patient alité, limite la dissémination. Après 2 à 4 jours la température diminue tandis que l'éruption cutanée ou « rash » apparaît.

Les lésions se développent initialement sur les muqueuses buccales et oropharyngées (phase d'érythème) et permettent la dissémination du virus par aérosol, via les sécrétions. L'éruption cutanée (exanthème) apparaît d'abord sur le visage, les mains et avant-bras puis s'étend au tronc et membres inférieurs et se généralise sur l'ensemble du corps en moins de 48 heures. Cette distribution centrifuge du rash permet de différencier la variole de la varicelle mais ne constitue pas un critère assez probant pour la plupart des médecins aujourd'hui. Les lésions évoluent de la macule à la papule de 2 à 3 millimètres de diamètre enchâssée dans le derme (2^{ème} jour après l'éruption), puis ces papules deviennent des vésicules à l'aspect de

perles de verre (3^{ème} au 4^{ème} jour). Les vésicules se transforment alors en pustules caractéristiques avec leur ombilication et leur infiltration sous-jacente (5^{ème} au 7^{ème} jour).

A partir du 11^{ème} jour, la pustule se dessèche et la croûte toujours infectieuse tombe à partir du 20^{ème} jour laissant chez 75% des survivants des cicatrices indélébiles (figure 1). L'éruption finit par atteindre toutes les muqueuses et est à l'origine de troubles laryngés, bronchiques et digestifs.

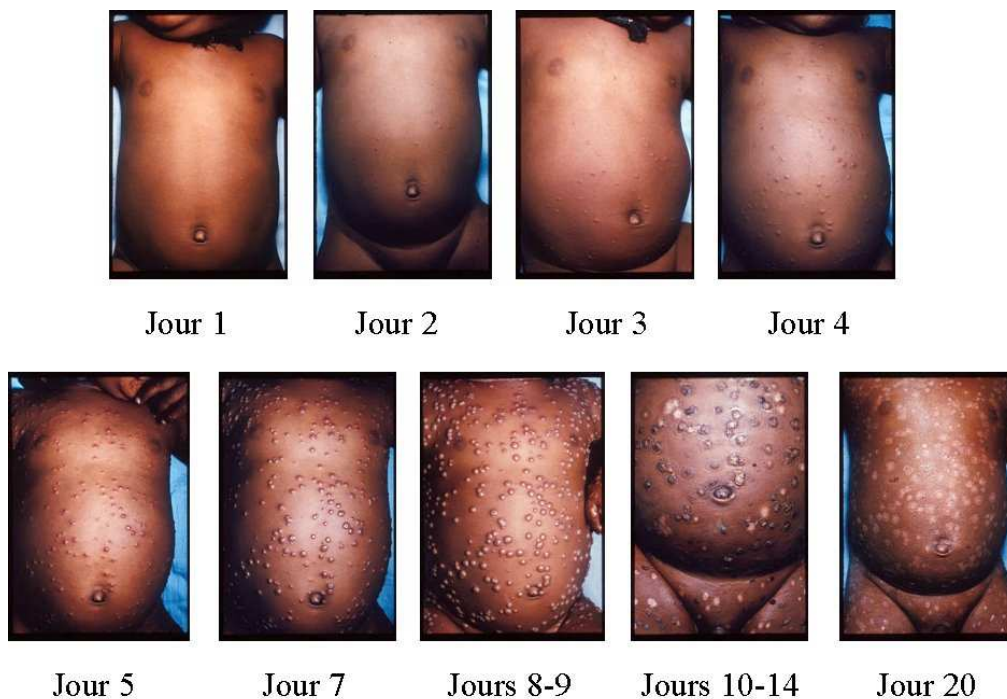


Figure 1 : Evolution de l'exanthème chez un enfant atteint par la variole. Du jour 2 au jour 4 : rash maculaire ; Jour 5 : vésicules ; Jours 7 à 9 : pustules ; Jours 10 à 14 : dessiccation et décrustation ; Jour 20 : cicatrices.

L'individu est contagieux un jour avant l'apparition des pustules et le reste jusqu'à la chute des croûtes. La contagion est maximale pendant les 7 à 21 jours suivant l'éruption cutanée. Un individu contagieux infecte en moyenne 1 à 5 personnes dans son entourage direct. Le taux de mortalité a été estimé de 30 à 50%. Il est lié en particulier aux surinfections bactériennes concomitantes et à la dissémination du virus dans l'organisme touchant les yeux (cécité), la peau (dermatite septique), les articulations et les os (déformations), les systèmes respiratoire, digestif, cardiaque et nerveux central (Fenner, Henderson et al. 1988). Les survivants développent une immunité antivariolique toujours protectrice (Vichniakov 1968).

d) La vaccination

Historiquement la pratique de la vaccination découverte par Edward Jenner à la fin du XVIII^{ème} siècle se réalisait de « bras à bras » (figure 2) et aboutissait bien souvent à la transmission accidentelle de maladies infectieuses comme la syphilis ainsi qu'à la réduction du pouvoir immunogène. Le vaccin était alors produit sur des génisses ou des moutons infectés par le virus cowpox par scarification cutanée (figure 3). La pulpe obtenue par grattage était additionnée de glycérine pour une conservation au froid possible pendant plusieurs mois.

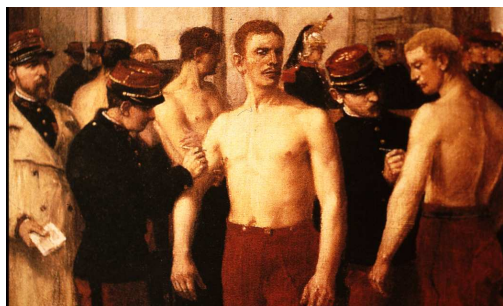


Figure 2 : La vaccination « bras-à-bras »

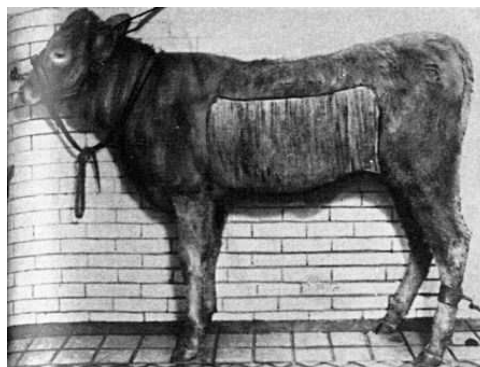


Figure 3 : Génisse curetée pour récupérer la pulpe vaccinale

En 1917 à l'Institut de la Vaccine à Paris, Fasquelle met au point la « dessiccation sous congélation » du virus vaccinal. Le vaccin est alors sec, thermostable et facilement transportable. La disponibilité d'un vaccin sous forme lyophilisée utilisé pendant la campagne d'éradication a permis par la suite d'intensifier les programmes de vaccination dans les zones endémiques. Plusieurs modes d'inoculation étaient utilisés, par scarification cutanée à l'aide d'un vaccinostyle ou de façon privilégiée à l'aide d'une aiguille bifurquée (figure 4).



Figure 4 : Aiguille bifurquée (à gauche) et vaccinostyle (à droite) utilisés pendant la campagne de vaccination

Mais quelque soit la technique, la prise du vaccin antivariolique est marquée, après une phase de latence de trois jours, par l'apparition d'une pustule « Jennerienne » caractéristique au site d'inoculation, et évoluant selon les mêmes étapes qu'une pustule variolique (figure 5). Elle s'accompagne fréquemment d'adénopathies marquant le développement de la réponse immune, et parfois d'un état fébrile. Douze à 20 jours après inoculation, la pustule se dessèche, une croûte brunâtre apparaît et laisse place à une cicatrice blanche et indélébile. L'apparition de la pustule vaccinale indique la prise vaccinale. Les anticorps neutralisants induits par la vaccination antivariolique sont spécifiques du genre et permettent une protection croisée avec les autres orthopoxvirus.

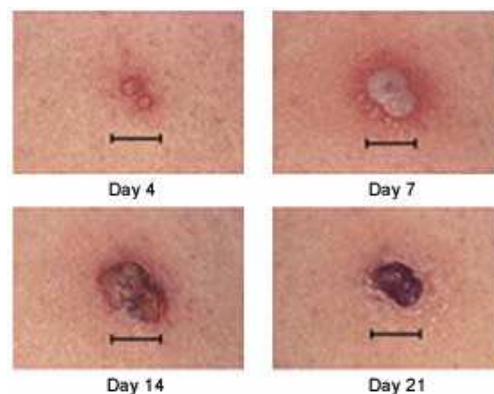


Figure 5 : Evolution de la lésion liée à la primo-vaccination

Bien que l'efficacité de cette vaccination n'ait jamais été mesurée dans un essai comparatif, des études épidémiologiques ont montré qu'une protection élevée persistait cinq ans après une primo-infection et au moins dix ans après un seul rappel. La meilleure preuve de l'efficacité du vaccin reste l'éradication mondiale de la variole.

e) Les complications post-vaccinales

Le vaccin peut engendrer certaines complications parfois mortelles. Ces complications post-vaccinales sont soit liées à une réplication excessive du virus de la vaccine, soit d'origine plus diverse (Crance, Lamarque et al. 2002; Cono, Casey et al. 2003) (figure 6).



Figure 6 : Les complications post-vaccinales : De gauche à droite : « *eczema vaccinatum* », « *vaccinia necrosum* », « vaccine généralisée » et « inoculation multiple secondaire ».

L'*eczema vaccinatum* pouvait toucher les enfants sujets à de l'eczéma ou à d'autres dermatoses prurigineuses. Il était caractérisé par une réplication active du virus sur de larges surfaces cutanées provoquant des lésions enflammées et infectées. Cette complication s'observait chez 42 sujets pour un million de vaccinés. Le décès survenait une fois sur trois.

Le *vaccinia necrosum* ou vaccine progressive était observé chez les individus ayant une déficience de l'immunité cellulaire. Il est caractérisé par une plaie au site de vaccination, liée à une réplication virale intense dans les tissus sous-jacents de l'épiderme, qui s'étend inexorablement et devient ulcéreuse. Cette complication s'observait chez 5 sujets pour un million de vaccinés. Le décès survenait systématiquement en trois à cinq mois.

L'encéphalite post-vaccinale, rare, survenait en général deux semaines après la vaccination chez des individus a priori sans prédisposition particulière. La fréquence des encéphalites dépendait de la pathogénicité de la souche vaccinale utilisée et pouvait avoir deux formes : soit des lésions vasculaires cérébrales chez les enfants de moins de dix ans lors de la primo vaccination soit des lésions démyélinisantes chez les plus de quinze ans lors du rappel. Environ 15 à 20% des cas étaient mortels.

La vaccine généralisée était associée au passage du virus dans le flux sanguin permettant sa dissémination dans tout l'organisme. Apparaissait alors une éruption papuleuse généralisée non pustuleuse liée à une multiplication virale épidermique. La fréquence de cette complication était de 250 cas sur un million avec le plus souvent une évolution favorable.

L'infection accidentelle par inoculations multiples secondaires (600 cas/million) était la plus commune. Le patient pouvait transmettre le virus à partir du site d'inoculation vers une autre surface de son corps ou contaminer un proche par contact. Les atteintes ophtalmologiques pouvaient conduire à la perte de l'œil.

Récemment, des cas de contaminations secondaires ont été décrits aux Etats-Unis en 2004 où plusieurs millions de personnes (civils et militaires) ont été vaccinées (Cono, Casey et al. 2003). D'autres complications ont aussi été répertoriées comme des myopéricardites, des angines de poitrine, des infarctus cardiaques et des thrombocytopénies. Elles ont conduit à l'arrêt de la campagne massive de vaccination aux USA bien que la relation de causalité n'ait été démontrée que pour les myocardites. D'après une étude réalisée en 1968 aux Etats-Unis, le nombre de décès causés par la vaccination était de un pour un million (Lane, Ruben et al. 1969).

A ce jour, en raison de la fréquence de ces complications, la vaccination n'est pas justifiée dans la mesure où le risque d'exposition est faible ou inexistant.

2- LES AUTRES INFECTIONS À ORTHOPOXVIRUS

a) L'infection par le virus de la vaccine

Le virus de la vaccine induit une protection croisée avec le virus de la variole et a été utilisé pour la vaccination antivariolique pendant près de deux cent ans mais son origine reste inconnue (Gubser, Hue et al. 2004). Au cours des décennies de vaccination antivariolique, il s'est avéré que le virus inoculé n'était plus le cowpox (prélevé sur une vache atteinte par ce virus) mais le virus de la vaccine (comme l'a prouvé Downie en 1939). Les hypothèses émises sur son origine que sont l'existence de mutations du virus cowpox ou de la variole, des recombinaisons entre les virus cowpox et de la variole ou même une contamination des bovins utilisés pour la vaccination par des chevaux infectés par un poxvirus équin ont été infirmés. Le virus considéré comme une espèce virale à part entière peut infecter de nombreux vertébrés.

Les rares infections humaines sont observées en cas de complications post-vaccinales, d'accident de laboratoire, ou de transmission accidentelle d'un individu récemment vacciné à un sujet non vacciné. Néanmoins plusieurs épidémies de vaccine ont été recensées au Brésil depuis 1999 (Damaso, Esposito et al. 2000) et en Inde. Les symptômes cliniques sont ceux observés lors de complications consécutives à la vaccination antivariolique, basée sur l'injection de ce virus.

b) L'infection par le virus monkeypox

Le virus monkeypox est principalement localisé en Afrique centrale et en République démocratique du Congo. Il a été identifié pour la première fois en 1958 à Copenhague comme étant l'agent étiologique d'une maladie semblable à la variole chez les singes en captivité. Le virus se propage au sein des populations d'écureuils, de rongeurs et de singes, au contact desquels l'homme peut être contaminé (Hutin, Williams et al. 2001). La transmission inter-humaine est peu importante (environ 3%). Cette zoonose est la poxvirose la plus préoccupante depuis l'éradication de la variole. Le premier cas humain de monkeypox a été décrit en 1970 en République Démocratique du Congo (ex-Zaïre), neuf mois après l'éradication de la variole dans le pays (Foster, Brink et al. 1972).

Jusqu'en 1979, une cinquantaine de cas ont été répertoriés majoritairement dans le bassin congolais, avec des taux de mortalité allant de 3% à 17% alors que plus de 10% des individus avaient subi une vaccination antivariolique (Jezek, Grab et al. 1988; Jezek, Grab et al. 1988). En mai 2003 la première épidémie hors Afrique équatoriale a eu lieu aux Etats-Unis où 81 cas ont été recensés (Di Giulio and Eckburg 2004). La source de cette épidémie était des chiens de prairie . Ces animaux, porteurs asymptomatiques, avaient été contaminés par de petits mammifères (écureuil et rat géant de Gambie) importés du Ghana au Texas. Ils ont à leur tour contaminé leurs propriétaires par morsure. Les manifestations cliniques d'une infection à monkeypox sont similaires à celles de la variole : éruption pustuleuse, fièvre, symptômes respiratoires causant parfois la mort. Les moyens prophylactiques et thérapeutiques antivarioliques, dont la vaccination sont efficaces contre « l'orthopoxvirose simienne » (Fine, Jezek et al. 1988).

c) L'infection par le virus cowpox

Le virus cowpox est responsable d'une maladie sporadique autrefois observée chez les vaches. Au début des années 1970, le virus est observé chez d'autres animaux infectés par des rongeurs péri-domestiques, constituant le réservoir de ce virus (Vestey, Yirrell et al. 1991). Le cowpox est présent dans quelques pays européens et des pays de l'Asie du sud ouest. Les infections chez l'homme sont rares souvent localisées aux mains, à la suite de griffures d'un chat domestique contaminé par un rongeur (Chantrey, Meyer et al. 1999; Hazel, Bennett et al. 2000). D'un point de vue clinique, après une incubation de douze jours, des papules douloureuses apparaissent et se transforment en vésicules puis en pustules ombiliquées hémorragiques. Les syndromes pseudo-grippaux sont rarement associés. Les lésions cutanées restent majoritairement présentes sur les mains et le visage et disparaissent après trois à douze semaines.

B/ CARACTERISTIQUES DES ORTHOPOXVIRUS

1- ORGANISATION DU GENOME ET PHYLOGENIE

Le génome des virus du genre orthopoxvirus est constitué d'un brin d'ADN linéaire, bicaténaire, dont la taille varie de 150 à 300 kpb et clos aux extrémités par des boucles en forme d'épingle à cheveux. La région centrale (fragment de 90 kpb) est fortement conservée entre les espèces tandis que les régions terminales sont relativement variables (Moss 2001). Les gènes de la région centrale codent majoritairement pour des protéines de structure du virion ou des enzymes impliquées dans la réplication et la transcription virale. Les régions terminales codent pour des protéines non essentielles à la réplication virale en culture cellulaire et notamment pour des facteurs de virulence et de restriction d'hôte. Ces gènes probablement d'origine cellulaire auraient été capturés au cours de la co-évolution des virus avec leurs hôtes naturels. Plus d'une centaine de séquences génomiques de poxvirus ont été analysés et ont permis d'étudier les relations phylogéniques entre les différents virus (McLysaght, Baldi et al. 2003). Ces études ont validé l'utilisation des virus de la vaccine, du cowpox, monkeypox et camelpox comme modèles substitutifs du virus de la variole.

2- STRUCTURE DES VIRIONS

Les images de microscopie électronique montrent que les particules virales des poxvirus ont la forme d'une brique lisse de 350 nm de long sur 250 nm de large (Dubochet, Adrian et al. 1994) (figure 7). Le virion est délimité par une membrane lipoprotéique épaisse de 12 nm lui conférant une structure antigénique complexe et renferme une nucléocapside de forme biconcave appelée « core » et deux corps latéraux positionnés dans les concavités. Le core contient le génome et les nucléoprotéines et est entouré par une palissade protéique de 18 nm.

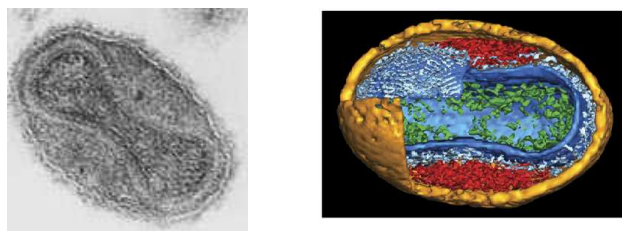


Figure 7 : Particule virale visualisée au microscope électronique et représentation schématique d'un virion mature intracellulaire. Membrane externe (jaune), corps latéraux (rouge), core (bleu et membrane en bleu foncée), ADN viral (vert).

Les orthopoxvirus produisent deux types de virions au cours de leur cycle réplcatif : la forme IMV (Intracellular Mature Virus) et la forme EEV (Extracellular Envelopped Virus), différents dans le fait que la particule EEV est entourée par un enveloppe lipidique supplémentaire, et donc distincte sur le plan antigénique.

3- CYCLE DE REPLICATION

(pour revue (Moss 2007))

Une des particularités des poxvirus par rapport à tous les autres virus à ADN est qu'ils se répliquent dans le cytoplasme cellulaire.

La première étape du cycle réplcatif des orthopoxvirus est l'attachement des virions à la surface de la cellule, réalisé par l'interaction de protéines virales probablement sur des glycosaminoglycanes cellulaires (Chung, Hsiao et al. 1998). Deux principaux mécanismes d'entrée ont été décrits, d'une part la fusion de la membrane externe du virion mature intracellulaire (IMV) avec la membrane cytoplasmique à pH neutre et d'autre part une endocytose pour les virions extracellulaires enveloppés (EEV) à pH faible.(Bengali, Townsley et al. 2009) Dans les deux cas le « core » viral contenant le génome est libéré dans le cytoplasme (figure 8). Dans le core a lieu, immédiatement après l'infection, l'étape de transcription de gènes viraux précoces permettant la production d'ARNm codant pour les protéines du complexe de réplcation et les immunomodulateurs. L'étape suivante est la réplcation de l'ADN viral et la transcription concomitante des gènes dits « intermédiaires » codant notamment des facteurs de transcription nécessaires pour enclencher la transcription tardive. Les gènes tardifs codant pour les protéines de structure sont ensuite transcrits et les protéines correspondantes sont incorporées dans la particule virale naissante. La morphogénèse des virions a lieu dans une région du cytoplasme dépourvue d'organelles appelée « usine virale » et débute par la formation d'une double couche lipidique présentant à sa surface les protéines virales membranaires. Une fois fermée cette membrane constitue la membrane externe du virion immature non-infectieux (IV), 5 à 6 heures post-infection. Le clivage des protéines des IV et la condensation du core viral transforment les IV en virions matures intracellulaires (IMV). Ces particules infectieuses sont relarguées soit par cytolysse soit par bourgeonnement. Les IMV peuvent acquérir une enveloppe supplémentaire provenant de l'appareil de Golgi ou d'endosomes primaires pour former des virions enveloppés intracellulaires (IEV). Ces derniers atteignent la surface cellulaire le long des microtubules et

sont libérés par fusion membranaire sous forme de virus enveloppé associé à la membrane (CEV) si le virion reste attaché à la cellule et sous forme d'EEV s'il se détache.

Les IMV sont responsables de la dissémination du virus d'individu à individu. Ces particules sont en effet très résistantes dans le milieu extérieur mais peu adaptées à la propagation chez l'hôte car facilement neutralisées par les anticorps. Les CEV sont essentiellement impliquées dans la transmission du virus de cellules à cellules (Blasco and Moss 1992). Les EEV sont responsables de la dissémination longue portée au sein de l'organisme entier par passage dans la circulation sanguine (Payne 1980). Les quantités de chacune de ces particules varient selon les souches virales (Smith, Vanderplassen et al. 2002).

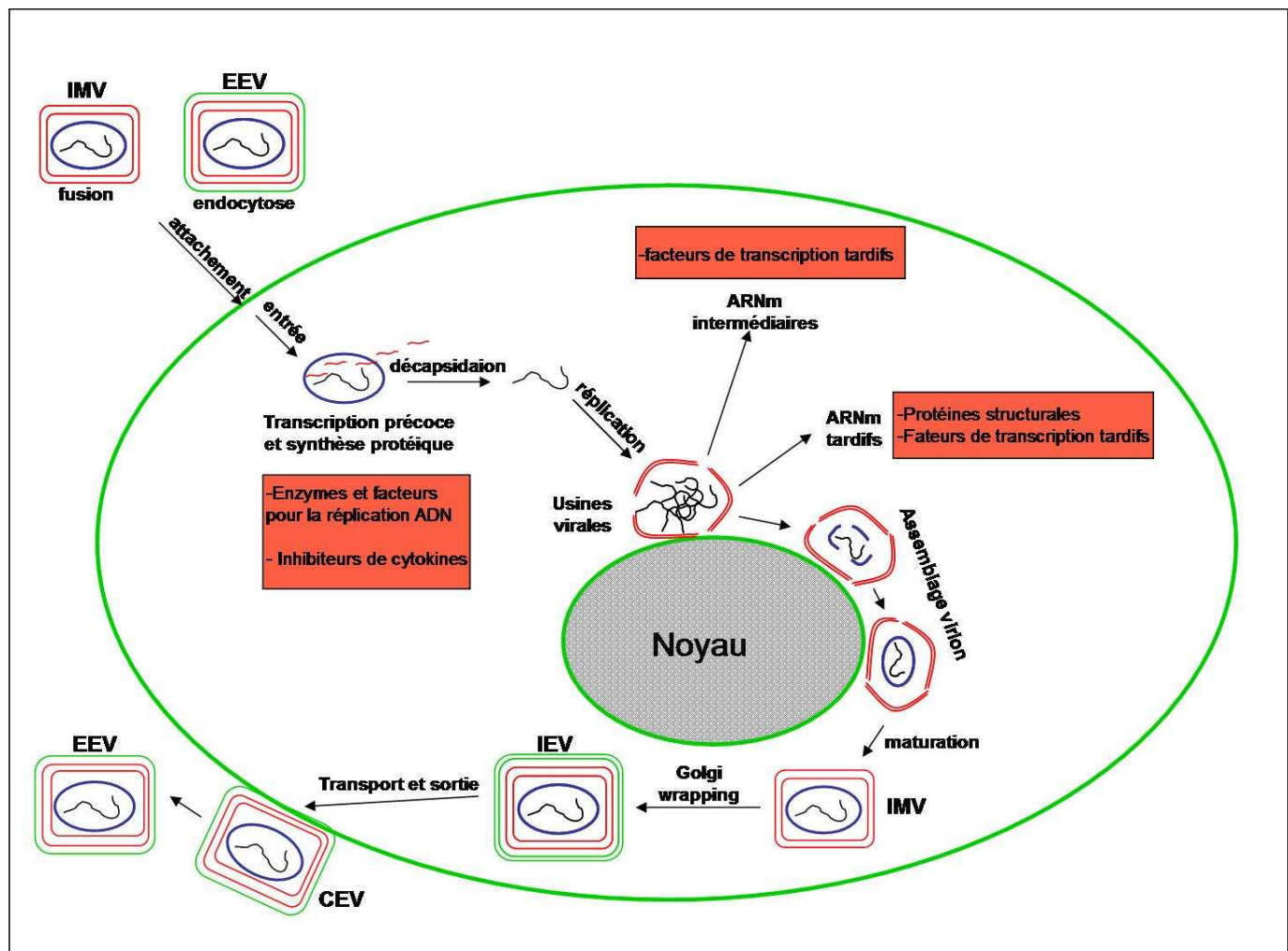


Figure 8 : Représentation schématique du cycle viral du virus de la vaccine. IMV : virus mature intracellulaire, EEV : virus extracellulaire enveloppé.

4- LES PROTEINES DU COMPLEXE DE REPLICATION

Les orthopoxvirus codent pour la plupart des protéines nécessaires à leur réplication. Le complexe de réplication du virus de la vaccine comprend à ce jour une ADN polymérase (E9), une composante stoechiométrique du facteur de processivité de la polymérase (A20), une protéine liant l'ADN simple brin (I3L), une topoisomérase (H5), une nucléoside triphosphatase indépendante de l'ADN avec une activité hélicase et primase (D5), une protéine capable de résoudre les jonctions de Holliday (A22), une uracile ADN glycosylase impliquée dans le métabolisme nucléotidique et second composant du facteur de processivité avec A20 (D4) (Klemperer, McDonald et al. 2001).

L'accent est mis sur 3 protéines du complexe montrées comme étant capables d'interagir avec la protéine A20 (Ishii and Moss 2002), fil conducteur de ce travail de thèse (figure 9):

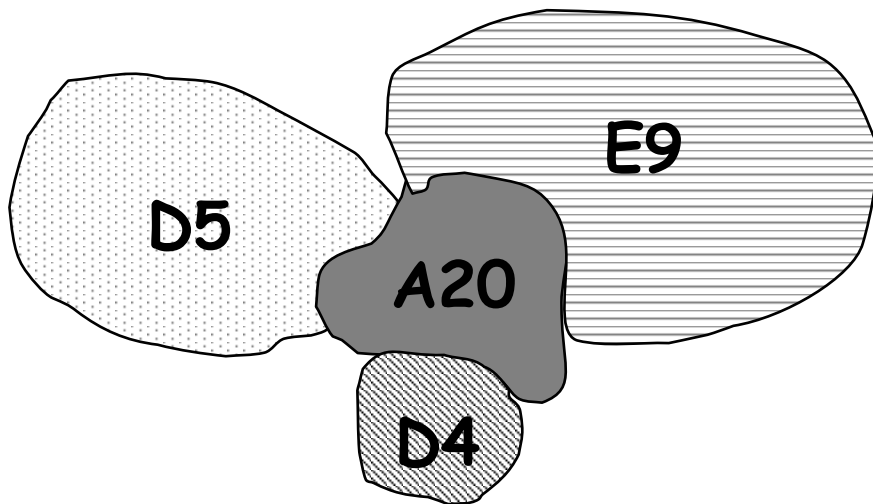


Figure 9 : Représentation schématique du complexe de réplication du virus de la vaccine

L'uracile ADN glycosylase (D4)

Les uraciles ADN glycosylases (UNG) sont ubiquitaires et retrouvées chez les mammifères, les bactéries, les herpèsvirus et les poxvirus. Cette enzyme, dont la fonction est l'excision des bases uraciles incorporées par erreur dans l'ADN, est essentielle pour la réplication virale (Millns, Carpenter et al. 1994). Il a été montré que cette protéine était capable d'interagir avec la protéine virale A20 pour former le facteur de processivité de l'ADN polymérase virale. L'interaction entre D4 et A20 est essentielle pour la réplication virale (Stanitsa, Arps et al. 2006) et l'activité glycosylase aurait un rôle dans la pathogenèse virale (De Silva and Moss 2003). Cette protéine est par conséquent une cible de choix pour le développement de composés inhibiteurs de la réplication des orthopoxvirus.

La nucléoside triphosphatase ADN-indépendante (D5)

Cette enzyme est synthétisée précocement lors de l'infection. Elle est essentielle à la réplication et interagit également avec A20 (Evans and Traktman 1992; Evans, Klemperer et al. 1995; McCraith, Holtzman et al. 2000; Ishii and Moss 2002).

Tout dernièrement l'analyse de mutants D5 sensibles à la température a montré une réduction drastique de la réplication virale à température non-permissive (Boyle, Arps et al. 2007). Les auteurs ont montré que la protéine devait être sous forme multimérique pour maintenir l'activité nucléoside triphosphatase. La multimérisation fait appel à deux domaines (domaine AAA+ et Walker B) et à une région en amont du site catalytique. Cette activité enzymatique bien que nécessaire à la réplication ne pourrait pourtant pas expliquer à elle seule la contribution essentielle de D5 à la réplication virale.

Des études *in silico* ont indiqué que la région C-terminale de D5 appartenait à la superfamille III (SFIII) des NTPases de classe AAA+, qui inclus les hélicases répliquatives de nombreux autres virus ADN et ARN, mais cette activité n'a pas été encore testée (Boyle, Arps et al. 2007). De plus le domaine N-terminal de cette protéine possède une séquence et des aspects structuraux en commun avec la superfamille des primases dont les membres ont divers rôles dans l'initiation de la transcription et la réparation de l'ADN. In vitro ce domaine est essentiel à la réplication de l'ADN viral (De Silva, Lewis et al. 2007).

L'ADN polymérase virale (E9)

Cette enzyme est essentielle à la réplication du virus et présente une homologie avec les polymérases des herpèsvirus (Earl, Jones et al. 1986). Elle possède une activité exonucléase 3'-5' pour corriger les erreurs introduites lors de la réplication (Challberg and Englund 1979). La protéine est capable de catalyser l'addition de 7000 nucléotides par événement de liaison *in vivo* et moins de 10 nucléotides *in vitro* (McDonald and Traktman 1994; McDonald and Traktman 1994). L'holoenzyme ADN polymérase active, essentielle à la réplication, est formée par la liaison d'E9 avec son facteur de processivité constitué par l'interaction des protéines A20 et D4 (Stanitsa, Arps et al. 2006).

La protéine A20

Toutes ces considérations autour de ces protéines nous laissent à penser que la protéine A20 joue un rôle pivot dans la réplication du virus. Très peu de données sont disponibles sur cette protéine qui ne possède aucune activité enzymatique connue. Le gène de cette protéine est transcrit de façon précoce après infection (Ishii and Moss 2001). A température non-permissive, des mutants thermosensibles entraînent des défauts dans l'accumulation de l'ADN et une perte de processivité de la polymérase virale (Punjabi, Boyle et al. 2001). Ces résultats, combinés au fait que la protéine soit capable d'interagir avec de multiples partenaires essentiels à la réplication du virus, nous permettent d'émettre l'hypothèse que A20 est impliquée dans l'assemblage du complexe de réplication (figure 9). La protéine A20 constitue donc une cible particulièrement pertinente pour le développement d'inhibiteurs de la réplication virale.

II] LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS À ORTHOPOXVIRUS :

A/ LES VACCINS ANTIVARIOLIQUES :

1- LES VACCINS DE PREMIERE GENERATION :

Il s'agit des vaccins vivants produits sur animaux jusqu'en 1980 et utilisés lors de la campagne d'éradication de la variole (Fenner, Henderson et al. 1988). Ils ont été entretenus et multipliés dans diverses conditions selon les pays. En 1968, 19 souches du virus de la vaccine étaient utilisées à travers le monde avec des pouvoirs pathogènes variables. Pendant le programme d'éradication les vaccins les plus utilisés étaient le vaccin Dryvax (souche New York city board of health), utilisé aux Etats-Unis et la souche Lister, utilisée en Europe, Afrique, Asie et Océanie (VACV-List)

Aucune étude épidémiologique n'a permis de mettre en évidence une souche vaccinale optimale, à la fois plus protectrice et moins pathogène. Ces vaccins étaient administrés avec une aiguille bifurquée ou un vaccinostyle.

En réponse à la menace terroriste d'utilisation de la variole, la France dispose à ce jour d'un stock suffisant de doses pour vacciner l'ensemble de la population. Ces vaccins ne disposent pas d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) mais d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte, régie par un décret ministériel qui autorise leur utilisation dans des conditions précises.

2- LES VACCINS DE DEUXIEME GENERATION :

Afin de répondre aux critères de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) faisant défaut aux vaccins de première génération, plusieurs compagnies pharmaceutiques ont développé de nouveaux vaccins, mono- ou polyclonaux, produits en culture cellulaire.

Le vaccin américain ACAM2000 des laboratoires Acambis-Baxter est un vaccin monoclonal dérivé du vaccin Dryvax, produit sur cellules Vero et mis au point pour tenter de limiter les

risques de complications post-vaccinales (Artenstein, Johnson et al. 2005). Mais les essais cliniques de phase I débutés en avril 2004 ont été stoppés suite à la survenue de myopéricardites dans les mêmes proportions qu'avec le vaccin Dryvax.

Deux vaccins polyclonaux sont actuellement en tests cliniques :

Il s'agit premièrement du vaccin Sanofi-Pasteur produit à partir de la souche vaccinale Lister amplifiée sur culture de cellules d'embryon de poulet. Des études chez la souris n'ont montré aucune différence significative de pathogénicité et une immunogénicité similaire au vaccin de première génération (Ferrier-Rembert, Drillien et al. 2007). Les essais cliniques ont donné satisfaction et le vaccin a été acquis par le Royaume Uni.

Le second vaccin a été développé par les Laboratoires Connaught sur cellules MRC-5 à partir du vaccin Dryvax. Les essais de phase I (350 patients) n'ont montré aucun effet secondaire à ce jour (Greenberg, Kennedy et al. 2005).

3- LES VACCINS DE TROISIEME GENERATION :

Les vaccins de deuxième génération ont permis de remplacer les précédents vaccins mais dans la plupart des cas les effets secondaires demeurent. Les vaccins de troisième génération sont produits en culture cellulaire à partir de souches virales non-répliquatives pour éliminer les possibles complications. Les souches sont obtenues par passages successifs en culture cellulaire (souche MVA) ou génétiquement modifiées par des délétions provoquées dans des gènes liés à la propagation virale (souche NYVAC).

Le candidat MVA a été développé à la suite de 500 passages successifs de la souche Ankara sur cellules d'embryon de poulet. Cette souche se retrouve délétée d'une vingtaine de gènes et criblée de mutations ponctuelles sur son génome (Drexler, Staib et al. 2004). Elle ne peut se répliquer dans les cellules humaines. De nombreuses études de protection chez différents animaux ont montré une bonne efficacité à court terme mais plus faible à long terme, et à des doses 100 à 1000 fois supérieures à celles du vaccin historique (Ferrier-Rembert, Drillien et al. 2008) (Phelps, Gates et al. 2007). Le vaccin « Imvamune » développé par la société Bavarian Nordic utilise la souche MVA. Les essais cliniques de phase I et II ont prouvé que le vaccin entraînait uniquement des réactions locales avec un titre en anticorps neutralisants qui persiste plus de cent jours.

La souche LC16m8 a quant à elle été isolée après plusieurs passages de la souche vaccinale Lister sur des cellules primaires de reins de lapins (Takahashi-Nishimaki, Suzuki et al. 1987).

Le phénotype de cette souche hautement atténuée est attribué à une mutation dans le gène B5R, codant pour une protéine d'enveloppe responsable de la dissémination du virus dans l'organisme. Les résultats obtenus chez l'animal montrent que cette souche permet une réponse humorale comparable à celle obtenue avec le Dryvax avec une pathogénicité diminuée. Les essais cliniques sont en cours (Kenner, Cameron et al. 2006).

4- LES VACCINS DE QUATRIEME GENERATION :

Il s'agit de vaccins sous-unitaires constitués de protéines virales antigéniques de surface des deux formes infectieuses IMV et EEV, produites par génie génétique. Un vaccin ADN contenant les gènes codant pour les protéines de surface L1 et A27 (pour la forme IMV) et A33 et B5 (pour la forme EEV) a été développé. Administré par voie intranasale, il a démontré son efficacité dans des études de protection contre une infection létale chez la souris et son immunogénicité chez le macaque (Hooper, Custer et al. 2003).

La variole ayant été éradiquée, l'évaluation précise de l'efficacité de tous ces nouveaux vaccins est impossible chez l'homme. Et en général les études sur modèles animaux, bien qu'imparfaits, indiquent une protection à long terme partielle contre une épreuve virale létale.

B/ LES IMMUNOGLOBULINES ANTI-VACCINE (VIG) :

Les VIG sont des solutions stériles de la fraction immunoglobulines issues de sérums humains contenant des anticorps anti-vaccinés d'individus vaccinés. Leur injection se fait par voie intramusculaire ou intraveineuse. Les autorités françaises ont collecté (chez des sujets vaccinés) et stocké environ 120 litres de plasmas hyper immuns utilisables uniquement en cas d'attaque variolique, et acheté quelques flacons de VIG pour traiter les éventuels accidents vaccinaux de l'équipe nationale dédiée. Bien qu'à ce jour, il n'existe aucune preuve absolue de leur efficacité chez l'homme leur action est tout de même considérée comme bénéfique par la grande majorité des experts. L'utilisation des VIG disponibles commercialement (VIGIV Cangene et VIGIV Dynport) est recommandée par le Center for Diseases Control (CDC) pour le traitement de l'*eczema vaccinatum* et certains cas de vaccine progressive ou généralisée (Witteck 2006).

C/ LES MOLECULES ANTIVIRALES :

1- LE CIDOFOVIR, INHIBITEUR DE L'ADN POLYMERASE VIRALE

Le (S)-HMPMC ou cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine, VistideTM], analogue acyclique du nucléoside cytosine, a été décrit en 1986 (De Clercq, Holy et al. 1986). Il s'agit d'un nucléoside phosphonate acyclique (ANP). *In vitro*, cette molécule montre une activité antivirale de longue durée et à large spectre contre les virus à ADN, incluant les adénovirus, les herpesvirus, les iridovirus et les poxvirus (De Clercq 2007). L'effet antiviral prolongé du cidofovir lié à la longue demi-vie de ses métabolites à l'intérieur des cellules, est une propriété de la molécule et permet des administrations espacées et une utilisation en prophylaxie.

Le cidofovir bloque la synthèse de l'ADN des poxvirus en agissant comme un terminateur de la chaîne d'élongation (Magee, Hostetler et al. 2005). De plus, son incorporation dans la chaîne par l'ADN polymérase virale inhibe également l'activité exonucléase 3'-5' de la polymérase du virus de la vaccine, censé corriger les erreurs lors de la réplication de l'ADN. L'obtention de virus de la vaccine résistants au cidofovir a permis de confirmer le mode d'action de la molécule chez ce virus (Andrei, Gammon et al. 2006). Deux mutations à l'origine des phénotypes de résistance ont été localisées dans le gène de l'ADN polymérase (E9L). La première au niveau de la région du gène codant pour l'activité 3'-5' exonucléase (A314T) et la seconde au niveau du domaine catalytique de la polymérase (A684V).

L'activité antivirale du cidofovir en culture cellulaire a d'abord été démontrée contre le virus de la vaccine avant d'être confirmée chez tous les virus du genre orthopoxvirus, dont le virus de la variole pour lequel la concentration requise pour inhiber 50% de la réplication virale (IC₅₀) est de 6µM (De Clercq 2002).

L'activité antivirale *in vivo* a été mise en évidence pour la première fois en 1993 chez des souris immunodéficientes SCID infectées par voie intraveineuse avec des doses létales du virus de la vaccine. Un seul traitement a permis d'augmenter de façon significative la survie des souris (Neyts and De Clercq 1993).

Plus récemment, chez des souris immunocompétentes infectées par voie intranasale avec une dose létale du virus de la vaccine, un traitement unique de 100mg/kg de cidofovir injecté par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée a permis la survie de toutes les souris en comparaison à la mort de l'ensemble des souris non-traitées, 8 jours post-infection (Smee, Bailey et al. 2001; Smee, Bailey et al. 2001; Smee, Bailey et al. 2002). La molécule est aussi efficace injectée par voie intranasale et protège les souris d'une infection par le virus cowpox, inoculé par voie aérienne en aérosol (Bray, Martinez et al. 2002). Enfin le cidofovir a prouvé son efficacité antivirale sur le modèle primate infecté par voie intratrachéale avec une dose létale de virus monkeypox (Stittelaar, Neyts et al. 2006).

Cette molécule a une AMM depuis 1996 pour le traitement par voie intraveineuse de la rétinite à cytomégalovirus chez les patients atteints du SIDA. Son potentiel thérapeutique chez l'homme a été démontré contre les infections par les herpèsvirus, adénovirus et poxvirus. Le cidofovir a été testé avec succès chez l'homme uniquement sur les poxviroses liées au virus orf (Parapoxvirus) (Geerinck, Lukito et al. 2001) et au virus du *molluscum contagiosum* (Molluscipoxvirus) (Meadows, Tying et al. 1997; Ibarra, Blanco et al. 2000).

Actuellement, en cas d'épidémie de variole le CDC recommande uniquement le cidofovir en tant que thérapie antivirale (Cono, Casey et al. 2003). Le médicament requiert une administration par voie intraveineuse avec un risque de néphrotoxicité élevé nécessitant un traitement protecteur complémentaire au probénécide (Lalezari and Kuppermann 1997; Lacy, Hitchcock et al. 1998).

Le groupement phosphonate étant responsable de sa faible biodisponibilité orale, des dérivés du cidofovir ont été synthétisés pour tenter de résoudre ce problème et améliorer le pouvoir antiviral de la molécule. Les plus prometteurs sont encore en cours d'évaluation chez l'animal (De Clercq 2007).

Des conjugués esters lipidiques alkoxyalkyles du cidofovir comme l'hexadecylpropanediol (HDP-cidofovir, appelé aussi CMX001) et l'octadecylethanediol (ODE-cidofovir) ont été synthétisés. Ces composés sont capables d'inhiber la réplication des orthopoxvirus *in vitro* avec des concentrations inhibitrices cent fois plus faibles que celle du cidofovir (Kern, Hartline et al. 2002).

Des expérimentations de protection chez la souris infectée par des doses létales de virus de la vaccine, cowpox ou le virus de l'ectromélie ont prouvé l'efficacité de ces deux molécules (Buller, Owens et al. 2004). Ces études démontrent que les dérivés semblent plus facilement absorbés par les cellules que le cidofovir (dans un rapport 11 à 23) et elles ne s'accumulent pas dans les reins (Ciesla, Trahan et al. 2003). Les molécules sont en cours d'évaluation chez l'animal. Les premiers résultats pour la molécule CMX001 sont encourageants puisque le composé administré oralement protège l'ensemble des souris infectées en intranasal avec une dose létale de virus de l'ectromélie, et ce même lorsque la molécule est administrée seulement au sixième jour après infection (Parker, Touchette et al. 2008).

D'autres dérivés ont également vu le jour ces dernières années avec le développement du 6-[2-(phosphomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidine (DAPy) ou HPMPO-DAPy. L'activité antivirale de ce composé a été démontrée *in vitro* contre le virus de la vaccine, le virus cowpox et le virus calmpox et *in vivo* chez la souris et le primate non-humain infectés par le virus monkeypox, avec une efficacité similaire au cidofovir (Balzarini, Pannecouque et al. 2004).

La toute dernière génération de dérivés du cidofovir regroupe les molécules (S)-HPMP-5-azacytosine, (S)-cHPMP-5-azacytosine et sa pro-drogue ester alkoxyalkyle, HDE-cHPMP-5-azacytosine (Krecmerova, Holy et al. 2007). Cette dernière molécule est capable d'inhiber la réplication du virus de la vaccine, du cowpox et du camelpox *in vitro* avec une efficacité 100 fois supérieure à la molécule parente (Krecmerova, Holy et al. 2007).

2- LE ST-246, INHIBITEUR DE LA FORMATION DES PARTICULES VIRALES ENVELOPPEES

La molécule ST-246 a été sélectionnée comme inhibiteur de l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) du virus de la vaccine sur cellules Vero au cours d'un criblage en culture cellulaire de plus de 300 000 composés chimiques (Yang, Pevear et al. 2005).

In vitro, cette molécule inhibe spécifiquement la multiplication des virus du genre orthopoxvirus dont la variole, le monkeypox et le cowpox, avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. *In vivo*, 70 à 100% des souris infectées par des doses létales de virus cowpox ou de la vaccine et traitées par voie orale avec 50mg/ml de ST-246 deux fois par jour pendant 5 à 14 jours (traitement non toxique) survivent (Quenelle, Buller et al. 2007).

L'obtention d'un virus cowpox résistant au ST-246 a montré une mutation dans le gène V061 du virus codant pour une protéine de l'enveloppe virale (Yang, Pevear et al. 2005). La protéine homologue chez le virus de la vaccine, F13, permet l'enveloppement du virus, au niveau du trans-Golgi lors de la morphogénèse, pour former des virions extracellulaires enveloppés (EEV). Dans les premières heures post-infection par le virus de la vaccine, *in vitro*, la molécule empêche la formation de formes EEV mais pas la formation des IMV.

La molécule ST-246 a une bonne biodisponibilité orale, est stable à température ambiante et s'avère prometteuse pour le traitement des orthopoxviroses et des complications post-vaccinales. Le ST-246 est actuellement en essai clinique chez l'homme (Jordan, Tien et al. 2008). D'ores et déjà, la compagnie pharmaceutique Albemarle a prévu d'entreprendre la synthèse à grande échelle du ST-246 pour porter le nombre de doses disponibles à 25 millions.

3- LES AUTRES MOLECULES ANTIVIRALES

Plusieurs autres molécules plus ou moins récentes sont capables d'inhiber la réplication des orthopoxvirus.

La plupart des molécules inhibitrices de la réplication virale sont des analogues nucléosidiques qui ciblent des enzymes virales nécessaires à la réplication.

La ribavirine et son dérivé EICAR [(5-éthynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide) 5'-monophosphate], inhibiteurs de l'IMPdéshydrogénase, sont efficaces contre plusieurs virus à ARN et ADN dont le virus de la vaccine *in vitro* et *in vivo* (Smee, Bailey et al. 2000). La neplanocine et ses dérivés inhibiteurs de la SAH (S-adenosyl-L-homocysteine) hydrolase sont également de puissants inhibiteurs du virus de la vaccine avec des IC₅₀ inférieures à 1μg/ml *in vitro*.

D'autres analogues nucléosidiques inhibent la polymérase virale comme l'adénine arabinose (araA) agissant en compétition avec le dATP, substrat naturel pour la synthèse d'ADN. Un analogue acyclique de la purine, S2242 [2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)méthyl]purine] et sa pro-drogue diacétyl ester, HOE961, ont montré une activité antivirale contre le virus cowpox *in vivo* mais moindre que le cidofovir (Smee, Bailey et al. 2002). Un inhibiteur connu de la réplication des herpèsvirus le 5'-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) est également capable de retarder significativement la mort de souris infectées par le virus de la vaccine même lorsque le traitement est donné 4 jours après l'infection. Mais le composé est trop toxique pour une utilisation par voie générale (Neyts, Verbeken et al. 2002).

Plus récemment un analogue nucléosidique de la thymidine la N-methanobarbathymidine [(N)-MCT] a prouvé son efficacité pour la protection de souris infectées par des doses létales du virus de la vaccine et du cowpox et s'est révélée non-toxique à fortes doses (Smee, Hurst et al. 2007).

D'autres molécules sont capables d'inhiber la morphogenèse et la propagation du virus de cellules à cellules :

Un inhibiteur des tyrosines kinases cellulaires nécessaire à la dissémination dans l'organisme des formes virales EEV a aussi été décrit en 2005. Il s'agit de la molécule GleevecTM (STI-571, utilisée dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques). La molécule est capable d'inhiber *in vitro* la sortie du virus de la cellule infectée, réduit la dissémination du virus *in vivo* et favorise la survie des souris infectées (Reeves, Bommarius et al. 2005).

Un inhibiteur de la kinase ErbB-1, la molécule CI-1033 (autre molécule anti-cancéreuse) permet d'inhiber la sortie des virions hors de la cellule infectée et permet également la protection des souris infectées avec des doses létales de virus de la vaccine (Yang, Kim et al. 2005).

Récemment la molécule anticancéreuse mitoxantrone a prouvé son action antivirale *in vitro* contre le virus de la vaccine en inhibant la formation des particules intracellulaires IMV (Deng, Dai et al. 2007). Un virus résistant à la molécule a permis d'identifier une ADN ligase virale comme étant la protéine cible. Cependant, la protection des souris infectées avec le virus de la vaccine n'est pas assurée par cette molécule administrée par voie intrapéritonéale.

La molécule TTP-6171 inhibe, *in vitro*, la protéinase I7L du virus de la vaccine impliquée dans la morphogenèse virale. Les tests d'inhibition *in vivo* n'ont pas encore été décrits (Byrd, Bolken et al. 2004; Byrd and Hruby 2005).

Cependant aucune de ces molécules inhibitrices ne se mesure au cidofovir ou au ST-246 en termes d'activité anti-orthopoxvirus.

III] LA TECHNOLOGIE DES APTAMERES PEPTIDIQUES

(Revue (Hoppe-Seyler, Crnkovic-Mertens et al. 2004; Baines and Colas 2006)

A/ DESCRIPTION

Les aptamères peptidiques ont été développés au milieu des années 90 dans le laboratoire du Dr Brent au Massachusetts General Hospital à Boston (Colas, Cohen et al. 1996).

Ces molécules inspirées directement des immunoglobulines ou des récepteurs des cellules T présentent un motif peptidique de séquence aléatoire, doublement contraint (par la structure protéique des régions entourant ce le motif), formant une boucle exposée à la surface d'une plate-forme protéique de séquence constante.

La double contrainte favorise l'exposition de la région variable vers l'extérieur (même pour des résidus hydrophobes), comme pour les régions déterminant la complémentarité (CDR) sur les immunoglobulines. L'avantage par rapport aux immunoglobulines est que les aptamères, facilement manipulables, sont conçus pour fonctionner à l'intérieur de la cellule.

Par rapport à des séquences peptidiques aléatoires non contraintes, ou fusionnées à l'extrémité de protéines ou molécules plates-formes, la double contrainte des régions variables, véritablement « ancrées », rend les aptamères moins vulnérables aux protéases et augmente l'affinité de liaison par réduction de la liberté conformationnelle des boucles variables (Colas 2000).

La plate-forme protéique la plus souvent utilisée est la thioredoxine (LaVallie, DiBlasio et al. 1993), choisie pour sa faible taille (12 kD), sa stabilité et sa solubilité. Mais d'autres protéines comme la green fluorescent protein (GFP) (Abedi, Caponigro et al. 1998), la nucléase staphylococcique (Norman, Smith et al. 1999) ou le STM, dérivé de l'inhibiteur de protéase Stefin A (Woodman, Yeh et al. 2005) ont été utilisées. Notons aussi que la double contrainte facilite l'élucidation de la structure tridimensionnelle des régions variables surtout lorsque l'on connaît la structure de la plate-forme comme pour la thioredoxine.

La banque d'aptamères peptidiques utilisée dans ces travaux de thèse pour cibler la protéine A20 du virus de la vaccine a été construite par la société Aptanomics. Pour limiter la fréquence d'apparition des codons stop à l'intérieur des régions variables, chaque résidu est codé par le motif NNK où N = A, T, C ou G et K= G ou C lors de la synthèse d'oligonucléotides, insérés par la suite dans le site actif de la thioredoxine A bactérienne. Cela permet le codage des 20 acides aminés en laissant seulement une possibilité de codon stop. La banque fournie se compose de séquences aléatoires codant pour des peptides de 8 acides aminés (complexité théorique de 20^8 combinaisons).

Les techniques de double-hybride sont le plus souvent employées pour sélectionner les aptamères pour leur capacité à reconnaître leurs protéines cibles dans la cellule (Geyer and Brent 2000). Cependant, un système « bacterial display » a aussi été utilisé pour sélectionner des aptamères contre des anticorps, protéines et même des cellules vivantes (Lu, LaVallie et al. 2003).

B/ LE DOUBLE HYBRIDE

La technique du double-hybride permet l'identification d'interactions protéiques *in vivo* dans un système cellulaire, principalement en levure. Son développement est lié à deux observations importantes.

La première est que les facteurs de transcription eucaryotes possèdent une structure modulaire constituée de deux domaines distincts : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription.

La seconde est que ces modules peuvent agir à proximité sans forcément faire partie du même ensemble protéique (Brent and Ptashne 1985).

L'idée est de fusionner une protéine dite « appât » au domaine de liaison à l'ADN et une autre protéine dite « proie » au domaine d'activation du facteur de transcription.

Un gène rapporteur dont le promoteur comporte des opérateurs pour le domaine de liaison à l'ADN de la fusion appât est également utilisé.

Si les deux protéines fusionnées sont capables d'interagir, les domaines de liaison et d'activation se retrouvent à proximité et le facteur de transcription actif est ainsi reconstitué (Fields and Song 1989). Ce dernier va alors permettre la transcription d'un gène rapporteur (figure 10).

La plupart du temps on utilise un gène rapporteur auxotrophique pour permettre la sélection positive des levures sur milieu sélectif mais également un rapporteur colorimétrique comme le gène *LacZ* pour confirmer la spécificité d'activation du facteur de transcription.

L'appât est la protéine contre laquelle on cherche à isoler des interacteurs et les protéines proies sont en général des protéines exprimées par une banque d'ADNc ou une banque d'aptamères peptidiques dans notre cas.

Différents systèmes double-hybride en levure ont été développés avec comme différences majeures la nature des modules transcriptionnels utilisés, l'expression constitutive ou inductible des protéines proies et les gènes rapporteurs utilisés pour révéler les phénotypes d'interaction. Le système appelé « interaction trap » est parmi les plus robustes jamais développés (Kolonin, Zhong et al. 2000). Ses aspects essentiels sont :

-l'utilisation du domaine de liaison à l'ADN du répresseur bactérien LexA et l'utilisation de modules activateurs synthétiques tels que B42 ou B112.

-l'expression inductible par le galactose des proies sous le contrôle du promoteur *GALI*

-l'utilisation des gènes rapporteurs intégrés auxotrophique *LEU2* et du gène *LacZ*, en amont desquels se trouve un nombre variable d'opérateurs *lexA*, conférant ainsi différents niveaux de sensibilité.

Pour s'affranchir d'une co-transfection fastidieuse des plasmides appât et proie, la technique a été améliorée par l'utilisation des propriétés de conjugaison des levures haploïdes de type sexuel différent (α ou \underline{a}). Chaque type portant soit le plasmide appât soit le plasmide proie, la conjugaison permet d'obtenir des levures diploïdes dans lesquelles sont apportées l'appât et la proie simultanément.

Lors de la sélection d'aptamères peptidiques, le système permet d'isoler facilement à partir de la colonie positive bleue, le plasmide codant pour l'aptamère capable d'interagir avec l'appât et de déterminer rapidement la séquence de sa région variable. La technique garantit également l'expression correcte et la non-toxicité de la protéine appât dans ce système eucaryote (figure 10).

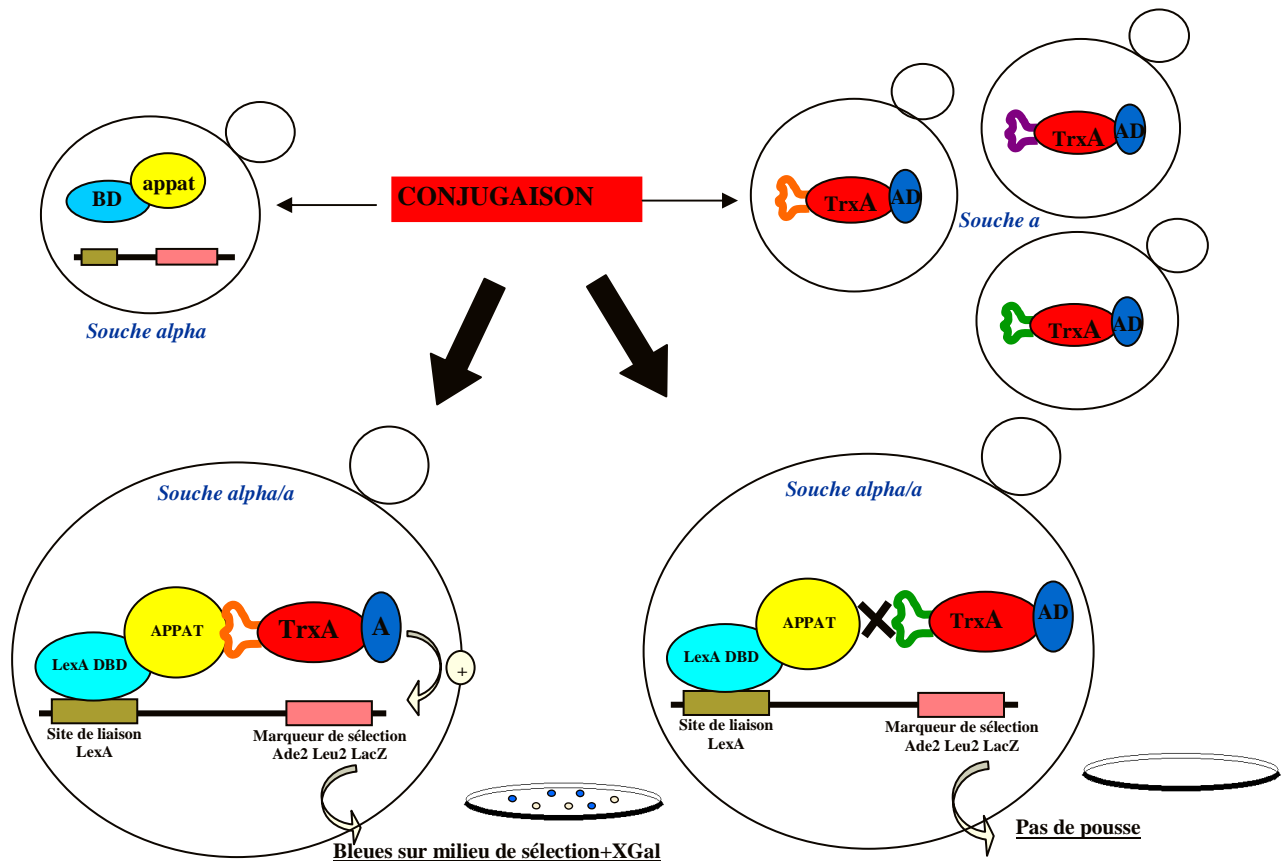


Figure 10 : Principe du criblage d'aptamères sur une protéine cible par double-hybride en levure. La protéine « appât » est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'un facteur de transcription comme LexA et les aptamères peptidiques sont fusionnés au domaine d'activation, dans 2 différentes souches de levure haploïde de type sexuel opposé. L'aptamère et l'appât sont apportés ensemble par conjugaison, processus par lequel deux cellules haploïdes fusionnent pour former une cellule diploïde. A l'intérieur d'une levure diploïde, si un aptamère est capable d'interagir avec la protéine appât il y a reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel qui active un ou plusieurs gènes rapporteurs contenant les sites de liaison pour le DBD et permet la pousse des levures avec une coloration bleue sur milieu de sélection.

C/ LES APPLICATIONS DES APTAMERES PEPTIDIQUES

Nous assistons actuellement à une crise dans la productivité de l'industrie pharmaceutique. Malgré des investissements phénoménaux sur de nouvelles technologies et de multiples partenariats avec les entreprises de biotechnologies les majors n'introduisent que très peu de nouveaux médicaments sur le marché. Le manque d'efficacité et la forte toxicité observés dans les essais cliniques restent les deux causes majeures d'échec dans la poursuite du développement de nouvelles thérapeutiques. Elles peuvent être expliquées la plupart du temps par l'utilisation au préalable de modèles animaux inadaptés, par la validation insuffisante des cibles thérapeutiques et parfois par l'insuffisante spécificité des composés sélectionnés. Généralement pour valider une cible il est d'usage d'agir sur l'expression protéique ou génique en cellule ou modèle animal par des techniques d'invalidation de gène knock-out, antisens ou ARN interférence, voire même une surexpression de la cible. Cependant la plupart des molécules thérapeutiques n'agissent pas sur l'expression de leur cible mais sur l'inhibition d'une fonction protéique qui ne reproduit pas forcément l'effet de l'inhibition d'expression. Ces méthodes classiques de validation de cible ne sont plus adaptées pour s'assurer qu'une molécule induise à posteriori le phénotype désiré.

Initialement développés pour l'étude des réseaux moléculaires de régulation, les aptamères peptidiques sont capables de se lier spécifiquement sur une cible protéique intracellulaire donnée avec la possibilité d'inhiber sa fonction, en général par inhibition des interactions protéiques, et d'une manière proche des perturbations causées par des petites molécules chimiques. Les aptamères « décorent » leur cible en se liant sur différentes surfaces de la protéine. Le site de liaison d'un peptide capable de générer le phénotype désiré représente une opportunité d'inhiber une fonction particulière ou une interaction clé impliquant la cible.

Les aptamères peuvent donc être employés pour valider avec plus de confiance des facteurs protéiques connus comme cibles thérapeutiques potentielles en testant les conséquences biologiques de leur inhibition intracellulaire.

De plus, avec leur capacité de se lier à différents domaines sur leur protéine cible, les aptamères sont capables de bloquer sélectivement des activités distinctes alors que les approches antisens ou ARN interférence abolissent toutes les interactions avec lesquelles le produit du gène cible est impliqué.

Ces molécules peuvent être également employées tels des anticorps pour la détection d'une protéine cible, et compte tenu de leur excellente spécificité, discriminer des membres très proches d'une même famille protéique avec de fortes similarités de séquence (Colas, Cohen et al. 1996) ou même dans quelques cas, discriminer plusieurs variants alléliques d'une protéine (Xu, Mendelsohn et al. 1997; Colas, Cohen et al. 2000).

Les aptamères peptidiques peuvent également avoir un impact direct ou indirect dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques :

Les aptamères peuvent être utilisés tels quels comme protéines thérapeutiques. Jusqu'à récemment, un certain nombre d'obstacles techniques était associé à la thérapie protéique dont l'instabilité métabolique des peptides, leur incapacité à traverser les membranes cellulaires et leur immunogénicité potentielle.

Des progrès ont été réalisés dans ce domaine avec l'adjonction de modifications chimiques pour la stabilisation des protéines thérapeutiques et le développement de systèmes de distribution.

En particulier les domaines de transduction protéique (PDT), consistant en une courte séquence d'acides aminés fusionnée aux protéines thérapeutiques, permettent une incorporation cellulaire efficace de peptides fonctionnellement actifs (Buerger, Nagel-Wolfrum et al. 2003).

Ainsi, des aptamères sélectionnés pour leur capacité à se lier au domaine intracellulaire du récepteur EGF et au facteur de transcription Stat3 ont été fusionnés au domaine de transduction protéique polyarginine, produits en bactérie, et sont capables d'inhiber la croissance des cellules tumorales *in vitro* (Buerger, Nagel-Wolfrum et al. 2003; Nagel-Wolfrum, Buerger et al. 2004).

Plus récemment, des aptamères dirigés contre la protéine reliée au prion Prp_C ont été produits en bactérie sans le domaine PDT puis ajoutés sur des cellules de neuroblastome infectées par le prion (Proske, Gilch et al. 2002). Ils ont permis de réduire la formation d'isoformes du prion pathogène Prp_{S_C}. De nombreuses études pré-cliniques sont encore nécessaires pour prouver l'intérêt des aptamères comme molécules thérapeutiques.

Une autre stratégie consiste à identifier et caractériser les surfaces d'interactions critiques des aptamères sur leur protéine cible (hot spots) et de rechercher des composés chimiques capables de « casser » ces interactions, dans l'espoir de mimer l'action biologique des peptides. L'avantage est que si la surface validée comme étant critique à la fonction de la protéine est accessible à l'aptamère, elle le sera très probablement à des composés chimiques capables de se fixer au même endroit pour déclencher le même effet biologique.

La société Aptanomics (Lyon) a adapté ce principe pour mettre au point un criblage haut-débit de molécules en levure appelé AptaScreenTM, basé sur le système rapporteur à double luciférase ou « dual luciferase » (Colas 2008). Les aptamères constituent donc d'excellents guides pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques inhibitrices d'interactions protéiques.

Nous avons utilisé cette technologie pour rechercher des composés chimiques capable de casser l'interaction entre plusieurs protéines du complexe de réplication (projet II).

Les propriétés physiques des aptamères en particulier la petite taille des régions variables insérées dans une protéine plate-forme bien caractérisée, peuvent être très utiles à l'élucidation de leur structure bioactive tridimensionnelle. Sur cette base, les aptamères peptidiques peuvent également permettre le développement de composés thérapeutiques mimétiques par des techniques de *drug design* basé sur la structure.

Une étude récente a même envisagé la possibilité d'utiliser les aptamères peptidiques pour la détection de protéines en haut-débit, en méthode alternative aux anticorps (Evans, Johnson et al. 2008). Les auteurs ont prouvé que l'immobilisation d'une dizaine d'aptamères sur des biopuces permettait la détection et la quantification de protéines cibles dans une mixture complexe avec une sensibilité de l'ordre de celle requise pour l'étude d'échantillons cliniques.

Une autre approche originale a consisté à sélectionner des aptamères non pas pour interagir avec une cible donnée mais pour leur capacité à conférer un phénotype particulier à un modèle cellulaire (sélection phénotypique). Un criblage dans le but d'empêcher la croissance bactérienne de souches pathogènes a permis par exemple de sélectionner un aptamère dont la cible, identifiée à posteriori, était un facteur de virulence, la thymidilate synthase (ThyA)

(Blum, Dove et al. 2000). Ce résultat confirme l'intérêt des aptamères pour le développement de nouveaux antibiotiques.

En résumé, les aptamères peptidiques peuvent être employés pour l'analyse fonctionnelle de protéines spécifiques en cellules, pour identifier et valider avec confiance de nouvelles cibles thérapeutiques et servir de base au développement de nouveaux traitements. Les aptamères sont d'extraordinaires outils moléculaires à l'interface entre la recherche fondamentale et appliquée et ils contribuent au rapprochement de ces deux domaines. L'ensemble des applications des aptamères peptidiques en recherche fondamentale et thérapeutique décrites précédemment sont résumées dans la figure 11.

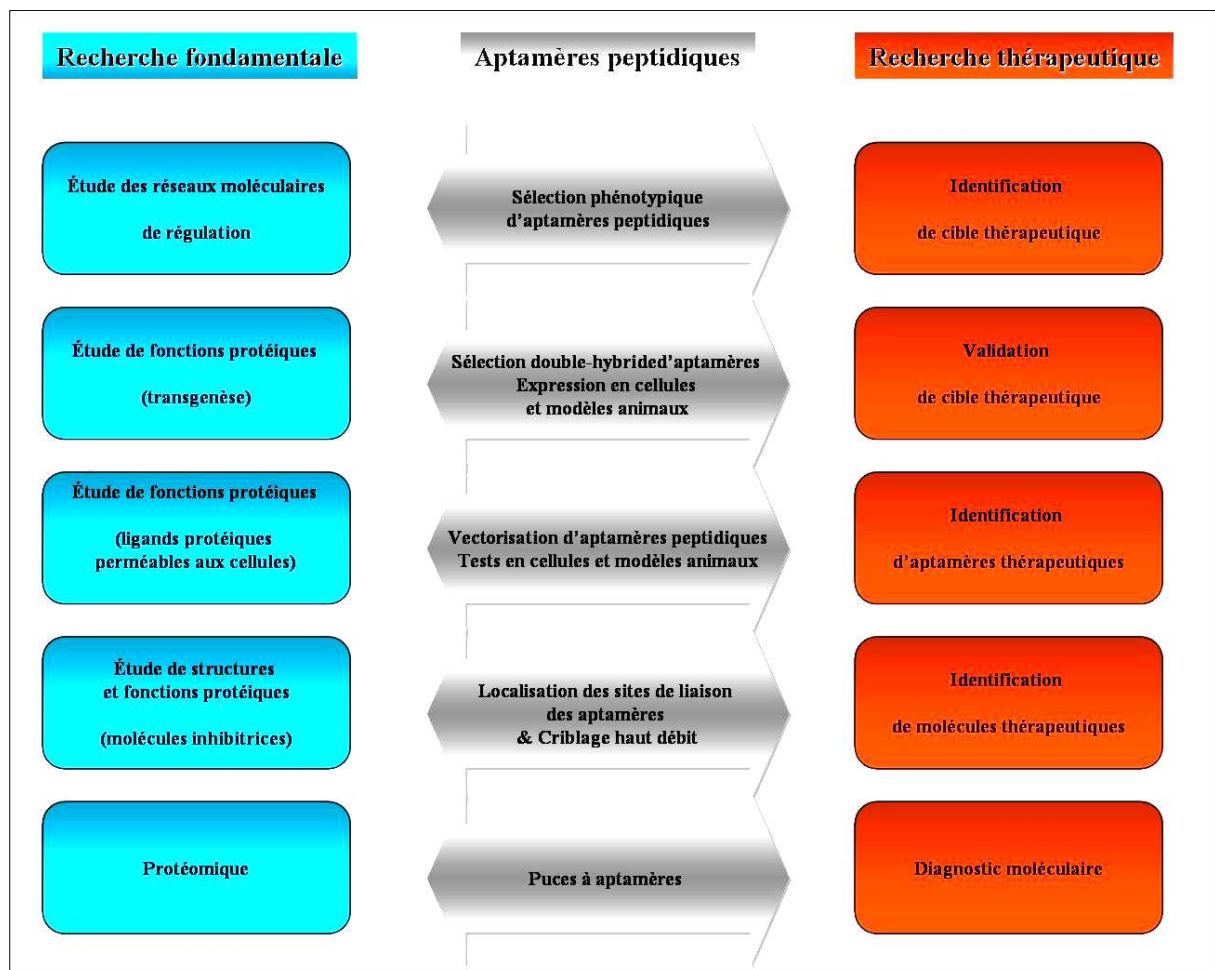


Figure 11 : Les applications des aptamères peptidiques en recherche fondamentale et appliquée (Y2H : double hybride en levure). D'après Pierre Colas 2008.

D/ LES SUCCES DES CRIBLAGES D'APTAMERES PEPTIDIQUES

La première sélection d'aptamères a été réalisée contre la protéine cyclin dépendant kinase 2 (Cdk2), régulateur du cycle cellulaire qui contrôle l'entrée des cellules en phase S (Colas, Cohen et al. 1996). Les auteurs ont isolé 14 peptides de 20 acides aminés capables de se fixer sur la protéine Cdk2 in vitro et affichant des affinités de liaison de l'ordre du nanomolaire ($38 < K_d < 112$ nM). Certains de ces aptamères sont capables d'interagir avec d'autres protéines de la famille Cdk, ce qui est probablement dû au fait que ces peptides se lient à des régions conservées entre des membres proches de la même famille protéique. Ces peptides sont d'autant plus intéressants pour des stratégies d'inhibition qu'ils ciblent des domaines conservés durant l'évolution à cause de leur importance biologique. L'analyse fonctionnelle des aptamères anti-Cdk2 révèle qu'ils peuvent efficacement interférer avec la phosphorylation de l'histone H1, substrat de Cdk2, in vitro, et ainsi inhiber l'activité de la protéine Cdk2. Parmi ces peptides, pep8 est capable d'interagir au niveau du site actif de Cdk2 et bloque l'interaction avec l'histone H1 par inhibition compétitive.

Par la suite des aptamères peptidiques ont été sélectionnés contre une gamme importante de protéines cibles : en passant par les régulateurs du cycle cellulaire comme E2F1 (Fabbrizio, Le Cam et al. 1999), ou la Cyclin J (Kolonin and Finley 1998; Kolonin and Finley 2000), des protéines G et facteurs d'échanges comme Ras (Xu and Luo 2002), ou Rho-GEFDD2 (Schmidt, Diriong et al. 2002), une protéine anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 : Nr-13 (Nouvion, Thibaut et al. 2007) un récepteur tyrosine-kinase : EGFr (Buerger, Nagel-Wolfrum et al. 2003) et même un facteur de transcription : STAT3 (Nagel-Wolfrum, Buerger et al. 2004).

Mais les aptamères peptidiques sont particulièrement adaptés pour cibler des facteurs non-cellulaires comme les protéines virales.

La réplication et la maturation du virus de l'hépatite B (HBV) se déroulent à l'intérieur des capsides virales nouvellement formées dans le cytoplasme des cellules infectées. Une sélection d'aptamères a été réalisée pour cibler la protéine core du virus qui multimérise pour former la capside virale. L'idée est qu'un aptamère capable de bloquer l'assemblage de la capside pourrait également bloquer la progression du cycle viral.

Parmi une série d'aptamères qui interagissent spécifiquement avec la protéine core, *in vitro*, et en cellules de mammifère, Butz et son équipe ont sélectionné un peptide capable de bloquer la formation de la capsid virale et par conséquent capable d'inhiber la réplication virale et la production de virions *in vitro* sur cellules de foie (Butz, Denk et al. 2001).

Les tumeurs causées par le papillomavirus humain (HPV), comme le cancer du col de l'utérus, expriment deux oncoprotéines virale E6 et E7. La protéine E6 exerce une action anti-apoptotique, entre autre, en induisant la dégradation protéolytique de la protéine p53.

Des aptamères peptidiques sélectionnés liant les protéines E6 du HPV sont capables de bloquer l'activité anti-apoptotique de la protéine et engendrent une élimination spécifique par apoptose des cellules cancéreuses positives au papillomavirus grâce à l'augmentation du niveau de la protéine p53 (Butz, Denk et al. 2000; Nauenburg, Zwerschke et al. 2001).

Des aptamères ont également été générés contre la protéine oncogène E7 de HPV. Ils induisent aussi l'apoptose des cellules cancéreuses (Nauenburg, Zwerschke et al. 2001).

Ces peptides vont pouvoir servir de modèle pour générer des agents thérapeutiques pour traiter les tumeurs et dysplasies associées au virus.

Cette stratégie de correction du défaut d'apoptose dans les cellules tumorales peut être étendue à de nombreux cancers en ciblant par des aptamères les protéines cellulaires anti-apoptotiques qui sont surexprimées ou exclusivement exprimées dans les tumeurs.

Une étude récente démontre que des aptamères ciblant sélectivement des mutants conformationnels de p53 à l'intérieur de cellules cancéreuses permet de réduire l'activité de transactivation du mutant et d'induire spécifiquement l'apoptose de ces cellules (Guida, Bisso et al. 2008).

Il existe d'autres exemples dans la littérature de criblage d'aptamères contre des cibles virales :

Des aptamères ciblant la partie N-ter de la protéine AL1 du virus de la mosaïque dorée de la tomate (TGMV, membre de la famille des geminivirus) permettent une réduction significative de la synthèse d'ADN *in vitro* dans un système réplicon (Lopez-Ochoa, Ramirez-Prado et al. 2006).

Des peptides sélectionnés par phage display et ciblant le complexe nucléoprotéine P du virus de la rage ont prouvé qu'ils pouvaient inhiber la réplication virale *in vitro* sur culture de cellules infectées (Real, Rain et al. 2004).

Une autre équipe a sélectionné des aptamères de 20 acides aminés contre l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1). Un peptide a permis d'inhiber l'activité enzymatique de l'intégrase *in vitro* et la réplication du virus en culture cellulaire. Les auteurs ont également prouvé que cet aptamère inhibait la liaison de l'intégrase sur l'ADN. Des expérimentations de gel filtration analytique ont révélé que l'aptamère inhibiteur renversait l'équilibre d'oligomérisation, de dimères actifs d'intégrase en tétramères inactifs (Armon-Omer, Levin et al. 2008).

Dans tous ces exemples, un ou plusieurs aptamères sélectionnés ont montré une capacité à interférer avec la fonction de la cible en causant un phénotype particulier, après expression (par transgénèse) ou introduction (comme protéines recombinantes fusionnées à des domaines de transduction protéiques) dans des modèles cellulaires ou chez la *Drosophile* (Kolonin and Finley 2000).

Dans la plupart des cas les affinités de liaison sont hautes et varient entre 1 et 100 nM et permettent donc aux aptamères d'interrompre les interactions protéine-protéine de leur cible ou même de bloquer le site actif d'une enzyme. L'excellente spécificité de reconnaissance et la forte affinité de liaison suggèrent que ces aptamères ainsi sélectionnés pourraient être utilisés à la manière d'anticorps dans la plupart des méthodes de détection de protéines.

Les mécanismes d'inhibition des aptamères observés à travers ces publications sont divers. Les aptamères peuvent soit bloquer directement des interactions protéiques clés de leur cible, se lier à des « hot spots », critiques pour certaines interactions ou inhiber des interactions protéine-ADN.

Un mode d'inhibition alternatif a été décrit pour les aptamères sélectionnés contre la protéine core du virus de l'hépatite B et l'oncoprotéine E6 du papillomavirus. Dans les deux cas, les aptamères sont capables de séquestrer leur protéine cible dans des corps d'inclusion périnucléaire appelés *aggresomes*, ce qui conduit à l'appauvrissement de la cible à l'intérieur de la cellule.

D'autres peptides ont été décrits comme activant, plutôt qu'inhibant, la fonction de la cible confirmant ainsi que les perturbations induites par les aptamères sont très similaires à celles causées par des molécules chimiques, et bien plus que des perturbations qui pourraient être causées par des méthodes de génétique reverse.

Ces exemples variés de sélections d'aptamères démontrent que cette technologie est vouée à un bel avenir.



PARTIE EXPERIMENTALE

I] INHIBITION DE LA REPLICATION DU VIRUS DE LA VACCINE PAR DES APTAMERES PEPTIDIQUES

A/ Introduction

La variole a longtemps constitué l'un des pires fléaux infectieux qu'ait connu l'humanité. Le succès de la campagne d'éradication du virus par l'OMS et l'arrêt de la vaccination par les pays industrialisés, font craindre une possible utilisation de ce virus comme arme biologique. Du fait de sa forte contagiosité, des faibles moyens thérapeutiques disponibles, l'utilisation du virus de la variole dans un acte terroriste entraînerait un désastre sans commune mesure avec l'utilisation d'autres armes biologiques.

De plus, en cas d'attaque, la vaccination antivariolique ne représenterait pas une solution satisfaisante pour les premières victimes et pour les personnes ayant des contre-indications puisque le vaccin proposé est source de morbidité et à l'origine d'un certain nombre de complications graves qu'il est nécessaire de traiter à l'aide d'antiviraux. Pour compléter la seule possibilité thérapeutique antivirale officielle que représente le cidofovir, l'identification de nouveaux inhibiteurs actifs sur les virus du genre orthopoxvirus (dont fait partie le virus de la variole) est nécessaire.

Les composants viraux plus particulièrement ciblés au cours de ce travail sont les protéines du complexe de réplication. En effet, les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN viral des poxvirus représentent des cibles de choix puisqu'elles sont essentielles à la multiplication virale.

Notre projet consistait à identifier des molécules capables d'inhiber les interactions protéine-protéine du complexe de réplication de la vaccine, modèle substitutif au virus de la variole.

Nous avons ciblé plus particulièrement la protéine A20 qui est un composant majeur du complexe et qui interagit physiquement avec 3 protéines virales essentielles à l'activité du complexe de réplication : l'ADN polymérase E9, la primase/hélicase D5 et l'uracile ADN glycosylase D4. Le but était de sélectionner des « aptamères peptidiques » interagissant spécifiquement avec la protéine A20 et capables d'inhiber son interaction avec les autres protéines virales.

Les aptamères sont des peptides de 8 acides-aminés qui sont exposés à la surface d'une protéine présentatrice (dans ce travail la protéine Thioredoxine A d'*E.coli*) et sont sélectionnés à partir d'une banque combinatoire constituée de plus de 30 millions de peptides différents.

Cette banque nous a été fournie par la société lyonnaise Aptanomics spécialisée dans la sélection d'aptamères inhibant l'activité de protéines oncogènes. La protéine A20 a été exprimée en levure et son interaction avec deux de ses partenaires (les protéines D4 et D5) a été confirmée. La sélection des aptamères interagissant avec A20 a ensuite été réalisée par criblage de la banque par la technique du double-hybride en levure. Après confirmation des interactions *in vitro* par GST pull-down, les aptamères interagissant spécifiquement avec la protéine A20 ont été exprimés de manière stable en culture cellulaire et leur capacité à inhiber la réplication virale a été évaluée après infection par le virus de la vaccine.

Nous avons prouvé qu'un des aptamères sélectionnés (Apt 72) interagissait avec une région centrale de la protéine A20 montrée comme critique pour la réplication de l'ADN viral. Nous avons également montré que cet aptamère 72 était capable d'inhiber significativement la production du virus de la vaccine *in vitro*.

B/ Publication n°1

Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers

**Laurent Saccucci^{1,2}, Jean-Marc Crance¹, Pierre Colas^{3,4}, Marc Bickle³, Daniel Garin^{1,*}
and Frédéric Iseni¹**

¹ Unité de virologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA) Emile Pardé, F-38702 Grenoble, France.

² Protein'expert SA, zone Minatec Entreprises, 7 parvis Louis Néel BP50, F-38040 Grenoble, France.

³ Aptanomics SA, 181-203 avenue Jean Jaurès, 69007 Lyon, France.

⁴ Present address: Station Biologique, CNRS, UPS 2682, Place Georges Teissier, 29280 Roscoff, France.

* Corresponding author.

CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 Grenoble, France.

Tel: +33-4-76-63-68-44 Fax: +33-4-76-63-69-06

E-mail address: Daniel.Garin@wanadoo.fr

Running title: Peptide aptamers against vaccinia virus.

Abstract: 182 words

Main Text: 5370 words

Figures: 5

Table: 1



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral



Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers

Laurent Saccucci^{a,b}, Jean-Marc Crance^a, Pierre Colas^{c,1}, Marc Bickle^c,
Daniel Garin^{a,*}, Frédéric Iseni^a

^a Unité de virologie, Institut de Recherches Biomédicales des Armées, CHSSA Emile Paré, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, BP97, F-38702 Grenoble, France

^b Protein'Expert SA, zone Minarec Entreprises, 7 parvis Louis Néel BP50, F-38040 Grenoble, France

^c Aptanomics SA, 181-203 avenue Jean Jaurès, 69007 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 December 2008
Received in revised form 22 January 2009
Accepted 16 February 2009
Available online xxx

Keywords:
Vaccinia virus
Peptide aptamer
Yeast two-hybrid
Genetic screen
Anti-orthopoxvirus drugs

ABSTRACT

A20 protein is a major component of the vaccinia virus replication complex. It binds to the DNA polymerase E9, the uracil DNA glycosylase D4 and the primase/helicase D5, three proteins that are essential for viral DNA synthesis. The identification of molecules able to interact with the replication complex and inhibit its activity is a promising strategy for the design of new anti-orthopoxvirus drugs. In this study, we used a yeast genetic approach to select, from combinatorial libraries, 8-mers peptide aptamers that specifically interact with A20. From this screen, we isolated five peptide aptamers whose binding to A20 was confirmed by a glutathione S-transferase (GST) pull-down assay. Among those, we determined that peptide aptamer 72 binds to a central domain on A20. Interestingly, this region of A20 was previously shown to be important for its function in DNA replication. We next showed that vaccinia virus DNA synthesis was impaired in cells constitutively expressing peptide aptamer 72 and that virus production was inhibited in those cells. Thus, peptide aptamer 72 may be a useful tool for the development of new compounds specifically targeting poxvirus replication.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Smallpox was eradicated 30 years ago after a worldwide vaccination campaign coordinated by the World Health Organization (WHO) (Geddes, 2006). Since then, vaccination has been stopped (except for some military and health care personnel), which results in a high proportion of unprotected people in today's population. This situation raises concerns about the potential use of variola virus (VARV) as a biological weapon. Indeed, variola virus is listed as a category A agent for bioterrorism by the Centers for Disease Control (CDC) (Lane et al., 2001). The fear of an attack using VARV has stimulated the development of new anti-orthopoxviral compounds that would be effective in response to a smallpox outbreak.

Up to date, there is no marketed antiviral molecule to treat poxvirus infection. The food and drug administration (FDA) has only approved the use of cidofovir (CDV), but solely as investigational new drug application. This nucleoside analogue is an inhibitor of a broad range of DNA viruses in cell culture (De Clercq, 2003). Unfortunately, CDV exhibits a number of disadvantages that would prevent its massive use in case of an orthopoxvirus epi-

demic: first, it has a poor oral bioavailability and therefore must be administered by the intravenous route; second it has a significant nephrotoxicity and, finally, cidofovir-resistant poxviruses have been isolated (Andrei et al., 2006; Kornbluth et al., 2006; Smee et al., 2002). Recently, ST-246, a promising new therapeutic against orthopoxvirus infection has been identified. This molecule, which can be administered by the oral route, is active against several orthopoxviruses such as vaccinia virus (VACV), cowpox virus (CPXV) and camelpox virus (CMLV) (Yang et al., 2005). ST-246 was shown to target the VACV F13 protein, which is involved in the formation of extracellular enveloped viruses (Blasco and Moss, 1991). This compound is currently in phase II clinical trials (Parker et al., 2008). There is still a need to enlarge the armamentarium of antiviral molecules active against poxviruses with different and original mechanism of action. The selection of new compounds acting against different targets could be useful in case of emergence of drug resistance to the reference anti-poxvirus agents and will be crucial to rapidly and efficiently respond to a potential smallpox outbreak.

Orthopoxviruses, for which VACV is the prototypical member, are unique among DNA viruses in that they carry out their replication exclusively in the cytoplasm of the host cell. Thus, the virus does not depend on nuclear enzymes, and consequently encodes most if not all the proteins necessary for genome replication (Moss, 2007). Among these proteins, five were shown to be absolutely essential for the synthesis of the ~200 kbp viral genome. These

* Corresponding author. Tel.: +33 4 76 63 68 44; fax: +33 4 76 63 69 06.
E-mail address: Daniel.Garin@wanadoo.fr (D. Garin).
¹ Present address: Station Biologique, CNRS, UPS 2682, Place Georges Teissier, 29280 Roscoff, France.

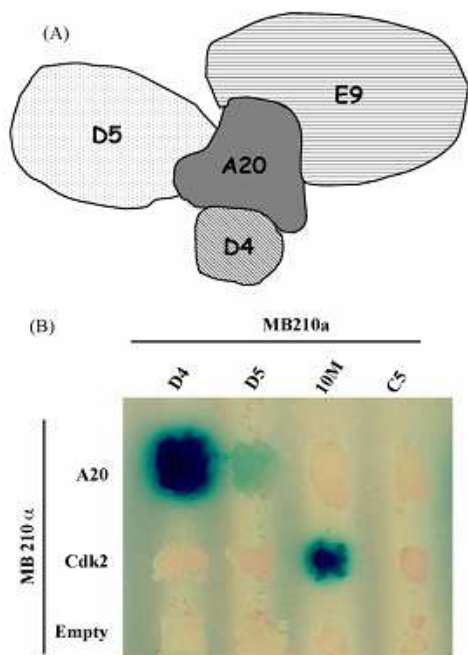


Fig. 1. Protein–protein interactions within the VACV replication complex. (A) Schematic representation of the VACV replication complex. E9: DNA polymerase, D4: uracil DNA glycosylase, D5: Primase/Helicase. A20 which has no known enzymatic activity interacts with E9, D4 and D5. (B) A20 interaction with D4 and D5 in yeast two-hybrid. MB210a yeast cells were co-transformed with pSH18-34 and pEG202-A20. MB210a yeast cells were transformed with pWP2 vectors expressing D4-B112 and D5-B112. After mating, the diploid yeasts were plated onto Ura⁻, His⁻, Trp⁻, galactose/raffinose plate containing X-gal. After 3 days incubation, the plate was scanned. 10 M: peptide aptamer that interacts with Cdk2 (Colas et al., 2000). C5: peptide aptamer randomly picked from a library. Empty: pEG202 vector (i.e. without A20R gene).

are E9, the catalytic subunit of the DNA polymerase, D5, a DNA-independent nucleoside triphosphatase (NTPase) that contains a helicase domain (Boyle et al., 2007) and a primase activity (De Silva et al., 2007), the uracil DNA glycosylase D4, the protein kinase B1 (Traktman et al., 1989) and the A20 protein. The latter protein has no known enzymatic activity but plays a major role in poxvirus replication. A20 in complex with D4 was recently shown to form a heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase (Stanitsa et al., 2006). Through its direct interaction with E9 (Klemperer et al., 2001), it probably serves as a bridge between D4 and the DNA polymerase. Yeast two-hybrid experiments have also revealed that A20 interacts with D5 and H5, a protein involved in transcription elongation (Cresawn and Condit, 2007; Ishii and Moss, 2002; McCraith et al., 2000). Thus, A20 is a central component whose role is likely to form and/or stabilize the DNA replication complex (Fig. 1A). The discovery of molecules able to inhibit the function of A20 within the replication complex could represent a relevant strategy to generate new compounds against orthopoxviruses.

Peptide aptamers are combinatorial protein molecules designed to inhibit the function of target proteins in living cells (Colas et al., 1996). They consist of conformationally constrained random sequence peptide loops displayed by a platform protein like the bacterial Thioredoxin A (TrxA) protein (Colas, 2008; Hoppe-Seyler et al., 2004). Once expressed intracellularly, peptide aptamers can inhibit the function of their target proteins by interfering with protein interactions or by inhibiting their enzymatic activity. Peptide

aptamers are selected, against the protein of interest, from combinatorial expression libraries using screening techniques like the yeast two-hybrid system (Geyer and Brent, 2000). A number of reports have described the selection of peptide aptamers targeting viral proteins such as the hepatitis B virus core protein (Butz et al., 2001), the tomato golden mosaic virus AL1 protein (Lopez-Ochoa et al., 2006) and human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins (Butz et al., 2000; Nauenburg et al., 2001). In all these studies, the selected peptides were able to interfere with the viral life cycle. Therefore, the peptide aptamer technology is a useful tool to validate therapeutic targets (Baines and Colas, 2006).

In this study we report the selection of peptide aptamers directed against VACV A20 protein. We show that one of the aptamers is a strong inhibitor of viral DNA synthesis and is able to inhibit virus production in cell culture. Interestingly, this peptide interacts with a domain of A20 that was previously shown to be critical for its function in DNA synthesis (Ishii and Moss, 2001; Punjabi et al., 2001).

2. Materials and methods

2.1. Materials

The yeast strains and yeast two-hybrid plasmids used in this study were supplied by APTANOMICS (Lyon, France) and described in detail elsewhere (Bickle et al., 2006).

2.2. Plasmid constructions

pEG202-A20 plasmid was constructed by PCR amplification of the A20R gene from VACV (Copenhagen strain) DNA using the primers 5'-CTG GAA TTC ATG ACT TCT AGC GCT GAT TTA AC-3' and 5'-CGA CTC GAG TCA CTC GAA TAA TCT TTT TTT GAC ATC-3' that contain an EcoRI and a XhoI site, respectively. The PCR fragment was cleaved and ligated into the EcoRI/XhoI-cleaved pEG202 plasmid.

pWP2-D4 and pWP2-D5 vectors were constructed in the same way using the primers 5'-TCT GAA TTC ACC ATG AAC TCA GTG ACT GTA TCA CAC G-3' and 5'-CTC CTC GAG ATA AAT AAA CCC TTG AGC CCA ATT TAT A-3', 5'-TCT GAA TTC ACC ATG GAT GCG GCT ATT AGA GGT AAT G-3' and 5'-CTC CTC GAG CCG AGA TGA AAT ATC CTC TAT GAA TAT-3', respectively. After digestion, the PCR products were cloned into the EcoRI/XhoI-cleaved pWP2 vector.

pEG202-A20 1-150, pEG202-A20 1-176, pEG202-A20 1-203, pEG202-A20 1-227, pEG202-A20 1-327 vectors containing truncations of the A20R gene were constructed using the forward primer 5'-CTG GAA TTC ATG ACT TCT AGC GCT GAT TTA AC-3' and reverse primers 5'-CGA CTC GAG TCA ATT AAC TGG AGA CTC ATA TTT TG-3' (A20 1-150), 5'-CGA CTC GAG TCA AAA TAA TGT GTC TTC CTC TAT TTC-3' (A20 1-176), 5'-CGA CTC GAG TCA TCC CAA CTT AAT ATA CGA TAT GG-3' (A20 1-203), 5'-CGA CTC GAG TCA ACG ATC TAC CTT GAT GGA CTC-3' (A20 1-227), 5'-CGA CTC GAG TCA CTC ATT AAT ATC TAA TTT ATT AG-3' (A20 1-327). The cleaved PCR fragments were ligated into the EcoRI/XhoI-cleaved pEG202 plasmid.

pGST/TrxA/aptamers vectors were obtained by PCR amplification of the TrxA/aptamer sequence from pWP2 plasmid using the primers 5'-CGA CAC CGA CGT GCT GAA GGC C-3' and 5'-GCT TGG CCA CGG TCA GCT TGC C-3'. The amplified product was introduced into a RsrII-cut pGST2/TrxA plasmid by homologous recombination in yeast as previously described (Abad et al., 2007).

2.3. Two-hybrid screening of the peptide aptamer library

The randomized eight amino-acid peptide aptamer library constructed in the pWP2 vector was supplied by APTANOMICS. 800 ml of MB210a yeasts were transformed with 100 µg of peptide aptamer library and 1.5×10^8 transformants were obtained.

MB226 α yeasts were co-transformed with pEG202-A20 and pSH18-34 (bearing a *lacZ* reporter gene). The yeast two-hybrid selection was performed essentially as previously described (Bickle et al., 2006); 2×10^7 diploid exconjugants were obtained (i.e. 33% mating efficiency). Diploids were plated onto Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻Ade⁻ galactose/raffinose plates and incubated for 7 days at 30°C. Plates were then replica-plated onto Ura⁻His⁻Trp⁻ X-gal galactose/raffinose. Clones that grew in the absence of leucine and adenine, which possessed a β -galactosidase activity, were picked. Library plasmids were recovered and re-transformed into EGY48 α yeasts. The interaction phenotypes were confirmed by mating assays with EGY42a yeast strains co-transformed with pEG202-A20 and pSH18-34. The aptamer genes obtained from positive clones were sequenced.

2.4. Interaction mating assay in yeast

MB210 α yeasts were co-transformed with pSH18-34 and pEG202-A20 (or pEG202- Δ A20 constructs). MB210 α yeasts were transformed with the pWP2 vectors (coding for D4, D5 or peptide aptamers). The two haploid yeast strains were streaked across plates as horizontal or vertical lines on yeast rich solid medium (YAPD). The diploid exconjugants formed by mating at the intersections were replicated onto Ura⁻His⁻Trp⁻ galactose/raffinose plates containing X-gal (to detect activation of the *lacZ* reporter gene) and incubated for 3 days at 30°C.

2.5. Expression of A20 in insect cells

To produce the A20 protein in insect cells, a recombinant baculovirus carrying the A20R gene was built according to the manufacturer's instructions (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, the VACV A20R gene (Copenhagen strain) was cloned into the pFastBacTM HT A vector. The construct was used to transform competent DH 10BacTM *E. coli* cells (Invitrogen, Carlsbad, CA). A recombinant bacmid DNA containing one copy of the A20R gene was recovered and transfected into Sf9 cells (Invitrogen, Cat. No. 11496-015). The recombinant viruses produced in the cell culture medium were used to obtain a high titer viral stock. For A20 expression, 7.5×10^7 Sf21 cells (Invitrogen, Cat. No. 11497-013) in suspension were infected at an MOI of 5 PFU/cell for 72 h in Sf-900 II SFM medium (GIBCO, Auckland, NZ). Infected cells were resuspended in 10 ml of lysis buffer [20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM beta-Mercaptoethanol, 0.01% Tween20, protease inhibitors (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and 2.5 μ g ml⁻¹ DNase I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)], sonicated 3 times 1 min on ice and centrifuged at 15,000 \times g for 15 min. Protein extract was then resolved on a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The expression of A20 (that carries an N terminal 6 His-tag) was detected by Western blot using the Penta-His Antibody (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) at a 1:2000 dilution.

2.6. GST pull-down

TrxA/ptamers were produced as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins in BL21 (DE3) *E. coli* strain. Protein expression (from a 20 ml culture) was induced with 0.5 mM of isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) for 16 h at room temperature. Bacteria were pelleted, resuspended in 1 ml PBS 1 \times and sonicated three times 1 min on ice. One per cent Triton X-100 was added and after a 30 min incubation on ice, the lysates were clarified by centrifugation at 12,000 \times g for 10 min. Extracts were then incubated with 45 μ l glutathione sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) at room temperature for 30 min on a rotating wheel. The beads were washed three times with 1 ml of PBS 1 \times

and incubated with 800 μ l of cell extracts from Sf21 cells overexpressing the His-tagged A20 (see above) for 2 h at 4°C on a rotating wheel. The beads were washed three times with 1 ml of wash buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 2 mM beta-Mercaptoethanol, 0.01% Tween20) and resuspended in 45 μ l of Laemmli buffer 2 \times . The retained material was loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the Penta-His Antibody for A20 detection and anti-glutathione S-transferase antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at a 1:1000 dilution for TrxA/ptamers detection. Anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated immunoglobulin was used as secondary antibody followed by chemoluminescent revelation (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2.7. Production of stable cell lines

Stable integration of CAT and TrxA/ptamers in 293 cells was accomplished according to the manufacturer's *Flp-In System* protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). pcDNA5/FRT/TrxA-aptamers vectors were constructed, first, by subcloning the TrxA-aptamer genes from pGST/TrxA/ptamer constructs into the XhoI/NotI-cleaved pPERh-MCS vector (Pamonsinlapatham et al., 2008). TrxA-aptamer genes were then subcloned into the XhoI/NheI cleaved pcDNA5/FRT vector. Flp-InTM-293 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing stably integrated pFRT/lacZeo (with the yeast FRT recombination site) were co-transfected with pcDNA5/FRT/TrxA-aptamers (or pcDNA5/FRT/CAT) and pOG44, a plasmid expressing the *S. cerevisiae* Flp recombinase. Stable cell lines were then selected by growth in 100 μ g ml⁻¹ hygromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

2.8. Cell lysis and detection of TrxA/ptamers

Confluent 293 cell cultures expressing the peptide aptamers were washed twice in cold PBS 1 \times and lysed in 1 ml cold lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP40 and protease inhibitors cocktail (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)] for 10 min on ice. Insoluble debris were removed by centrifugation at 12,000 \times g for 10 min. For Western blot analysis, protein extracts were boiled for 5 min in Laemmli buffer and separated on a 15% SDS-PAGE. The proteins were electrotransferred onto a 0.2 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The TrxA/ptamer fusion proteins were detected using the Thio-probe (K-20): sc-801 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

2.9. Virus and infections

Twenty-four-well plate containing 293 cells expressing the peptide aptamers (or CAT) were infected with VACV (WR strain, ATCC VR-119) at an MOI of 0.001 PFU/cell in DMEM supplemented with 0.4% (v/v) fetal calf serum at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were harvested at the indicated time points (7, 24, 30, 48, 54, and 72 hpi). The virus yield was determined by virus titration in 96-well plates of Vero cells (ATCC CCL-81). Titration was performed with serial fourfold dilutions of the samples and the viral titer was expressed in CCID₅₀ ml⁻¹ (Ferrier et al., 2004). Three separate experiments were performed, and each sample was titrated in quadruplicate.

2.10. Quantification of viral DNA synthesis

293 cells expressing the peptide aptamers (or CAT) were infected with VACV (WR strain) at an MOI of 3 PFU/cell. At 2 hpi, cells were washed twice and supplemented with fresh media. Cells were harvested at the indicated time points and total DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the Manufacturer's instructions. Amplification

of the VACV A27L gene by real-time PCR was performed using the primers 5'-CAA CGA CTA ACT AAT TTG GAA AAA AAG AT-3' and 5'-GCC AGA GAT ATC ATA GCC GCT C-3' and the A27L gene specific probe 5'-TTT TCC AAC CTA AAT AGA ACT TCA TCG TTG CGT T-3' in an Applied Biosystems Prism 7000 SDS instrument with v2.1.1 software (Scaramozzino et al., 2007). Reactions were carried out in 20 μ l using the TaqMan qPCR Mastermix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgium), 0.3 μ M of each primer, 0.2 μ M of TaqMan probe and 5 μ l of extracted viral DNA (or 5 μ l of serial 10-fold dilutions of pVACV-A27L standard plasmid). Thermal cycling was performed as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles each of 95 °C for 15 s, followed by 60 °C for 60 s. All PCR runs included negative and positive controls and all samples were assayed in triplicate. Normalization of the DNA quantity to GAPDH was performed using specific GAPDH primers and probe from the TaqMan GAPDH control reagents kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the Manufacturer's instructions. Correlation values of standard curves were always >99%.

2.11. Statistical analysis

Significant variations of quantitative data were calculated using the two-tailed Student's *t*-test ($P < 0.05$; statistical significance).

3. Results

3.1. Protein interactions within the VACV replication complex

A20 is a major component of the VACV replication complex that physically interacts with three other essential proteins involved in viral DNA synthesis (Fig. 1A). In order to isolate peptide aptamers targeting A20 we used an improved yeast two-hybrid peptide aptamer screen (Bickle et al., 2006). As a preliminary experiment, we wanted to verify that A20 fused to the DNA binding domain of LexA was well expressed in yeast. A mating interaction assay shows that A20 exhibits a strong interaction phenotype with D4 and to a lesser extent with D5, confirming that A20 is indeed expressed in its native conformation in this yeast two-hybrid system (Fig. 1B). Both A20 interaction phenotypes with D4 and D5 are specific, since no interaction is detected with peptide aptamer 10M, selected to bind to the cell cycle regulator Cdk2 (Colas et al., 2000), or with peptide aptamer C5, randomly taken from a library. The differential strength of the interaction phenotypes observed between A20/D4 and A20/D5 is in agreement with previous data obtained in yeast using the GAL4 two-hybrid system (Ishii and Moss, 2002).

3.2. Two-hybrid screening of the peptide aptamer library

Peptide aptamers targeting A20 were selected from a randomized library of eight amino acid long peptides displayed at the surface of a modified *E. coli* thioredoxin A protein (Bickle et al., 2006). Haploid MB226 α yeasts, co-transformed with pEG202-A20 and the *lacZ* reporter plasmid pSH18-34, were mated with MB210 α yeasts transformed with the library in which TrxA/peptide aptamers are fused to the B112 transcriptional module (Bickle et al., 2006). From 2×10^7 transformants, 11 clones expressed a peptide aptamer showing an interaction phenotype with A20. The interactions between the 11 peptides and A20 were reconfirmed using different yeast strains (i.e. by mating EGY48 α yeasts expressing peptide aptamers with EGY42 α yeasts expressing A20) (data not shown).

3.3. Interactions between A20 and peptide aptamers in vitro

The interaction between the selected peptide aptamers and A20 was then tested, in vitro, in glutathione S-transferase (GST)

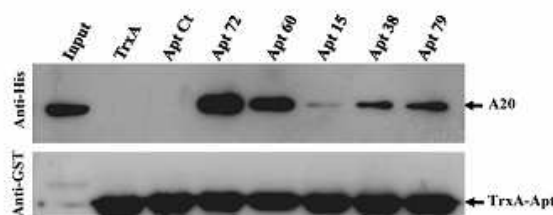


Fig. 2. In vitro interactions between A20 and peptide aptamers. TrxA/Aptamers (TrxA-Apt) were fused to GST and expressed in bacteria. Fusion proteins were immobilized on glutathione sepharose 4B beads and incubated with cell extracts from S21 cells overexpressing the His-tagged A20. After washes, the retained complexes were analyzed by Western blot using anti-His and anti-GST antibodies for A20 and TrxA/aptamers detection, respectively. TrxA: thioredoxin A without peptide. Apt Ct: unrelated peptide aptamer used as negative control. Input: cell lysate from S21 cells expressing His-A20.

pull-down experiments. Bacterially expressed TrxA/aptamer fused to GST were immobilized on glutathione beads and incubated with an extract from insect cells expressing A20. The retained material was loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot (Fig. 2). This experiment was repeated several times and aptamers 15, 38, 60, 72 and 79 reproducibly pulled down A20 from the cell extract. We also noticed that peptide aptamer 72 (and to a lesser extent peptide aptamer 60) pulled down A20 with a better efficiency than peptide aptamers 79, 38 and 15. The remaining six peptide aptamers did not interact with A20 expressed from insect cells in this assay (data not shown). Overall, the results obtained with the pull-down assay and with the yeast two-hybrid analysis led us to conclude that the relative interaction strength between A20 and peptide aptamers are as follows: A20–Apt72 > A20–Apt60 > A20–Apt79 > A20–Apt38 and A20–Apt15 (Fig. 2 and Table 1).

The sequences of the variable regions of peptide aptamers 72, 60, 79, 38 and 15 (inserted in the active-site loop of TrxA) are shown in Table 1. While peptides 15 and 38 do not show any similarities with the other peptides, peptides 72, 60 and 79 share common features. Peptides 60 and 72 are enriched in positively charged amino acids (50% and 37%, respectively). A BLAST analysis against available viral databases revealed that peptide 72 exhibits sequence similarity with VACV A47 protein (see Section 4).

3.4. Mapping of peptide aptamer binding sites on A20

In order to determine the A20 domains that are recognized by peptide aptamers, a yeast interaction mating assay was performed between peptide aptamers and various C-terminal deletion constructs of A20 (Fig. 3A). In this experiment, D4 protein was used to validate the expression of A20 truncations. Indeed, D4, known to interact with the first 25 amino acid of A20 (Ishii and Moss, 2002), shows a strong interaction phenotype with all A20 deletion constructs tested (Fig. 3A). Since the interaction phenotypes observed with construct AA 1–227 are at least as strong as those observed with the full length A20 protein, we conclude that the A20 C-terminal region comprised between AA 227 and AA 426 is

Table 1
Sequences of peptide aptamer variable regions.

Aptamer	A20 interaction	Variable regions
72	+++	TrxA-RQLVLRTR-TrxA
60	++	TrxA-RHMMLARR-TrxA
79	++	TrxA-GALLRQV-TrxA
38	+	TrxA-EALMVEGF-TrxA
15	+	TrxA-GPWRVWSP-TrxA

TrxA: thioredoxin A

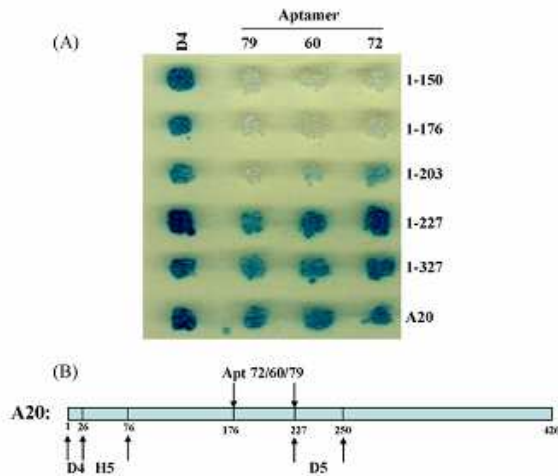


Fig. 3. Mapping of peptide aptamer binding sites on A20. (A) A yeast two-hybrid mating assay was performed using full length A20 and C-term truncated mutants (numbers on the right indicated the region of A20 that is expressed) as baits and peptide aptamers 72, 60 and 79 as preys. D4, which interacts with the first 25 AA of A20 (Ishii and Moss, 2002) was used as a positive interaction control. (B) Location of binding sites on A20. The arrows and amino-acid numbers indicate the binding site of D4, H5, D5 (Ishii and Moss, 2002) and peptide aptamers on A20.

not required for binding of peptide aptamers 72, 60 and 79. No interaction phenotypes are observed with the construct AA 1–176, therefore we conclude that the interaction site of peptide aptamers involve key residues located between AA 176 and 227. However, we cannot rule out that region 1–176 contains residues that also contribute to the interaction. Although peptide aptamers 15 and 38 bind to full length A20, we did not detect any interaction phenotype between these aptamers and the A20 deletion mutants (data not shown). This is probably due to a weaker interaction between these aptamers and A20 or to the fact that they recognize a region located in the last 100 AA of the protein. The interaction sites of D4, D5 and H5 on A20 have been previously mapped (Ishii and Moss, 2002). D4 and H5 interact with the very N-terminus of A20, while D5 binds to a central domain, between amino acids 227 and 250. Thus, our results indicate that peptide aptamers 72, 60 and 79 interact with a domain that is adjacent (but not overlapping) to the D5 binding site (Fig. 3B).

3.5. Inhibition of VACV DNA synthesis by peptide aptamers

We then wanted to determine whether VACV DNA synthesis was inhibited in cells expressing peptide aptamers. We decided to test the potential inhibitory effect of two peptide aptamers: peptide aptamer 72, which exhibits the highest apparent binding affinity for A20, and peptide aptamer 38 whose A20 interacting domain remains unknown. Stable 293 cell lines that constitutively express these peptide aptamers were obtained together with a control cell line producing the scaffold TrxA protein without inserted peptide. Fig. 4A shows that the three cell lines produce similar amounts of the expected proteins with an apparent molecular weight of ~10–12 kDa. Peptide aptamer expressing cells were infected with VACV at an MOI of 3 PFU/cell. Viral DNA synthesis was then quantified by real-time PCR at 3, 5, 7, 9 and 12 h post-infection (hpi). Fig. 4B shows that in cells expressing the control TrxA, the level of viral DNA produced over time is higher than in cells expressing the peptide aptamers. A notable reduction in DNA synthesis was observed as early as 7 hpi for peptide aptamer 72 and 9 hpi for peptide aptamer 38. The inhibition is then maintained up to 12 hpi, the

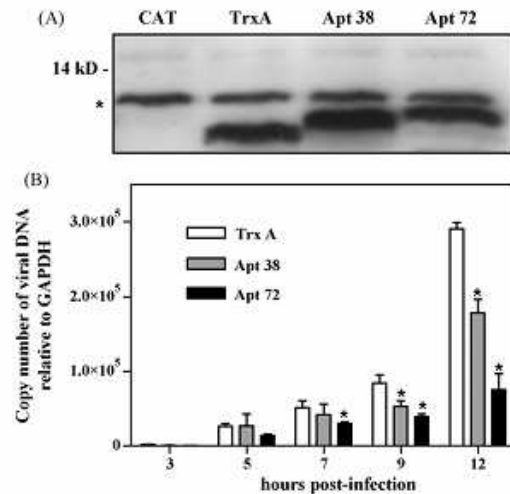


Fig. 4. Inhibition of VACV DNA synthesis by peptide aptamers. (A) Lysates from stable 293 cells lines expressing TrxA, TrxA/aptamers (38 and 72) and CAT were loaded on a 15% SDS-PAGE and electrotransferred on a nitrocellulose membrane. Expression of TrxA/aptamers was detected with an anti-TrxA antibody. A molecular weight marker is shown on the left. * indicates a cellular protein that cross-reacts with the anti TrxA antibody. (B) 293 cells stably expressing TrxA, and TrxA/aptamers 38 and 72 were infected with VACV (WR strain) at an MOI of 3 PFU/cell. Cells were harvested at the indicated time points; VACV DNA was extracted and quantified by real-time PCR using primers specific to VACV A27L gene. Results are expressed as copy number of viral DNA relative to GAPDH and reported as mean \pm S.D. from three samples. *Significant differences compared to the TrxA control; Student's *t*-test; $P < 0.05$. These experiments were performed twice with comparable results.

last time point tested. We reproducibly noticed that the inhibitory activity is statistically stronger (at 9 and 12 hpi) in cells expressing peptide aptamer 72 than in cells expressing peptide aptamers 38 (Student's *t*-test; $P < 0.05$). Thus, the expression of peptide aptamers 72 and 38 induced a significant inhibition of VACV DNA synthesis (75% and 40%, respectively, at 12 hpi), suggesting an efficient intracellular targeting of A20 by these peptide aptamers and confirming the essential role played by this protein in viral DNA replication.

3.6. Inhibition of VACV growth by peptide aptamers

We next investigated whether viral DNA synthesis inhibition was correlated with a reduction of virus production in peptide aptamer expressing cells infected with VACV. Stable 293 cell lines were infected at an MOI of 0.001 PFU/cell and virus yield was quantified at different time points up to 72 hpi. The results, shown in Fig. 5, indicate that from 24 hpi virus replication in cells expressing peptide aptamer 72 is significantly reduced (>75% from 32 hpi) in comparison with the virus yield obtained in TrxA-producing cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$). However, in cells expressing peptide aptamer 38, production of infectious virus is less inhibited and only significantly at 48 and 72 hpi.

4. Discussion

The A20 protein plays a major role in VACV DNA replication. It is a central component that interacts with the DNA polymerase ϵ and two others partners, D5 and D4 with which it forms the heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase (Stanitsa et al., 2006). The four above-mentioned proteins are essential for DNA synthesis and share 98% sequence identity with the corresponding variola proteins. Thus, the identification of molecules that specifically target the VACV replication complex

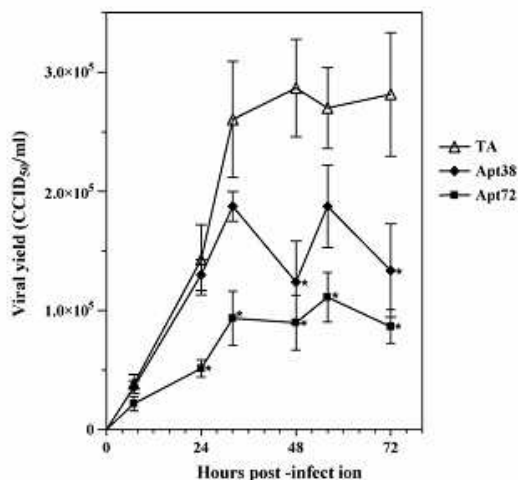


Fig. 5. Inhibition of VACV growth by peptide aptamers. 293 cells stably expressing TrxA, TrxA/aptamers 38 and 72 were infected with VACV (WR strain) at an MOI of 0.001 PFU/cell. Infections were stopped at the indicated time points. Virus yields were determined by virus titration and expressed as CCID₅₀ ml⁻¹ and reported as mean ± S.D. For peptide aptamers 38 and 72 significant differences from control TrxA are indicated by *P < 0.05 (Student's t-test). These experiments were performed three times with comparable results.

could be relevant for the design of new anti-orthopoxvirus drugs in case of a smallpox outbreak. In this study we have used a yeast two-hybrid screen to select 8-mer peptide aptamers that specifically interact with A20. From yeast two-hybrid interaction assays against different truncated forms of A20, we demonstrated that three peptide aptamers (peptides 72, 60, and 79) interact with a central domain of this protein between AA 176 and AA 227. This region does not correspond to the D4 and H5 binding domain (located at the A20 N-terminus extremity) (Ishii and Moss, 2002) and is adjacent to (but does not overlap with) the D5 interacting domain. Since the E9-binding site(s) on A20 has not been mapped yet, we do not know whether these peptide aptamers compete with the DNA polymerase for a common binding site on A20.

When the sequence of peptide aptamer 72 (R Q L V L R T R) was aligned against available viral databases, it appeared to share a certain degree of identity with the sequence of VACV A47 protein: ¹⁹⁰R Q L / L R ¹⁹³ (V and I being two close aliphatic residues). Furthermore, both sequences are flanked by Proline residues, suggesting that the A47 sequence may be exposed in a loop at the surface of the viral protein. A47 (28 kDa), as A20, is expressed early after VACV infection (as predicted from its gene promoter sequence) but its function in the virus life cycle remains unknown. Recently, a CD8⁺ T cell epitope on A47 was identified and characterized (Mathew et al., 2005). The sequence similarity between A47 and peptide aptamer 72 suggests that A47 may interact with A20. Unfortunately, we were not able to detect an interaction phenotype between A47 and A20 in a yeast two-hybrid assay. However, this negative result could be explained by a poor expression level of the A47 two-hybrid construct and/or by a misfolding or mislocalisation of the fusion protein. Moreover, in our hands, A47 was poorly expressed in bacteria as a GST fusion protein.

Viral DNA synthesis was impaired in cells constitutively expressing peptide aptamer 72. This inhibition correlates with a decrease in virus production in those cells (Figs. 4 and 5). Although the inhibitory activity of Apt 72 in the virus yield assay is weak, it was significant and reproducible. One reason that may explain the low inhibitory effect of this aptamer is its limited expression in the stable cell line. Furthermore, the level of peptide aptamer expression

may be decreased upon virus infection since VACV is known to shut off host protein synthesis (Moss, 2007).

Our results suggest that peptide aptamer 72 binds to a domain of A20 that is critical for its function in viral DNA polymerase activity. Interestingly, two independent reports highlighted the importance of this domain of A20 (Ishii and Moss, 2001; Punjabi et al., 2001). Using an approach in which clusters of three or four charged residues are changed to alanine (i.e. clustered charge-to-alanine mutagenesis), mutants of A20 were generated. Recombinant VACV viruses carrying the mutated A20R gene were then recovered and characterized. Strikingly, several recombinant viruses containing mutations in the region between AA 167 and AA 227 of A20 could not be rescued suggesting that these particular mutations are lethal to the virus (Ishii and Moss, 2001; Punjabi et al., 2001). In contrast, other recombinant viruses with mutations either at the N- or C-terminus of A20 were viable. Overall, these results and our data delineate a region of A20 that is critical for its function in DNA polymerase activity.

Peptide aptamer 72 is enriched with positively charged arginine residues suggesting that its interaction with the highly (mainly) negatively charged domain of A20 may be electrostatic. Further experiments will focus on the precise mapping of the aptamer binding surface of A20, by an AptaPrint approach (Pamonsinlapatham et al., 2008). Peptide aptamer 72 provides a promising tool for the discovery of new compounds targeting specifically the poxvirus replication complex. It could itself be developed as a therapeutic molecule. Indeed, by fusing the thioredoxin scaffold to a protein transduction domain, consisting of nine arginine residues, peptide aptamers can be introduced into cultured cells and can inhibit their protein targets (Borghouts et al., 2008). Alternatively, peptide aptamer 72 could be used as guide for the discovery of small molecules through a yeast two-hybrid peptide aptamer displacement screening assay (Baines and Colas, 2006). Developing inhibitors that bind to a precise domain of a protein involved in DNA synthesis may represent an alternative to the more classical screen for inhibitors of the viral DNA polymerase activity.

Acknowledgements

We thank Olivier Moncorgé and Marc Le Breton (Aptanomics, Lyon, France) for the construction of the 8-mer peptide aptamer library. We thank Corinne Rothlisberger for excellent technical assistance and Rob Ruigrok and Livia Merendino for critical reading of the manuscript. This work was supported by research grants from the Service de Santé des Armées, the Délégation Générale pour l'Armement, the ARAMI association and the GenHomme network.

References

- Abed, N., Bickle, M., Mari, B., Schapira, M., Sanjuan-Espana, R., Robbe Sermesant, K., Moncorgé, O., Mouradian-Garcia, S., Barbry, P., Rudkin, B.B., Fauvarque, M.O., Michaud-Soret, L., Colas, P., 2007. A comparative analysis of perturbations caused by a gene knock-out, a dominant negative allele, and a set of peptide aptamers. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2110–2121.
- Andrei, G., Gammon, D.B., Fiten, P., De Clercq, E., Odenakker, G., Snoeck, R., Evans, D.H., 2006. Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice. *J. Virol.* 80, 9391–9401.
- Baines, I.C., Colas, P., 2006. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov. Today* 11, 334–341.
- Bickle, M.B., Dusserre, E., Moncorgé, O., Bottin, H., Colas, P., 2006. Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nat. Protoc.* 1, 1066–1091.
- Biasco, R., Moss, B., 1991. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J. Virol.* 65, 5910–5920.
- Borghouts, C., Kunz, C., Delis, N., Groner, B., 2008. Monomeric recombinant peptide aptamers are required for efficient intracellular uptake and target inhibition. *Mol. Cancer Res.* 6, 267–281.
- Boyle, K.A., Arps, L., Traktman, P., 2007. Biochemical and genetic analysis of the vaccinia virus d5 protein: multimerization-dependent ATPase activity is required to support viral DNA replication. *J. Virol.* 81, 844–859.

Please cite this article in press as: Saccucci, L., et al., Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers. *Antiviral Res.* (2009), doi:10.1016/j.antiviral.2009.02.191

- Butz, K., Denk, C., Fitscher, B., Crnkovic-Mertens, I., Ullmann, A., Schröder, C.H., Hoppe-Seyler, F., 2001. Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* 20, 6579–6586.
- Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, F., 2000. Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6693–6697.
- Colas, P., 2008. The eleven-year switch of peptide aptamers. *J. Biol.* 7, 2.
- Colas, P., Cohen, B., Jessen, T., Grishina, I., McCoy, J., Brent, R., 1996. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380, 548–550.
- Colas, P., Cohen, B., Ko Ferrigno, P., Silver, P.A., Brent, R., 2000. Targeted modification and transportation of cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13720–13725.
- Cresawn, S.G., Condit, R.C., 2007. A targeted approach to identification of vaccinia virus postreplicative transcription elongation factors: genetic evidence for a role of the H5R gene in vaccinia transcription. *Virology* 363, 333–341.
- De Clercq, E., 2003. Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 569–596.
- De Silva, F.S., Lewis, W., Berglund, P., Koonin, E.V., Moss, B., 2007. Poxvirus DNA primase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18724–18729.
- Ferrier, A., Garin, D., Crance, J.M., 2004. Rapid inactivation of vaccinia virus in suspension and dried on surfaces. *J. Hosp. Infect.* 57, 73–79.
- Geddes, A.M., 2006. The history of smallpox. *Clin. Dermatol.* 24, 152–157.
- Geyer, C.R., Brent, R., 2000. Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries. *Methods Enzymol.* 328, 171–208.
- Hoppe-Seyler, F., Crnkovic-Mertens, I., Tomal, E., Butz, K., 2004. Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function. *Curr. Mol. Med.* 4, 529–538.
- Ishii, K., Moss, B., 2001. Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: construction and characterization of temperature-sensitive mutants. *J. Virol.* 75, 1656–1663.
- Ishii, K., Moss, B., 2002. Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex. *Virology* 303, 232–239.
- Klemperer, N., McDonald, W., Boyle, K., Unger, B., Traktman, P., 2001. The A20R protein is a stoichiometric component of the processive form of vaccinia virus DNA polymerase. *J. Virol.* 75, 12298–12307.
- Kornbluth, R.S., Smee, D.F., Sidwell, R.W., Snarsky, V., Evans, D.H., Hostetler, K.Y., 2006. Mutations in the E9L polymerase gene of cidofovir-resistant vaccinia virus strain WR are associated with the drug resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 4038–4043.
- Lane, H.C., Montagne, J.L., Fauci, A.S., 2001. Bioterrorism: a clear and present danger. *Nat. Med.* 7, 1271–1273.
- Lopez-Ochoa, L., Ramirez-Prado, J., Hanley-Bowdoin, L., 2006. Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells. *J. Virol.* 80, 5841–5853.
- Mathew, A., Tarajima, M., West, K., Green, S., Rorhman, A.L., Ennis, F.A., Kennedy, J.S., 2005. Identification of murine poxvirus-specific CD8+ CTL epitopes with distinct functional profiles. *J. Immunol.* 174, 2212–2219.
- McCraith, S., Holtzman, T., Moss, B., Fields, S., 2000. Genome-wide analysis of vaccinia virus protein–protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4879–4884.
- Moss, B., 2007. Poxviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, pp. 2905–2945 (2 vols.).
- Nauenburg, S., Zwierschke, W., Jansen-Durr, P., 2001. Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein. *FASEB J.* 15, 592–594.
- Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Raynaud, F., Bickle, M., Corneloup, C., Barthelax, A., Lepelletier, Y., Mercier, P., Schapira, M., Samson, J., Mathieu, A.L., Hugo, N., Moncorgé, O., Mikaelian, I., Dufour, S., Garbay, C., Colas, P., 2008. A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP–Aurora interaction and induces caspase-independent tumor cell death. *PLoS ONE* 3, e2902.
- Parker, S., Touchette, E., Oberle, C., Almond, M., Robertson, A., Trost, L.C., Lampert, B., Painter, G., Buller, R.M., 2008. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antivir. Res.* 77, 39–49.
- Punjabi, A., Boyle, K., DeMasi, J., Grubisha, O., Unger, B., Khanna, M., Traktman, P., 2001. Clustered charge-to-alanine mutagenesis of the vaccinia virus A20 gene: temperature-sensitive mutants have a DNA-minus phenotype and are defective in the production of processive DNA polymerase activity. *J. Virol.* 75, 12308–12318.
- Scaramozzino, N., Ferrier-Rembert, A., Favier, A.L., Rothlisberger, C., Richard, S., Crance, J.M., Meyer, H., Garin, D., 2007. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. *Clin. Chem.* 53, 606–613.
- Smee, D.F., Sidwell, R.W., Kefauver, D., Bray, M., Huggins, J.W., 2002. Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1329–1335.
- Stanitsa, E.S., Arps, L., Traktman, P., 2006. Vaccinia virus uracil DNA glycosylase interacts with the A20 protein to form a heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 281, 3439–3451.
- Traktman, P., Anderson, M.K., Rempel, R.E., 1989. Vaccinia virus encodes an essential gene with strong homology to protein kinases. *J. Biol. Chem.* 264, 21458–21461.
- Yang, G., Pevear, D.C., Davies, M.H., Collett, M.S., Bailey, T., Rippen, S., Barone, L., Burns, C., Rhodes, G., Tohan, S., Huggins, J.W., Baker, R.O., Buller, R.L., Touchette, E., Waller, K., Schriever, J., Neyts, J., De Clercq, E., Jones, K., Hruby, D., Jordan, R., 2005. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *J. Virol.* 79, 13139–13149.

C/ Discussion

La mise en place d'un criblage haut-débit en levure d'une banque d'aptamères peptidiques à région variable de huit acides aminés a permis de sélectionner un peptide interagissant fortement avec la protéine A20 du complexe de réplication et capable d'inhiber *in vitro* la réplication du virus de la vaccine.

Nous avons localisé la région d'interaction des aptamères 60, 72 et 79 entre les acides aminés 176 et 227 sur la protéine cible A20. Nous ne pouvons cependant pas exclure que des résidus compris entre 1-176 soient aussi impliqués dans l'interaction. Pour écarter cette hypothèse des constructions fonctionnelles de A20, tronquées en N-terminal, auraient été nécessaires. Mais bien que l'ensemble des constructions tronquées en C-terminal de la protéine A20 interagisse avec l'aptamère, il est à noter qu'aucune des protéines A20 tronquées en N-ter ne nous a permis de préciser les régions d'interaction (figure 12). Cela est sans doute lié à un problème de stabilité et de repliement de ces constructions dans le système levure.

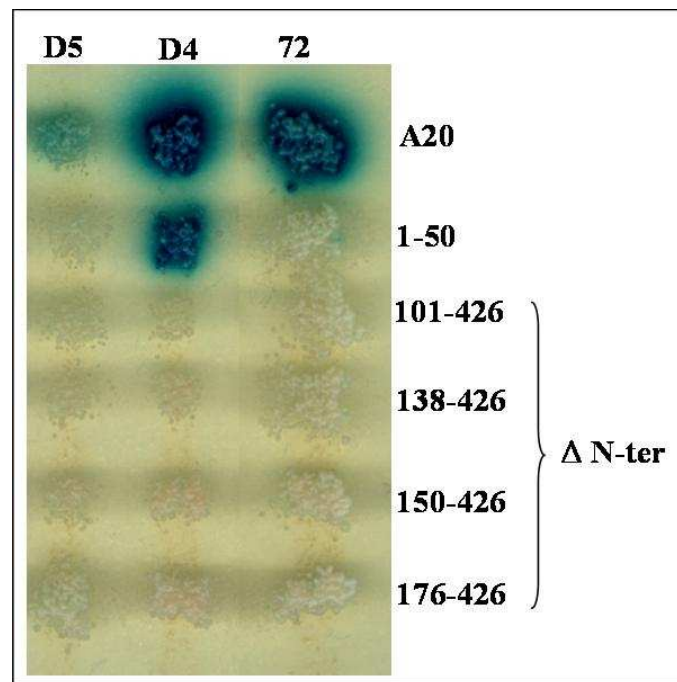


Figure 12 : Complément de la localisation des interactions de l'aptamère 72 sur la protéine A20 (426 AA). Différentes constructions tronquées en N-terminal de la protéine A20 (séquences en AA indiquées à droite) sont utilisées comme proie dans un test double hybride en levure contre l'aptamère 72 et la protéine D5. La protéine D4 connue pour interagir avec les 25 premiers acides aminés de A20 est utilisée comme contrôle positif. Aucune interaction n'est observée entre les troncations N-ter et l'aptamère 72 ou même D5 pourtant connue pour interagir entre les acides aminés 227 et 250 de A20. Ces troncations N-ter ne nous ont donc pas permis de préciser les régions d'interactions des aptamères sur A20.

De façon intéressante, en effectuant une recherche de similarité de séquence des aptamères sélectionnés avec des banques de protéines virales (Blast P), nous avons remarqué que la séquence de l'aptamère 72 (et seulement elle) présentait une similarité marquée avec une partie de la séquence de la protéine A47 du virus de la vaccine. La fonction de cette protéine de 28 kDa reste inconnue mais nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être impliquée dans la réplication virale compte tenu du fait qu'elle est exprimée de façon précoce après infection par le virus de la vaccine. Pour tenter de démontrer alors une éventuelle interaction entre A47 et A20 (compte tenu de leurs similarités de séquences) nous avons utilisé différentes stratégies qui se sont révélées malheureusement toutes inefficaces.

Nous avons tout d'abord cloné le gène codant pour la protéine A47 dans le vecteur plasmidique de proie (pWP2-DBD) utilisé pour le criblage de la banque d'aptamère. Le test double-hybride, identique à celui mis en œuvre pour l'identification des régions d'interaction des aptamères sur A20, ne nous a pas permis de confirmer notre hypothèse, vraisemblablement à cause d'un problème d'expression de A47 dans le système levure. Par la suite le gène A47L a été sous-cloné dans le vecteur GST utilisé pour la confirmation *in vitro* des interactions aptamères-A20 par pull-down. Là encore, l'expression de la protéine A47 était trop faible pour envisager la poursuite de l'expérimentation. Nous avons également cloné la partie C-ter de A47 contenant la séquence similaire à celle de l'aptamère 72, toujours dans le vecteur GST mais sans succès non plus au niveau de l'expression de la fusion. Le gène de A47 a alors été cloné dans un vecteur d'expression mammifère, en fusion avec l'étiquette HA dans l'optique de réaliser une co-immunoprécipitation avec A20 en cellules de mammifères. Là aussi la fusion A47-HA n'a pas pu être correctement détectée par immunoblot. Il resterait néanmoins très intéressant de démontrer une éventuelle interaction entre A20 et A47. L'expression de A47 par le système baculovirus est maintenant envisagée.

L'inhibition de la multiplication virale bien que reproductible s'est avérée faible. Il est envisageable que l'expression des aptamères dans les lignées stables soit fortement inhibée lors de l'infection par le virus de vaccine qui interfère avec la synthèse protéique de la cellule hôte au bénéfice de la traduction des protéines du virus. D'où un effet antiviral limité dans le temps qui pourrait expliquer l'inhibition relativement modeste observée, en particulier par rapport à l'effet de molécules anti-orthopoxvirus disponibles.

Pour le moment le mode d'action de l'aptamère inhibiteur 72 dans les cellules reste à démontrer. Rien ne prouve que l'inhibition virale soit liée à l'interruption d'une interaction entre A20 et l'un de ses partenaires et causée par ce peptide. La liaison de l'aptamère sur la protéine A20 pourrait aussi très bien affecter la processivité de la polymérase sans pour autant casser la moindre interaction.

La démarche idéale à entreprendre dans l'avenir, une fois la preuve de l'inhibition spécifique de l'aptamère obtenue, serait d'utiliser cet aptamère inhibiteur pour réaliser un criblage haut-débit en levure de composés chimiques capables de rompre l'interaction entre cet aptamère et la protéine A20 et ainsi, on l'espère, de mimer l'effet du peptide (Cf. technique AptaScreenTM décrite en introduction, III, D/).

Les délais de la thèse étant trop courts pour effectuer une sélection d'aptamères inhibiteurs et la sélection de molécules mimétiques, nous avons tout de même effectué un criblage similaire en sélectionnant des molécules capables de rompre l'interaction entre la protéine A20 et deux de ses interacteurs connus, D4 et D5, utilisés en contrôle préalable au criblage d'aptamères (figure 1B de l'article 1). Ces expérimentations constituent le second volet des travaux de thèse.

II] INHIBITION DE LA REPLICATION DES ORTHOPOXVIRUS PAR DES MOLECULES CHIMIQUES

A/ Introduction

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle primordial dans la plupart des processus biologiques, de la communication intercellulaire à la mort cellulaire programmée en passant par la réplication des virus dans la cellule hôte et représentent donc une source importante de cibles thérapeutiques potentielles. Encore perçues comme des cibles difficiles d'utilisation par l'industrie pharmaceutique, les stratégies de perturbation des interactions protéine-protéine restent peu utilisées. Pourtant la plupart du temps il s'agit de trouver une molécule capable d'agir directement au niveau des « hot spots » d'interaction, c'est-à-dire interrompre les quelques liaisons chimiques vraiment indispensables à l'intégrité de l'interaction et parfois, en conséquence, au maintien de la fonction. La découverte d'inhibiteurs de ces interactions a été accélérée ces dernières années avec la constitution et le criblage d'importantes banques de composés chimiques de faible poids moléculaire.

Différents tests rapides, robustes, reproductibles, miniaturisés et automatisés ont été développés et un nombre croissant de publications rapporte l'identification de molécules inhibitrices d'interaction protéine-protéine (Colas 2008). *In vitro*, ces tests font généralement appel à des techniques de type ELISA, FRET (Fluorescence resonance energy transfert), à la résonance plasmonique de surface ou à la polarisation de fluorescence. Le criblage peut également reposer sur un test cellulaire dans lequel les interactions peuvent être évaluées par des techniques de double-hybride en levure ou cellules de mammifère.

Les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral des orthopoxvirus sont des cibles de choix dans le but d'obtenir des inhibiteurs spécifiques de la multiplication virale.

Afin de cribler des composés capables de rompre spécifiquement l'interaction entre les protéines virales A20 et D4 ou entre A20 et D5, un criblage double-hybride haut débit en levure, basé sur le système rapporteur « dual luciférase » a été effectué.

La particularité du test, réalisé en plaques 384 puits, réside dans le fait que les deux différentes interactions sont détectées indépendamment par la mesure de l'activité des deux protéines luciférase (Firefly et Renilla), utilisées comme rapporteurs respectifs des interactions (Cf. figure 1 du second article).

Ainsi à l'intérieur d'un même puits il est possible d'identifier une molécule capable de rompre spécifiquement une seule des deux interactions, l'une représentant le contrôle de l'autre. Ce test est l'adaptation du criblage AptaScreenTM initialement développé dans le but d'identifier des molécules capable de rompre les interactions entre un aptamère et sa cible protéique spécifique (Colas 2008).

Un avantage important avec cette technique est que le criblage de molécules ne se fait pas directement sur des complexes protéiques préformés car le système utilise des promoteurs inductibles au galactose (GALp) en amont des séquences codant pour les protéines d'intérêt et l'induction se fait simultanément à l'ajout des composés chimiques.

Une souche de levure déletée pour le gène *erg6*, codant pour une stérol transmethylase impliquée dans la synthèse de l'ergosterol, est utilisée pour augmenter la perméabilité de la levure aux composés chimiques. Cette mutation n'affecte pas la viabilité cellulaire mais la croissance des levures est plus lente.

L'obstacle technique initial était lié à l'importante différence entre le phénotype double hybride de l'interaction A20-D4 et celui de l'interaction A20-D5 bien moins intense (Cf. figure 1B du premier article). Afin d'harmoniser ces deux phénotypes double-hybride pour obtenir des signaux luciférase comparables et cohérents pour une lecture au luminomètre nous avons introduit les gènes codant pour les protéines D4 et D5 dans les plasmides pLP2 et pLP4 contenant respectivement une origine de répllication forte (2 μ) et faible (ARS/CEN).

De même le gène codant pour la protéine A20 a été introduit sur les plasmides pEG202 et pHA1 (2 μ et ARS/CEN respectivement). Les 16 différentes possibilités de couples ont été testées indépendamment pour déterminer le profil d'activation des deux rapporteurs luciférase (figure 13). Ainsi nous avons pu sélectionner les deux couples A20-D4 et A20-D5 optimaux pour le criblage, à savoir pHA1-A20R / pLP4-D4R avec le rapporteur Firefly et pEG202-A20R / pLP2-D5R avec le rapporteur Renilla.

Comparaison des signaux luciférase

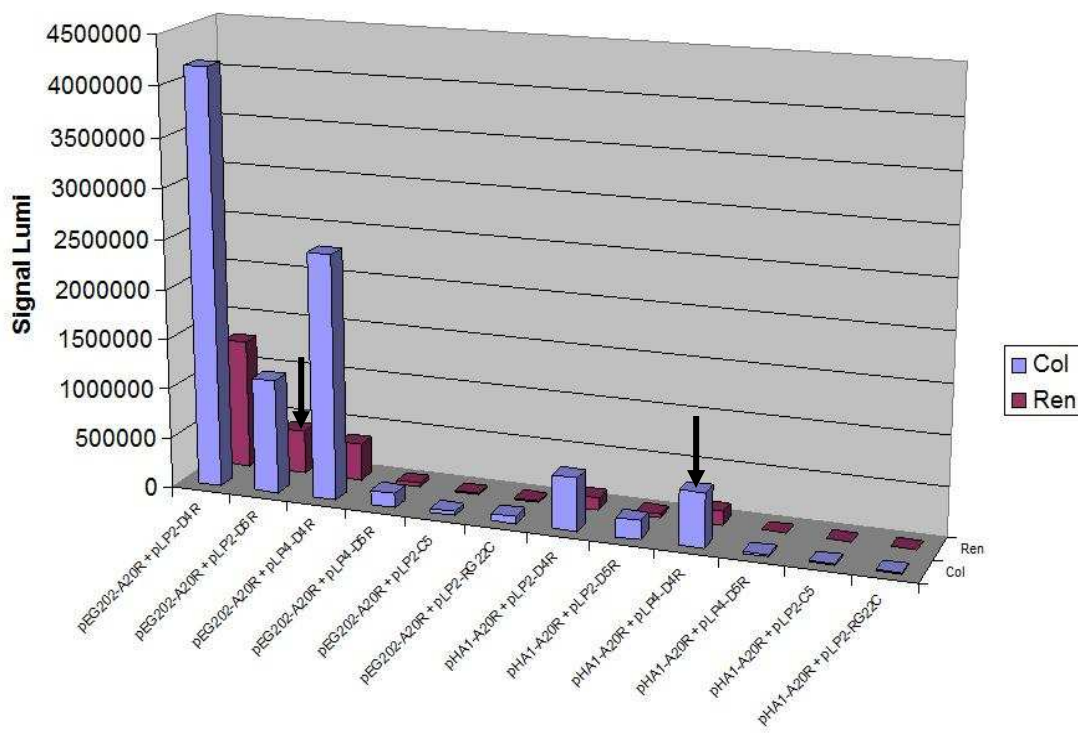


Figure 13 : Détermination des couples optimaux pour le criblage haut débit de molécules. Les gènes D4 et D5 sont introduits dans les plasmides pLP2 et pLP4 et le gène A20 est introduit dans les plasmides pHA1 et pEG202. Les différentes possibilités de couples sont testées indépendamment pour l'activation du signal luciférase Firefly (Col) et Renilla (Ren) dans un test double-hybride en levure. Les gènes C5 et RG22C sont utilisés comme contrôles négatifs. Les couples sélectionnés avec leur rapporteur spécifiques sont indiqués par une flèche.

Au total, 27 600 molécules ont été criblées. Elles sont issues des banques commerciales Prestwick, Nanosyn, Tripos et Chembridge, dans l'optique de disposer de composés les plus diversifiés possible en terme de structure.

148 composés ont présenté une activité luciférase supérieure à 40% pour une des interactions testées tout en ne dépassant pas 30% d'activité sur l'autre interaction. Remarquablement, la plupart des composés ciblent l'interaction A20-D5 (cercle pointillé figure 14) alors que peu d'entre eux sont spécifique de l'interaction A20-D4 (cercle plein, figure 14).

L'activité inhibitrice de ces molécules a été examinée de nouveau dans des conditions identiques et 66 composés ont montré une concordance satisfaisante avec les résultats du criblage initial.

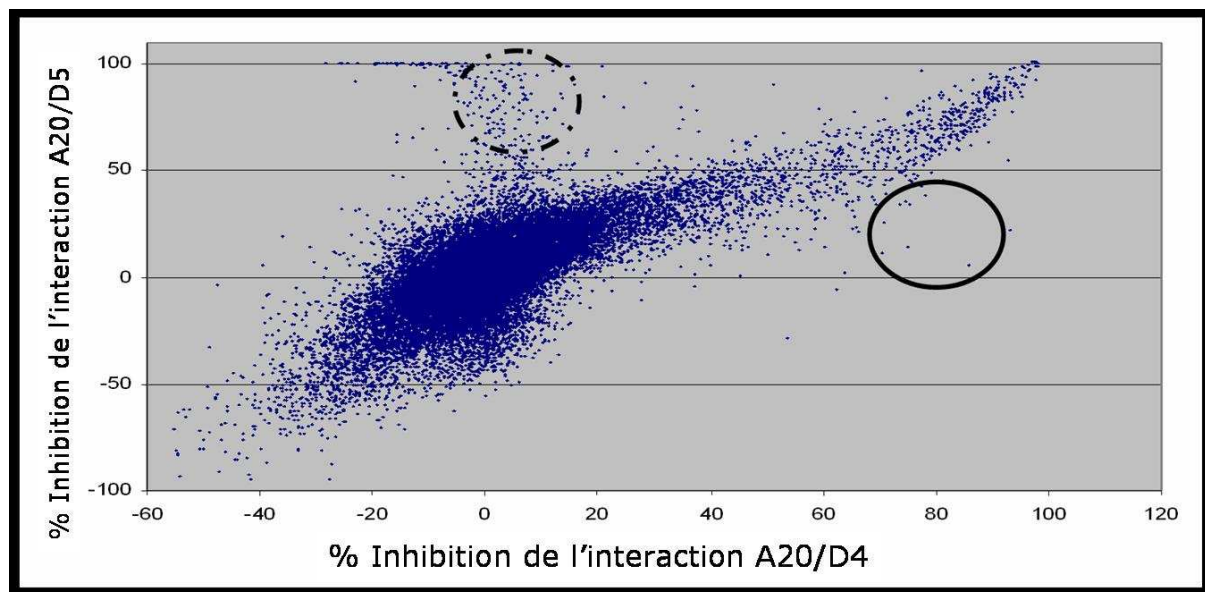


Figure 14 : Résultat du criblage des 27600 composés chimiques. Chaque molécule est représentée par le pourcentage d'inhibition de l'interaction A20-D5 (signal ruc) et le pourcentage d'inhibition de l'interaction A20-D4 (signal luc). Les cercles représentent les molécules sélectionnées pour la reconfirmation.

Cependant, seules les molécules qui, en plus de présenter une bonne confirmation de leur activité sur ce criblage, ne présentaient ni d'inhibition significative sur des précédents criblages effectués chez Aptanomics (contrôle de spécificité) ni de caractéristiques physico-chimiques intrinsèques préjudiciables à la validité du résultat (stabilité, solubilité etc...) ont été sélectionnées pour les tests en culture cellulaire (cellules Vero).

Ce contrôle « chimique » des composés a été fait en concertation avec Jérôme Pansanel, chémo-informaticien. Vingt-neuf molécules toutes spécifiques de l'interaction A20-D5 ont alors été testées individuellement pour leur capacité à diminuer l'effet cytopathogène (ECP) induit par le virus de la vaccine en culture cellulaire. Nous avons identifié deux inhibiteurs spécifiques de la réplication des virus de la vaccine et du virus cowpox in vitro. Ces composés inhibent spécifiquement la synthèse de l'ADN viral.

B/ Publication n°2

Small molecule inhibitors of vaccinia virus replication

Laurent Saccucci^{1,2}, Jean-Marc Crance¹, Pierre Colas^{3,4}, Daniel Garin^{1,*} and Frédéric Iseni¹

¹Unité de virologie, Centre de recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA) Emile Pardé, F-38702 Grenoble, France.

²Protein'expert SA, zone Minatec Entreprises, 7 parvis Louis Néel BP50, F-38040 Grenoble, France.

³Aptanomics SA, 181-203 avenue Jean Jaurès, 69007 Lyon, France.

⁴Present address: Station Biologique, CNRS, UPS 2682, Place Georges Teissier, 29280 Roscoff, France.

* Corresponding author.

CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 Grenoble, France.

Tel: +33-4-76-63-68-44 Fax: +33-4-76-63-69-06

E-mail address: Daniel.Garin@wanadoo.fr

MANUSCRIT EN PREPARATION

Introduction

Variola virus (VARV), the etiologic agent of smallpox, was responsible for the most devastating of all infectious diseases. After an intense campaign of vaccination to eliminate the virus worldwide, the last natural case of smallpox was reported in 1977 in Somalia (Geddes 2006). In the late 70's, the vaccination program against smallpox had ceased in most countries which resulted in a high proportion of non-immune people in today's population. Therefore, if used as a biological weapon by terrorists, VARV could represent a serious threat to the civilian population since no specific antiviral treatment is yet available against orthopoxvirus infection and vaccination is a source of morbidity and mortality (Berche 2001). As a consequence, important efforts have been made, in recent years, to develop effective new anti-poxviral agents. These compounds would not only be precious in response to the malicious release of VARV but could also be used to treat complications due to vaccination and rarer infections caused by monkeypox virus (MPXV), cowpox virus (CPXV) and molluscum contagiosum virus (MCV).

Currently, for treatment of human poxvirus infections, the food and drug administration (FDA) only allows the use of cidofovir (CDV), a nucleoside analogue approved for the treatment of cytomegalovirus retinitis (CMV) in AIDS patients. CDV was shown to block the replication of a broad range of DNA viruses in cell culture (De Clercq 2003) and is effective against orthopoxviruses such as VARV, vaccinia virus (VACV), CPXV, and MPXV (De Clercq 2002). The efficacy of CDV was also proven, *in vivo*, in several animal models challenged with lethal doses of either VACV, CPXV or MPXV (Bray, Martinez et al. 2000; Smee, Bailey et al. 2001; Smee, Bailey et al. 2001; Bray, Martinez et al. 2002; Stittelaar, Neyts et al. 2006).

Unfortunately, in case of a renewed smallpox outbreak, the large-scale use of CDV is unrealistic because of its poor oral bioavailability (i.e. it must be administered intravenously), and its significant kidney toxicity. However, a promising CDV chemical analogue (CMX001), that could be delivered orally, was shown to retain a potent antiviral activity while being less nephrotoxic (Parker, Touchette et al. 2008).

This molecule is currently under development (phase I clinical trials) for the treatment of poxvirus infections. Recently, ST-246, another efficient anti-poxviral compound has been identified. Unlike CDV which targets the viral DNA polymerase (Kornbluth, Smee et al. 2006), ST-246 interferes with the function of F13L, a viral protein involved in virion assembly and dissemination (Blasco and Moss 1991; Yang, Pevear et al. 2005). This orally available compound is active against orthopoxviruses in cell culture and mice (Yang, Pevear et al. 2005; Duraffour, Snoeck et al. 2007). Despite their efficacy, CMX001 and ST-246 will not be approved for the treatment of orthopoxvirus infections before several years. Thus, it is crucial to find new treatments and to develop new strategies to design potent inhibitors against orthopoxviruses.

Protein-protein interactions play a major role in most biological processes, including the successive events leading to the production of viruses from infected cells. In that particular case, protein interactions occur between cellular and virus-encoded components or between viral proteins themselves. These interactions are involved in all steps of the virus life cycle such as virus entry, replication (see below), assembly and virus egress and many of them are potential targets for antiviral agents (Loregian, Marsden et al. 2002). Inhibitors of such interactions present some advantages over more classical compounds designed to inhibit the enzymatic activity of a protein target. Indeed, the complementarity at protein-protein interfaces is such that it gives the possibility to select small molecules that will interfere with the interaction in a highly specific manner.

Furthermore, resistance to these molecules is unlikely since one mutation in one protein would require a simultaneous mutation on the other partner to restore the interaction (Loregian and Palu 2005). Moreover, active site-directed inhibitors often require a single mutation to lead to drug resistance. This is what was observed with CDV where mutations at position 314 or 684 in the DNA polymerase induce resistance to VACV (Andrei, Gammon et al. 2006). Recently, the successful selection of compounds targeting the subunit interactions of herpes simplex virus and cytomegalovirus viral polymerase was reported (Pilger, Cui et al. 2004; Loregian and Coen 2006).

Poxviruses are unique among DNA viruses in that they replicate exclusively in the cytoplasm of the host cell. DNA synthesis takes place in so-called ‘viral factories’ which consist of cytoplasmic foci located at the periphery of the nucleus (Moss 2007). Because they do not rely on nuclear enzymes, poxviruses encode most if not all the proteins necessary for genome replication. Among these proteins, four were shown to be essential and directly involved in the synthesis of the ~ 200 kbp genome. For VACV these are: E9, the catalytic subunit of the DNA polymerase, D5, a DNA-independent nucleoside triphosphatase (NTPase) that contains a helicase domain (Boyle, Arps et al. 2007) and a primase activity (De Silva, Lewis et al. 2007), D4, a uracil DNA glycosylase and A20, a central component whose role is likely to assemble and/or stabilize the complex formed by these four proteins. Recently, A20 and D4 were shown to form the processivity factor for the viral DNA polymerase (Stanitsa, Arps et al. 2006). Through the direct interaction between A20 and E9 (Klemperer, McDonald et al. 2001), the three proteins assemble the processive DNA polymerase holoenzyme. Yeast–two hybrid experiments have also revealed that D5 interacts with a central domain of A20 (McCraith, Holtzman et al. 2000; Ishii and Moss 2002).

Thus, the discovery of molecules able to disrupt protein-protein interactions within the replication complex, and particularly the interactions between A20 and its viral partners, could represent an excellent strategy to develop effective antiviral drugs against orthopoxviruses.

In this study, we have performed a high-throughput screening of small molecules to isolate compounds capable of disrupting A20 interaction with either D4 or D5 proteins. The screen is based on an automated dual-luminescence yeast two-hybrid assay, performed in 384-well plates (Nieuwenhuijsen, Huang et al. 2003). The firefly and the Renilla luciferases were used as reporter genes. This system enables a rapid and simultaneous detection of the two-hybrid phenotypes caused by the interaction between A20-D4 and A20-D5, hosted by two yeast populations mixed in each well.

Thus the screening of a collection of 27,600 compounds from diverse commercial libraries led to the identification of 2 potent inhibitors that exhibit antipoxvirus effect in infected cell culture. Compounds were also found to specifically inhibit DNA replication.

Results

High-throughput dual-luciferase yeast two-hybrid screen for D4/A20 or D5/A20 interaction inhibitors.

A duplex forward Y2H assay was developed with two luciferase reporter genes (firefly *luc* and Renilla reniformis *ruc*) to detect small-molecules able to disrupt interaction between two proteins of the replication complex. Two yeast strains were used, each hosting a protein-protein interacting pair directing the transcription of either the *luc* or *ruc* luciferase. More sensitive *Erg6* deleted yeast strains were used to enhance permeability to small molecules. We have previously determined optimal pairs of plasmids to obtain consistent *luc/ruc* luciferase signals. Thus, for the D4/A20 interaction, corresponding genes were integrated into low-copy number plasmids whereas for the D5/A20 interaction we used high-copy number plasmids. Briefly, molecules that decrease both two-hybrid signals were considered to be toxic or to interfere with the assay, whereas a hit candidate was defined as any compound that selectively elicit ≥ 60 % reduction in one of the two luciferase signal and ≤ 40 % in the other luciferase signal (figure 1). More than 27,000 diverse molecules from compound commercial collections were tested at a single dose of 10 μ M. The initial hit compounds were retested at 10 μ M in the high throughput screening (HTS) assay to finally select a total of 66 compounds for subsequent *in vitro* cellular analysis.

These molecules were next sorted *in silico* according to physicochemical and pharmacological properties to match with a cellular assay. None of these hit molecules was identical to any compound previously identified in screening at Imaxio for inhibition of different protein-protein interactions (C. Bardou, personal communication).

Based on these criteria 29 selected compounds were repurchased individually and next screened in a manual assay of viral-induced cytopathic effect (CPE) by VACV-Lister strain on Vero monolayers as a function of compound concentration. This dose-response analysis permitted to gauge EC_{50} and CC_{50} values in 96-well plates. 2 compounds clearly emerged from this cellular screen and efficiently inhibited VACV-induced CPE formation in Vero cells (Figure 2). Remarkably, these two molecules targeted only the A20-D5 interaction. All other molecules tested were ineffective at therapeutically relevant concentrations or had too small selectivity and were eliminated for subsequent experiments.

Antiviral and cytotoxicity assays.

The antiviral activities of these two selected compounds were precisely determined in VACV-Lister or CPXV-infected Vero cells using the same previously CPE assay and results are shown in Table 1. The two molecules inhibited the visually observed cytopathic effects of the viruses in cultured cells and exhibited a comparable potent activity against the different orthopoxviruses tested with the reference compound cidofovir (EC_{50} of 11.7 and 11.4 for compounds 8776 and 10295 respectively). Compounds 8776 and 10295 yielded comparable selectivity indices and lower than cidofovir due to lower concentrations required to a decrease of cell viability of 50% (CC_{50}). However we worked with raw molecules directly picked from the initial screening library.

Virus yield assay

The inhibitory effects of compound 8776 and 10295 on the yield of progeny virus were evaluated at a low MOI (0.01) in Vero cell monolayers. As shown in figure 3 (A) and (B), the two selected molecules displayed a dose-dependant inhibition of the virus production at 24 h postinfection. A treatment of 50µg/ml of the two compounds reduced the viral titres by approximately > 1 log unit relative to infection in the absence of drugs for the two different orthopoxviruses tested. Potency was quantified as EC₉₉, the concentration at which virus yield was reduce by a factor of 100. The EC₉₉ value for molecule 10295 with the VACV-Lister strain was 2-fold lower than values obtained for cidofovir or molecule 8776. In comparison, the EC₉₉ value observed with molecule 8776 in CPXV-infected Vero cells was 2-fold higher than values obtained for cidofovir and molecule 10295 (Table 2). Vaccinia virus was significantly more sensitive than cowpox to the compounds.

Compounds 8776 and 10295 were evaluated for their cytostatic effects on uninfected exponentially growing Vero cells for 24h. Molecules exhibited moderate cytostatic potentials toward Vero cells in culture over the concentration tested with respectively CC₅₀ of 118 µg/ml and 267 µg/ml for compounds 8776 and 10295 (figure 3 (C)).

In contrast to CC₅₀ values obtained at 72 h post-treatment with the two molecules on confluent Vero cell monolayers, CC₅₀ values evaluated at 24 h post-treatment on exponential growing cells were 3- to 4-fold higher.

Specificity of the two selected compounds for viral inhibition

To confirm that viral inhibition exerted by the two molecules is due to an action inside infected cells and to turn down the hypothesis that molecule could block entry of the virus, we performed experiments in which molecules were added only 2 h post-infection of Vero cells with VACV-Lister strain. As shown in figure 4, the two selected compounds retained ability to inhibit virus production by about 1 log and dose-response curve profiles were identical to those in previously described experiments during the virus adsorption (figure 3 (A)).

Interestingly, the two hit compounds or cidofovir, used as control, were inactive against the replication of the Poxvirus-unrelated Yellow fever virus (YF17D) (data not shown) in Vero cells. This result suggests that the selected compounds show some selectivity toward VACV and CPXV. Thus, the effects of these compounds observed in antiviral assays are due to specific antiviral activity rather than the moderate cytotoxicity.

The two selected compounds specifically inhibited DNA replication.

We next investigated the abilities of the two compounds to inhibit VACV DNA replication in Vero cells. Total DNA was extracted from cells at various times after infection and viral DNA was identified by real time PCR experiments with specific vaccinia virus probe (figure 5). Results show that viral DNA was detectable by 5 h after infection and accumulated up to 12 h (the last time point tested). Inclusion of the two molecules and cidofovir in the culture medium significantly inhibited DNA accumulation from 7 hpi. At 12 hpi DNA replication was drastically inhibited (>80 % inhibition) by each of these molecules in comparison with non-treated Vero cells.

We also reproducibly noticed that the inhibitory activity is statistically stronger at 12 hpi in cells treated by the molecule 10295 than in cells treated by the molecule 8776 or cidofovir (Student's t test; $P < 0.05$).

Effect of the two compounds in a mouse model of lethal cowpox virus infection.

To evaluate compounds in their efficacy in protecting mice against intranasal infection with a lethal dose of CPXV virus (2.10^5 PFU) we challenged infected mice with intranasal (i.n.) or intraperitoneal (i.p.) doses of molecules or sterile saline for placebo group, starting 6h after virus infection. Two compound regimens were tested: 6.25 mg/kg/day and 25 mg/kg/day from day 0 to 4 post-infection (figure 6).

Notably, uninfected mice treated in parallel with the same doses of compounds gained weight, indicating a lack of toxicity of these molecules up to 25 mg/kg in mice. As a positive treatment control, one group of infected animals received i.p. dose cidofovir (100mg/kg/day 0 post-infection). Whereas 5/6 mice in the placebo group died 7 days post-infection, 6/6 cidofovir-treated mice survived. All 6 mice in each molecule 10295-treated cohort mice died at 7 days. Interestingly, all 6 mice in cohort treated with 25 mg/kg/day of molecule 8776 survived 7 days post-infection and the virus-induced mortality was delayed by only 2 days. Unfortunately, this delay in death was not considered as statistically significant from placebo group.

Discussion

With the possible existence of clandestine stocks of variola and the possibility of bioengineered strains resistant to the classical vaccination, there is an increasing concern that the variola virus may be used for bioterroristic purposes. Virtually all children and a majority of the adult population are susceptible to smallpox. With the considerable need for new anti-orthopoxvirus drugs, the goal of this study was to identify, via an original high-throughput screening, small molecules that could inhibit interactions between several proteins of the virus replication complex and as a consequence inhibit the orthopoxvirus replication.

We adapted a dual luciferase screen that enables simultaneous identification of small molecule modulators for 2 independent protein-protein interactions within the replication complex, A20/D4 and A20/D5. This assay was reproducible, had a robust signal-to-noise ratio and allows for the sequential quantitative measurement of both luciferase activities in a single well.

We performed a screen of 27.600 selected small molecule compounds from commercial libraries on the basis of availability and chemical diversity criteria. We identified two compounds whose antiviral profile is sufficiently attractive to justify further drug development efforts (including lead optimization, pharmacokinetic and toxicokinetic studies, and animal efficacy studies).

Notably, the compound potencies observed on virus multiplication were similar to those of cidofovir, the unique approved drug for the treatment of orthopoxvirus infections. These small molecules, without any chemical modification, exhibited significantly greater cytotoxicity activities than that of cidofovir. Thus, the selectivity indices were relatively low in comparison with the reference substance cidofovir. In general, it is expected that a viable therapeutic antiviral drug should be active at concentrations in the submicromolar range.

Identification of derivatives of these molecules will be necessary to improve their antiviral potential and decrease their cytotoxicity. Nevertheless, the small molecules identified in this HTS assay represent an interesting starting point for the discovery of new drugs more potent and specific than currently antipoxvirus compounds, and that should be active against viral mutants resistant to cidofovir.

Combination drug therapy against rapidly evolving pathogens is essential in the treatment of infections by a number of viruses, including variola virus, to enhance the potency and decrease emergence of resistant variants. Synergy studies should be performed with these compounds and existing therapeutics against VACV. We plan to test *in vitro* our lead compounds in combination with new described inhibitors like ST-246.

Although the mode of action of these compounds was proved to be based on the inhibition of the DNA replication (figure 4), further studies are needed to confirm if the D5-A20 interaction disruption is indeed the antiviral mechanism. Moreover, we do not know whether these molecules bind to A20 or D5 or whether they inhibit competitively by binding to the interaction interface or whether they inhibit allosterically.

In vivo studies with these two molecules have not been promising since only 2 days delay in CPXV-induced mortality in infected BALB/c mice was observed with a *i.p.* treatment with 25mg/kg/day for 4 days for compound 8776. However we found these compounds to be non-toxic to mice at doses of 25mg/kg/day, by *i.p.* and *i.n.* treatment route. The objectives of the further animal experimentations would be to defining doses of compounds and treatment regimens that may be effective in preventing death of cowpox-infected mice.

These compounds join a short but expanding list of small molecules that can specifically abrogate protein-protein interactions.

The screening for inhibitors of protein-protein interactions within viral replication complex remains to be a promising strategy for identifying new compounds active against other viral infections.

Material and Methods

Materials

Small-molecule compounds used in this study were selected from Preswick, Nanosyn, Tripos and Chembridge chemical libraries. Compounds 10295 and 8776 were purchased from ASDI Biosciences (Newark, DE) (vendor ID, 150003007) and LifeChemicals (Burlington, Canada) (vendor ID, F0035-0015) respectively. Cidofovir (HPMPC, VistideTM) was synthesized at, and provided by Gilead Sciences (Foster City, CA). The yeast strains and yeast two-hybrid plasmids used in this study were described in detail elsewhere (Bardou, Borie et al. 2009).

Cells and Viruses

Vero cells (ATCC CCL-81), were propagated in M199 medium (Gibco, Invitrogen Corporation, UK) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS) at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. The viral strains used in this report are: VACV (Lister strain, X55-33), provided by Sanofi-Pasteur, CPXV (Brighton strain, ATCC VR 302) and Yellow Fever (YF) vaccine strain 17D.

Experimental animals

Four-week old female BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Arbresle, France) and quarantined one week before experiment. Each group of 6 animals was housed in filter-top micro-isolator cages. General anesthesia was performed by intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (100 mg/kg) and atropine (1.5 mg/kg). Animals were sacrificed by i.p. injection of pentobarbital (330 mg/kg). All protocols were approved by the local ethical committee (protocol number: 2008/20.0).

Plasmid constructions

pLP4-D4 plasmid, carrying an ARS/CEN origin of replication, was constructed by PCR amplification of the D4R gene from VACV (Copenhagen strain) DNA using the primers 5'-TCT GAA TTC ACC ATG AAC TCA GTG ACT GTA TCA CAC G-3' and 5'-CTC CTC GAG TCA ATA AAT AAA CCC TTG AGC CCA ATT TAT AG-3'. The PCR fragment was cleaved and ligated into the EcoRI/XhoI-cleaved pLP4 plasmid.

pLP2-D5, a high-copy number vector (2 μ), was constructed by subcloning the D5R gene from pWP2-D5 plasmid (Saccucci et al) into the XhoI/EcoRI-cleaved pLP2 vector.

pHA1-A20 plasmid (ARS/CEN) was obtained by subcloning the VACV A20R gene from previously described pEG202-A20R vector (Saccucci et al) into the Xho1/EcoR1-digested pHA1 plasmid.

Construction of luciferase reporter yeast strains

All yeast transformations were performed using the lithium acetate method (Bickle, Dusserre et al. 2006). To generate the Renilla luciferase reporter strain, TB50 α -erg6 yeasts were sequentially transformed with pHB2-Ren (Bardou, Borie et al. 2009), pLP4-D4 and pHA1-A20 vectors. Similarly, Firefly luciferase reporter strain was obtained by co-transformation of TB50 α -erg6 yeasts with pHB2-FF (Bardou, Borie et al. 2009), pLP2-D5 and pEG202-A20 vectors. Transformants were grown on Ura⁻His⁻Leu⁻, Glucose 20 % plates for 2 days at 30 °C.

High-throughput dual luciferase screening

Screening was performed essentially as described in Bardou et al. (Bardou, Borie et al. 2009). Briefly, TB50 α -erg6 yeasts expressing D4 and D5 were grown in Ura⁻His⁻Leu⁻, Glycerol 1 % and Raffinose 1 % medium at 30 °C. Yeasts were then diluted to OD₆₀₀ = 0.75 and an equal volume of each culture were mixed. 2.5 μ l of diluted compound in 10 % DMSO (10 μ M final concentration), were distributed in 384-well plates (Microlon Greiner), followed by addition of 2.5 μ l of Galactose 20 % and 20 μ l of mixed yeast culture. Protein interactions (i.e. A20/D4 and A20/D5) were allowed to form in presence of the compounds for 6 h at 30 °C. Light emission catalyzed by firefly luciferase was then quantified after addition of 20 μ l of firefly luciferase reagent (Dual Glow Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI), and 4 h incubation at 30 °C, in an EnVision plate reader (Perkin Elmer, Shelton, CT). Likewise, luminescence signal produced by Renilla luciferase was determined following addition of 20 μ l of renilla luciferase reagent (Dual Glow Luciferase Assay System,) and after 3 h incubation at 30 °C.

In vitro antiviral assays

Confluent monolayers of Vero cells in 96-well plates were infected with VACV or CPXV at a multiplicity of infection of 0.01 and simultaneously treated with serial dilutions of compounds 10295 or 8776. Infected cells were cultivated 72 hours in M199 medium supplemented with 0.4 % FCS at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. At 72 hours post infection (hpi), cells infected but not treated showed 100% virus-induced cytopathic effects (CPEs).

Percentage of CPEs in infected cells treated with compounds 10295 or 8776 was recorded microscopically and the 50% effective concentration (EC_{50}) was defined as the concentration of molecule required to reduce the viral CPE by 50%. The EC_{50} of the selected molecules was calculated as the means from two independent experiments.

Determination of cytotoxic and cytostatic effects of molecules 8776 and 10295

Cytotoxicity was assayed in confluent Vero cell cultivated for 3 days in presence of different concentrations of the tested compounds. Cytotoxic effects were monitored microscopically: the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the compound concentration causing 50% cell mortality and calculated as the means from two independent experiments.

The cytostatic effect of molecules 10295 and 8776 was evaluated on exponential growing Vero cells. Vero cells were seeded into 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/well. After 1 day of incubation, 500 μ l of medium containing serial dilutions of the selected compounds was added. Following 1 or 3 days of incubation, cells were trypsinized and the cell number per well was determined by manual counting with a hemacytometer (Trypan blue exclusion assay). The cytotoxic effect of the compounds was expressed as the 50% cytostatic concentration (CC_{50}), defined as the concentration required to reduce cell growth by 50% and calculated as the means from two independent experiments.

Determination of virus yield in cells treated with molecules 8776 and 10295

Confluent VERO cells grown in 24-well plates were infected with VACV, CPXV or YF at an MOI of 0.01 in DMEM supplemented with 0.4% v/v FCS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were treated either simultaneously or after 1 h incubation with different concentrations of compound 10295 or 8776. The viral inoculum was removed 2 hpi, cells were washed with 1 ml PBS and fresh medium was added. Virus titration was performed 24 h post-infection, on VERO cells, in 96-well microtiter plates as already described (Ferrier, Garin et al. 2004). Viral titre was expressed in log₁₀ PFU/ml. The EC_{99} (i.e. the compound concentration required to reduce the viral titer by 99%) was calculated for each compound from dose-response curves by regression analysis.

Quantification of viral DNA synthesis

Vero cells were infected with VACV at an MOI of 3 and harvested at the indicated time points. Monolayers were rinsed two times at 2 hpi and supplemented with fresh media. Total DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Amplification of the vaccinia virus A27L gene by real-time PCR was performed using the primers 5'-CAA CGA CTA ACT AAT TTG GAA AAA AAG AT-3' and 5'-GCC AGA GAT ATC ATA GCC GCT C-3' and the A27L gene specific probe 5'-TTT TCC AAC CTA AAT AGA ACT TCA TCG TTG CGT T-3' in an Applied Biosystems Prism 7000 SDS instrument with v2.1.1 software (Scaramozzino, Ferrier-Rembert et al. 2007). Reactions were carried out in 20µl using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3µM of each primer, 0.2µM of TaqMan probe and 5µL of extracted viral DNA (or 5µl of serial 10-fold dilutions of pVACV-A27L standard plasmid for direct quantification of DNA). Thermal cycling was performed as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles each of 95°C for 15s, followed by 60°C for 60s. All PCR runs included negative and positive controls and all samples were assayed in triplicate. Normalization of the DNA quantity to GAPDH was performed using kit (Taq Man GAPDH control reagents Kit, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Correlation values of standard curves were always >99%.

Mice inoculation, treatment and evaluation

Five-week old BALB/c mice were challenged by intranasal (i.n.) inoculation under general anesthesia with a lethal dose (2.10^5 TCID₅₀) of cowpox virus (Bray, Martinez et al. 2000; Ferrier-Rembert, Drillien et al. 2007). Uninfected mice were inoculated with sterile saline to evaluate toxicity of the compounds. Compounds 10295, 8776 or CDV were administrated 6 h after virus challenge. Animals were treated by i.n. or i.p. injection with 6.25 or 25 mg/kg of each molecule once a day for 4 days. Mice treated with cidofovir were inoculated once with 100mg/kg. Mice were observed for signs of CPXV infection, individually weighed every 2-3 days and deaths recorded during a 21 day period after challenge. Statistically significant differences in the mean day of death were assayed by the two-tailed Mann-Whitney *U*-test. All statistical comparisons were made between drug-treated groups and mock-infected mice.

References

- Andrei, G., D. B. Gammon, et al. (2006). "Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice." J Virol 80(19): 9391-401.
- Bardou, C., C. Borie, et al. (2009). "Peptide aptamers for small molecule drug discovery." Methods Mol Biol 535: 373-88.
- Berche, P. (2001). "The threat of smallpox and bioterrorism." Trends Microbiol 9(1): 15-8.
- Bickle, M. B., E. Dusserre, et al. (2006). "Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures." Nat Protoc 1(3): 1066-91.
- Blasco, R. and B. Moss (1991). "Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein." J Virol 65(11): 5910-20.
- Boyle, K. A., L. Arps, et al. (2007). "Biochemical and genetic analysis of the vaccinia virus d5 protein: Multimerization-dependent ATPase activity is required to support viral DNA replication." J Virol 81(2): 844-59.
- Bray, M., M. Martinez, et al. (2002). "Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized cidofovir." Antiviral Res 54(3): 129-42.
- Bray, M., M. Martinez, et al. (2000). "Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge." J Infect Dis 181(1): 10-9.
- De Clercq, E. (2002). "Cidofovir in the treatment of poxvirus infections." Antiviral Res 55(1): 1-13.
- De Clercq, E. (2003). "Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections." Clin Microbiol Rev 16(4): 569-96.
- De Silva, F. S., W. Lewis, et al. (2007). "Poxvirus DNA primase." Proc Natl Acad Sci U S A 104(47): 18724-9.
- Duraffour, S., R. Snoeck, et al. (2007). "Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures." Antivir Ther 12(8): 1205-16.
- Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, et al. (2007). "Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate." Vaccine 25(49): 8290-7.
- Ferrier, A., D. Garin, et al. (2004). "Rapid inactivation of vaccinia virus in suspension and dried on surfaces." J Hosp Infect 57(1): 73-9.
- Geddes, A. M. (2006). "The history of smallpox." Clin Dermatol 24(3): 152-7.
- Ishii, K. and B. Moss (2002). "Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex." Virology 303(2): 232-9.
- Klemperer, N., W. McDonald, et al. (2001). "The A20R protein is a stoichiometric component of the processive form of vaccinia virus DNA polymerase." J Virol 75(24): 12298-307.
- Kornbluth, R. S., D. F. Smee, et al. (2006). "Mutations in the E9L polymerase gene of cidofovir-resistant vaccinia virus strain WR are associated with the drug resistance phenotype." Antimicrob Agents Chemother 50(12): 4038-43.

-
-
- Loregian, A. and D. M. Coen (2006). "Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase." Chem Biol 13(2): 191-200.
- Loregian, A., H. S. Marsden, et al. (2002). "Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy." Rev Med Virol 12(4): 239-62.
- Loregian, A. and G. Palu (2005). "Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy." J Cell Physiol 204(3): 750-62.
- McCraith, S., T. Holtzman, et al. (2000). "Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions." Proc Natl Acad Sci U S A 97(9): 4879-84.
- Moss, B. (2007). Poxviridae: The viruses and Their Replication. Fields Virology D. M. Knipe, and P.M. Howley. Philadelphia, Lippincott, Williams, & Wilkins. 2: 2905-2945.
- Nieuwenhuijsen, B. W., Y. Huang, et al. (2003). "A dual luciferase multiplexed high-throughput screening platform for protein-protein interactions." J Biomol Screen 8(6): 676-84.
- Parker, S., E. Touchette, et al. (2008). "Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model." Antiviral Res 77(1): 39-49.
- Pilger, B. D., C. Cui, et al. (2004). "Identification of a small molecule that inhibits herpes simplex virus DNA Polymerase subunit interactions and viral replication." Chem Biol 11(5): 647-54.
- Scaramozzino, N., A. Ferrier-Rembert, et al. (2007). "Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses." Clin Chem 53(4): 606-13.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2001). "Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir." Antivir Chem Chemother 12(1): 71-6.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2001). "Effects of cidofovir on the pathogenesis of a lethal vaccinia virus respiratory infection in mice." Antiviral Res 52(1): 55-62.
- Stanitsa, E. S., L. Arps, et al. (2006). "Vaccinia virus uracil DNA glycosylase interacts with the A20 protein to form a heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase." J Biol Chem 281(6): 3439-51.
- Stittelaar, K. J., J. Neyts, et al. (2006). "Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection." Nature 439(7077): 745-8.
- Yang, G., D. C. Pevear, et al. (2005). "An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge." J Virol 79(20): 13139-49.

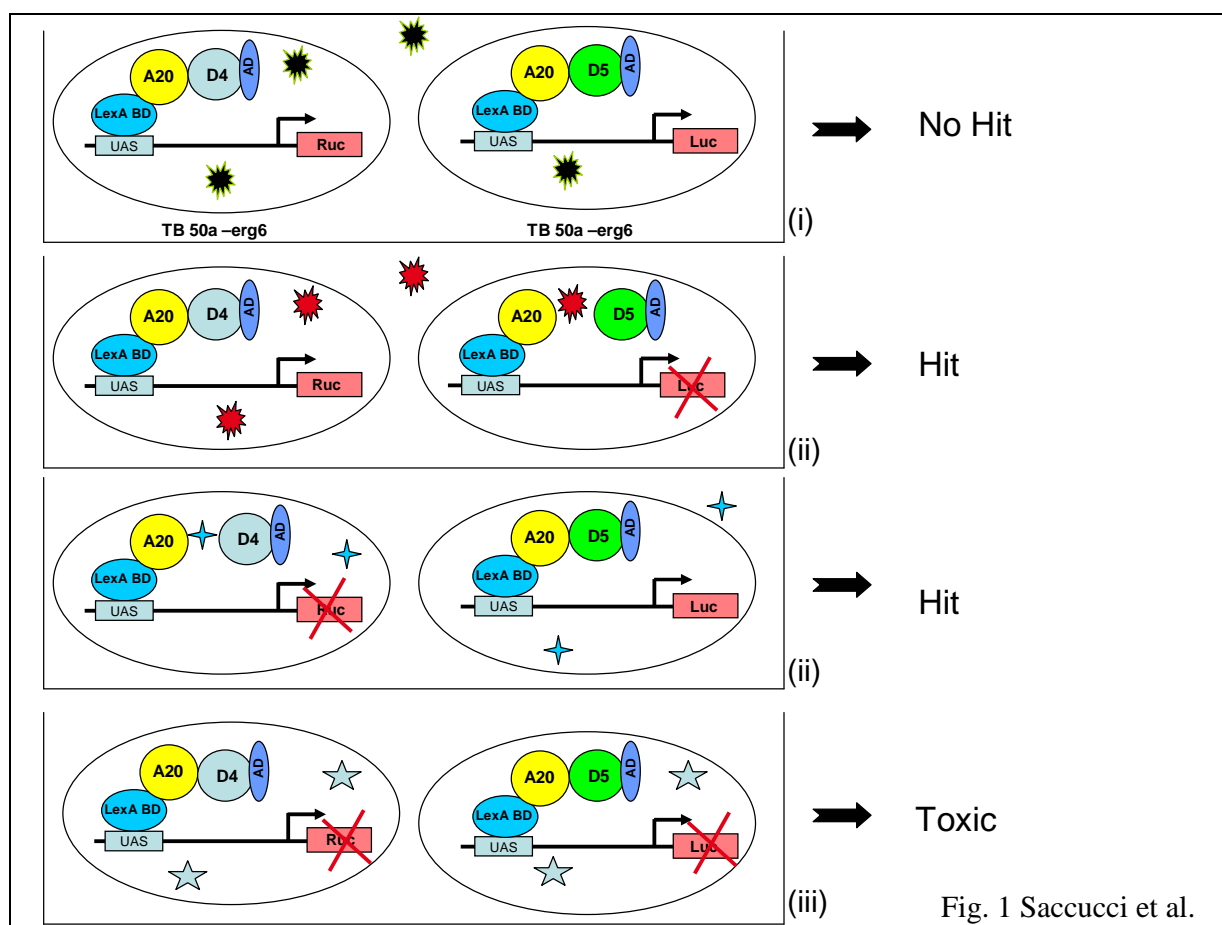
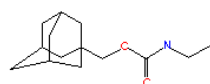
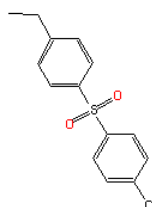


Figure 1. Principle of the dual luciferase multiplexed high-throughput yeast two-hybrid assay.

Two yeast strains are used, each hosting a protein-protein interacting pair. The VACV A20 protein is fused to the DNA-binding domain of the transcription factor LexA and VACV D4 or D5 proteins are fused to a transcriptional activation domain. Reconstitution of an active transcription factor, mediated by protein-protein interactions, directs the transcription of either the firefly (*Luc*) or *Renilla* (*Ruc*) luciferase, the two reporter genes used in this assay. The panels represent four wells from a 384-well plate, in which different small molecules are screened. (i) The added molecule produces no effect on either yeast two-hybrid phenotype. (ii) The added molecule inhibits selectively one of the two phenotypes and is considered as a hit candidate. (iii) The added molecule inhibits both phenotypes, either because it interferes with the yeast two-hybrid assay or because it is toxic to yeast.



Compound 8776 (FW 237.3)



Compound 10295 (FW 280.8)

Fig. 2 Saccucci et al.

Figure 2. Structures of compounds selected for viral inhibition

Compound 8776 : 1-adamantylmethyl ethylcarbamate

Compound 10295 : 1-chloro-4-[(4-ethylphenyl)sulfonyl] benzene

	Compound	EC ₅₀ ^a (µg/ml)	CC ₅₀ ^b (µg/ml)	SI ^c
Vaccinia Virus	8776	11.7 ± 0.8	35.4 ± 2.1	3.0
	10295	11.4 ± 0.2	48.2 ± 1.8	4.2
	Cidofovir	9.8 ± 0.9	170 ± 10	17.3
Cowpox Virus	8776	22.9 ± 5.2	42.2 ± 7.8	1.8
	10295	15.1 ± 4.2	43.75 ± 6.25	2.9
	Cidofovir	27.3 ± 4.3	170 ± 10	6.2

Table 1 Saccucci et al.

Table 1. Antiviral activities of selected compounds and CDV against VACV and CPXV in Vero cells monolayers.

^a Concentration required to inhibit 50% of virus-induced cytopathic effect.

^b Concentration required to reduce cell viability by 50%

^c Selectivity index (ratio of CC₅₀ to EC₅₀).

CC₅₀ and EC₅₀ values for each compound are the mean ± SD of the values of at last two independent experiments

	Compound	EC ₉₉ ^a (µg/ml)	CC ₅₀ ^b (µg/ml)
Vaccinia Virus	8776	59.5	118.7
	10295	31.3	267.1
	Cidofovir	61.4	148.2
Cowpox Virus	8776	109.8	118.7
	10295	57.3	267.1
	Cidofovir	65.9	148.2

Table 2 Saccucci et al.

Table 2. Inhibition of virus multiplication by selected compounds and CDV against VACV and CPXV in Vero cells monolayers

^a Concentration required to reduce the viral titer by 99%

^b Concentration required to reduce cell growth by 50%

CC₅₀ and EC₉₉ values for each compound are the mean ± SD of the values of at last two independent experiments.

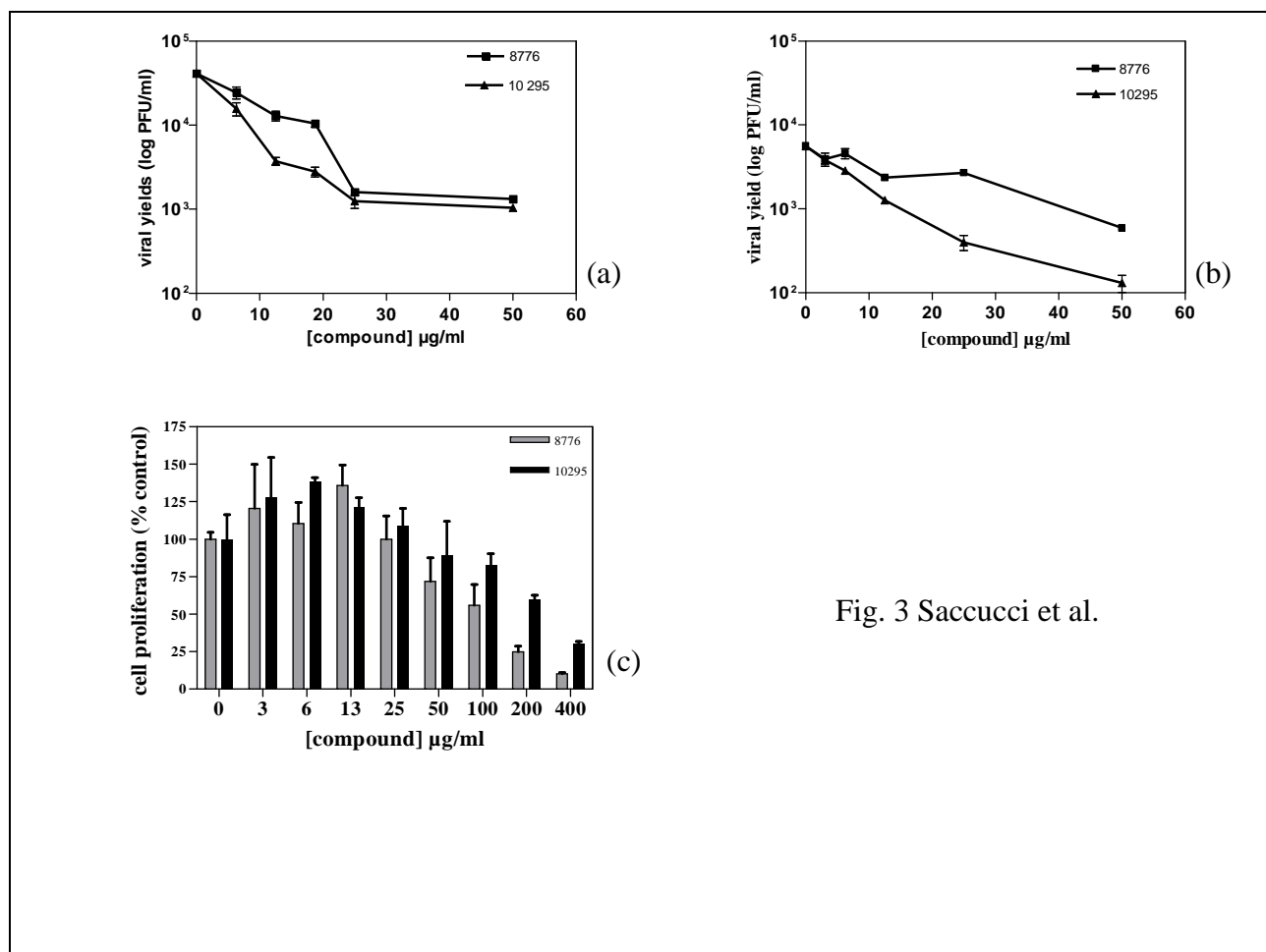


Fig. 3 Saccucci et al.

Figure 3. The inhibitory effect of selected compounds on the production of VACV (A) and CPXV (B) and their cytopathic effect on cell growth

The effects of several concentrations of selected molecules on virus production were determined 24h post-infection (see Materials and Methods for details). Viral titres were determined by plaque reduction assay on Vero cells. The errors bars represent the standard deviation of the means of quadruplicate virus yield determination. (c). The effects of several concentrations of selected molecules on cell growth were determined 24h post-incubation (see Materials and Methods for details). The number of live cells was determined by Blue Trypan exclusion staining on Vero cells. The values indicate the percentage of live cells compared with DMSO-treated control. The errors bars represent the standard deviation of the means of triplicate counting.

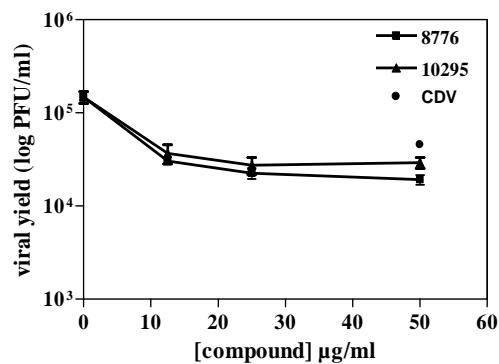


Fig. 4 Saccucci et al.

Figure 4. Specificity of selected compounds for viral inhibition

The inhibitory effect of selected compounds, added 2 h post-infection, on the production of VACV. The effects of several concentrations of selected molecules on virus production were determined 24h post-infection (see Materials and Methods for details). Viral titres were determined by plaque reduction assay on Vero cells. The errors bars represent the standard deviation of the means of quadruplicate virus yield determination.

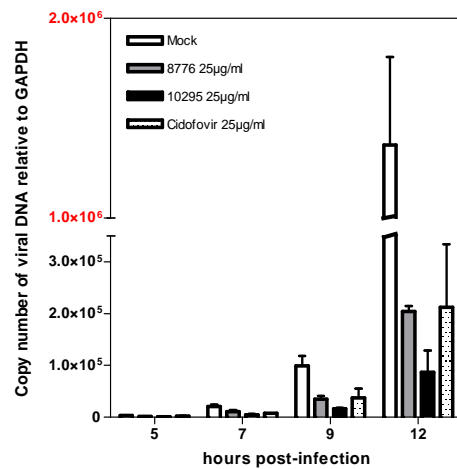


Fig. 5 Saccucci et al.

Figure 5. The two selected compounds specifically inhibit VACV replication.

Vero cells were treated with 25µg/ml of selected compound or Cidofovir and infected with VACV (Lister strain) at an MOI of 3. Cells were harvested at the indicated time points; VACV DNA was extracted and quantified by real-time PCR using primers specific to VACV A27L gene. Results are expressed as copy number of viral DNA relative to GAPDH and reported as mean +/- S.D. from three samples.

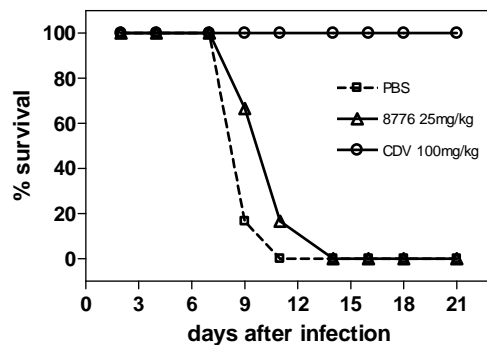


Fig. 6 Saccucci et al.

Figure 6. Effect of selected compound 8776 in protection against CPXV infection.

Survival of BALB/c mice infected intranasally with $2 \cdot 10^5$ PFU of CPXV and treated with 25 mg/kg/ x4 days of compound 8776, 100mg/kg/ x1day of Cidofovir or PBS (untreated control) was observed at different days post-infection (see Materials and Methods for details).

C/ Discussion

A ce jour nous ne pouvons toujours pas écarter le risque d'utilisation du virus de la variole à des fins terroristes. Le vaccin antivariolique pourrait ne pas être efficace sur des souches virales modifiées génétiquement et son utilisation est synonyme de nombreuses complications post-vaccinales. La variole mais aussi d'autres infections humaines à poxvirus pourraient être traitées en orientant les recherches vers le développement de molécules antivirales actives sur les orthopoxvirus.

Cette technique originale de criblage haut-débit de molécules chimiques a permis de sélectionner deux composés capables d'inhiber très nettement la réplication du virus de la vaccine et du virus cowpox.

La spécificité de ces molécules doit encore être précisée avec l'utilisation du virus Orf du genre *Parapoxvirus* (également de la famille des *Poxviridae*) pour déterminer si les composés n'inhibent de façon spécifique que la réplication des virus du genre orthopoxvirus. L'utilisation d'un autre virus à ADN tel que l'herpes virus viendra également confirmer cette hypothèse.

Il serait plus que pertinent pour la suite de prouver que ces deux molécules agissent au niveau de l'interaction A20/D5 *in vitro*. La protéine A20 est extrêmement délicate à produire par génie génétique et ce n'est que très récemment que cette protéine a pu être exprimée au laboratoire en complexe avec D4 qui semble la stabiliser. Ceci ouvre de nouvelles perspectives pour l'élaboration d'expérimentations de co-immunoprécipitation visant à confirmer l'action des composés.

Les essais sur le modèle souris infecté par le virus cowpox n'ont pas été concluants dans les conditions testées pour ces deux composés, directement issus du criblage. La synthèse d'analogues de ces molécules par des chimistes pourrait permettre le développement de dérivés au pouvoir inhibiteur amélioré et moins toxiques.

D'autres tests cellulaires seront nécessaires avant les tests sur le modèle souris. Différentes posologies de ces dérivés et plusieurs modes d'administration (*per os*, sous-cutanée...) devront alors être testés pour trouver les conditions optimales d'un effet protecteur *in vivo*.

Une perspective à court terme est de tester la trentaine de molécules capables d'inhiber les deux interactions protéiques à plus de 50% et qui dans un premier temps ont été éliminées car considérées comme toxiques (figure 14). Or il est tout à fait envisageable qu'une ou plusieurs de ces molécules agissent sur la protéine A20 en bloquant toute interaction avec ses deux partenaires.

Le pari d'interrompre de telles interactions était ambitieux compte tenu du fait que nous avons utilisé les protéines entières et pas seulement des régions « druggable » qui apparaîtraient à priori comme des cibles pertinentes pour des molécules inhibant les interactions protéiques. Mais nous disposons de très peu de données sur les protéines du complexe de réplication.

Une preuve de concept a été établie avec ces expérimentations. Le criblage d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine du complexe de réplication est une stratégie prometteuse pour identifier de nouveaux composés actifs contre d'autres infections virales.

DISCUSSION GENERALE

Après la découverte de l'existence d'un programme de mise au point et de production d'armes biologiques et notamment de la variole et la série d'attentats qui ont eu lieu à partir du 11 septembre 2001 la menace variole est prise très au sérieux en occident.

L'OMS a recommandé la mise au point de deux molécules antivirales disponibles immédiatement en cas d'attaque bioterroriste pour traiter les personnes infectées et pour traiter les complications post-vaccinales. Différentes stratégies vaccinales et antivirales ont été imaginées pour lutter contre le virus de la variole. Les molécules les plus performantes dans les essais cliniques sont des dérivés du cidofovir et la molécule ST-246, mais aucune n'est encore officiellement approuvée comme traitement spécifique.

Dans le but de sélectionner d'autres molécules anti-poxvirus, nous avons développé deux stratégies antivirales originales basées sur l'interruption des interactions protéine-protéine au sein du complexe de réplication des virus du genre orthopoxvirus.

L'idée initiale a été de sélectionner des aptamères peptidiques ciblant une protéine clé dans l'assemblage du complexe de réplication : la protéine A20 du virus de la vaccine, modèle substitutif du virus de la variole. Cette protéine virale, en position centrale au sein du complexe de réplication, joue un rôle essentiel dans la processivité de la polymérase virale et interagit avec au moins trois partenaires. Remarquablement un aptamère exprimé de façon stable en cellule a montré un pouvoir inhibiteur sur la réplication virale. Bien que cet aptamère soit capable d'interagir avec la protéine A20 en levure et dans des tests *in vitro*, rien ne prouve encore que l'inhibition observée soit liée à l'interruption directe d'une interaction entre A20 et l'un de ses partenaires en cellules infectées. Les perspectives à court terme seront de déterminer si l'inhibition n'est pas liée à la perturbation des interactions entre A20 et ses trois partenaires connus à ce jour D4, D5 et E9.

A ce jour cette sélection d'aptamères peptidiques est la seule effectuée sur un virus du genre orthopoxvirus. De futures expérimentations devront maintenant déterminer si l'aptamère inhibiteur 72 est actif sur d'autres membres du genre, en particulier sur le virus camelpox qui selon de récents travaux est le virus le plus proche du virus de la variole et donc le modèle le plus pertinent pour le développement d'antiviraux efficaces contre la variole.

Pour tenter d'améliorer l'effet inhibiteur du peptide sur la réplication virale une voie de recherche serait de fusionner l'aptamère inhibiteur au domaine de transduction protéique (PDT) polyarginine et d'envisager une production en bactérie avant addition de ces fusions sur des cultures de cellules infectées. Cette démarche permettrait d'infirmer l'hypothèse d'une restriction de l'expression des gènes cellulaires et par conséquent des aptamères dans les lignées stables lors de l'infection par le virus de la vaccine particulièrement cytolytique.

Cette expérimentation permettrait également de comparer l'inhibition virale exercée par l'aptamère avec celle des molécules anti-orthopoxvirales actuellement développées car il est alors possible de contrôler la concentration de l'aptamère.

Il peut être plus judicieux d'utiliser l'aptamère inhibiteur pour réaliser un criblage haut-débit en levure de composés chimiques capables de rompre l'interaction entre cet aptamère et la protéine A20 et ainsi, on l'espère, de mimer l'effet du peptide (technique AptaScreen™)

La démarche de sélection d'aptamères est applicable à l'ensemble des organismes infectieux à condition de pouvoir exprimer la protéine cible de façon correcte en levure dans une configuration la plus proche de la protéine native du pathogène. Cette stratégie couplée au criblage de molécules chimiques mimétiques de l'effet de l'aptamère permettrait de disposer rapidement de nouveaux composés potentiellement intéressants pour l'industrie pharmaceutique dans le domaine de l'infectiologie.

Idéalement pour chaque pathogène plusieurs protéines pourraient être ciblées, certaines intervenant dans la réplication, d'autres au niveau d'étapes différentes du cycle viral dans la sortie de la cellule infectée pour ainsi envisager une multithérapie limitant l'apparition de mutants résistants.

Les limitations actuelles restent le coût des réactifs du criblage et des molécules et le coût des installations spécifiques à l'étude de certains pathogènes (laboratoires NSB3/4 par exemple).

La technique AptaScreen a été « détournée » pour le second volet de ces travaux.

Nous avons criblé des composés chimiques variés capables de rompre spécifiquement l'interaction entre les protéines virales A20 et D4 ou entre A20 et D5, par un test double-hybride haut débit en levure, basé sur le système rapporteur « dual luciférase ».

Malgré le faible nombre de molécules criblées (seulement 27 600 composés !) en rapport avec les criblages réalisés par les grandes compagnies pharmaceutiques, deux molécules ont prouvé leur pouvoir inhibiteur sur la réplication du virus en culture cellulaire, bien que leur utilisation soit limitée par leur toxicité intrinsèque.

Des dérivés de ces molécules devraient être synthétisés, testés à nouveau en culture cellulaire avant de montrer un éventuel pouvoir protecteur sur des souris infectées.

Là encore des expérimentations devront être effectuées pour prouver le mécanisme d'inhibition théorique basé sur la perturbation de l'interaction entre les protéines D5 et A20.

Par ces deux démarches et grâce aux résultats encourageants obtenus, nous avons renforcé l'idée que le criblage d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine dans le complexe de réplication viral est une stratégie prometteuse pour identifier de nouveaux composés actifs contre d'autres infections virales.

Grâce au criblage d'aptamères peptidiques et à ce criblage de molécules nous disposons maintenant non seulement de nouveaux inhibiteurs, dont le développement doit être poursuivi, mais également de nouveaux outils moléculaires pour l'étude de la réplication des orthopoxvirus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedi, M. R., G. Caponigro, et al. (1998). "Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides." Nucleic Acids Res **26**(2): 623-30.
- Alibek, K. (1999). "The Soviet Union's anti-agricultural biological weapons." Ann N Y Acad Sci **894**: 18-9.
- Andrei, G., D. B. Gammon, et al. (2006). "Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice." J Virol **80**(19): 9391-401.
- Armon-Omer, A., A. Levin, et al. (2008). "Correlation between shiftase activity and HIV-1 integrase inhibition by a peptide selected from a combinatorial library." J Mol Biol **376**(4): 971-82.
- Artenstein, A. W., C. Johnson, et al. (2005). "A novel, cell culture-derived smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults." Vaccine **23**(25): 3301-9.
- Baines, I. C. and P. Colas (2006). "Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery." Drug Discov Today **11**(7-8): 334-41.
- Balzarini, J., C. Pannecouque, et al. (2004). "6-[2-phosphonomethoxy]alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines: a new class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates with antiviral activity." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **23**(8-9): 1321-7.
- Bardou, C., C. Borie, et al. (2009). "Peptide aptamers for small molecule drug discovery." Methods Mol Biol **535**: 373-88.
- Bengali, Z., A. C. Townsley, et al. (2009). "Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry." Virology **389**(1-2): 132-40.
- Berche, P. (2001). "The threat of smallpox and bioterrorism." Trends Microbiol **9**(1): 15-8.
- Bickle, M. B., E. Dusserre, et al. (2006). "Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures." Nat Protoc **1**(3): 1066-91.
- Blasco, R. and B. Moss (1991). "Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein." J Virol **65**(11): 5910-20.
- Blasco, R. and B. Moss (1992). "Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread." J Virol **66**(7): 4170-9.
- Blum, J. H., S. L. Dove, et al. (2000). "Isolation of peptide aptamers that inhibit intracellular processes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2241-6.
- Boyle, K. A., L. Arps, et al. (2007). "Biochemical and genetic analysis of the vaccinia virus d5 protein: Multimerization-dependent ATPase activity is required to support viral DNA replication." J Virol **81**(2): 844-59.
- Bray, M., M. Martinez, et al. (2002). "Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized cidofovir." Antiviral Res **54**(3): 129-42.
- Bray, M., M. Martinez, et al. (2000). "Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge." J Infect Dis **181**(1): 10-9.
- Brent, R. and M. Ptashne (1985). "A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor." Cell **43**(3 Pt 2): 729-36.
- Buerger, C., K. Nagel-Wolfrum, et al. (2003). "Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells." J Biol Chem **278**(39): 37610-21.
- Buller, R. M., G. Owens, et al. (2004). "Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model." Virology **318**(2): 474-81.

-
-
- Butz, K., C. Denk, et al. (2001). "Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity." *Oncogene* **20**(45): 6579-86.
- Butz, K., C. Denk, et al. (2000). "Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6693-7.
- Byrd, C. M., T. C. Bolken, et al. (2004). "New class of orthopoxvirus antiviral drugs that block viral maturation." *J Virol* **78**(22): 12147-56.
- Byrd, C. M. and D. E. Hruby (2005). "Development of an in vitro cleavage assay system to examine vaccinia virus I7L cysteine proteinase activity." *Virology* **2**(1): 63.
- Challberg, M. D. and P. T. Englund (1979). "The effect of template secondary structure on vaccinia DNA polymerase." *J Biol Chem* **254**(16): 7820-6.
- Chantrey, J., H. Meyer, et al. (1999). "Cowpox: reservoir hosts and geographic range." *Epidemiol Infect* **122**(3): 455-60.
- Chung, C. S., J. C. Hsiao, et al. (1998). "A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate." *J Virol* **72**(2): 1577-85.
- Ciesla, S. L., J. Trahan, et al. (2003). "Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney." *Antiviral Res* **59**(3): 163-71.
- Colas, P. (2000). "Combinatorial protein reagents to manipulate protein function." *Curr Opin Chem Biol* **4**(1): 54-9.
- Colas, P. (2008). "High-throughput screening assays to discover small-molecule inhibitors of protein interactions." *Curr Drug Discov Technol* **5**(3): 190-9.
- Colas, P., B. Cohen, et al. (1996). "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2." *Nature* **380**(6574): 548-50.
- Colas, P., B. Cohen, et al. (2000). "Targeted modification and transportation of cellular proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13720-5.
- Cono, J., C. G. Casey, et al. (2003). "Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians." *MMWR Recomm Rep* **52**(RR-4): 1-28.
- Crance, J. M., D. Lamarque, et al. (2002). "Variole : la menace fantôme." *Médecine et armées* **30**(5): 495-502.
- Damaso, C. R., J. J. Esposito, et al. (2000). "An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine." *Virology* **277**(2): 439-49.
- De Clercq, E. (2002). "Cidofovir in the treatment of poxvirus infections." *Antiviral Res* **55**(1): 1-13.
- De Clercq, E. (2003). "Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections." *Clin Microbiol Rev* **16**(4): 569-96.
- De Clercq, E. (2007). "The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: Historical perspective." *Antiviral Res* **75**(1): 1-13.
- De Clercq, E. (2007). "Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: The phosphonate bridge." *Biochem Pharmacol* **73**(7): 911-22.
- De Clercq, E., A. Holy, et al. (1986). "A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent." *Nature* **323**(6087): 464-7.
- De Silva, F. S., W. Lewis, et al. (2007). "Poxvirus DNA primase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18724-9.
- De Silva, F. S. and B. Moss (2003). "Vaccinia virus uracil DNA glycosylase has an essential role in DNA synthesis that is independent of its glycosylase activity: catalytic site

- mutations reduce virulence but not virus replication in cultured cells." *J Virol* **77**(1): 159-66.
- Deng, L., P. Dai, et al. (2007). "Identification of novel antipoxviral agents: Mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly." *J Virol*.
- Di Giulio, D. B. and P. B. Eckburg (2004). "Human monkeypox." *Lancet Infect Dis* **4**(4): 199.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" *Curr Opin Biotechnol* **15**(6): 506-12.
- Dubochet, J., M. Adrian, et al. (1994). "Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy." *J Virol* **68**(3): 1935-41.
- Duraffour, S., R. Snoeck, et al. (2007). "Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures." *Antivir Ther* **12**(8): 1205-16.
- Earl, P. L., E. V. Jones, et al. (1986). "Homology between DNA polymerases of poxviruses, herpesviruses, and adenoviruses: nucleotide sequence of the vaccinia virus DNA polymerase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 3659-63.
- Esposito, J. J. and F. Fenner (2001). Chapter 85: Poxviruses. *Fields Virology Fourth Edition*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2885-2921.
- Evans, D., S. Johnson, et al. (2008). "Electrical protein detection in cell lysates using high-density peptide-aptamer microarrays." *J Biol* **7**(1): 3.
- Evans, E., N. Klemperer, et al. (1995). "The vaccinia virus D5 protein, which is required for DNA replication, is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase." *J Virol* **69**(9): 5353-61.
- Evans, E. and P. Traktman (1992). "Characterization of vaccinia virus DNA replication mutants with lesions in the D5 gene." *Chromosoma* **102**(1 Suppl): S72-82.
- Fabbrizio, E., L. Le Cam, et al. (1999). "Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity." *Oncogene* **18**(30): 4357-63.
- Fenner, F. (1980). "The global eradication of smallpox." *Med J Aust* **1**(10): 455-5.
- Fenner, F., D. A. Henderson, et al. (1988). *Smallpox and its eradication*. Geneva, WHO.
- Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, et al. (2007). "Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate." *Vaccine* **25**(49): 8290-7.
- Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, et al. (2008). "Short- and long-term immunogenicity and protection induced by non-replicating smallpox vaccine candidates in mice and comparison with the traditional 1st generation vaccine." *Vaccine* **26**(14): 1794-804.
- Ferrier, A., D. Garin, et al. (2004). "Rapid inactivation of vaccinia virus in suspension and dried on surfaces." *J Hosp Infect* **57**(1): 73-9.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-6.
- Fine, P. E., Z. Jezek, et al. (1988). "The transmission potential of monkeypox virus in human populations." *Int J Epidemiol* **17**(3): 643-50.
- Foster, S. O., E. W. Brink, et al. (1972). "Human monkeypox." *Bull World Health Organ* **46**(5): 569-76.
- Geddes, A. M. (2006). "The history of smallpox." *Clin Dermatol* **24**(3): 152-7.
- Geerinck, K., G. Lukito, et al. (2001). "A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream." *J Med Virol* **64**(4): 543-9.
- Geyer, C. R. and R. Brent (2000). "Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries." *Methods Enzymol* **328**: 171-208.

-
- Greenberg, R. N., J. S. Kennedy, et al. (2005). "Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomised controlled trial." Lancet **365**(9457): 398-409.
- Gubser, C., S. Hue, et al. (2004). "Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis." J Gen Virol **85**(Pt 1): 105-17.
- Guida, E., A. Bisso, et al. (2008). "Peptide aptamers targeting mutant p53 induce apoptosis in tumor cells." Cancer Res **68**(16): 6550-8.
- Hazel, S. M., M. Bennett, et al. (2000). "A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents." Epidemiol Infect **124**(3): 551-62.
- Hooper, J. W., D. M. Custer, et al. (2003). "Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates." Virology **306**(1): 181-95.
- Hoppe-Seyler, F., I. Crnkovic-Mertens, et al. (2004). "Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function." Curr Mol Med **4**(5): 529-38.
- Hutin, Y. J., R. J. Williams, et al. (2001). "Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997." Emerg Infect Dis **7**(3): 434-8.
- Ibarra, V., J. R. Blanco, et al. (2000). "Efficacy of cidofovir in the treatment of recalcitrant molluscum contagiosum in an AIDS patient." Acta Derm Venereol **80**(4): 315-6.
- Ishii, K. and B. Moss (2001). "Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: construction and characterization of temperature-sensitive mutants." J Virol **75**(4): 1656-63.
- Ishii, K. and B. Moss (2002). "Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex." Virology **303**(2): 232-9.
- Ishii, K. and B. Moss (2002). "Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex." Virology **303**(2): 232-9.
- Jezeq, Z., B. Grab, et al. (1988). "Human monkeypox: disease pattern, incidence and attack rates in a rural area of northern Zaire." Trop Geogr Med **40**(2): 73-83.
- Jezeq, Z., B. Grab, et al. (1988). "Human monkeypox: secondary attack rates." Bull World Health Organ **66**(4): 465-70.
- Jordan, R., D. Tien, et al. (2008). "Single-Dose Safety and Pharmacokinetics of ST-246, a novel orthopoxvirus egress inhibitor." Antimicrob Agents Chemother.
- Kenner, J., F. Cameron, et al. (2006). "LC16m8: An attenuated smallpox vaccine." Vaccine.
- Kern, E. R., C. Hartline, et al. (2002). "Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 991-5.
- Klemperer, N., W. McDonald, et al. (2001). "The A20R protein is a stoichiometric component of the processive form of vaccinia virus DNA polymerase." J Virol **75**(24): 12298-307.
- Kolonin, M. G. and R. L. Finley, Jr. (1998). "Targeting cyclin-dependent kinases in *Drosophila* with peptide aptamers." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14266-71.
- Kolonin, M. G. and R. L. Finley, Jr. (2000). "A role for cyclin J in the rapid nuclear division cycles of early *Drosophila* embryogenesis." Dev Biol **227**(2): 661-72.
- Kolonin, M. G., J. Zhong, et al. (2000). "Interaction mating methods in two-hybrid systems." Methods Enzymol **328**: 26-46.
- Kornbluth, R. S., D. F. Smee, et al. (2006). "Mutations in the E9L polymerase gene of cidofovir-resistant vaccinia virus strain WR are associated with the drug resistance phenotype." Antimicrob Agents Chemother **50**(12): 4038-43.
- Krecmerova, M., A. Holy, et al. (2007). "Antiviral activity of triazine analogues of 1-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine (cidofovir) and related compounds." J Med Chem **50**(5): 1069-77.

-
-
- Kretzschmar, M., J. Wallinga, et al. (2006). "Frequency of Adverse Events after Vaccination with Different Vaccinia Strains." *PLoS Med* **3**(8).
- Lacy, S. A., M. J. Hitchcock, et al. (1998). "Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys." *Toxicol Sci* **44**(2): 97-106.
- Lalezari, J. P. and B. D. Kuppermann (1997). "Clinical experience with cidofovir in the treatment of cytomegalovirus retinitis." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **14 Suppl 1**: S27-31.
- Lane, J. M., F. L. Ruben, et al. (1969). "Complications of smallpox vaccination, 1968." *N Engl J Med* **281**(22): 1201-8.
- LaVallie, E. R., E. A. DiBlasio, et al. (1993). "A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm." *Biotechnology (N Y)* **11**(2): 187-93.
- Lopez-Ochoa, L., J. Ramirez-Prado, et al. (2006). "Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells." *J Virol* **80**(12): 5841-53.
- Loregian, A. and D. M. Coen (2006). "Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase." *Chem Biol* **13**(2): 191-200.
- Loregian, A., H. S. Marsden, et al. (2002). "Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy." *Rev Med Virol* **12**(4): 239-62.
- Loregian, A. and G. Palu (2005). "Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy." *J Cell Physiol* **204**(3): 750-62.
- Lu, Z., E. R. LaVallie, et al. (2003). "Using bio-panning of FLITRX peptide libraries displayed on E. coli cell surface to study protein-protein interactions." *Methods Mol Biol* **205**: 267-80.
- Magee, W. C., K. Y. Hostetler, et al. (2005). "Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(8): 3153-62.
- Mahy, B. W. (2003). "An overview on the use of a viral pathogen as a bioterrorism agent: why smallpox?" *Antiviral Res* **57**(1-2): 1-5.
- McCraith, S., T. Holtzman, et al. (2000). "Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4879-84.
- McCraith, S., T. Holtzman, et al. (2000). "Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4879-84.
- McDonald, W. F. and P. Traktman (1994). "Overexpression and purification of the vaccinia virus DNA polymerase." *Protein Expr Purif* **5**(4): 409-21.
- McDonald, W. F. and P. Traktman (1994). "Vaccinia virus DNA polymerase. In vitro analysis of parameters affecting processivity." *J Biol Chem* **269**(49): 31190-7.
- McLysaght, A., P. F. Baldi, et al. (2003). "Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15655-60.
- Meadows, K. P., S. K. Tyring, et al. (1997). "Resolution of recalcitrant molluscum contagiosum virus lesions in human immunodeficiency virus-infected patients treated with cidofovir." *Arch Dermatol* **133**(8): 987-90.
- Millns, A. K., M. S. Carpenter, et al. (1994). "The vaccinia virus-encoded uracil DNA glycosylase has an essential role in viral DNA replication." *Virology* **198**(2): 504-13.
- Moss, B. (2001). Chapter 84: Poxviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology Fourth Edition*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2849-2883.

-
- Moss, B. (2007). Chapter 74: Poxviridae: The viruses and their replication. Fields Virology Fourth Edition. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2905-2946.
- Moss, B. (2007). Poxviridae: The viruses and Their Replication. Fields Virology D. M. Knipe, and P.M. Howley. Philadelphia, Lippincott, Williams, & Wilkins. **2**: 2905-2945.
- Nagel-Wolfrum, K., C. Buerger, et al. (2004). "The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells." Mol Cancer Res **2**(3): 170-82.
- Nauenburg, S., W. Zwerschke, et al. (2001). "Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein." Faseb J **15**(3): 592-4.
- Neyts, J. and E. De Clercq (1993). "Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine for the treatment of lethal vaccinia virus infections in severe combined immune deficiency (SCID) mice." J Med Virol **41**(3): 242-6.
- Neyts, J., E. Verbeke, et al. (2002). "Effect of 5-iodo-2'-deoxyuridine on vaccinia virus (orthopoxvirus) infections in mice." Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 2842-7.
- Nieuwenhuisen, B. W., Y. Huang, et al. (2003). "A dual luciferase multiplexed high-throughput screening platform for protein-protein interactions." J Biomol Screen **8**(6): 676-84.
- Norman, T. C., D. L. Smith, et al. (1999). "Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways." Science **285**(5427): 591-5.
- Nouvion, A. L., J. Thibaut, et al. (2007). "Modulation of Nr-13 antideath activity by peptide aptamers." Oncogene **26**(5): 701-10.
- Parker, S., E. Touchette, et al. (2008). "Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model." Antiviral Res **77**(1): 39-49.
- Payne, L. G. (1980). "Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia." J Gen Virol **50**(1): 89-100.
- Phelps, A. L., A. J. Gates, et al. (2007). "Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine." Vaccine **25**(1): 34-42.
- Pilger, B. D., C. Cui, et al. (2004). "Identification of a small molecule that inhibits herpes simplex virus DNA Polymerase subunit interactions and viral replication." Chem Biol **11**(5): 647-54.
- Proske, D., S. Gilch, et al. (2002). "Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation." Chembiochem **3**(8): 717-25.
- Punjabi, A., K. Boyle, et al. (2001). "Clustered charge-to-alanine mutagenesis of the vaccinia virus A20 gene: temperature-sensitive mutants have a DNA-minus phenotype and are defective in the production of processive DNA polymerase activity." J Virol **75**(24): 12308-18.
- Quenelle, D. C., R. M. Buller, et al. (2007). "Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice." Antimicrob Agents Chemother **51**(2): 689-95.
- Real, E., J. C. Rain, et al. (2004). "Antiviral drug discovery strategy using combinatorial libraries of structurally constrained peptides." J Virol **78**(14): 7410-7.
- Reeves, P. M., B. Bommarius, et al. (2005). "Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases." Nat Med **11**(7): 731-9.

-
-
- Scaramozzino, N., A. Ferrier-Rembert, et al. (2007). "Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses." Clin Chem **53**(4): 606-13.
- Schmidt, S., S. Diriong, et al. (2002). "Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio." FEBS Lett **523**(1-3): 35-42.
- Sherman, I. W. (2008). "Twelve diseases that changed our world." Emerg Infect Dis **14**(5): 866.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2000). "Treatment of cowpox virus respiratory infections in mice with ribavirin as a single agent or followed sequentially by cidofovir." Antivir Chem Chemother **11**(4): 303-9.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2001). "Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir." Antivir Chem Chemother **12**(1): 71-6.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2002). "Treatment of lethal cowpox virus respiratory infections in mice with 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]purine and its orally active diacetate ester prodrug." Antiviral Res **54**(2): 113-20.
- Smee, D. F., K. W. Bailey, et al. (2001). "Effects of cidofovir on the pathogenesis of a lethal vaccinia virus respiratory infection in mice." Antiviral Res **52**(1): 55-62.
- Smee, D. F., B. L. Hurst, et al. (2007). "Efficacy of N-methanocarbothymidine in treating mice infected intranasally with the IHD and WR strains of vaccinia virus." Antiviral Res **76**(2): 124-9.
- Smith, G. L., A. Vanderplasschen, et al. (2002). "The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus." J Gen Virol **83**(Pt 12): 2915-31.
- Stanitsa, E. S., L. Arps, et al. (2006). "Vaccinia virus uracil DNA glycosylase interacts with the A20 protein to form a heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase." J Biol Chem **281**(6): 3439-51.
- Stittelaar, K. J., J. Neyts, et al. (2006). "Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection." Nature **439**(7077): 745-8.
- Takahashi-Nishimaki, F., K. Suzuki, et al. (1987). "Genetic analysis of vaccinia virus Lister strain and its attenuated mutant LC16m8: production of intermediate variants by homologous recombination." J Gen Virol **68**(Pt 10): 2705-10.
- Vestey, J. P., D. L. Yirrell, et al. (1991). "What is human catpox/cowpox infection?" Int J Dermatol **30**(10): 696-8.
- Vichniakov, V. E. (1968). "A study of immunity to smallpox in persons who have experienced a previous attack." Bull World Health Organ **39**(3): 433-7.
- WHO (1999). "Smallpox eradication. Destruction of variola virus stocks." Wkly Epidemiol Rec **74**(24): 188-91.
- Wittek, R. (2006). "Vaccinia immune globulin: current policies, preparedness, and product safety and efficacy." Int J Infect Dis **10**(3): 193-201.
- Woodman, R., J. T. Yeh, et al. (2005). "Design and validation of a neutral protein scaffold for the presentation of peptide aptamers." J Mol Biol **352**(5): 1118-33.
- Xu, C. W. and Z. Luo (2002). "Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers." Oncogene **21**(37): 5753-7.
- Xu, C. W., A. R. Mendelsohn, et al. (1997). "Cells that register logical relationships among proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12473-8.
- Yang, G., D. C. Pevear, et al. (2005). "An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge." J Virol **79**(20): 13139-49.
- Yang, H., S. K. Kim, et al. (2005). "Antiviral chemotherapy facilitates control of poxvirus infections through inhibition of cellular signal transduction." J Clin Invest **115**(2): 379-87.