



HAL
open science

Criblage d'inhibiteurs de l'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4: une cible antivirale à large spectre

Sisley Austin

► To cite this version:

Sisley Austin. Criblage d'inhibiteurs de l'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4: une cible antivirale à large spectre. Immunologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0340 . tel-01675983v2

HAL Id: tel-01675983

<https://theses.hal.science/tel-01675983v2>

Submitted on 24 Jan 2018

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
SPECIALITE : MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Sisley AUSTIN

**Criblage d'inhibiteurs de l'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4 :
une cible antivirale à large spectre**

Sous la direction du Dr Fabienne RAYNE

Soutenue le 04 décembre 2015

Membres du jury :

| | | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| M. NOEL, Thierry | Professeur à l'Université de Bordeaux | Président |
| M. COUX, Olivier | Directeur de recherche à l'Université de Montpellier | Rapporteur |
| M. CHEVET, Eric | Directeur de recherche à l'Université de Rennes | Rapporteur |
| M. WODRICH, Harald | Chercheur à l'Université de Bordeaux | Examineur |
| Mme GUILLOT-COMBE, Emmanuelle | Responsable domaine biologie à la DGA | Examineur |
| M. TAOUJI, Saïd | Docteur en biologie à l'institut Bergonier | Invité |
| Mme. RAYNE, Fabienne, | Maitre de conférences à l'Université de Bordeaux | Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Fabienne Rayne, mon directeur de thèse, mon mentor. Merci pour ta bonne humeur, ta patience, ta gentillesse, ton écoute et ta disponibilité. Merci pour toutes nos discussions et tous ces bons moments. Je retiendrai de ton enseignement la qualité et la rigueur du travail bien fait. Je te remercie Chef de m'avoir formée, d'avoir veillé sur moi (en mode « pit-bull »), de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse et de sa rédaction (malgré les fautes d'orthographes). Je tiens à te dire qu'en plus d'être un bon enseignant et un très bon chercheur, tu es le directeur de thèse idéal! Je commence ma vie professionnelle avec la méthodologie et tous les outils requis et un bon modèle à suivre.

Je tiens également à remercier le Dr Harald Wodrich, le directeur de l'équipe, mon co-directeur de thèse et mon « Lab papa ». Merci de m'avoir permis de faire mon stage de Master 2 puis ma thèse dans ton équipe et ainsi de découvrir un métier passionnant. Merci Harry pour toutes nos discussions, ton écoute, ta considération et ton respect qui m'ont donné confiance en moi. Merci pour ta façon de diriger cette équipe et les étudiants que tu accueilles en étant toujours disponible et attentionné. Merci de m'avoir fait participer à des conférences en Allemagne et au Japon, tu n'imagines pas à quel point cela m'a fait grandir. Merci aussi de m'avoir permis d'améliorer mon anglais. Grâce à vous deux et à cette expérience, je continue mon parcours avec envie et je vous serai toujours reconnaissante.

Je voudrais remercier le Professeur Thierry Noel. D'abord, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse mais aussi d'avoir accepté mon dossier pour intégrer le Master Microbio il y a cinq ans. C'est grâce à toi que cette histoire a commencé et que j'écris aujourd'hui ma thèse. Merci pour ton écoute et tes conseils professionnels.

Je souhaiterais remercier les Dr Eric Chevet et Said Taouji pour avoir accepté de faire partie de ce jury mais aussi pour leur aide lors de la mise en place de l'AlphaScreen, pour toutes nos discussions et leurs conseils.

Je remercie aussi le Dr Olivier Coux pour avoir accepté de faire partie de mon jury de demi-thèse et de thèse. Ses remarques et ses conseils m'ont été très utiles.

Je voudrais adresser mes remerciements à la DGA et à ma tutrice Emmanuelle Guillot-Combe pour m'avoir donné l'opportunité de pouvoir réaliser cette thèse et d'entrevoir le milieu de la défense.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « Adéno », à commencer par Charlotte Montespan. Merci mon petit pigeon, ces années n'auraient pas été aussi géniales sans toi et j'aurais souhaité t'emmener dans ma valise en post-doc ! Plus qu'une simple collègue c'est une véritable amie que j'ai découverte dans ce laboratoire. Merci pour ta bonne humeur, ton caractère bien trempé, ton optimisme, ta fidélité, ta patience devant mes psychoses microbiennes, merci de m'avoir écouté et soutenue pendant toute cette thèse, merci pour toutes nos courses à pied effrénées (ou presque) sur le bord des quais. Merci du fond du cœur.

Merci à Irène Carlon et Noémie Pied pour leur bonne humeur et parce qu'elles ont fait en sorte que la supériorité féminine perdure dans les rangs des doctorants du labo.

Merci à celles qui font que tout est plus facile pour nos manips : merci Muriel pour tous ces repas animés et les corrections de mon Mat&Meth, merci Jess pour ta bonne humeur et ton professionnalisme et merci Cindy pour ces heures passées au confocal afin de permettre la réalisation de notre article.

Je souhaite aussi remercier Marie-Edith Lafon pour sa gentillesse, Benoit Roger pour ses conseils, Tetsuro Komatsu pour sa participation à l'article et aussi Arnaud, Valérie, Kati, Farida et les anciens Quentin, Ruben et Rémi.

Je tiens à remercier toute l'équipe « HBV/Parvo ». Tout d'abord, Michael Kann, le directeur de cette unité, pour m'avoir permis d'assister à cette conférence au Japon qui m'a donné envie de voyager tous les jours. Merci à Christian Cazenave pour sa gentillesse et aux nouvelles venues, Lara et Marie-Lise. Merci à toi, Kenza Snoussi. Nous nous sommes rencontrées en Master et notre intérêt pour les virus a fait qu'aujourd'hui nous sommes des amies que 10 000 km n'ont pas séparé. J'ai découvert en toi une personne ambitieuse, d'une force morale à toute épreuve et d'une générosité sans limite, merci pour ton soutien.

Je souhaiterais remercier tous mes amis de promo, à commencer par Julia Guegueniat. Merci pour tout ! Merci pour ces gâteaux et ces friandises qui n'ont eu de cesse de rassasier mon estomac de « miam-miam ». Merci pour ta générosité et ton soutien ! Un grand merci à Chloé Jaubert, pour sa bonne humeur, son originalité, toutes nos discussions et ces bons moments passés.

Je remercie toutes les équipes du REGER. Je tiens à remercier le Dr Vincent Parissi pour m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 1 sur le VIH et confirmer mon intérêt pour la virologie. Merci aussi à Michel Ventura pour toutes nos conversations et un grand merci à Cyril Massante, le Marty MacFly du labo, toujours de bonne humeur et toujours prêt à rendre service même lorsqu'il s'agit de m'aider à enlever les virus informatiques que j'installe sur l'ordi de ma chef... que veux-tu, j'adore la Viro!

Merci aussi à toutes les équipes de PARASITO, aux trois nico et Julien pour leur esprit sportif à « l'ultimate » et à Anna pour l'organisation des « Beer-meeting ».

Je remercie sincèrement tous mes amis. Merci à mes amies de toujours pour lesquelles une page ne suffirait pas. Merci à Lucile, nos chemins se sont croisés au collège et ne se sont plus jamais séparés. Merci à Aline ma « grande sœur » et Maria « la clef », les deux « MousCLetaires » de notre trio qui dure depuis plus de 10 ans. Un grand merci à tous mes amis de Master et de Licence ainsi qu'à tous ceux de la promo de dentaire sans qui toutes ces années n'auraient pas été si agréables. Merci !

Enfin je tiens à remercier ma famille. Tout d'abord ma maman, merci pour tout ton amour, merci de m'avoir soutenue, consolée et félicitée et pour ton aide dans la correction de cette thèse. Je souhaite remercier ma sœur, merci pour ton soutien et ta présence depuis toujours. J'ai aussi une pensée pour Abdel et son soutien. Un grand merci à mon frère, pour nos discussions scientifiques, son soutien et d'être si génial !

Je souhaite remercier Mireille et Louis pour leur soutien, leur affection et pour m'avoir accueillie sur Bordeaux.

Enfin, merci à toi Guillaume pour ton amour, ta joie de vivre, ta patience et ton soutien indéfectibles, merci d'avoir cru en moi.

Virus : « a little piece of bad news
wrapped in a protein »
(*Sir Peter Medawar, 1983*)

TABLE DES MATIERES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABREVIATIONS | 15 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 19 |
| Tableaux | 19 |
| Figures | 20 |
| Annexes | 21 |
| INTRODUCTION | 23 |
| Chapitre 1 : Les stratégies antivirales | 23 |
| 1. Les vaccins antiviraux « classiques »..... | 23 |
| 2. La thérapie génique antivirale | 25 |
| 3. La sérothérapie | 27 |
| 4. Les interférons et protéines associées | 27 |
| 5. Les composés antiviraux (ou chimiothérapie antivirale) | 30 |
| 6. Antiviraux à large spectre : une nécessité | 34 |
| Chapitre 2 : Les « late domains », un motif commun aux virus..... | 35 |
| 1. Les « late domains » viraux..... | 35 |
| 2. Interchangeabilité des « late domains » | 37 |
| 3. Le recrutement des protéines cellulaires nécessaires au bourgeonnement | 38 |
| 4. L'implication des « late domains » dans d'autres étapes | 44 |
| Chapitre 3 : L'interaction protéine VI virale/Nedd4 chez les Adénovirus..... | 49 |
| 1. Les adénovirus : historique et classification | 49 |
| 2. Généralités..... | 49 |
| 3. La protéine VI des adénovirus possède un « late domain »..... | 53 |
| 4. L'interaction protéine VI/Nedd4 : la clef de l'entrée des AdV | 57 |
| 5. La fonction « précoce » du « late domain » des AdV | 63 |
| Chapitre 4 : Les ubiquitine ligases E3 de la famille Nedd4 | 65 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. L'ubiquitylation..... | 65 |
| 2. Les ubiquitine ligases Nedd4 : une famille d'E3 de type HECT | 70 |
| 3. Fonctions cellulaires des Nedd4..... | 71 |
| 4. Les Nedd4 et les virus : des IPP virus/hôte communes..... | 72 |
| 5. L'interaction motif PPxY/Nedd4 : une cible antivirale à large spectre | 74 |
| Chapitre 5 : Les HTS biochimiques et la découverte de nouveaux antiviraux..... | 75 |
| 1. Le criblage à haut débit (HTS)..... | 75 |
| 2. Les techniques d'HTS biochimiques..... | 77 |
| 3. Les autres méthodes d'HTS | 82 |
| 4. Les techniques d'HTS et le développement d'antiviraux à large spectre | 84 |
| Les objectifs de la thèse..... | 87 |
| MATERIEL ET METHODES..... | 89 |
| Chapitre 1 : Purification des protéines..... | 89 |
| 1. Purification des His-Protéines VI sauvage et mutante M1..... | 89 |
| 2. Purification de la protéine GST-Nedd4-2 | 91 |
| 3. Quantification des protéines par dosage de Bradford | 92 |
| 4. Détection des protéines par Western-blot | 93 |
| 5. Détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie..... | 94 |
| 6. Test d'ubiquitylation <i>in vitro</i> | 95 |
| Chapitre 2 : Criblage d'inhibiteurs de l'interaction His-VI-wt/GST-Nedd4-2 en AlphaScreen® | 97 |
| 1. Test d'interaction His-VI-wt /GST-Nedd4-2 par AlphaScreen® | 97 |
| 2. Criblage d'inhibiteurs de l'IPP Protéine VI/Nedd4-2 par AlphaScreen® | 97 |
| 3. Elimination des inhibiteurs « faux-positifs » TruHit® test..... | 98 |
| 4. Calcul du facteur Z' | 98 |
| Chapitre 3 : Culture cellulaire..... | 99 |
| Chapitre 4 : Caractérisation des composés inhibiteurs identifiés en AlphaScreen® | 101 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Détermination de l'IC ₅₀ des composés en AlphaScreen® | 101 |
| 2. Test de cytotoxicité des composés dans les lignées cellulaires..... | 101 |
| Chapitre 5 : Purification des virus et vecteurs adénoviraux | 103 |
| 1. Les virus et les vecteurs | 103 |
| 2. Amplification des virus et vecteurs | 103 |
| 3. Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium | 103 |
| 4. Marquage des virus et vecteurs purifiés | 104 |
| 5. Quantification des virus et vecteurs purifiés | 104 |
| Chapitre 6 : Expériences d'immunofluorescence | 107 |
| 1. Transfection de protéines fusionnées à eGFP/mRFP | 107 |
| 2. Infection | 107 |
| 3. Immunofluorescence | 108 |
| 4. Microscopie et analyse des images | 109 |
| Chapitre 7 : Transduction de vecteurs | 111 |
| 1. Test d'infection par quantification des cellules fluorescentes par FACS | 111 |
| 2. Test d'infection par dénombrement et mesure des plages fluorescentes | 111 |
| Chapitre 8 : Tests de réplication | 113 |
| 1. Quantification du nombre de copies de génome AdV par qPCR..... | 113 |
| 2. Quantification relative des ARN viraux et cellulaires par RT-qPCR | 113 |
| 3. Test de réplication par dénombrement des plages de lyse | 116 |
| Chapitre 9 : Analyse de la libération des pseudoparticules de Filovirus | 117 |
| 1. Transfection de la protéine de capsid VP40 | 117 |
| 2. Concentration des pseudoparticules virales (VLP) | 117 |
| 3. Quantification des pseudoparticules virales sécrétées | 118 |
| Chapitre 10 : Analyse de séquences et génération de motifs MEME..... | 119 |
| 1. Répertoire des protéines virales contenant des motifs [LP]PxY | 119 |
| 2. Génération de motif MEME..... | 120 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| RESULTATS | 121 |
| Chapitre 1 : Motif [LP]PxY/Domaine WW, une interaction virus/hôte commune | 121 |
| 1. Les protéines à motif [LP]PxY chez les virus humains | 121 |
| 2. Etude des fonctions des protéines virales à motif [LP]PxY | 127 |
| 3. Recherche de résidus conservés autour du motif [LP]PxY | 129 |
| 4. Conclusion..... | 131 |
| Chapitre 2 : Criblage d'inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 | 133 |
| 1. Purification des partenaires : protéines His-VI-wt et GST-Nedd4-2 | 133 |
| 1. Test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i> en AlphaScreen® | 137 |
| 2. Criblage de la banque « Prestwick Chemical »..... | 141 |
| 3. Caractérisation des composés : IC ₅₀ <i>in vitro</i> , structure et cytotoxicité | 144 |
| 4. Conclusion..... | 147 |
| Chapitre 3 : Effets des inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 sur la réplication des AdV | 149 |
| 1. Effet des composés sur la propagation des adénovirus | 149 |
| 2. Effets des composés sur production de particules adénovirale | 151 |
| 3. Conclusion..... | 153 |
| Chapitre 4 : Caractérisation de l'action des composés sur les étapes d'entrée de l'AdV | 155 |
| 1. Effets des composés sur l'infectiosité des AdV | 155 |
| 2. Effets des composés sur l'entrée des virus dans la cellule..... | 158 |
| 3. Effets des composés sur la libération du génome viral dans le noyau | 160 |
| 4. Effets des composés sur l'expression des gènes adénoviraux précoces..... | 162 |
| 5. Effet des composés sur l'échappement endosomal | 164 |
| 6. Conclusion..... | 166 |
| Chapitre 5 : Effets des composés sur les <i>Filoviridae</i> : une famille de virus à ARN enveloppés | 171 |
| 1. Effets des composés sur la libération de pseudoparticules de filovirus | 171 |

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2. | Effet des composés sur la réplication du virus de Marburg | 175 |
| 3. | Conclusion..... | 177 |
| Chapitre 6 : Effets des analogues du composé C9 sur la réplication des AdV..... | | 179 |
| 1. | Les antifongiques de la banque « Prestwick Chemical »..... | 179 |
| 2. | Synthèse et caractérisation des molécules analogues au sulconazole | 182 |
| 3. | Effets des analogues du sulconazole sur l'infection adénovirale..... | 182 |
| 4. | Conclusion..... | 188 |
| CONCLUSION GENERALE | | 191 |
| DISCUSSION..... | | 195 |
| Chapitre 1 : Les antiviraux du futur..... | | 195 |
| 1. | Les antiviraux ciblant les interactions virus/hôte | 195 |
| 2. | La combinaison des techniques d'HTS | 196 |
| Chapitre 2 : Les dérivés imidazolés, une nouvelle classe d'antiviraux à large spectre ? | | 199 |
| 1. | L'effet des dérivés imidazolés sur les virus | 199 |
| 2. | Les composés azolés : une classe d'antifongiques..... | 200 |
| 3. | Les dérivés imidazolés : le remède miracle ?..... | 200 |
| 4. | Les mécanismes d'action des dérivés imidazolés | 202 |
| 5. | Le cholestérol et les virus..... | 203 |
| 6. | Hypothèse sur le mécanisme d'action du Sulconazole sur les virus | 204 |
| Chapitre 3 : Le calcium, une cible cellulaire pour un antivirale à large spectre..... | | 207 |
| 1. | La Flunarizine : un antimigraineux, inhibiteur des canaux calciques | 207 |
| 2. | La Nedd4-2 et le calcium | 207 |
| 3. | Les virus et le calcium..... | 208 |
| 4. | Le repositionnement des inhibiteurs de canaux Ca ²⁺ comme antiviraux | 209 |
| 5. | Hypothèse sur le mécanisme d'action du composé C4 sur l'AdV | 210 |
| Chapitre 4 : Caractérisation du rôle la Nedd4-2 dans la réplication des Adénovirus... | | 213 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1. Les composés C4 et C9 des outils de biologie cellulaire | 213 |
| 2. Hypothèses sur le rôle de la Nedd4-2 dans l'entrée | 214 |
| Chapitre 5 : Une nouvelle interaction motif [LP]PxY adénoviral/domaine WW | 219 |
| 1. BAG3 : une chaperonne cellulaire possédant un domaine WW | 219 |
| 2. Un facteur impliqué dans la régulation de nombreux virus | 219 |
| 3. BAG 3 interagit avec les motifs PPxY de l'AdV..... | 220 |
| 4. Quel serait l'effet des composés sur l'interaction protéine VI/BAG3 ? | 222 |
| 5. BAG3 : le chaînon manquant ? | 222 |
| REFERENCES | 225 |
| ANNEXES | 255 |
| PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS | 264 |
| Publications..... | 264 |
| Posters..... | 264 |
| Communications..... | 264 |

ABBREVIATIONS

- ABCG - G subfamily of ABC transporters
- ADNc - ADN complémentaire
- ADP - Death Adenoviral Protein
- allo-HSCT - allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
- AlphaScreen - Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen
- ALV - virus de la leucose aviaire
- ANSM - Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
- ARNm - ARN messagers
- ART - arrestin-related trafficking adaptors
- ATP - adénosine triphosphate
- BAG - Bcl2-associated athanogene
- Blastp - Basic Local Alignment Search Tool in protein
- BLV - virus de la leucémie bovine
- BRET - Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- BSA - bovin serum albumin
- BTV - Bluetongue virus
- CAR - Coxsackie Adenovirus Receptor
- CatL - cathepsine L
- Cav3 - canaux calciques voltages dépendant de type T 3
- CK - créatine kinase
- CMH-I - molécule d'histocompatibilité de classe I
- CP - créatine phosphate
- CRM1 - chromosome region maintenance 1
- CTT - chaperonin containing TCP-1
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DELFI A - Dissociation-Enhanced Lanthamine Fluorescent Assay
- DHODH - dihydro-orotique acide déshydrogénase
- DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium
- DO - densité optique
- DRACO - Double-stranded RNA (dsRNA) Activated Caspase Oligomerizer
- DSG-2 - desmoglécine-2

Dsl3 - Dishevelled 3
DUB - dé-ubiquitylases
EBV - virus d'Epstein Barr
ECL - ElectroChemiLuminescence
EIAV - virus de l'anémie infectieuse des équidés
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA - European Medicines Agency
ENaC - Epithelial sodium [Na] Channel
ERAD - endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ESCRT - Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA - Food and Drug Administration
FIV - virus de l'immunodéficience féline
FP - Fluorescence Polarization
FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP - Gene Fluorescent Protein
GST - glutathion S-transférase
HAdV - adénovirus humain
HECT - Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HEK293 - cellules d'épithélium rénal embryonique humain
His - étiquette poly-histidine
HLA - human leukocyte antigen
HPV – Human papillomavirus
HTLV-1- virus T-lymphotrope humain de type 1
HTRF - Homogenous Time Resolved Fluorescence
HTS - High-throughput screening
HUH-7 - cellules d'hépatocarcinome humain
IFIT - IFN-Induced proteins with Tetratricopeptide repeats protein
IFN - Interferon
IPP - interactions protéine/protéine
IPTG - isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
ISG - gènes induits par l'interféron
KCNQ - Potassium [K] Channel, Voltage-Gated, KQT-like subfamily
LAMP2A - latent membrane protein 2A

LCV - virus de la chorioméningite lymphocytaire
LFV - virus de la fièvre de Lassa
LOCI - Luminescent Oxygen Channeling Assay
LTC - lymphocytes T cytotoxiques
MCV - Polyomavirus de Merkel
MERS - Middle East Respiratory Syndrome
MLV - virus de la leucémie murine
MMTV - Mouse mammary tumor virus
MPMV - Mason-Pfizer Monkey virus
MST - Microscale thermophoresis
MTOC - microtubule-organizing center
MVB - Multi-vesicular bodies
M β CD - methyl- β -cyclodextrin
NA - neuraminidase
NaCl - chlorure de sodium
NCC - thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ Cotransporter
NDPK - nucléoside diphosphate kinases
Nedd4-2 - neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4-2
NES - Nuclear Export Sequence
NK - Natural-killer
NLS - Nuclear Localisation Sequence
NPC - pores nucléaire
Nup - nucléoporine
OAS – 2'-5' oligo-synthétases
PBS - tampon phosphate salin
PCR - polymerase chain reaction
PMSF - fluorure de phénylméthylsulfonyle
PRRSV - Porcine reproductive and respiratory syndrome virus -
qPCR - PCR quantitative
RING - Really Interesting New Gene
RSV - virus du sarcome de Rous
RT-PCR - Transcription inverse PCR
Ru - ruthenium
SDS - sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
SIV - virus de l'immunodéficience simien
SNX - sorting nexin
SPR - surface plasmon resonance
SV5 - parainfluenza simien de type 5
T-Ag - T-Antigène
TBS - Tris-Buffered Saline
TCP - two-pore channels
TLR - Toll-like receptor
TP - protéine terminal
TPA - triptopropylamine
TR-FRET - Time-Resolved FRET
TRPV6 - Transient receptor potential Vanilloid 6
U2OS - cellules d'ostéosarcome humain
Ub - ubiquitine
UBE1 - Ubiquitin Activating Enzyme human recombinant
UPS - Ubiquitin-Proteasome System
VCP - valosin-containing protein
VIH - virus de l'immunodéficience humaine
VLP - virus-like particles
VSV - virus de la stomatite vésiculaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Schémas

Schéma 1: La réponse antivirale des interférons de type 1

Schéma 2: Le détournement de la machinerie ESCRT par les virus

Schéma 3: Modèle des connections entre les « late domains » et les machineries d'ubiquitylation et ESCRT

Schéma 4: Structure de la capside des Adénovirus

Schéma 5: Le rôle de la protéine VI dans l'entrée des Adénovirus

Schéma 6: La réaction d'ubiquitylation

Schéma 7: Signalisation cellulaire associée aux différents types d'ubiquitylation

Schéma 8: Les techniques d'HTS biochimiques

Schéma 9: Représentation du test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 avec la technologie AlphaScreen

Schéma 10 : Schéma des effets des composés sur la réplication de l'AdV

Schéma 11: Rôle de l'interaction protéine VP40/Nedd4 dans le bourgeonnement des Filovirus.

Schéma 12: Effets des analogues du Sulconazole sur la réplication de l'AdV

Schéma 13: Inhibition de la synthèse des stérols par les dérivés imidazolés

Schéma 14: Hypothèse sur les effets du composé C9 sur l'entrée des AdV

Schéma 15: Hypothèse sur les effets du composé C4 sur la réplication des AdV

Schéma 16: Une des hypothèses sur le rôle de la Nedd4-2 dans l'entrée

Schéma 17: Modèle de l'implication de Nedd4-2, BAG3 et VCP/p97 dans l'entrée des AdV

Tableaux

Tableau 1: Les stratégies antivirales

Tableau 2: Les protéines virales interagissant avec les ubiquitine ligases de la famille Nedd4

Tableau 3: Liste des protéines virales possédants un motif [LP]PxY.

Tableau 4: Caractéristiques des composés

Tableau 5: Bilan des effets des composés sur les étapes de réplication des AdV.

Tableau 6: Structure chimique des composés

Tableau 7: Bilan des effets des analogues du Sulconazole sur les étapes précoces et la propagation des AdV.

Figures

Figure 1: Distribution des motifs [LP]PxY des protéines virales

Figure 2: Proportion des motifs [LP]PxY dans les protéomes viraux

Figure 3: Analyse des séquences autour des motifs [LP]PxY

Figure 4: Purification de la protéine His-VI-wt

Figure 5: Purification de la protéine GST-Nedd4-2

Figure 6 : Mise en place du test d'IPP protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen

Figure 7: Criblage de la banque "Prestwick Chemical" an AlphaScreen

Figure 8: Détermination des IC₅₀ des composés C1 à C9, du N4 et de l'imidazole

Figure 9: Détermination de la cytotoxicité des composés

Figure 10: Effets des composés sur la propagation de l'AdV

Figure 11: Effet des composés sur la production de particules d'AdV

Figure 12: Tests de transduction des AdV en présence des composés

Figure 13: Variation des lignées cellulaires lors du test des effets des composés sur la transduction des AdV

Figure 14: Effet des composés sur l'endocytose des AdV.

Figure 15: Effet des composés sur l'import nucléaire du génome de l'AdV

Figure 16: Effet des composés sur l'expression des gènes viraux précoces

Figure 17: Effet des composés C4 et C9 sur l'échappement endosomal des AdV

Figure 18: Effet des composés sur la libération des pseudoparticules (VLP) de VP40

Figure 19: Effet des composés sur la réplication du virus de Marburg

Figure 20: Les antifongiques de la banque « Prestwick Chemical » et les analogues synthétiques du Sulconazole

Figure 21: Détermination de la cytotoxicité des composés

Figure 22: Effets des analogues du Sulconazole sur la transduction et l'import du génome de l'AdV

Figure 23: Effets des composés analogues du Sulconazole sur la propagation de l'AdV

Figure 24: L'interaction protéine VI/BAG3 est dépendante du motif PPSY de la protéine VI

Annexes

ANNEXE 1: Liste des virus, abréviations et pathologies associées

ANNEXE 2: Protocole détaillé de la mise en place du criblage à haut débit d'inhibiteurs de l'IPP virus/hôte: His-VI-wt/GST-Nedd4-2 avec la technique d'AlphaScreen®

ANNEXE 3: IC₅₀ des 11 composés candidats inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen®

ANNEXE 4: Structures chimiques des antifongiques de la banque « Prestwick Chemical ».

ANNEXE 5: Les différentes sortes de dérivés imidazolés

ANNEXE 6: Manuscrit de l'article soumis dans PNAS en Mai 2015

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les stratégies antivirales

Les stratégies antivirales regroupent tous les moyens médicaux permettant de lutter et de traiter les infections virales *via* l'administration de molécules interférant avec la multiplication du virus ou *via* la vaccination qui permet une réponse plus efficace du système immunitaire vis-à-vis de l'infection.

Depuis la découverte des virus à la fin du XIXe siècle par les biologistes D. Ivanovsky et M. Bejerinck, il a d'abord fallu attendre près de 50 ans avant de pouvoir les cultiver et les observer en microscopie. Les années 60 ont ensuite vu le développement et la production industrielle des premiers vaccins anti-poliovirus (Sabin 1955) et les premiers tests de médicaments antiviraux contre le virus de l'herpès (avec l'idoxuridine) (Key 1965). Depuis, la science n'a eu de cesse de chercher des moyens de lutte contre ces microorganismes. A l'heure actuelle il existe plus de 80 drogues antivirales et des dizaines de vaccins ou autres thérapeutiques antivirales sur le marché (**Tableau 1**). La recherche dans ce domaine a explosé depuis les années 90. Cependant elle continue encore de nos jours car la découverte d'un antiviral à large spectre, à l'image de certains antibiotiques, est le but commun de la virologie et de la pharmacologie et permettrait de lutter efficacement contre un maximum de virus à la fois.

Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, l'ensemble des virus cités ainsi que les pathologies auxquels ils sont associés au cours de cette introduction est décrit en **ANNEXE 1**.

1. Les vaccins antiviraux « classiques »

Les vaccins sont des cocktails biologiques préparés à partir de virus inactivés, atténués ou de protéines virales. Ils permettent de stimuler le système immunitaire des personnes à qui ils sont administrés. Cette stimulation par le vaccin, suite à la reconnaissance des antigènes viraux, conduit à la production d'anticorps spécifiques et parfois à l'activation des lymphocytes T mémoires. Une immunité cellulaire spécifique est alors induite chez le patient dont le système immunitaire saura répondre de manière plus efficace et plus rapide en cas d'infection par le virus pour lequel il a été immunisé par le vaccin.

Il existe plusieurs sortes de vaccins (He 2013) :

| LES STRATÉGIES ANTIVIRALES | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vaccins « classiques » | Thérapie génique | Sérothérapie | Interférons | Antiviraux |
| <ul style="list-style-type: none"> - Virus inactivés - Virus atténués - Vaccins protéiques | <ul style="list-style-type: none"> - Vaccins recombinants - Vaccin ADN - « Prime-Boost » - Immunisation cellulaire - Immunothérapie adoptive | <ul style="list-style-type: none"> - Immunisation artificielle passive | <ul style="list-style-type: none"> - IFN type I (α, β) - IFN type II (γ) - ISG: OAS, ARNase L, ADAR1, NOS, Mx, IFIT | <ul style="list-style-type: none"> Ciblant: - le virus - les facteurs cellulaires - les interactions virus/hôte |
| | | | <i>Antiviraux à large spectre</i> | |

Tableau 1: Les stratégies antivirales.

- Les vaccins à virus inactivés qui sont composés de virus détruits chimiquement ou par choc thermique et d'adjuvants permettant une meilleure stimulation du système immunitaire. C'est le cas des vaccins contre la grippe (virus Influenza), la poliomyélite et l'hépatite A (Picornavirus) ou la rage (Rhabdovirus).
- Les vaccins à virus atténués, composés de virus infectieux mais modifiés par réassortiment ou délétion génétique afin de ne plus être pathogènes. Ils se répliquent donc dans les cellules et stimulent de manière efficace le système immunitaire sans induire de symptomatologie clinique (ex : le vaccin ROR contient les virus atténués de la rougeole (Morbillivirus), de la rubéole (Rubivirus) et des oreillons (Myxovirus)).
- Les vaccins protéiques : ils sont composés de protéines extraites ou purifiées ou de peptides de synthèse (ex : le vaccin contre le virus de l'hépatite B composé des protéines de surface du virus ou le vaccin contre le papillomavirus qui est composé de pseudoparticules virales).

2. La thérapie génique antivirale

2.1. *Les vaccins à base de virus recombinants*

Les recherches actuelles se concentrent également sur les vaccins recombinants. Ils utilisent des virus inactivés ou atténués dans lesquels est introduit un gène qui code pour l'antigène vaccinant dans le génome du virus ou un vecteur codant pour la ou les protéines d'un second virus. Le vecteur recombinant obtenu permet de vacciner le patient contre les deux types de virus. Récemment, l'équipe de Yang *et al.* a testé l'immunisation de souris avec un vaccin appelé rFLU/HAdV, qui est constitué du virus Influenza dans lequel la séquence codant pour l'épitope antigénique de la protéine adénovirale d'hexon des HAdV-3 et HAdV-7 est insérée à la place d'un gène du virus Influenza (P. Yang et al. 2015). Cette vaccination permet l'immunisation contre le virus Influenza et les HAdV-3 et HAdV-7.

2.2. *Les vaccins ADN et la stratégie du « prime-boost »*

La recherche médicale s'intéresse également aux vaccins à ADN, jusqu'à présent uniquement utilisés en médecine vétérinaire. Un plasmide codant pour la protéine virale antigénique souhaitée est directement injecté (injection cutanée, sous-cutanée ou intramusculaire) et délivré aux cellules qui synthétisent les protéines antigéniques d'intérêt. L'optimisation des systèmes d'injection du vaccin (formulation avec des microparticules, association à des lipides ou méthode d'injection physique telle que l'aiguille) a permis

d'augmenter le potentiel de ces vaccins chez l'animal (Bolhassani and Yazdi 2009). Récemment, l'équipe de Muthumani *et al.* a validé l'immunisation de singes grâce à l'utilisation d'un vaccin à ADN codant pour les protéines de surface du virus « Middle East Respiratory Syndrome » (MERS), un coronavirus émergent (Muthumani et al. 2015).

La stratégie de vaccination « prime-boost » a également augmenté le potentiel d'utilisation des vaccins ADN (Bolhassani and Yazdi 2009). Cette stratégie consiste à administrer un vaccin ADN puis un vaccin protéique ou un vaccin recombinant ainsi que les adjuvants appropriés afin de permettre une activation plus efficace du système immunitaire avec le vaccin ADN seul. En 2000, une stratégie vaccinale de « prime-boost » contre le virus Ebola a été testée sur les primates. Le « prime » était réalisé grâce à un vaccin ADN codant pour les glycoprotéines du virus Ebola suivi d'un « boost » réalisé avec un vecteur recombinant : un adénovirus non répliquatif codant pour les nucléoprotéines et les glycoprotéines du virus Ebola (Yan Zhou and Sullivan 2015). Suite à l'épidémie à Ebola en 2014, le nouveau vaccin chimère ChAd3/MVA donne des résultats encourageants chez l'Homme. Il est composé de deux vaccins recombinants : un adénovirus de chimpanzé non répliquatif (vecteur) codant pour les glycoprotéines du virus Ebola et un poxvirus modifié codant également pour les glycoprotéines du virus Ebola (Yan Zhou and Sullivan 2015).

2.3. L'immunisation intracellulaire

L'introduction dans les cellules de l'organisme, d'un gène d'intérêt codant pour des facteurs antiviraux qui pourront défendre la cellule durant l'infection définit l'immunisation intracellulaire. Les facteurs antiviraux exprimés peuvent être des protéines leurres du virus, des protéines virales mutantes transdominantes négatives (Crowder and Kirkegaard 2005), des séquences leurres pour des protéines régulatrices des virus, des ARN interférents, des ARN antisens (pour les rétrovirus) ou des ribozymes. Ils peuvent également être des dérivés des gènes de l'organisme comme des récepteurs cellulaires solubles de l'interféron (IFN) ou des séquences de gènes codant pour les chaînes lourdes et légères d'anticorps neutralisants.

Cette approche repose sur l'utilisation de vecteurs pour permettre le transfert de gènes aux cellules cibles. Les vecteurs adénoviraux ont la capacité de transférer de grands gènes mais peuvent induire une forte réponse immunitaire et se heurtent au problème de l'immunité intrinsèque anti-Ad préexistante dans la population (Dharmapuri, Peruzzi, and Aurisicchio 2009). La recherche actuelle vise à développer des vecteurs adénoviraux moins immunogènes, mais également des vecteurs de synthèse (Roth and Sundaram 2004). Les nanotechnologies ont également développé des vésicules artificielles de type liposomes,

capables de fusionner avec la membrane cellulaire et ainsi libérer les facteurs antiviraux dans la cellule (Trovato 2015).

2.4. Immunothérapie adoptive spécifique antivirale

Face à la nécessité d'une réponse antivirale chez les patients immunodéprimés, l'immunothérapie adoptive a vu le jour. En effet, les personnes ayant subi une greffe d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques sont généralement sous immunomodulateurs ou doivent attendre un certain délai avant que leur système immunitaire soit de nouveau reconstitué et fonctionnel. Les infections virales chez ces patients peuvent conduire à des infections disséminées graves pouvant être mortelles. L'immunothérapie adoptive spécifique consiste à prélever des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) du donneur. Ces cellules sont ensuite activées *in vivo* ou *in vitro* contre le ou les virus souhaités. Puis, la population de lymphocytes est débarrassée de tous les LTC allo-réactifs et les cellules immunitaires spécifiques d'un ou plusieurs virus sont alors transplantées chez le patient immunodéprimé afin de lui fournir une immunité transitoire et permettre une réponse antivirale en cas d'infection (Sautto et al. 2015).

3. La sérothérapie

La sérothérapie est utilisée en prophylaxie mais également en thérapeutique antivirale. Elle consiste en l'administration d'un sérum immunisant afin de permettre la réponse antivirale d'un patient immunodéprimé.

Le sérum est historiquement d'origine animale mais de plus en plus, ce sont les immunoglobulines humaines qui sont utilisées. Pour cela, elles sont prélevées chez des patients donateurs et elles sont administrées à fortes doses au patient immunodéprimé, lui conférant une immunité passive. Ainsi, un traitement immunoglobulinique s'est révélé efficace pour les traitements des infections oculaires dues à l'infection par l'adénovirus chez le lapin (Nwanegbo et al. 2007).

4. Les interférons et protéines associées

4.1. Les interférons (IFN)

Synthétisés par la cellule en réponse à une infection, les interférons (IFN) sont des cytokines qui stimulent le système immunitaire et l'activation des voies de défenses

antivirales (**Schéma 1**). Les IFN α , sécrétés principalement par les lymphocytes et les IFN β , synthétisés par les fibroblastes et cellules épithéliales, sont les IFN de type I et représentent la première ligne de défense antivirale avant la mise en place de l'immunité cellulaire. Ils inhibent entre autre, la synthèse des protéines *via* l'activation de l'expression de gènes induits par l'interféron (ISG) conduisant à la synthèse d'effecteurs cellulaires, stoppant ainsi la multiplication du virus (**Schéma 1**). Parmi eux, on retrouve la 2',5'-oligoadénylate synthase (OAS) qui lie la ARNase L, une ribonucléase qui fragmente les ARN viraux. On retrouve également la kinase PKR cellulaire qui inhibe le complexe d'initiation de la traduction. D'autres effecteurs tels que l'ARN désaminase ADARI, les GTPases Mx, la synthétase NOS ou encore les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CHM I et II) sont aussi exprimés dans la réponse antivirale (Samuel 2001). L'IFN γ de type II appartient à l'immunité spécifique (cellulaire et humorale). Sécrété par les cellules de l'immunité (les lymphocytes T et les **Natural-Killer (NK)**), l'IFN γ a une fonction antivirale mais également immunomodulatrice. Il active les cellules effectrices de l'immunité : les cellules T-cytotoxiques, les macrophages et les NK qui vont participer à l'élimination des cellules infectées.

Les IFN inhibent l'infection virale en bloquant la réplication virale et en activant les cellules de l'immunité capables de détruire le virus *via* la destruction de la cellule hôte infectée.

Répondant à l'ensemble des infections virales, les IFN sont utilisés en thérapie antivirale. Les IFN α synthétiques sont les plus administrés notamment dans le traitement des hépatites (Isorce et al. 2015). Une forme modifiée des IFN α , à laquelle a été ajoutée une chaîne de PEG (polyéthylène glycol) permet d'augmenter la stabilité chimique et induit une diffusion plus lente dans l'organisme et donc une action plus longue.

Si les IFN semblent être la réponse idéale à une infection virale, le fait qu'ils soient naturellement produits par la cellule a permis aux virus de développer au cours de l'évolution des contre-attaques à cette voie de défense cellulaire. De plus, l'administration des IFN induit des effets secondaires chez les patients, ce qui constitue un inconvénient majeur à leur utilisation (Isorce et al. 2015).

4.2. **Les IFIT**

Récemment ce sont les protéines IFIT (pour « **IFN-Induced proteins with Tetratricopeptide repeats protein** ») qui sont apparues comme des candidats idéaux pour le traitement de l'ensemble des infections virales. Les protéines IFIT font partie des protéines

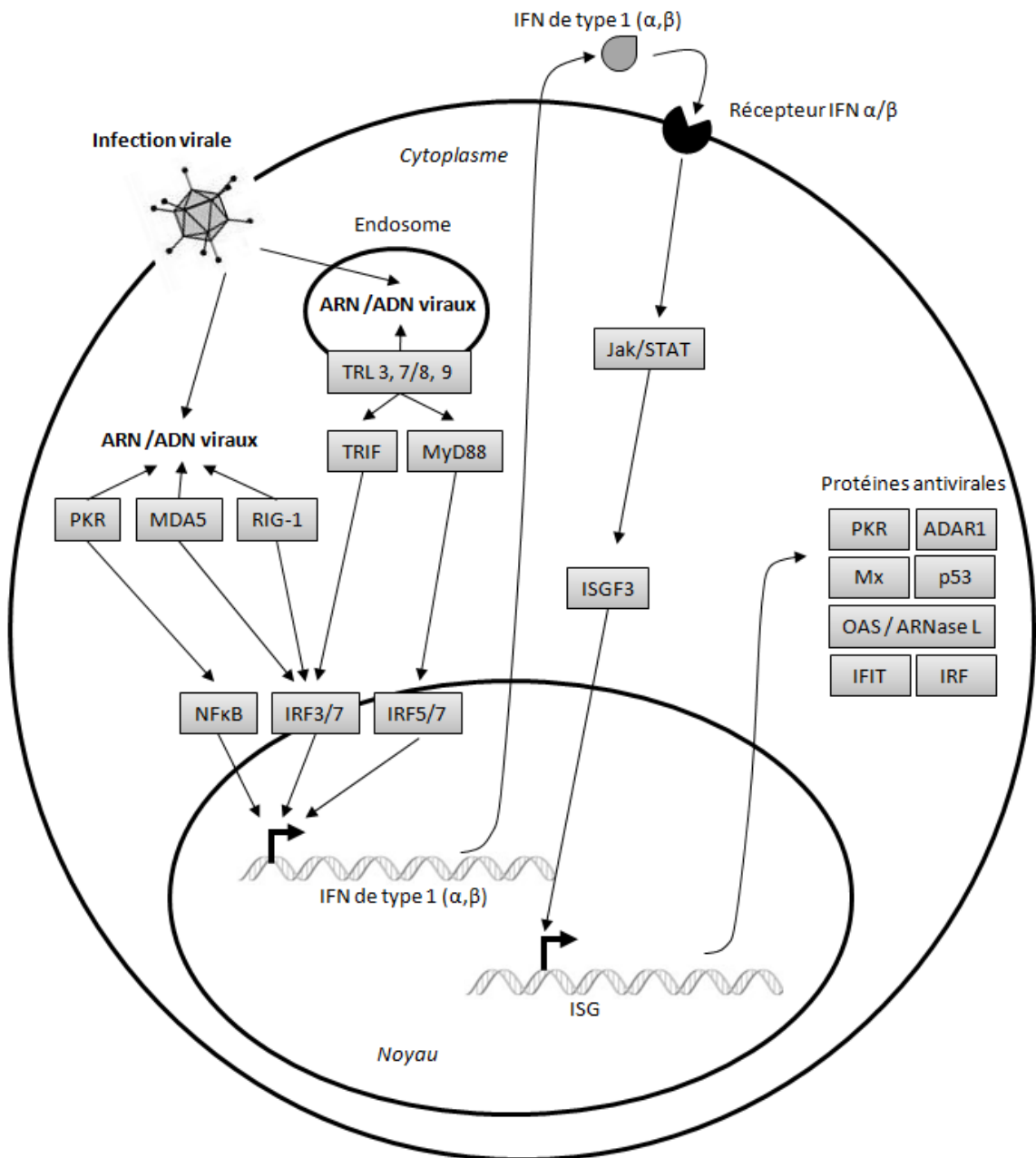


Schéma 1: La réponse antivirale des interférons de type 1. Les acides nucléiques viraux sont reconnus par des senseurs cellulaires (TLR, MDA5, RIG1) et induisent l'activation des facteurs de transcription NF κ B et IRF. Celle-ci entraîne l'expression et la sécrétion d'IFN de type 1. La liaison des IFN sur les récepteurs à la surface des cellules active la voie de signalisation JAK/STAT conduisant à l'activation de l'expression de gènes induits par l'interféron (ISG). Parmi eux, on retrouve la 2'-5' oligo-synthétase (OAS), la kinase PKR, l'ARN désaminase (ADAR1) ou les GTPases Mx. L'ensemble de ces effecteurs participe à la réponse antivirale.

induites en réponse à l'IFN, les ISG. Elles inhibent différentes étapes de la traduction des ARNm viraux, l'infection et la réplication par la reconnaissance spécifique des coiffes triphosphate des ARN viraux en 5' (les ARN cellulaires ont une 2'-O-méthylation sur leur coiffe en 5'). Elles permettent également de moduler l'inflammation et ont des propriétés antiprolifératives qui conduisent à l'arrêt de la multiplication du virus (Diamond and Farzan 2012).

5. Les composés antiviraux (ou chimiothérapie antivirale)

5.1. *Les antiviraux ciblant le virus*

La majorité des drogues antivirales actuellement sur le marché, sont des antiviraux ciblant directement le virus.

La quasi-totalité des molécules antivirales cible des enzymes virales spécifiques à la réplication et à l'expression des génomes viraux : les polymérases virales, les intégrases, les transactivateurs de la transcription (ex : protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine, VIH), les méthyltransférases virales, les hélicases virales ou alors les protéases virales (E. D. Clercq 2004; de Chassey et al. 2012; Lou, Sun, and Rao 2014). D'autres empêchent la formation de complexes protéiques viraux nécessaires à la réplication et à la transcription des génomes viraux (ex : la drogue TZP/U inhibe la formation du complexe hélicase-primase du virus de l'herpès et provoque l'arrêt de la synthèse d'ADN viral (E. D. Clercq 2004)).

Il y a également des antiviraux qui agissent de manière indirecte sur la réplication des virus à ADN. C'est le cas :

- des analogues nucléosidiques (ex : l'Aciclovir ou le Ganciclovir, des analogues de la guanosine, utilisés dans le traitement des virus de l'herpès),
- des analogues des nucléotides qui sont des nucléosides monophosphatés (ex : le Cidofovir, analogue de la cytosine, utilisé dans le traitement des virus herpès et des Adénovirus),
- des analogues des pyrophosphates (ex : le Foscarnet, utilisé dans le traitement des virus herpès), qui sont intégrés lors de la réplication de l'ADN et agissent comme des terminateurs de chaîne, provoquant l'arrêt de la synthèse d'ADN.

Pour les rétrovirus, il existe :

- des analogues nucléosidiques (ex : la Zidovudine ou AZT, analogue de la thymidine, utilisé pour le traitement du VIH-1),

- des analogues nucléotidiques (ex : le Tenofovir, un analogue de l'adénosine, utilisé pour le traitement du VIH-1 et de l'hépatite B), inhibant spécifiquement la transcriptase inverse des virus.

La Ribavirine est un analogue nucléosidique actif sur les virus à ARN et à ADN mais très toxique.

Les ribozymes de synthèse sont des molécules d'ARN avec une activité nucléase qui permet l'inhibition de l'étape de traduction grâce au découpage de séquences cibles de l'ADN et l'ARN viral (He 2013).

Certaines molécules antivirales sont des analogues des récepteurs et corécepteurs cellulaires reconnus par les virus. Elles ciblent directement les glycoprotéines virales et empêchent leur liaison aux protéines cellulaires par compétition, inhibant généralement les étapes d'attachement et d'entrée des virus. Le Zanamivir et l'Oseltamivir, par exemple, sont des inhibiteurs de la neuraminidase (NA), une enzyme de surface du virus de la grippe, nécessaire à l'entrée et principalement à la sortie du virus Influenza. Les lectines issues de plantes, capables de lier certaines protéines de surfaces du VIH, des Coronavirus et du virus Ebola, ont été décrites comme agents antiviraux potentiels (E. De Clercq 2015a; Balzarini et al. 2004).

Généralement, les traitements sont combinés (bi- ou tri-thérapie) afin de limiter les risques de mutation des virus. En effet, la réplication des génomes des virus à ARN en particulier, est peu fidèle et cela peut être la cause de l'apparition de mutations.

Ces classes d'antiviraux sont généralement restreintes à une espèce ou à une famille de virus.

5.2. Les antiviraux ciblant les interactions virus/hôte

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. Ils utilisent et détournent la machinerie cellulaire afin d'assurer leur réplication. Les interactions entre les facteurs viraux et ceux de la cellule hôte sont donc nombreuses. Le ciblage des fonctions cellulaires essentielles à la réplication du virus constitue une autre stratégie antivirale en plein développement.

En 2012, la base de données VirHostNet comptabilisait plus de 3000 interactions protéine/protéine (IPP) entre les virus et la cellule hôte (de Chassey et al. 2012). Dans leur étude de 2014, Chassey *et al.* ont dénombré près de 7000 IPP virus/hôte (de Chassey et al. 2014).

Ainsi on retrouve sur le marché ou en phase clinique des composés antiviraux ciblant directement les récepteurs cellulaires (ex : le Maraviroc, un antagoniste du récepteur CCR5 nécessaire à l'entrée du VIH-1) ou des enzymes cellulaires (ex : kinases, hydrolases).

Site à l'épidémie d'Ébola qui a débuté en 2013, de nouvelles thérapeutiques ont été développées. Elles ciblent un large spectre de protéines cellulaires impliquées dans la réplication des virus enveloppés. On y retrouve par exemple des inhibiteurs de la voie de modification des protéines par le réticulum endoplasmique (glycosidase et chaperonne HSPA5), des inhibiteurs des canaux ioniques (ex : l'anti-arythmique Amiodarone, inhibiteur des canaux potassiques (Gehring et al. 2014) ou encore des antioxydants (E. De Clercq 2015b).

On pourrait inclure dans cette catégorie d'antiviraux ciblant les facteurs cellulaires, les analogues nucléotidiques, précédemment cités dans le paragraphe « *Les antiviraux ciblant le virus* », qui ne sont pas spécifiques des cellules infectées. En effet, si les analogues nucléosidiques nécessitent une première phosphorylation par les kinases virales afin de pouvoir être intégrés dans la chaîne d'ADN en cours de réplication, cela n'est pas le cas des analogues nucléotidiques. Ainsi le Cidofovir est un analogue nucléotidique acyclique mono-phosphate, il ne nécessite donc pas de pré-phosphorylation par les kinases virales avant d'être pris en charge par les kinases cellulaires (les NDPK pour **n**ucléoside **d**iphosphate **k**inases) et agir comme terminateur de chaîne de la synthèse d'ADN viral ou mitochondriale en cours. Ils ciblent donc la synthèse d'ADN cellulaire et sont donc responsables d'effets secondaires.

Il a été montré qu'entre 5 et 20%, des cibles cellulaires et des processus biologiques étaient partagés par 5 virus (le virus Influenza, le virus de l'Hépatite C, le virus d'Epstein-barr, le virus de la dengue et le virus de la varicelle) dont les interactomes ont été établis (Meyniel-Schicklin et al. 2012). Ainsi, les antiviraux qui ciblent les facteurs cellulaires nécessaires à la réplication de plusieurs espèces ou plusieurs familles de virus sont potentiellement des antiviraux à large spectre (Meyniel-Schicklin et al. 2012). De nouveaux antiviraux à large spectre ciblant la multiplication des virus ont été identifiés ces dernières années grâce aux nouvelles techniques de criblage à haut débit. Ces techniques et les antiviraux à large spectre potentiels identifiés grâce à ces méthodes seront décrits dans le chapitre 5 de cette introduction.

5.3. *Les antiviraux immunomodulateurs*

Il existe aussi des composés ciblant des protéines impliquées dans la réponse immunitaire, on parle d'antiviraux immunomodulateurs (ex : molécules stimulant les récepteurs « Toll-like » [TLR] ou des activateurs de la voie des IFN). Des antagonistes de la cyclophiline A, comme la cyclosporine immunosuppressive, aux fonctions immunomodulatrices et pro-répliquatives pour certains virus (ex : VIH, influenza virus, virus de l'hépatite C), sont également utilisés (Lou, Sun, and Rao 2014).

Tout comme les IFN, les antiviraux immunomodulateurs ont l'avantage d'avoir un spectre d'action large et efficace sur un grand nombre de virus (Burke and Fish 2009). Ainsi, plusieurs drogues antivirales immunorégulatrices à large spectre ont vu le jour et une partie d'entre elles cible les défenses immunitaires de l'hôte (Zhu et al. 2015). Cependant leur utilisation peut être limitée par leurs effets pléiotropiques dans la cellule et les effets secondaires des immunosuppresseurs.

i. Inhibiteurs du protéasome

Le MG-132 et le Bortezomib (également appelé PS-341) sont deux inhibiteurs du protéasome identifiés comme potentiels inhibiteurs à large spectre. En 2000, Schubert *et al.* ont montré que l'inhibiteur du protéasome MG-132 interférait avec les étapes de maturation des polyprotéines Gag et de libération des particules des VIH-1 et 2 (Schubert et al. 2000). Le Bortezomib est efficace *in vitro* contre la réplication du virus Influenza et du VSV en induisant l'activation de la réponse antivirale grâce à l'induction de la voie NFκB et la production subséquente d'IFN de type I (Dudek et al. 2010). Ainsi l'inhibition de la maturation des protéines et l'activation de la réponse antivirale, provoquées par ces inhibiteurs du protéasome en font des antiviraux, potentiellement à large spectre.

ii. DRACO

DRACO signifie en anglais « Double-stranded RNA (dsRNA) Activated Caspase Oligomerizer ». Ce sont des ARN double brin (ARNds) qui induisent spécifiquement l'apoptose des cellules infectées contenant des ARNdb viraux. DRACO est efficace *in vitro* contre 15 virus différents dont le virus de la Dengue, des Arénavirus (responsable de fièvres hémorragiques), le virus Guama (un Bunyavirus) et le virus Influenza contre lequel il est également efficace *in vivo* (Rider et al. 2011). Récemment, il a été montré que DRACO inhibait aussi un Artérovirus, un autre virus à ARNdb économiquement important car responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (PRRSV pour « Porcine

reproductive and respiratory syndrome virus ») (Guo et al. 2015). Cependant cette drogue cible principalement les virus à ARN, même si les virus à ADN peuvent présenter des ARNdb lors de leur réplication.

iii. Les polymères de mucine

En 2012, l'équipe de Lieleg *et al.* a montré que des polymères de mucines extraits du mucus gastrique de porc étaient des antiviraux naturels empêchant la pénétration dans les cellules de virus comme le papillomavirus humain (HPV), le Polyomavirus de Merkel (MCV, *a priori* impliqué dans la formation du carcinome à cellules de Merkel) ou le virus Influenza (Lieleg et al. 2012). Il pourrait alors s'agir d'une protection cutanée antivirale à large spectre à utiliser en prévention ou pour des infections superficielles.

6. Antiviraux à large spectre : une nécessité

Les vaccins et les stratégies de thérapies antigéniques constituent donc des protections efficaces et à long terme contre le virus contre lequel le patient a été immunisé. Le vaccin n'est cependant pas efficace contre un ensemble de virus, ni contre l'apparition de virus émergents (Burke and Fish 2009) ou contre les virus mutés (c'est le cas du vaccin de la grippe qui doit être adapté chaque année). De plus, le coût des vaccins et leur défaut de stabilité limitent leur emploi. Le fait qu'ils ne soient pas efficaces ou présentent une faible efficacité si la personne est déjà infectée nécessite l'utilisation d'autres stratégies antivirales. Le spectre d'action des antiviraux actuel n'est pas aussi vaste que celui des antibiotiques. La recherche d'antiviraux à large spectre est par conséquent une nécessité et implique de découvrir de nouvelles cibles.

Chapitre 2 : Les « late domains », un motif commun aux virus

1. Les « late domains » viraux

Le bourgeonnement des virus enveloppés consiste en l'enveloppement des particules virales au niveau de la membrane cellulaire associées aux glycoprotéines virales et à leur libération dans l'espace extracellulaire. Les « late domains » viraux ont été identifiés en 1991 chez les rétrovirus, des virus enveloppés (Göttlinger et al. 1991). En effet, la mutation du « late domain » de la protéine p6 du précurseur Gag du VIH-1 conduit à une accumulation des particules néoformées au niveau de la membrane. Les « late domains » ont été désignés comme des facteurs essentiels au bourgeonnement des virus enveloppés. L'implication de ces motifs dans les phases tardives de la réplication des virus enveloppés leur a valu le nom de « late domain » ou « L domain ».

Ce n'est que très récemment que les « late domains » ont été impliqués dans d'autres étapes du cycle infectieux des virus enveloppés et même chez les virus non enveloppés (*Cf, partie 4. de ce chapitre*).

Ces motifs sont des séquences très conservées chez les virus enveloppés et impliqués dans un grand nombre d'interactions avec la machinerie cellulaire (Freed 2002). Ils sont divisés en quatre classes de motifs.

1.1. *Les motifs P(T/S)AP*

Les motifs P(T/S)AP (Pro-[Thr ou Ser]-Ala-Pro), ont été les premiers identifiés sur le précurseur Gag du VIH-1 et d'autres rétrovirus, et rapidement désignés comme facteurs essentiels au bourgeonnement du virus (Göttlinger et al. 1991). Ils ont ensuite été découverts sur les protéines de virus enveloppés appartenant à différentes familles : les *Filoviridae*, les *Arenaviridae* et les *Rhabdoviridae* (Votteler and Sundquist 2013). En 2005, un motif PSAP a été aussi décrit sur une protéine non-structurale d'un virus non-enveloppé appartenant à la famille des *Reoviridae*, le Bluetongue virus (BTV) responsable de la fièvre catarrhale chez les ruminants (Wirblich, Bhattacharya, and Roy 2006).

1.2. *Les motifs PPxY*

Chez d'autres rétrovirus, il a rapidement été montré que le motif PPxY (Pro-Pro-x-Tyr, où x est n'importe quel acide aminé) du précurseur Gag joue aussi le rôle de « late domain ». On le retrouve chez le virus du sarcome de Rous (RSV), le virus Mason-Pfizer du singe (MPMV pour « Mason-Pfizer Monkey virus ») (Jiro Yasuda and Hunter 1998) et le virus de la leucémie murine (MLV) (Yuan et al. 2000).

Les motifs de type PPxY ont également été identifiés sur les protéines de matrice (protéine M) du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Jayakar, Murti, and Whitt 2000) et du virus de la rage (un Lyssavirus), deux virus de la famille des *Rhabdoviridae* et là encore, ces motifs se révélèrent essentiels au bourgeonnement des virus (Ronald N. Harty et al. 1999).

Tout comme les motifs P(TS)AP, on retrouve des motifs PPxY dans les protéines des virus des familles : *Filoviridae*, *Arenaviridae* et *Hepadnaviridae* (Votteler and Sundquist 2013).

On retrouve également des motifs PPxY au niveau des protéines des virus non-enveloppés : chez l'adénovirus (Harald Wodrich et al. 2010) et le BTV (Wirblich, Bhattacharya, and Roy 2006; Bhattacharya, Celma, and Roy 2015).

1.3. *Les motifs (L)YPx¹/₃L*

Les motifs de type (L)YPx_{1/3}L constituent une troisième classe de « late domain ». Ils ont été identifiés sur le précurseur Gag du rétrovirus responsable de l'anémie infectieuse des équidés (EIAV) dont la séquence était de type YxxL (Puffer et al. 1997). Puis, ils ont été retrouvés chez d'autres rétrovirus (le VIH-1 et le MLV) (Votteler and Sundquist 2013). Cette année un motif de type YP_{x(n)}L/I a été identifié sur la protéine VP40 du filovirus Ebola (Han et al. 2015).

1.4. *Le motif FVIV*

En 2005, Schmitt *et al.* ont identifié un motif de type FVIV sur la protéine de matrice d'un paramyxovirus, le virus parainfluenza simien de type 5 (SV5). Ce motif est nécessaire au bourgeonnement et à la réplication du SV5 et permet de compenser l'absence de motif PTAP chez un VIH-1 mutant et de restaurer le bourgeonnement des particules (Schmitt et al. 2005) et constitue une nouvelle classe de « late domain ».

1.5. *Plusieurs « L domains » chez un même virus*

Un grand nombre de virus possède plusieurs « late domains » situés sur la même protéine ou sur des protéines différentes. C'est le cas du virus Ebola qui possède au niveau de sa protéine VP40, trois « late-domains » : une superposition de motifs de type PTAP et PPxY (PTAPPxY) (Ronald N. Harty et al. 2000) et également un motif de type YPx_(n)L/I (Han et al. 2015). Le MLV possède également trois « L domains » sur son précurseur Gag. Le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) possède un motif de type PTAP et un autre de type PPxY sur sa protéine de matrice (MA) du précurseur Gag (H. Wang, Machesky, and Mansky 2004), tout comme le MPMV, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCV), le virus de Lassa, le BTV tandis que le RSV possède un motif PPxY et un motif YPxL sur son précurseur Gag. Le virus de Marburg possède quant à lui un motif PPxY sur sa protéine VP40 et un motif PSAP sur sa nucléoprotéine NP (Votteler and Sundquist 2013). On peut retrouver des motifs PPxY sur les protéines de structure VI (Wodrich et al. 2010) et penton (Galinier et al. 2002) de l'adénovirus.

2. Interchangeabilité des « late domains »

Les « late domains » regroupent des motifs différents qui semblaient conserver la même fonction d'un virus à l'autre. Pour tester cela, en 1995 l'équipe de Parent *et al.* a remplacé le « late domain » de type PTAP du précurseur Gag du VIH-1 par le motif PPxY de celui du RSV. Ces travaux ont montré que cet échange de « late domain » restaurait le défaut de bourgeonnement du VIH-1 muté au niveau de son « late domain » (Parent et al. 1995). Des expériences du même type ont montré que le « late domain » de type PPxY du MLV peut être remplacé par les « late domains » d'autres rétrovirus (Yuan et al. 2000).

L'interchangeabilité des « late domain » n'est pas réservée aux membres de la famille des rétrovirus. En effet, le motif PPPY du RSV, un Rétrovirus, peut être échangé avec un motif PPxY d'une protéine de matrice (M) du VSV, un Rhabdovirus (Craven et al. 1999) et le « late domain » de type PSAP du précurseur Gag du VIH-1 peut être remplacé par le motif PTAPPxY de la protéine VP40 du virus Ebola, un filovirus (Accola, Strack, and Göttlinger 2000).

Différents types de « late domains » ont été identifiés comme responsables du bourgeonnement des virus enveloppés de différentes familles et leur interchangeabilité a rapidement été mise en évidence (Zhadina and Bieniasz 2010).

Cette interchangeabilité des domaines de types différents et la redondance des « late domains » chez certains virus suggèrent la conservation de fonction(s) associée(s) aux « late domain » et de mécanismes communs à plusieurs familles de virus.

3. Le recrutement des protéines cellulaires nécessaires au bourgeonnement

L'équipe de Krishna *et al.* en 2001 a montré que des protéines de capsides de virus non-enveloppés, lorsqu'elles étaient simplement liées au « late domain » et au domaine de liaison à la membrane de virus enveloppés, permettaient leur bourgeonnement (Krishna and Wills 2001). Cette étude illustre l'importance et le rôle clef des « late domains » dans la libération des particules de virus enveloppés. Le recrutement de la machinerie cellulaire pour assurer le bourgeonnement des virus enveloppés est l'une des premières fonctions attribuées aux « late domains » (Freed 2002).

3.1. Recrutement de la machinerie ESCRT

Selon les rétrovirus, en général, le bourgeonnement est décrit selon deux voies (Hütter, Zurnic, and Lindemann 2013).

La première illustre l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales au niveau de la membrane plasmique enrichie en glycoprotéines virales. L'assemblage de la particule se fait par oligomérisation des précurseurs Gag associés au génome viral. Dans ce cas, l'assemblage et le bourgeonnement sont concomitants. C'est le cas par exemple des virus VIH-1, MLV et RSV. C'est également vrai pour d'autres familles de virus enveloppés comme les *Orthomyxoviridae*, les *Rhabdoviridae*, les *Filoviridae* et les *Paramyxoviridae*, le bourgeonnement se déroule aussi à la membrane plasmique, durant l'assemblage des protéines de structure virales.

Dans la deuxième voie, la première étape d'assemblage de la capside et du génome viral se situe dans le cytoplasme comme par exemple au niveau du centre organisateur de microtubules (MTOC pour « microtubule-organizing center ») ou des corps multi-vésiculaires (MVB pour « Multi-vesicular bodies »). Ensuite, les capsides immatures sont dirigées vers les sites de bourgeonnement. Ces sites peuvent se situer à la membrane plasmique ou bien au niveau de la membrane de compartiments intracellulaires (ex : réticulum-endoplasmique, appareil de Golgi) dans lesquelles sont enchâssées des glycoprotéines virales. Dans ce cas, les virus peuvent être libérés soit par exocytose, soit en utilisant la voie « classique » de bourgeonnement des virus à la membrane plasmique. Cette seconde voie est la voie des

rétrovirus MPMV et MMTV (pour « Mouse mammary tumor virus », un virus responsable de tumeurs mammaires chez la souris) et du virus Foamy. Le bourgeonnement intracellulaire est également employé par certains virus des familles des *Coronaviridae*, des *Hepadnaviridae*, des *Flaviviridae* ou des *Bunyaviridae*.

Quelque soit la voie de bourgeonnement, le virus utilise la machinerie du trafic endosomal ESCRT (pour « Endosomal Sorting Complexes Required for Transport ») (**Schéma 2**). La machinerie ESCRT est impliquée dans le remodelage de la membrane cellulaire lors de la formation des MVB et dans la scission des zones membranaires invaginées notamment lors de la division cellulaire. La topologie du bourgeonnement des virus est la même que celle de la formation des MVB et de ce fait les virus recrutent la machinerie ESCRT afin d'assurer leur bourgeonnement et la scission des zones membranaires invaginées pour libérer les nouveaux virions enveloppés.

i. La protéine Tsg101

Plusieurs groupes ont montré que le précurseur Gag du virus VIH-1 interagit avec la protéine cellulaire Tsg101 *via* son « late domain » de type P(T/S)AP et que cette interaction est nécessaire au bourgeonnement et à la libération des virions (Garrus et al. 2001; VerPlank et al. 2001; Demirov et al. 2002). Ce type d'interaction a aussi été mis en évidence chez d'autres rétrovirus : le HTLV-1 (Bouamr et al. 2003), le MPMV (Gottwein et al. 2003), le virus Foamy (Patton et al. 2005) mais également chez les arénavirus avec le LCMV et le virus de la fièvre de Lassa (Perez, Craven, and Juan 2003) ou encore chez le filovirus Ebola (Licata et al. 2003; J. Yasuda et al. 2003). Récemment, Dolnik *et al.* ont montré l'interaction de Tsg101 avec le motif PSAP de la protéine de nucléocapside du virus de Marburg (O. Dolnik et al. 2010).

Tsg101 est une protéine impliquée dans le tri des protéines dans la voie des MVB via la machinerie ESCRT (**Schéma 2**). Tsg101 appartient au complexe ESCRT I, un des 4 complexes protéiques (ESCRT 0, I, II et III) du système ESCRT. Les protéines formant les complexes possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine (IPP), des domaines de liaison aux phospholipides et certains aux ubiquitines (Katzmann, Babst, and Emr 2001). Une des sous-unités du complexe ESCRT 0 possède un motif de type P(T/S)AP qui permet le recrutement de Tsg101 et donc du complexe ESCRT I et l'initiation des étapes de remodelage de la membrane cellulaire. Les virus utilisent donc leurs motifs P(T/S)AP pour recruter Tsg101 puis toute la machinerie ESCRT au niveau du site de bourgeonnement (Votteler and Sundquist 2013) (**Schéma 2**).

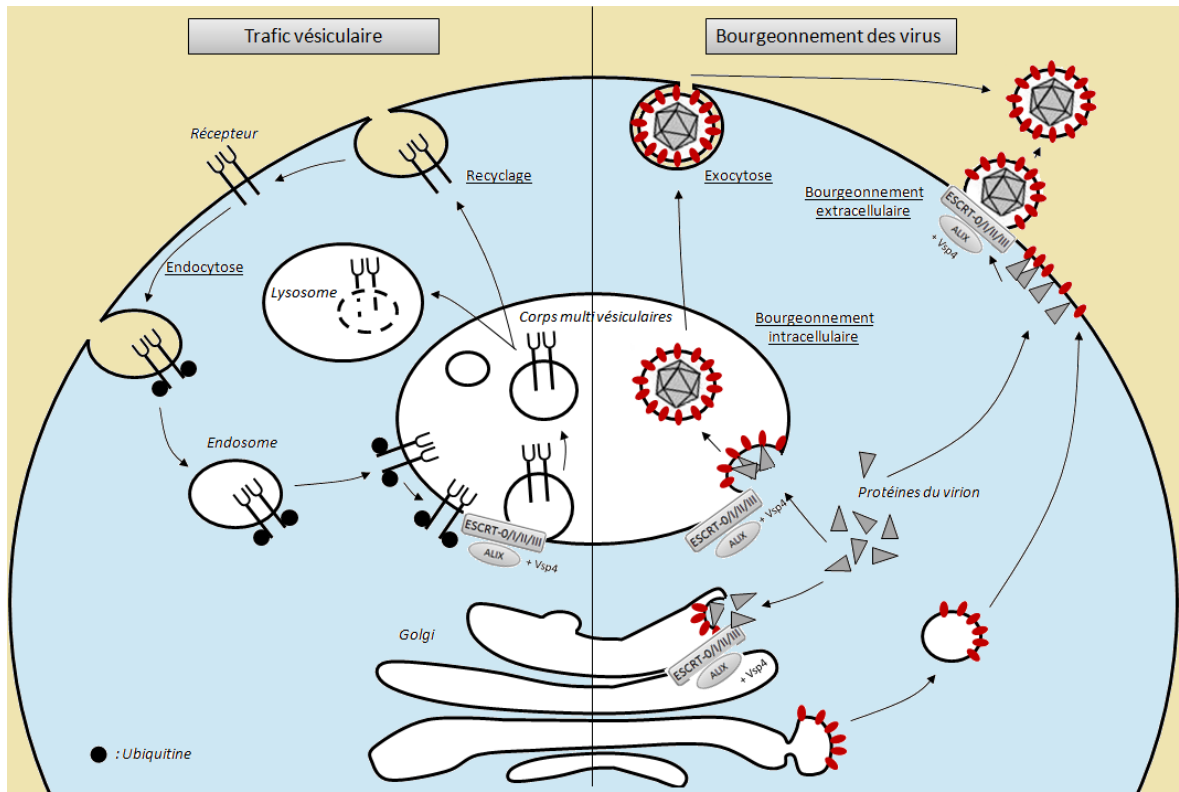


Schéma 2: Le détournement de la machinerie ESCRT par les virus. L'ubiquitylation des protéines membranaires induit leur endocytose et leur adressage vers les voies de tri vésiculaires permettant leur transport et leur entrée dans les vésicules des corps multi-vésiculaires (MVB) (*panel de gauche*). La machinerie ESCRT permet l'invagination de la membrane endosomale et la scission des zones membranaires invaginées avec l'aide des protéines ALIX et Vsp4. La topologie du bourgeoisement des virus est la même que celle de la formation des MVB et de ce fait, les virus enveloppés détournent la machinerie ESCRT au cours du bourgeoisement des particules (site intracellulaire ou membrane plasmique) (*panel de droite*).

Tsg101 a d'autres rôles cellulaires. Cette protéine est aussi impliquée dans la stabilisation du génome et la transcription des gènes cellulaires (Y.-S. Lin et al. 2013) et viraux. Ainsi la protéine Rta du virus d'Epstein Barr (virus de l'herpès 4 ou EBV) recrute Tsg101 *via* une interaction indépendante d'un « late domain » afin de permettre l'activation de la transcription de ses gènes viraux tardifs (Chua et al. 2007).

ii. La protéine adaptatrice ALIX

Les virus possédant un « late domain » de type LYP_{x_n}L interagissent avec la protéine adaptatrice ALIX ainsi que les protéines AP1/AP2. Le complexe ESCRT I et ALIX recrutent ensemble le complexe ESCRT III et l'ATPase Vps4 nécessaires à l'étape de scission membranaire. Comme Tsg101, ALIX permet le recrutement de la machinerie ESCRT au niveau des sites de bourgeonnement des virus enveloppés (**Schéma 2**).

L'équipe de Strack *et al.* a montré en 2003 que le précurseur Gag du VIH possède également un motif de type LYP_{x_n}L qui lui permet de recruter la protéine ALIX, tout comme celui d'EIAV (Strack et al. 2003) et de MLV (Jadwin et al. 2010). Cette interaction a également été décrite pour la protéine de matrice du virus de Sendai un *Paramyxoviridae* (Irie et al. 2007). Récemment, Zhai *et al.* ont montré que le précurseur Gag du virus d'immunodéficiência simienne (SIV) recrute ALIX en absence d'un « late domain » classique. Dans ce cas là, ALIX se lie à une séquence contenant une tyrosine et des résidus hydrophobes : $\Phi Y_{x_{0/2}}(P/\Phi)_{x_{0/3}}(L/I)$, (avec Φ correspondant à n'importe quel acide aminé hydrophobe) (Zhai et al. 2011). Cette année, Han *et al.* ont découvert un « L domain » de type LYP_{x_n}L/I sur la protéine VP40 du virus Ebola lui permettant d'interagir avec ALIX.

Ainsi les virus recrutent Tsg101 et/ou la protéine adaptatrice ALIX via leurs « L domains » afin de détourner et d'utiliser la machinerie ESCRT nécessaire à leur bourgeonnement.

3.2. **Recrutement de la machinerie cellulaire d'ubiquitylation**

Le rôle de la machinerie cellulaire d'ubiquitylation permet la liaison d'ubiquitine, une petite protéine, à des protéines agissant comme un signal d'adressage de ces protéines dans la cellule. L'ubiquitylation peut conduire à la dégradation des protéines mais permet également de réguler leur stabilité, leur fonction, leur localisation et leur interaction avec les autres protéines cellulaires (Coux 2011). L'ubiquitine, l'ubiquitylation et les ubiquitine ligase E3 impliquées dans la réaction d'ubiquitylation seront décrites dans le Chapitre 4.

Les virus possédant des « L domains » de type PPxY sont capables d'interagir avec la famille des ubiquitine ligases de type HECT de la famille Nedd4. Le motif de type PPxY se lie aux domaines WW présents sur les Nedd4 (*Cf. Chapitre 4*). Un domaine WW est composé d'une quarantaine d'acides aminés dont deux résidus tryptophanes conservés et forme trois feuillets β antiparallèles dans lesquels viennent se fixer les résidus prolines et la tyrosine du motif PPxY (Macias, Wiesner, and Sudol 2002).

La découverte de ce type d'interaction chez les virus a commencé avec la protéine VP40 du virus d'Ebola *via* son motif PSAPPxY (Ronald N. Harty et al. 2000, 200) puis avec la confirmation de l'implication du motif de type PPxY dans cette interaction (J. Yasuda et al. 2003). Par la suite, l'interaction des motifs PPxY avec les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 a été montrée chez le RSV (Kikonyogo et al. 2001), le HTLV-1 (Bouamr et al. 2003), le MPMV (Gottwein et al. 2003) et le virus de Marburg (Urata and Yasuda 2010). Le précurseur Gag du VSV est également capable d'interagir *in vitro* avec l'homologue de la Nedd4, Rsp5 chez la levure, de manière dépendante du motif PPxY (R. N. Harty et al. 2001).

3.3. *L'ubiquitylation, les Nedd4 et la machinerie ESCRT*

L'implication de l'ubiquitylation et des ubiquitine ligases E3 dans le bourgeonnement des virus enveloppés n'est pas claire. Certains liens entre les ubiquitine ligases Nedd4 et la machinerie ESCRT sont établis. En effet, l'ubiquitine est impliquée dans les signaux de tri vésiculaire tel que le transport des protéines depuis l'appareil de Golgi vers les endosomes (Helliwell, Losko, and Kaiser 2001) ou dans l'entrée des protéines dans les vésicules des corps multi-vésiculaires régulés par la machinerie ESCRT (Katzmann, Babst, and Emr 2001; Urbanowski and Piper 2001). Ainsi l'ubiquitine serait un facteur clef dans le transport des membranes cellulaires (O. Staub 2006a) et donc des protéines et vésicules associées (Stringer and Piper 2011; Zhadina and Bieniasz 2010). De plus, les protéines ESCRT sont elles même ubiquitylées et cette modification permettrait de réguler la reconnaissance des cargos ubiquitylés (Hicke and Dunn 2003). Cependant, les protéines et facteurs cellulaires permettant de relier les machineries et ESCRT ne sont pas bien connus. Plusieurs candidats sont proposés (**Schéma 3**):

i. L'ubiquitine

Certaines publications suggèrent que le recrutement d'ubiquitine ligases sur le site de bourgeonnement permet l'ubiquitylation de protéines virales et/ou cellulaires conduisant au recrutement de la machinerie ESCRT nécessaire au bourgeonnement (Votteler and Sundquist

2013; Martin-Serrano 2004). Ceci peut être expliqué par le fait que l'ubiquitine est impliquée dans les signaux de tri vésiculaire tel que l'entrée des protéines dans les vésicules des corps multi-vésiculaires qui est régulée par la machinerie ESCRT (Katzmann, Babst, and Emr 2001; Urbanowski and Piper 2001). L'ubiquitylation des protéines virales ou cellulaires pourrait également conduire au recrutement de protéines impliquées dans le remodelage de la membrane (ex : la protéine AP-2 impliquée dans l'endocytose) (Vogt 2000).

L'ubiquitine semble être un facteur essentiel puisque la déplétion de l'ubiquitine conduit à une inhibition du bourgeonnement des rétrovirus RSV, VIH-1/2 et du SIV (Akash Patnaik, Chau, and Wills 2000; Schubert et al. 2000). De plus, des ubiquitines libres sont également retrouvées dans les particules rétrovirales du virus de la leucose aviaire (ALV) (Putterman, 1990) et au niveau des précurseurs Gag du VIH-1, du SIV et du MLV (Ott et al. 1998). Il apparaît donc que l'ubiquitylation du précurseur Gag du VIH-1 est un pré-requis nécessaire au bourgeonnement du virus (Ott et al. 2000, 200; Gottwein et al. 2006; Weiss et al. 2010; Sette et al. 2013).

Cependant la nécessité de l'ubiquitylation des protéines virales possédant des « late domains » est discutée. En effet, le précurseur Gag du EIAV est insensible aux inhibiteurs du protéasome (MG-132) conduisant à la déplétion en ubiquitine dans la cellule, ce qui suggère que le bourgeonnement des particules est indépendant de l'ubiquitylation de Gag pour ce virus (A. Patnaik et al. 2002; Shehu-Xhilaga et al. 2004). C'est également le cas du virus Foamy (Zhadina et al. 2007).

Mais l'ubiquitylation peut également être associée à des protéines cellulaires. Les protéines de la machinerie ESCRT tel que Tsg101, ALIX ou ESCRT-II contiennent des domaines de liaison à l'ubiquitine et sont elles mêmes ubiquitylées. L'ubiquitylation des complexes ESCRT eux même, par les ubiquitine ligases E3 conduirait à l'inhibition de la reconnaissance des cargos protéiques ubiquitylés (Hicke and Dunn 2003).

Ainsi le bourgeonnement des virus dépendrait de l'ubiquitylation des protéines virales et/ou des facteurs cellulaires recrutés sur le site de bourgeonnement (Vogt 2000, 200; Freed 2002; Stringer and Piper 2011). Les résultats d'Usami *et al.* en 2009 confirment cette hypothèse car ils montrent que l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (pour « neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4-2 ») est capable de stimuler le bourgeonnement du VIH-1, en l'absence de motif PPxY dans le précurseur Gag qui contient en revanche un motif PSAP liant Tsg101, laissant supposer que la Nedd4-2 pourrait alors réguler l'activité d'ESCRT-I (Usami et al. 2009). Les mêmes résultats ont été montrés pour le virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Calistri et al. 2009).

L'ubiquitylation de facteurs cellulaires ou viraux permettrait de recruter directement ou indirectement la machinerie ESCRT nécessaire au bourgeonnement et surtout à la scission des membranes afin de libérer la particule virale enveloppée (**Schéma 3**).

ii. Les ART

Plus récemment, des connections entre des adaptateurs associés au trafic des arrestines (ART pour « **arrestin-related trafficking adaptors** »), la machinerie ESCRT et la famille des ubiquitines ligase Nedd4 ont été également mises en évidence (Rauch and Martin-Serrano 2011). Les ART se lieraient aux ubiquitine ligases de type HECT comprenant les Nedd4 (*Cf. Chapitre 4*) et recruteraient la machinerie ESCRT *via* leur liaison avec les protéines Tsg101 et ALIX, agissant comme des adaptateurs entre les machineries d'ubiquitylation et ESCRT. D'autre part, les ART sont également recrutées sur le site de bourgeonnement.

Les protéines virales possédant des « late domains » pourraient recruter les ART (Rauch and Martin-Serrano 2011) ou bien jouer le rôle d'adaptateur entre les deux types de machinerie à la manière des ART (Votteler and Sundquist 2013 ; Kuo and Freed 2012).

Le fait que certains virus possèdent plusieurs « late domains » sur une même protéine (ex : la protéine VP40 du virus Ebola qui possède trois types de « late domains ») ou bien sur plusieurs protéines (ex : le virus de Marburg qui possède des « late domains » sur ses protéines VP40 et NP) suggère le recrutement de facteurs et de mécanismes communs entre les voies d'ubiquitylation et ESCRT dans le bourgeonnement des virus enveloppés (**Schéma 3**).

4. L'implication des « late domains » dans d'autres étapes

Les « late domains » ont largement et presque exclusivement été étudiés dans le bourgeonnement des virus enveloppés. Cependant, les « late domains » ont aussi des fonctions à d'autres étapes de la réplication des virus enveloppés. Et ce n'est que très récemment qu'ils ont aussi été impliqués dans la réplication des virus non-enveloppés.

4.1. *Les étapes précoces et la maturation des virus enveloppés*

En 1999, il a été montré que la mutation du motif YxxL chez le virus de la leucémie bovine (BLV, un rétrovirus) provoquait un défaut d'incorporation des protéines d'enveloppe dans les virions mais également un défaut d'entrée du virus dû à une diminution de la capacité de liaison du virus aux cellules cibles (Inabe et al. 1999).

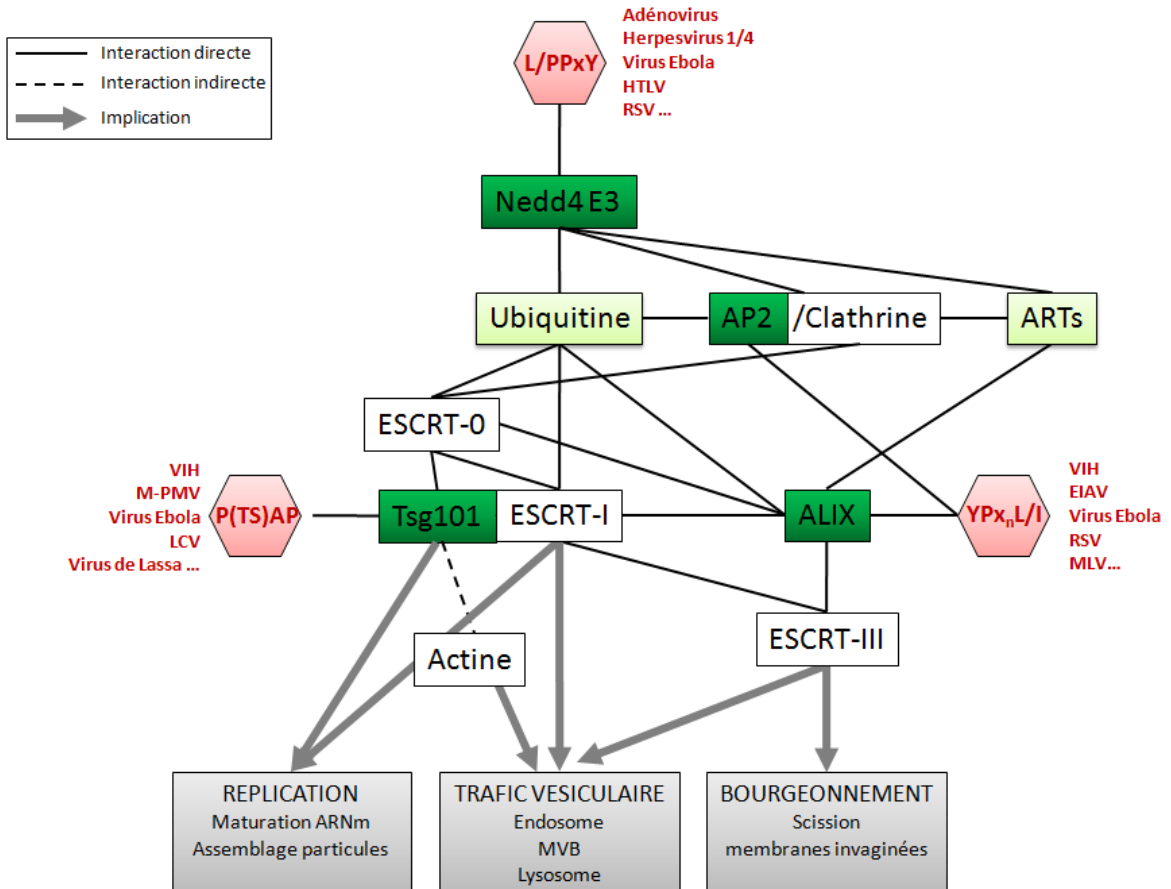


Schéma 3: Modèle des connexions entre les « late domains » et les machineries d'ubiquitylation et ESCRT. Les « late domains » viraux (*en rouge*) permettent le recrutement de facteurs cellulaires clés que sont Nedd4-2, Tsg101, ALIX et AP2 (*en vert foncé*). Certains de ces facteurs interagissent avec les ubiquitines ou avec les ARTs qui jouent le rôle d'adaptateurs (*en vert clair*). Le recrutement de la machinerie d'ubiquitylation et/ou la machinerie ESCRT permet le trafic intracellulaire des virus au cours de l'entrée jusqu'à leur site de réplication, la maturation des nouveaux virions ainsi que le bourgeonnement et la libération des particules dans le cas des virus enveloppés.

La même année, Yuan *et al.* ont montré que le « late domain » du M-MLV avait des fonctions multiples au cours du cycle de réplication du virus. En effet, des rétrovirus mutés au niveau du « late domain » de leurs précurseurs Gag présentent un défaut de maturation des précurseurs Gag et des protéines d'enveloppe du virus par les protéases (Yuan 1999) en plus du défaut de bourgeonnement.

4.2. *Le transport des particules virales*

Comme expliqué précédemment et dans le Chapitre 4 de cette introduction, l'ubiquitine serait un facteur clef dans le transport des protéines membranaires (Staub 2006a) et donc des protéines et vésicules associées (Zhadina and Bieniasz 2010; Stringer and Piper 2011).

i. Le transport vers le site de bourgeonnement des virus enveloppés

En 2004, il a été montré que les « late domains » du virus HTLV-1, qui possède à la fois un motif PPxY et un motif PTAP, étaient impliqués dans le trafic des protéines virales via les MVB avant l'étape de bourgeonnement à la membrane (Blot 2004).

Dolnik *et al.* ont montré que les nucléocapsides du virus de Marburg étaient transportées depuis leur site de réplication appelés « inclusions » (des sites intracellulaires proches du noyau) jusqu'au site de bourgeonnement grâce au motif PSAP de la protéine NP et au recrutement de Tsg101. La protéine Tsg101 recruterait la protéine cellulaire IQGAP1 permettant le transport actine-dépendant des nucléocapsides dans le cytoplasme (Dolnik *et al.* 2014; Schudt *et al.* 2015). La même équipe a montré que la machinerie ESCRT, la protéine transmembranaire LAMP1 associée au MVB mais également les protéines Nedd4, ALIX et Vsp4 colocalisaient près des « inclusions » (Dolnik *et al.* 2015).

Les machineries ESCRT et d'ubiquitylation semblent donc impliquées dans le transport des particules jusqu'au site de bourgeonnement des virus enveloppés.

ii. Le transport des capsides des virus non-enveloppés durant l'entrée

C'est en 2010, qu'il a été montré pour la première fois par notre laboratoire, qu'un « late domain » de type PPxY était impliqué dans l'entrée d'un virus non-enveloppé : l'adénovirus. Un motif PPSY a été trouvé sur une protéine de capsid (protéine VI) et un adénovirus muté pour ce motif présentait un défaut de trafic jusqu'au noyau après son entrée dans la cellule (Harald Wodrich *et al.* 2010).

En 2013, l'équipe de Silva-Ayala *et al.* a mis en évidence par un criblage d'ARN interférents, l'implication de la machinerie ESCRT dans l'entrée des Rotavirus, d'autres virus

non-enveloppés (Silva-Ayala et al. 2013). Si aucun « late domain » n'a encore été décrit chez les Rotavirus, la présence de l'un d'eux pourrait expliquer le recrutement de la machinerie ESCRT dans l'entrée de ces virus.

4.3. *Le pseudo-bourgeoisement des virus non-enveloppés*

En 2015, les « late domains » ont été impliqués dans la réplication des BTV, une autre famille de virus non-enveloppés. Si ce virus est capable de sortir des cellules par induction de la lyse cellulaire, comme le font généralement les virus non-enveloppés, le virus BTV est également capable de sortir de la cellule à la manière des virus enveloppés. Des virions enveloppés dans une « pseudo-enveloppe » de membrane cellulaire sont ainsi libérés. La protéine NS3 des BTV possède deux « late domains », un motif PSAP et un motif PPxY. L'équipe de Polly Roy a montré que le motif PSAP de NS3 recrute la machinerie ESCRT *via* son interaction avec la protéine Tsg101. Cette interaction est nécessaire à la libération des virions de la cellule à la manière des virus enveloppés (Wirblich, Bhattacharya, and Roy 2006). Cette équipe a aussi démontré que le motif PPxY de la protéine NS3 est impliqué dans la maturation du virus, son trafic intracellulaire *via* les MVB et la voie d'exocytose (Bhattacharya, Celma, and Roy 2015).

Il est à noter que les BTK ne sont pas les seuls virus non-enveloppés à présenter une étape d'enveloppement dans la formation et la libération des particules. Les Picornavirus utilisent le même mécanisme et la biosynthèse de ses enveloppes est dépendante de la machinerie ESCRT. Par exemple, deux motifs conservés de type YPX3L ont été identifiés sur la protéine de capsid VP2 du virus de l'hépatite A et leur mutation conduit à une réduction de la libération des virus (Feng et al. 2013) suggérant un rôle essentiel des « late domains » et de la machinerie ESCRT pour la réplication de ces virus « non-enveloppés ».

Il semble aujourd'hui que les « late domains » soient également impliqués dans les étapes précoces du cycle de réplication des virus comme l'entrée et le trafic des particules virales que ces particules soient enveloppées ou non.

Chapitre 3 : L'interaction protéine VI virale/Nedd4 chez les Adénovirus

1. Les adénovirus : historique et classification

Les adénovirus ont été mis en évidence en 1953 par Rowe *et al*, à partir de fragments d'amygdale d'enfant et en 1954 par Hilleman *et al*, chez des militaires souffrant d'infections respiratoires aiguës (Rowe et al. 1953 ; Hilleman et al. 1954).

Associé à un grand nombre de pathologies, l'adénovirus possède également un pouvoir oncogène sur les cellules de rongeur (Moore, Horikoshi, and Shenk 1996).

La famille des *Adenoviridae* est divisée en quatre genres: les Mastadenovirus, les Aviadenovirus, les Atadenovirus, et les Siadovirus. Les Mastadenovirus infectent près de 90 espèces de mammifères parmi lesquelles : les bovidés, les équidés, les chiens, les porcs, les singes et l'Homme. Parmi les adénovirus humains, on compte six espèces notées de A à G de la plus oncogénique (groupe A) à la moins oncogénique chez le rongeur (groupe G). Les espèces ont été classées en fonction de la longueur de la protéine de fibre, les propriétés d'hémagglutination, le pourcentage de guanine et de cytosine (% GC) du génome et les homologies de séquences ADN. Au moins 67 types d'adénovirus humain (HAdV) ont été décrits à ce jour : 51 types (notés HAdV-1 à 51) ont été identifiés par sérotypages et 16 autres types par séquençage génomique ou analyse informatique (notés HAdV-52 à 67) (Lion 2014).

2. Généralités

2.1. *Transmission et pathologies associées*

Les adénovirus sont principalement transmis de manière directe *via* les contacts et la pulvérisation de gouttelettes respiratoires. Ils peuvent être également être transmis par l'eau, les aliments et le matériel opératoire. L'adénovirus est donc un virus facilement transmissible et potentiellement hautement contagieux du fait de la stabilité de sa capsid.

Chez le patient immunocompétent, les infections sont généralement asymptomatiques ou faiblement pathogènes. L'adénovirus humain est capable de se multiplier efficacement dans une grande variété de types cellulaires mais les cellules épithéliales sont les principaux sites de réplication. Cela conduit principalement à des infections au niveau des voies respiratoires supérieures (angine, rhinopharyngite). Jusqu'à 3 % des pneumopathies chez le jeune enfant

sont associées à une infection adénovirale. Chez l'adulte, plus de 85 % de la population possède des anticorps contre les adénovirus de l'espèce C, responsables des infections des voies aériennes supérieures. Une étude réalisée entre les années 2008 et 2012 au CHU de Bordeaux par notre laboratoire, a montré la prévalence des HAdV de type C dans les infections respiratoires et intestinales et cela indépendamment de l'état immunitaire des patients infectés (Berciaud et al. 2012). Certains types de virus de l'espèce D infectent également l'épithélium conjonctival et sont responsables de conjonctivites et plus sévèrement de kératoconjonctivites. Les adénovirus HAdV-40 et 41 infectent les cellules du tractus intestinal et sont responsables de diarrhées, gastroentérites, cystites et hépatites. Ces hépatites, si elles se prolongent, peuvent évoluer en cancer du foie. D'autres infections adénovirales sont responsables de myocardites ou de méningo-encéphalites. Des études récentes suggèrent que l'adénovirus serait impliqué dans certaines formes d'obésité (Ponterio and Gnessi 2015). De manière générale, les infections adénovirales restent souvent bénignes et localisées chez le patient immunocompétent.

Elles sont plus significatives chez les patients immunodéprimés où elles sont responsables de forts taux de morbidité et de mortalité. En effet, des taux de 6 à 70 % de mortalité sont signalés pour les patients transplantés pédiatriques et adultes (Echavarria 2008). En effet, les jeunes enfants ayant subi une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT) ou les personnes ayant reçu des transplants d'organes tels que le foie ou les reins, sont les personnes les plus à risque. Elles possèdent un système immunitaire affaibli du fait des traitements immunosuppresseurs et une infection à adénovirus peut alors se disséminer, comme tout agent pathogène opportuniste et conduire à un rejet de greffe voir à la mort du patient transplanté.

Les infections disséminées à HAdV sont de plus en plus reconnues comme un facteur de risque pour toutes les personnes immunodéprimées (Heim 2011). De plus, les HAdV sont souvent associés à des co-infections bactériennes ou virales. On retrouve aussi les HAdV associés au CMV et à l'EBV (Berciaud et al. 2012). Chez les patients greffés avec du sang de cordon, l'adénovirus est le plus souvent associé au virus Herpès de type 6 (HHV6) ou au CMV (Desclaux *et al.* données non publiées). Ces co-infections peuvent parfois conduire à des symptômes cliniques sévères chez les personnes hospitalisées (Berciaud et al. 2012).

2.2. *Traitements : antiviraux, vaccins et immunothérapie*

Le traitement aux infections adénovirales bénignes est le plus souvent un traitement symptomatique. Dans le traitement des kératoconjonctivites, de l'interféron (IFN) peut être administré par voie locale (Lion 2014).

Un vaccin anti-HAdV4 et 7 a été développé au Etats-Unis afin de réduire les incapacités temporaires des troupes militaires subissant des épidémies de virus respiratoires ou gastro-intestinaux. Cependant les campagnes de vaccination ont été stoppées suite à la découverte du pouvoir oncogène de l'adénovirus sur des cellules de rongeur même si aucun lien entre infection adénovirale et tumeur n'a été découvert chez l'Homme (Moore, Horikoshi, and Shenk 1996).

Il existe plusieurs stratégies antivirales visant à soigner les personnes immunodéprimées et infectées par l'adénovirus.

Chez les personnes venant de subir une greffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT), dans un premier temps le traitement consiste à réduire la thérapie immunosuppressive puis à administrer des antiviraux et, en dernier lieu, à recourir à l'immunothérapie (Lion 2014).

Le Cidofovir paraît être l'antiviral le plus efficace contre l'adénovirus puisqu'il est efficace sur un grand nombre de familles de virus à ADN (E. De Clercq 2002). Il est le plus largement utilisé en prévention d'une infection, il est cependant moins efficace quand l'infection est déclarée ou quand le patient ne possède pas d'immunité anti-HAdV. C'est un analogue nucléotidique de la cytosine, monophosphaté (*Cf.* Chapitre 1). Cependant son utilisation est limitée du fait de sa faible biodisponibilité. En effet, en raison du groupement phosphate, le composé est très mal absorbé par la cellule. Il provoque des pénuries des leucocytes et des neutrophiles. Il est aussi néphrotoxique car il s'accumule dans les tubules rénaux, ce qui oblige à surveiller les fonctions rénales des patients traités. De plus, des problèmes récents de rupture de stock en raison d'un défaut de qualité ont mis en évidence des difficultés industrielles de production de ce médicament.

L'autre antiviral utilisé est la Ribavirine, elle aussi analogue nucléotidique mais de la guanidine, elle inhibe la réplication des virus à ADN et à ARN. Elle serait efficace uniquement contre les HAdV-C (Naesens et al. 2005) et son efficacité *in vivo* est controversée. Cependant, le fait qu'elle soit faiblement néphrotoxique a justifié son utilisation récente en combinaison avec le Cidofovir dans les traitements préventifs des enfants ayant subi une greffe allo-HSCT (Lion 2014).

Le Brincidofovir est un dérivé du Cidofovir qui est, depuis mars 2014, en phase 3 des essais clinique (Wold and Toth 2015). Il présente moins de néphrotoxicité car il est lié à un lipide qui lui permet de pénétrer dans les cellules de manière plus efficace. Une fois dans la cellule, la portion lipidique est clivée par les phospholipases cellulaires et la molécule de Cidofovir est libérée. Le Brincidofovir est efficace *in vitro* contre 5 familles de virus à ADN (Florescu and Keck 2014). Les résultats des tests cliniques sont encourageants et le Brincidofovir remplacera bientôt le Cidofovir.

L'autre approche prometteuse pour le traitement de l'adénovirus est l'immunothérapie. Elle est basée sur l'administration de lymphocytes T cytotoxiques anti-HAdV produits à partir des cellules du donneur. Elle permettrait la restauration de l'immunité anti-HAdV. On parle d'immunothérapie adoptive. La recherche actuelle consiste à déterminer quelle méthode de production des lymphocytes T cytotoxiques anti-HAdV, *ex vivo* (Feucht et al. 2015) ou *in vitro* (Geyeregger et al. 2013) est la plus efficace. En cas de non disponibilité des cellules du donneur, une équipe a testé l'utilisation de préparation de cellules cryogénisées issus de donneurs possédant les haplotypes (HLA pour « human leukocyte antigen ») les plus fréquents (Leen, Heslop, and Brenner 2014). Les résultats des essais cliniques en cours sont eux aussi encourageants même si la mise en œuvre de ce traitement est plus complexe qu'un traitement médicamenteux.

Cependant, en attendant la fin des essais cliniques et faute d'un traitement efficace à 100%, une combinaison de plusieurs traitements semble être la solution la plus efficace contre l'infection adénovirale (Wold and Toth 2015).

2.3. Les vecteurs AdV en thérapie génique et vaccination

Les adénovirus sont largement utilisés en thérapie génique et en vaccination car ils sont faciles à produire et cela à hauts titres (1.10^{12} particules physiques par millilitre minimum) et peuvent infecter une grande diversité de cellules du fait de leur large tropisme, y compris les cellules qui ne se divisent pas. De plus, ils ont un génome de grande taille et sont donc capables de transporter un gène thérapeutique d'une taille relativement élevée allant jusqu'à 35 kpb. Il n'y a pas d'intégration du gène transféré ce qui peut être un avantage et conduit à une durée d'expression limitée.

Une limite de leur utilisation vient du fait que les patients sont généralement déjà porteurs d'une immunité anti-adénovirale qui réduit l'efficacité du traitement. Les infections adénovirales étant courantes et souvent asymptomatiques, le risque de recombinaison ou de

complémentation des vecteurs avec un adénovirus infectieux est à considérer. De plus la réponse inflammatoire à l'adénovirus peut être forte.

Les avantages et la facilité d'utilisation des vecteurs AdV, font qu'ils sont toujours utilisés en thérapie génique. Ainsi le rAd-p53 (Gendicine), un vecteur adénoviral codant pour le suppresseur de tumeur p53, est en cours d'étude pour le traitement des cancers (Li et al. 2015). Un autre exemple est l'utilisation des vecteur adénoviraux pour le traitement des cancers de la face et du cou, actuellement en phase II des tests cliniques (Ye et al. 2014). Les AdV sont également utilisés en vaccination, comme par exemple pour lutter contre le VIH-1 avec le vecteur recombinant rAd5 en phase 1 des tests cliniques (Sarwar et al. 2014) ou encore le virus Influenza avec le vecteur recombinant rFLU/HAdV (Yang et al. 2015) ou le virus Ebola avec la stratégie du « prime-boost » et le vecteur recombinant ChAd3/MVA (Zhou and Sullivan 2015) (*Cf. Chapitre 1*).

2.4. Réponse inflammatoire à l'adénovirus

Une forte réponse inflammatoire peut être induite par la présence seule de la particule adénovirale, en absence de l'expression des gènes viraux. Celle-ci est induite dès l'entrée du vecteur dans la cellule (Barlan et al. 2011). Le jeune Jesse Gelsinger fut victime d'une réponse inflammatoire massive en 1999 après avoir reçu une trop forte dose de vecteur adénoviral (Raper 2003).

3. La protéine VI des adénovirus possède un « late domain »

3.1. Structure des adénovirus

Les adénovirus sont des virus non-enveloppés possédant une capsidie d'un diamètre d'environ 90 nm qui protège l'ADN. La capsidie de symétrie icosaédrique est formée de 20 faces triangulaires, 30 arrêtes et 12 sommets (**Schéma 4**). Elle est composée de deux types de sous-unités appelées capsomères :

- les capsomères hexamériques formés par les protéines hexon. On retrouve 12 hexons par face de l'icosaèdre, soit 240 protéines hexon par particule,
- les 12 capsomères pentamériques formés par les hexons péripentonaux et les bases des pentons situés au niveau des sommets (1 penton-base entouré de 5 protéines hexon par sommet).

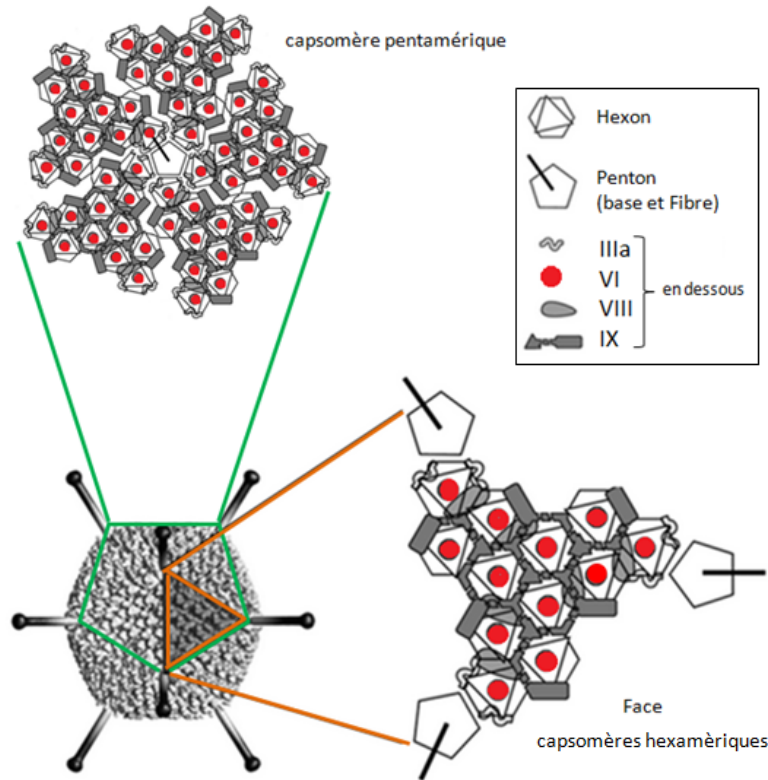
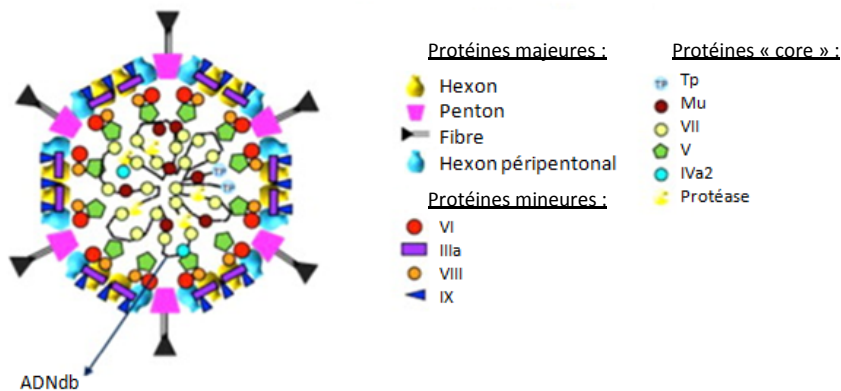
A**B**

Schéma 4: Structure de la capsid des Adénovirus. (A) La capsid de l'AdV présente une symétrie icosaédrique, avec 20 faces triangulaires (*en orange*), 30 arrêtes et 12 sommets. Elle est composée de capsomères hexamériques formés par les protéines hexon et les capsomères pentamériques (*en vert*) formés par 1 penton-base entouré de 5 protéines hexon par sommet. Schéma modifié d'après San Martin (2012). (B) Les protéines hexon, penton et fibre constituent les protéines majeures de la capsid. La structure de la particule est maintenue par les protéines mineures IIIa, VI (en rouge), VIII et XI et contient les protéines « core » V, VII, μ , IVa2, la protéine terminal (TP) ainsi que le génome d'ADN double brin linéaire de 34 kpb. Schéma modifié de Reddy et Nemerrow (2014).

Les sommets de la particule sont coiffés d'une spicule, la fibre liée à la base du penton. Les protéines hexon, penton et fibre constituent les protéines majeures de la capsid (Schéma 4).

La structure de la particule est maintenue par les protéines mineures IIIa, VI, VIII et XI (Schéma 4). Elles participent à la stabilité de la capsid et assurent son étanchéité. Elles interviennent également durant l'assemblage et le désassemblage de la capsid. L'organisation et la structure des protéines majeures sont connues (Roberts et al. 1986; Saban et al. 2006). Ce n'est que très récemment que celles des protéines mineures ou ciment ont pu être modélisées grâce à la combinaison de cryo-microscopie électronique (cryo-ME) et de méthodes de cristallographie conduisant à la modélisation d'une structure à haute résolution de l'adénovirus et à la localisation des protéines ciments IIIa et XI (Reddy and Nemerow 2014). Celles-ci seraient plutôt situées à l'extérieur de la capsid.

Les autres protéines, dites protéines « core » comprennent les protéines V, VII, μ , IVa2, la protéine terminale (TP) (Schéma 4). Elles sont encapsidées avec l'ADN viral et la protéase virale. La cystéine protéase virale assure la maturation de la capsid grâce au clivage des protéines virales. Les protéines V, VII et μ compactent le génome et forment des structures analogues aux nucléosomes. La liaison des protéines V et VII avec la protéine VI (formation d'un trimère V-VI-VII) permet la stabilisation de la capsid. La protéine IVa2 lie également l'ADN et joue un rôle dans son encapsidation par les virions en cours d'assemblage. Enfin, la protéine terminale (TP) se lie aux extrémités 5' des brins d'ADN viraux et joue un rôle essentiel dans la réplication du génome viral.

Le génome viral est un ADN double brin linéaire de 34 kpb. L'expression du génome viral est activée grâce à des facteurs de transcription viraux et à la polymérase II cellulaire. Le génome code pour 39 gènes classés en fonction de leur ordre d'expression. En effet, le génome adénoviral est exprimé de façon coordonnée dans le temps par vagues d'expression successives. Ainsi, les gènes nécessaires à l'activation de la réplication sont les premiers à être exprimés, suivis des gènes codant pour les protéines de structure du virion et de la régulation des voies de signalisation cellulaire. On retrouve :

- le gène « Précoce Immédiat »: E1A. E1 est la première unité de transcription à être exprimée, avant que la réplication débute et permet l'expression d'E1A qui provoque

l'activation de la phase S et donc la prolifération cellulaire (Frisch and Mymryk 2002) et la stimulation de la transcription des gènes « Précoces ».

- les gènes « précoces » comprennent les gènes E1B, E2A, E2B, E3 et E4. Issue des unités de transcription E1, E2 et E3, les protéines E1B, E3 et E4 ont pour fonction de protéger le virus contre les défenses de la cellule hôte en début de cycle (protéines anti-apoptotiques, modulateurs du système immunitaire) et de déclencher l'apoptose nécessaire à la libération des nouveaux virions en fin de cycle. La protéine E2 est nécessaire à la multiplication du virus tandis que la protéine E4 est un régulateur de la transcription des gènes viraux.
- les gènes « Intermédiaires » permettent la synthèse des protéines de capsid IVa2 et IX.
- les gènes « Tardifs » : L1, L2, L3, L4 et L5 codent pour les protéines de structure et les protéines nécessaires aux étapes d'assemblage des nouvelles particules.

3.2. *Le « late domain » de la protéine de capsid VI*

La protéine VI est une des protéines qui serait située au niveau de la face interne de la particule virale à la périphérie des hexons péripentonaux (Wodrich et al. 2003; Snijder et al. 2014). Elle est présente dans le virus sous forme de trimères de dimères (Stewart, Fuller, and Burnett 1993). Il a été dénombré 360 protéines VI par virus (Benevento et al. 2014) alors que les structures cristallographiques des particules virales ne permettent de distinguer que 180 copies. Il se pourrait alors que les 180 copies restantes soient associées à la nucléocapsid et à l'ADN du virus, des régions non-structurées et donc non-cristallisables (Wiethoff and Nemerow 2015).

Le précurseur de la protéine VI est une protéine de 26 kDa, de 250 acides aminés. Il est clivé au niveau des acides aminés 34 et 239 par la protéase virale durant la maturation de la capsid conduisant à une forme mature de 22 kDa et de 204 acides aminés. Cette maturation permettrait un changement conformationnel de la protéine et une meilleure accessibilité du domaine nécessaire à la lyse des membranes. De plus, le peptide clivé en C-terminal sert de cofacteur activateur de la protéase virale (Webster, Leith, and Hay 1994).

Si la structure de la protéine VI n'est pas connue, certains domaines ont été caractérisés. La protéine VI possède une structure en hélice et des extrémités non structurées (Reddy and Nemerow 2014). Elle présente une hélice amphipatique (acides aminés 34 à 53) impliquée dans la lyse des membranes. L'hélice jouerait également un rôle dans la stabilité et la labilité de la capsid avant l'attachement et l'internalisation du virus dans la cellule (Martinez et al.

2015). Elle possède également deux NLS (Nuclear Localisation Sequence) et une NES (Nuclear Export Sequence). Ces séquences sont impliquées dans la régulation de la morphogenèse de la particule (Wodrich et al. 2003) (*Cf. partie 4.*).

L'ensemble des espèces d'adénovirus possède un motif PPSY (proline-proline-sérine-tyrosine) autour de la position 147 de la protéine VI. Le motif PPxY est extrêmement conservé et fait partie des « late domains ». Les motifs PPxY identifiés sur la protéine de penton (Galinié et al. 2002) et sur la protéine VI (Wodrich et al. 2010) furent les premiers exemples de « late domain » décrit chez un virus non-enveloppé. Les AdV-21 et 50 humains et simiens possèdent un deuxième « late domain » de type PSAP sur leur protéine VI. Le motif PPxY permet l'interaction avec les protéines possédant un domaine WW. Ainsi il a été montré que la protéine VI de l'HAdV-5 était capable d'interagir *via* son domaine PPSY avec les ubiquitine ligases cellulaires de la famille Nedd4 (*Cf. Chapitre 4*). La protéine VI interagit tout particulièrement avec l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (Harald Wodrich et al. 2010). Elle est mono- et poly-ubiquitylée par celle-ci (Wodrich et al. 2010). En effet, Ruben Martinez durant sa thèse en 2012 (thèse n°1973) a montré que la Nedd4-2 était capable de di-ubiquityler la lysine 131 de la protéine VI.

La présence d'un « late domain » de type PPxY conservé sur la protéine VI de tous les types d'HAdV (Wodrich et al. 2010) laisse supposer un rôle majeur de ce « late domain » dans la réplication des adénovirus.

4. L'interaction protéine VI/Nedd4 : la clef de l'entrée des AdV

4.1. L'endocytose des adénovirus dans la cellule

Le récepteur CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor) est, comme son nom l'indique, le récepteur cellulaire du virus coxsackie B3 et le récepteur primaire des adénovirus (Bergelson 1997). C'est un récepteur de la famille des immunoglobulines, impliqué dans la formation des jonctions intercellulaires au niveau du pôle basolatéral des cellules épithéliales (Cohen 2001; Walters et al. 2002). Les fibres des adénovirus des espèces A, C, D, E et F lient le domaine extracellulaire des récepteurs CAR (Roelvink et al. 1998). Il existe d'autres récepteurs primaires de l'adénovirus :

- la desmogléine-2 (DSG-2), une cadhérine impliquée dans les jonctions cellulaires (Wang et al. 2011) et le cofacteur membranaire CD46 qui sont liés par les fibres des adénovirus d'espèce B (Trinh et al. 2012),

- le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) qui lie les fibres des HAdV-C et B,
- les héparanes sulfates qui sont liés également par les fibres des HAdV-C,
- les acides sialiques sont aussi utilisés par les HAdV-D (Nilsson et al. 2011).

Dans un premier temps, la tête de la fibre du virus reconnaît les récepteurs cellulaires primaires. L'interaction de la particule virale avec les récepteurs CAR conduit au mouvement des virus à la surface des cellules (Burckhardt et al. 2011). Ce mouvement est dépendant du système actine/myosine. La mobilité des récepteurs primaires induit le détachement de la fibre et l'exposition du motif RGD (arginine-glycine-aspartate) présent à la surface du penton-base des adénovirus à l'exception des HAdV-F. Le motif RDG du penton-base interagit alors avec les récepteurs cellulaires secondaires : les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ou $\alpha_M\beta_2$ (Wickham 1993). Les intégrines sont des récepteurs statiques et les différentes forces appliquées sur le virus conduiraient au désassemblage partiel de la particule virale, à la surface même des cellules, en commençant par le détachement des fibres du virus et à la rotation des pentamères de penton (Lindert et al. 2009; Burckhardt et al. 2011). L'interaction virus/intégrine active la transduction de signaux cellulaires (*via* l'activation de la voie des kinases PI-3K et de la famille des Rho-GTPase) conduisant au remodelage de l'actine et à l'endocytose clathrine-dépendante de la particule (Li et al. 1998; Meier and Greber 2004). Il a été montré que les adénovirus B entrent dans les cellules par macropinocytose (*via* l'activation de la PKC et de la famille Rho-GTPases) (Meier 2002; Kalin et al. 2010).

En moins de 10 min, la moitié des virus fixés aux cellules, se retrouve dans les endosomes où ils continuent leur désassemblage (**Schéma 5**).

4.2. *La protéine VI permet la rupture de la membrane endosomale*

Une fois entrée dans la cellule, le virus est prisonnier des endosomes et doit échapper à la voie de dégradation lysosomale.

Pour s'échapper de l'endosome, les AdV induisent une fragmentation de la membrane plutôt que la formation de pores (Wiethoff et al. 2005) comme peuvent le faire les réovirus, les picornavirus ou les parvovirus. Plusieurs facteurs ont été décrits comme responsables de la lyse des membranes par l'AdV.

Il a d'abord été proposé que l'échappement endosomal soit un événement dépendant du pH (Seth 1984). Cependant, l'inhibition de l'acidification des endosomes n'aurait pas d'impact sur l'entrée des virus (Rodriguez and Everitt 1996). En revanche, le pH acide des

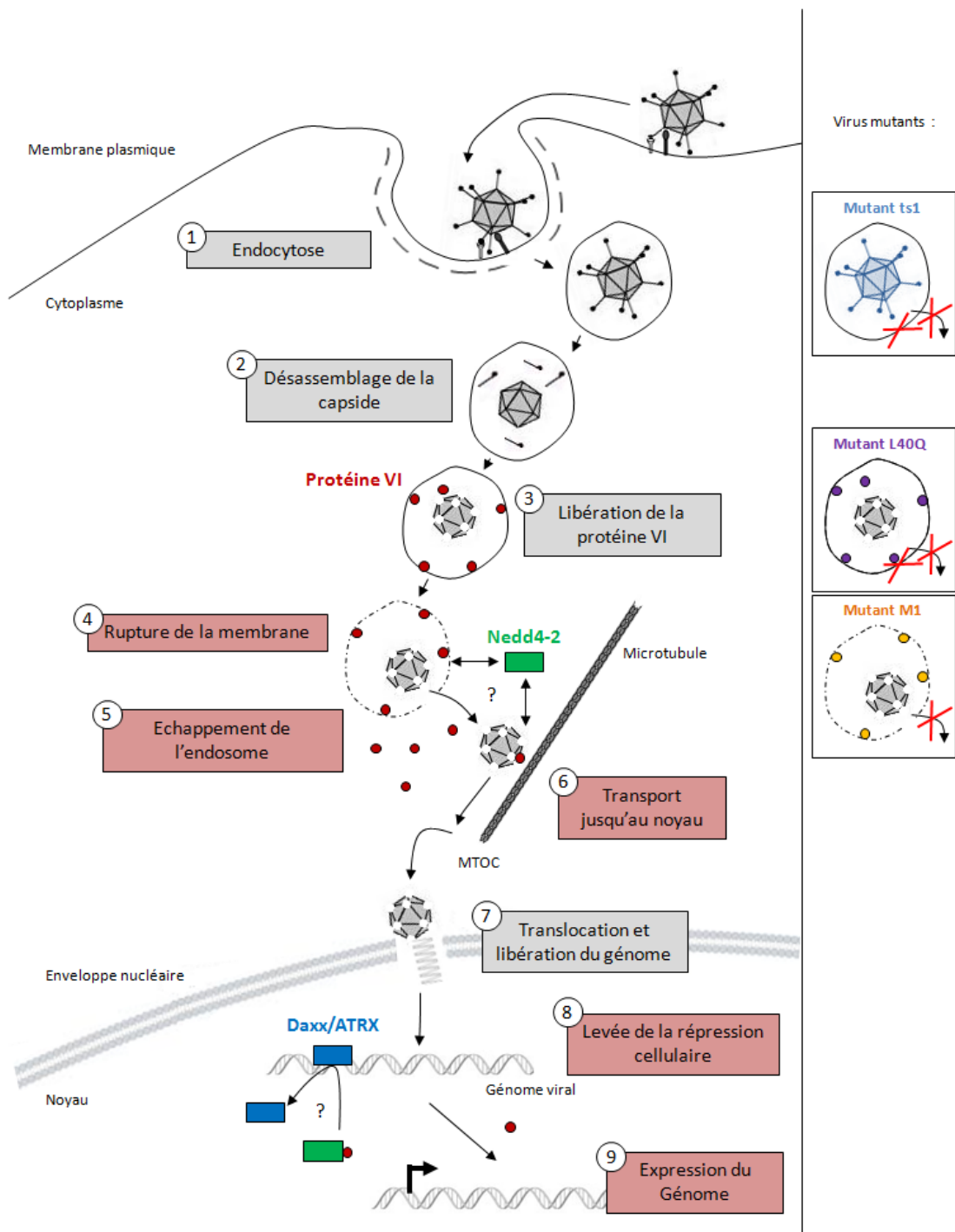


Schéma 5: Le rôle de la protéine VI dans l'entrée des Adénovirus. Après l'endocytose dépendante de la clathrine des AdV, la particule est partiellement désassemblée. La protéine VI est alors libérée et induit la rupture de l'endosome. L'interaction protéine VI/Nedd4-2 est responsable de la libération de la particule des endosomes et de leur trafic jusqu'au noyau. Après sa libération dans le noyau, la protéine VI lève la répression exercée par l'immunité intrinsèque sur le génome AdV et active l'expression des gènes viraux. Toutes les étapes où intervient la protéine VI sont représentées en rouge. A droite, sont représentés les différents virus mutants et l'étape de l'entrée à laquelle ils sont bloqués.

endosomes serait nécessaire au changement de conformation de la protéine de capsid hexon, nécessaire à l'étape de transport de la particule jusqu'au noyau (Scherer and Vallee 2015).

Des tests d'entrée réalisés avec un virus AdV muté au niveau de la protéase virale conduisant à la formation d'une capsid hyper-stable, appelé AdV-ts1, ont montré que ce virus mutant était incapable de lyser les endosomes (Wiethoff et al. 2005) (**Schéma 5**). Ces résultats ont montré l'importance de la maturation de la capsid par la protéase et la nécessité du désassemblage de la capsid afin de permettre la rupture de la membrane endosomale par l'AdV.

La localisation de la protéine VI sous les sommets de l'icosaèdre permettrait sa libération lors de la perte des hexons péripentonaux pendant le désassemblage de la capsid dans les endosomes (Reddy and Nemerow 2014). Cette libération serait due aux forces opposées créées par la mobilité des récepteurs primaires et l'immobilité des intégrines, appliquées sur la particule virale, conduisant au détachement des fibres, à la libération des penton-bases et par conséquent à l'exposition de la protéine de capsid VI (Reddy and Nemerow 2014; Snijder et al. 2014).

La protéine VI possède une hélice amphipatique capable de s'associer aux membranes (Wiethoff et al. 2005). La mutation L40Q de cette hélice induit une affinité et une capacité à rompre les membranes réduites du virus mutant AdV-L40Q (Moyer et al. 2011) démontrant que l'hélice amphipatique est nécessaire à la rupture des membranes. Une fois associée à la membrane, la protéine VI induirait une courbure positive de la bicouche lipidique qui serait responsable de la fragmentation et de la rupture de la membrane endosomale (Wiethoff et al. 2005; Maier et al. 2010; Moyer et al. 2011) (**Schéma 5**).

4.3. L'échappement endosomal et le transport jusqu'au noyau sont dépendants du motif PPXY

Des données du laboratoire montrent que la présence de membrane rompue provoque le recrutement de la machinerie de l'autophagie (Montespan *et al.* données non publiées). Le virus devrait être par la suite, capable de s'échapper de la voie de dégradation lysosomale et/ou de l'autophagie afin de transporter son génome jusqu'au site de réplication : le noyau.

Ainsi après la rupture de la membrane endosomale par la protéine VI, le virus s'échappe des endosomes rompus (Maier et al. 2012). Il a été montré que les étapes qui suivaient cette rupture étaient dépendantes de l'intégrité du motif PPxY de la protéine VI et de son interaction avec l'ubiquitine ligase cellulaire Nedd4-2 (Wodrich et al. 2010).

En effet, la protéine VI est capable de lier *via* son motif PPxY, certaines ubiquitine ligases E3 de la famille Nedd4 : la Nedd4-1, la Nedd4-2, Itch, WWP1 et WWP2. Son interaction avec la Nedd4-2 est la plus importante car seul le knock-down (KD) de la Nedd4-2 conduit à une diminution de l'infectivité de l'HAdV-5 et à un défaut d'accumulation des particules virales au MTOC (Wodrich et al. 2010). De plus, le virus mutant HAdV-5 M1 dont le motif PPSY de la protéine VI a été muté en PGAA et donc incapable de lier la Nedd4-2 se multiplie 20 fois moins que le virus sauvage (Wodrich et al. 2010). Si la rupture des endosomes par la protéine VI est toujours efficace en absence de motif PPxY, ce sont l'échappement et le transport des particules virales jusqu'à la périphérie nucléaire, au niveau du MTOC, qui sont affectés. Le motif PPxY de la protéine VI est impliqué dans la mobilité intracellulaire de la protéine, probablement associée à des structures vésiculaires, le long des microtubules (**Schéma 5**).

La protéine VI est ubiquitylée par la Nedd4-2 (Wodrich et al. 2010) mais le rôle de cette ubiquitylation et de la Nedd4-2 n'est pas encore élucidé. Elle pourrait être nécessaire au recrutement de facteurs cellulaires à identifier, impliqués dans la libération et/ou le transport de la particule virale et de la protéine VI jusqu'au noyau.

Lors du transport de la particule le long des microtubules jusqu'au noyau, une partie des protéines VI serait libérée dans le cytosol tandis qu'une autre resterait associée à la particule virale et serait impliquée dans le trafic des capsides le long des microtubules (Wodrich et al. 2010).

Le transport de la capside le long des microtubules passerait aussi par une interaction entre les protéines d'hexon et la dynéine (Bremner et al. 2009). Cette interaction serait dépendante du pH probablement nécessaire au changement de conformation des protéines de capside dans l'endosome (Scherer and Vallee 2011).

Les particules virales s'accumulent ensuite au niveau du MTOC avant d'être transloquées au niveau des pores nucléaires. Les mécanismes de transport sont méconnus à l'heure actuelle mais il semblerait qu'ils fassent intervenir la machinerie cellulaire d'import nucléaire et le facteur CRM1 (Strunze et al. 2005).

4.4. La libération du génome dans le noyau

Le désassemblage de la particule virale et la libération de l'ADN viral ont lieu au niveau des pores nucléaires (NPC) et plus précisément au niveau de la nucléoporeine Nup214 (Cassany et al. 2015). La fixation de la particule virale à la Nup214 (Trotman et al. 2001), le recrutement de la kinésine (Strunze et al. 2011) et l'intervention de la Nup358 permettraient

le désassemblage de la capsid et augmenteraient la perméabilité des pores nucléaires. L'ADN est alors libéré et le reste de la particule virale désassemblée est redirigé vers la périphérie. Le génome adénoviral, associé à la protéine virale VII est alors importé dans le noyau via la transportine, l'importine β et l'importine 7 (Trotman et al. 2001; Wodrich et al. 2006).

Puisque qu'une partie des protéines VI serait associée à la nucléocapside et à l'ADN du virus (Wiethoff and Nemerow 2015), la protéine VI pourrait aussi être importée dans le noyau avec le génome (**Schéma 5**).

4.5. L'activation de l'expression du génome, une nouvelle étape dépendante du « late domain » de la protéine VI

Au cours des différentes étapes de l'entrée des AdV dans la cellule, le virus doit faire face à l'activation de la réponse antivirale cellulaire. Le génome viral libéré dans le noyau est une des cibles de l'immunité intrinsèque associée au complexe Daxx/ATRAX. Ce complexe cellulaire est en effet capable de s'associer au génome viral et de bloquer son expression.

La protéine E1B-55k, une des protéines codées par l'unité de transcription E1B du virus, est capable de se à lier Daxx et d'induire sa dégradation par le protéasome (Schreiner et al. 2010) inhibant ainsi la réponse antivirale.

Cependant, pour que la transcription d'E1B-55k soit initiée, l'expression préalable d'E1A est nécessaire. Sa transcription est aussi soumise à la répression par le complexe Daxx/ATRAX. Le virus doit donc utiliser ses protéines de structure, présentes dès son entrée, pour lutter contre cette réponse antivirale. Ce type de contre-attaque a été décrit pour d'autres familles de virus. Par exemple, la protéine pp71 du tégument du CMV est capable de s'associer à Daxx et d'empêcher l'interaction Daxx/ATRAX. Ceci permet l'activation des promoteurs viraux.

La protéine VI des Adénovirus serait capable de lever la répression exercée par Daxx/ATRAX sur E1A et cela de manière dépendante du motif PPxY (Schreiner et al. 2012) (**Schéma 5**). Ici encore, l'interaction protéine VI/Nedd4 paraît être essentielle à la réplication du virus.

Sachant que le complexe Daxx/ATRAX est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes cellulaires (Ishov 2004), la protéine VI pourrait être capable d'interférer avec l'expression des gènes cellulaires. Une telle modulation permettrait au virus de convertir l'environnement cellulaire antiviral en un environnement optimal pour sa propre réplication. Cependant le rôle de la protéine VI dans la régulation des gènes cellulaires reste encore à définir.

Après activation de l'expression des gènes adénoviraux, les protéines nécessaires à la réplication du virus sont d'abord exprimés (E1A, E2A) en parallèle des protéines régulatrices détournant la machinerie cellulaire (E1B, E3 et E4). Enfin, les protéines « core » (V, VII, μ , IVa2, TP), les protéines mineures (IIIa, VI, VIII, XI) et majeures (hexon penton, fibre) de la capsid sont synthétisées.

4.6. *Le rôle de la protéine VI dans les phases tardives de l'infection adénovirale*

L'assemblage des virions a lieu dans le noyau. Ici encore, la protéine VI joue un rôle clef dans le cycle viral. En effet, les précurseurs nouvellement synthétisés de la protéine VI sont capables d'interagir avec la protéine hexon synthétisée dans le cytoplasme. L'hexon ne possède pas de NLS et la protéine VI assure son transport, *via* les importines α et β , jusqu'au noyau où sont assemblées les particules (Wodrich et al. 2003).

Les protéines antivirales codées par l'unité de transcription E3, telles que l'ADP (pour « Death Adenoviral Protein » ou protéine E3-11.6K) vont permettre la lyse de la cellule (Tollefson et al. 1996) et la libération des nouveaux virions.

5. La fonction « précoce » du « late domain » des AdV

Ainsi l'AdV, un virus non-enveloppé possède lui aussi, des « late domains ». En effet des motifs de types PPxY ont été retrouvés sur les protéines penton-base (Galinier et al. 2002) et sur la protéine de capsid VI (Wodrich et al. 2010) de tous les types d'HAdV. De plus les HAdV-21 et 50 possèdent un second « late domain » de type PSAP (données du laboratoire non publiées) dont la fonction reste à définir. La protéine VI est capable d'interagir avec la famille des ubiquitine ligases Nedd4 et de recruter la machinerie d'ubiquitylation qui lui est associée. Tout comme chez les virus enveloppés, la présence de ces « late domains » et leur intégrité sont nécessaires à la réplication de l'adénovirus.

Les étapes principales de la réplication d'un virus sont **l'entrée** dans la cellule, **l'expression des gènes** et la réplication du génome, **l'assemblage** et la libération. La protéine VI est impliquée dans 3 de ces 5 étapes majeures (en gras) et l'implication de son motif PPxY a été décrite dans l'entrée et l'expression des gènes de l'AdV. Ainsi l'interaction protéine VI/Nedd4-2 est responsable de la libération de la particule des endosomes, de son trafic jusqu'au noyau et joue probablement un rôle dans l'activation de la transcription du génome viral, soit tout au long des étapes précoces cycle viral. Empêcher cette interaction inhibe la

réplication de l'adénovirus (Wodrich et al. 2010) et cela dès le début de l'infection. L'interaction PPxY/Nedd4 constitue donc une cible de choix pour un antiviral.

Chapitre 4 : Les ubiquitine ligases E3 de la famille Nedd4

1. L'ubiquitylation

1.1. *L'ubiquitine : une modification post-traductionnelle*

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés. La liaison covalente d'une ubiquitine sur une protéine constitue une modification post-traductionnelle qui adresse la protéine modifiée vers différentes voies de dégradation cellulaire. Elle a été découverte par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose à la fin des années 1970 et ceux ci ont reçu le prix Nobel de chimie de 2004 (Coux 2011).

Une des premières voies de dégradation des protéines associées à l'ubiquitine est celle associée au protéasome appelée système UPS pour « Ubiquitin-Proteasome System ». Ce système fait intervenir le protéasome 26S. Le protéasome est constitué d'un cœur catalytique (protéasome 20S) associé à une ou deux parties régulatrices (protéasomes 19S). Il est ainsi chargé de reconnaître les protéines ubiquitylées et de les dégrader par hydrolyse des liaisons peptidiques (Coux 2011).

Le système UPS a d'abord été défini comme un système de « nettoyage » de la cellule et par la suite, il a été impliqué dans d'autres processus: la voie de dégradation associée au réticulum-endoplasmique (ERAD pour « endoplasmic-reticulum-associated protein degradation »), la régulation des suppresseurs de tumeurs, l'apoptose, la réplication et la prolifération cellulaire (Coux 2011).

Une deuxième voie de protéolyse dépendante de l'ubiquitine a été mise en évidence par la suite, appelée voie de dégradation lysosomale. Cette voie ne fait pas intervenir le protéasome mais le lysosome : un système de protéolyse vésiculaire contenant des hydrolases actives à un pH acide. Les protéines de surface endocytées (Harper and Schulman 2006) ou provenant de l'appareil de Golgi, lorsqu'elles sont ubiquitylées, peuvent être recyclées et adressées de nouveau vers la surface cellulaire ou bien être dégradées par la voie lysosomale. Les protéines sont alors ciblées vers les vésicules internes des MVB (Katzmann, Babst, and Emr 2001; Urbanowski and Piper 2001) puis les vésicules fusionnent avec les lysosomes, dans lesquels sont dégradées les protéines (Hicke 2001, 200). La voie d'endocytose et de dégradation des protéines de surface ubiquitylées fait intervenir la machinerie ESCRT impliquée dans la

biosynthèse des MVB. Le détournement de l'ubiquitylation et de la machinerie ESCRT a largement été décrit lors du bourgeonnement des virus enveloppés *via* leurs « late domains » (Cf. *Chapitre 2*).

L'ubiquitine est considérée comme une modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation de la dégradation des protéines mais également dans la régulation de leur fonction, de leur localisation et de leurs interactions *via* l'adressage vers des voies de signalisation cellulaire différentes de la protéolyse (Coux 2011). Récemment, un lien a été établi entre les ubiquitines et les ubiquitine ligases E3 dans la régulation de l'autophagie. L'autophagie est un mécanisme d'auto-dégradation nécessaire au maintien de l'équilibre énergétique de la cellule en développement ou en réponse à un stress énergétique (Glick, Barth, and Macleod 2010). L'autophagie exerce également des fonctions antivirales en capturant les virus ou les facteurs viraux et en les dirigeant vers la voie de dégradation lysosomale, un mécanisme appelé xénophagie. Elle collabore aussi avec le système immunitaire en adressant les protéines virales aux senseurs immunitaires (TLR-7, CMH-II, RIG-1). Certains virus utilisent l'autophagie et notamment les structures en double membrane caractéristiques des autophagosomes pour permettre leur réplication (ex : le VIH-1, les Poliovirus, le Coxsackievirus B3, l'HCV, les Rotavirus) (Kudchodkar and Levine 2009). Les ubiquitines permettraient de réguler la dégradation ou la stabilisation des membres de la machinerie de l'autophagie mais également de permettre le recrutement de protéines adaptatrices (Kuang, Qi, and Ronai 2013).

1.2. *L'ubiquitylation des protéines*

i. Les enzymes

Les premières enzymes à intervenir dans la cascade d'ubiquitylation des protéines sont les dé-ubiquitylases (DUB), des hydrolases qui vont permettre la libération d'ubiquitines. Les ubiquitines sont exprimées sous forme de précurseurs protéiques formant des chaînes d'ubiquitines ou bien associées aux sous-unités ribosomales (Wilkinson 1997; Stringer and Piper 2011). Ensuite les ubiquitines libres vont pouvoir être liées à des substrats protéiques cibles par une réaction d'ubiquitylation.

L'ubiquitylation fait intervenir trois types d'enzymes appelées E1, E2 et E3 (**Schéma 6**).

- L'ACTIVATION : l'ubiquitine est d'abord covalamment liée et activée de manière dépendante de l'ATP, à un résidu cystéine de la protéine E1 dite « activatrice ».

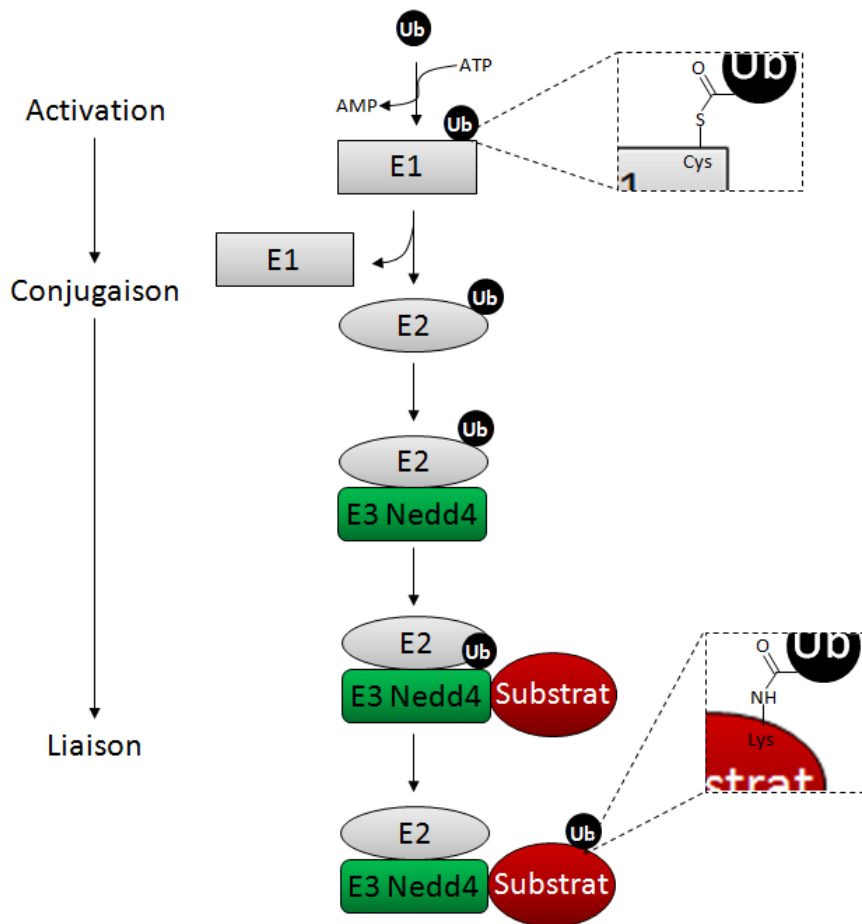


Schéma 6: La réaction d'ubiquitylation. L'ubiquitylation est une réaction enzymatique faisant intervenir les protéines E1, E2 et E3 et conduisant à la liaison isopeptidique d'un ou plusieurs groupements d'ubiquitine sur un substrat protéique. Elle débute par une étape d'activation au cours de laquelle l'ubiquitine est covalamment liée et activée de manière dépendante de l'ATP, à un résidu cystéine de la protéine E1. Puis l'ubiquitine est transférée à l'enzyme E2 dans une étape de conjugaison. Enfin l'enzyme E3, la Nedd4 sur le schéma, lie l'ubiquitine *via* son résidu glycine en C-terminal et le transfère au groupement amine d'un résidu lysine de la protéine cible, ici la protéine VI.

- LA CONJUGAISON : l'ubiquitine est transférée à l'enzyme E2 dite « de conjugaison ».
- LA LIAISON : l'enzyme E3 dite « ligase » ou le complexe E3/E2 (en fonction du type de E3), lie l'ubiquitine *via* son résidu glycine en C-terminal et la transfère au groupement amine d'un résidu lysine (en général) de la protéine cible, formant ainsi une liaison isopeptidique (Vogt 2000; Freed 2002).

L'enzyme E3 qui nous intéresse dans ce manuscrit est la famille des Nedd4 appartenant aux E3 de type HECT dont la réaction d'ubiquitylation est représentée sur le **Schéma 6**.

ii. Les différentes ubiquitylations

L'ubiquitine est une protéine comportant sept lysines qui peuvent à leur tour être ubiquitylées et permettre la formation de chaînes d'ubiquitines. Les protéines peuvent ainsi être mono-ubiquitylées, multi-ubiquitylées sur plusieurs lysines ou poly-ubiquitylées avec des chaînes d'ubiquitine (**Schéma 7**).

Il existe différentes chaînes d'ubiquitines associées à différents adressages des substrats protéiques dans la cellule. Les chaînes les plus connues sont celles liées à la lysine K48 et à la lysine K63 de l'ubiquitine. Les signaux associés aux différentes ubiquitylations sont très variés mais on peut classer grossièrement la chaîne K48 comme un adressage des protéines au protéasome (Chau et al. 1989) et les chaînes K63 ainsi que les mono-ubiquitylations comme un signal d'adressage vers la voie de dégradation lysosomale (Welchman, Gordon, and Mayer 2005). En réalité, beaucoup de fonctions autres que la dégradation sont associées à ces ubiquitylations comme l'endocytose, le trafic intracellulaire, la régulation de l'autophagie (Platta et al. 2012), la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la réponse inflammatoire ou encore la transduction de signaux cellulaires (Coux 2011).

iii. Les ubiquitine ligases E3

Les ubiquitine ligases E3 sont des facteurs essentiels à la réaction d'ubiquitylation car ils sont responsables de la reconnaissance du substrat (Robinson 2004). Cette fonction est soulignée par la quantité importante d'ubiquitine ligases dans les cellules humaines. En effet, il existe plusieurs famille d'ubiquitine ligases E3 : les ubiquitine ligases à domaine RING (pour « **R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene »), les U-box (des RING-like) et les HECT.

Dans ce manuscrit, je me focaliserai sur les ubiquitine ligases de type HECT car certaines de ces E3 sont capables de reconnaître et de lier les « late domains » viraux. Elles sont ainsi

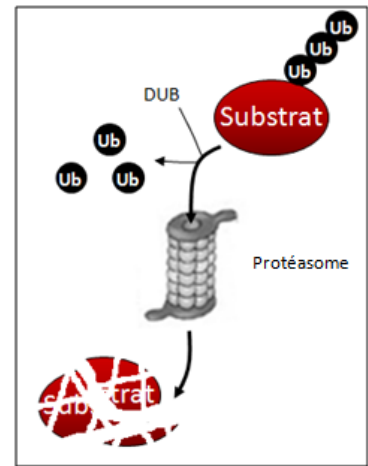
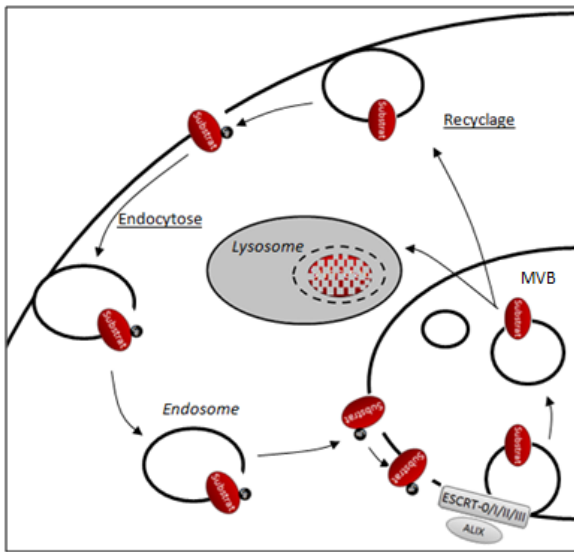
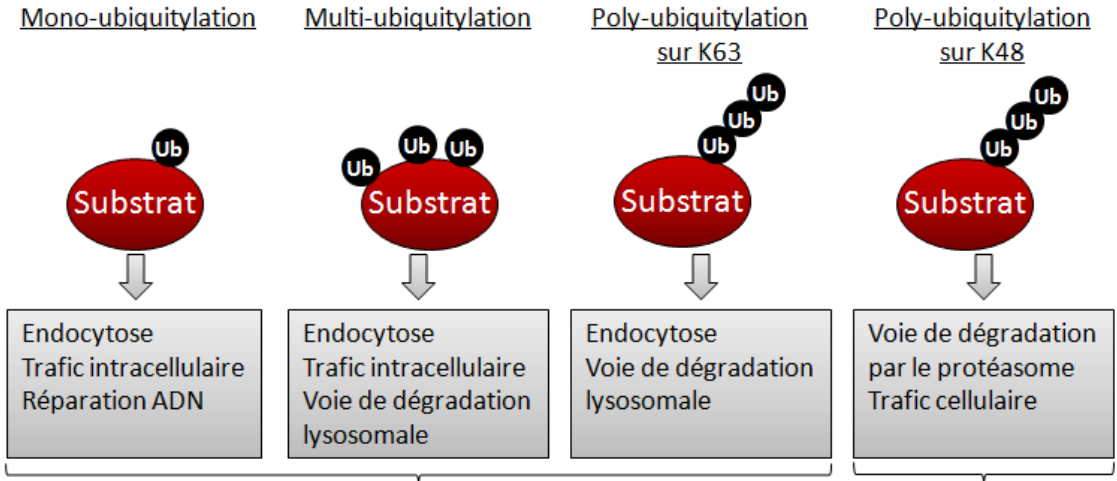


Schéma 7: Signalisation cellulaire associée aux différents types d'ubiquitylation. Il existe différentes chaînes d'ubiquitines associées à différents adressages des protéines dans la cellule. La poly-ubiquitylation K48 cible essentiellement les protéines vers le protéasome (*schéma de droite*). La mono-ubiquitylation induit principalement l'endocytose des protéines tout comme la poly-ubiquitylation K63 et la multi-ubiquitylation qui ciblent ensuite les protéines vers la voie de dégradation lysosomale (*schéma de gauche*). D'autres fonctions que la dégradation sont associées à ces ubiquitylations comme l'endocytose, le trafic intracellulaire ou la réparation de l'ADN.

impliquées dans un grand nombre d'interactions protéine/protéine (IPP) virus /hôte, comme celles décrites dans le Chapitre 2 (partie 3), de cette introduction.

2. Les ubiquitine ligases Nedd4 : une famille d'E3 de type HECT

Les ubiquitine ligases E3 de type HECT ont été les premières E3 décrites en 1995 (Huibregtse et al. 1995). Elles possèdent toutes un domaine HECT pour « **H**omologous to the **E6-AP Carboxyl Terminus** », dont la séquence est très similaire à la partie C-terminale de l'ubiquitine ligase E6AP. Le domaine HECT possède une activité enzymatique et catalyse directement la liaison de l'ubiquitine au substrat protéique grâce à la formation d'un complexe intermédiaire ubiquitine-HECT durant la réaction. Les autres protéines E3 n'appartenant pas à la famille HECT ne semblent pas avoir d'activité enzymatique. Les E3 HECT comptent 28 membres répartis dans :

- la famille Nedd4 qui compte 9 membres caractérisés par la présence de domaines WW,
- la famille HERC composée de 6 membres et définie par la présence de domaines RLD (pour « RCC1-like domains »),
- les autres HECT, ne faisant partie ni de la famille de Nedd4, ni des HERC, au nombre de 13 parmi lesquelles on retrouve l'ubiquitine ligase E6AP (Scheffner and Kumar 2014).

Les ligases de la famille Nedd4 possèdent :

- un domaine HECT,
- un domaine C2 : un domaine de liaison aux lipides, calcium dépendant, qui est responsable de la localisation de la protéine.
- 1 à 4 domaines WW : des domaines d'interaction protéine-protéine, constitués de deux tryptophanes séparés par 22 acides aminés formant 3 feuillets β antiparallèles (Macias, Wiesner, and Sudol 2002; Staub 2006b). Ces domaines sont responsables de la reconnaissance des substrats possédant des motifs de type (L/P)PxY (Kanelis, Rotin, and Forman-Kay 2001; Kasanov et al. 2001).

Les 9 membres de la famille Nedd4 sont Nedd4 (ou Nedd4-1), Nedd4-2 (ou Nedd4L), Itch (ou AIP4), WWP1, WWP2, Smurf1, Smurf2, NEDL1 (ou BUL1) et NEDL2 (ou BUL2). Le domaine C2 est conservé chez tous les membres excepté chez une isoforme NEDD4-2/ Δ C2

de la Nedd4-2 dont le domaine C2 est tronqué suite à un épissage alternatif (Itani et al. 2003). Tous possèdent un nombre variable de domaines WW (1 à 4) et un seul domaine HECT.

3. Fonctions cellulaires des Nedd4

Les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 sont impliquées dans de nombreuses fonctions comprenant l'ubiquitylation de protéines membranaires ou des protéines de la machinerie du trafic vésiculaire (Staub 2006a).

Les membres de la famille Nedd4 sont plutôt responsables de la formation de chaîne d'ubiquitine K63, impliquée généralement dans la signalisation de la voie lysosomale ou des voies non protéolytiques (ex : endocytose, trafic intracellulaire, réparation de l'ADN, réponse inflammatoire, (Coux 2011), mais elles sont également capables de faire des chaînes d'ubiquitine K48 impliquées dans la dégradation des protéines par le protéasome (Kim and Huibregtse 2009).

L'endocytose dépendante de l'ubiquitine a d'abord été décrite chez la levure, identifiant l'ubiquitine ligase *Rsp5*, homologue des Nedd4 chez l'Homme (Hein et al. 1995) révélant la conservation du système d'ubiquitylation entre la levure et l'Homme.

Du fait de ses multiples domaines WW, la famille Nedd4 peut potentiellement interagir avec de très nombreuses protéines (Scheffner and Kumar 2014). Les implications des Nedd4 dans un grand nombre de fonctions cellulaires *via* des interactions avec des transporteurs, des canaux ioniques, des récepteurs, des kinases, tend à confirmer cela (Yang and Kumar 2010).

3.1. *La Nedd4 (ou Nedd4-1)*

La Nedd4 est le membre le plus connu des ubiquitine ligases E3 car il est le premier à avoir été identifié en 1992 (Kumar 1992). Elle est responsable de la régulation des récepteurs à l'insuline et, est donc impliquée dans la croissance (Cao et al. 2008). Elle est aussi impliquée dans la croissance et l'arborisation des neurones (Drinjakovic et al. 2010). La Nedd4 permet aussi d'augmenter la réponse immunitaire adaptative en provoquant l'activation des lymphocytes T (Yang et al. 2008) et serait impliquée dans le développement vasculaire (Fouladkou et al. 2010).

3.2. *La Nedd4L (ou Nedd4-2)*

La Nedd4-2 a été identifiée en 1996 par Staub *et al.* comme partenaire des sous-unités des canaux sodiques épithéliaux ENaC (pour « **E**pithelial sodium [**Na**] **C**hannel ») (Staub et al.

1996). Ces canaux possèdent des motifs PPxY au niveau du domaine cytoplasmique de chacune de leurs sous-unités et lient la Nedd4-2 *via* ses domaines WW (Fotia et al. 2004a, 200). Cette interaction permet l'ubiquitylation, l'endocytose et la dégradation lysosomale de ces récepteurs (Staub 2006a). La régulation par la Nedd4-2 de plusieurs canaux et transporteurs possédant des motifs PPxY a ensuite été découverte (Scheffner and Kumar 2014). La Nedd4-2 régule ainsi les co-transporteurs du chlore NCC (pour « thiazide-sensitive Na^+ - Cl^- Cotransporter »), elle est de ce fait impliquée dans l'hypertension (Ronzaud et al. 2013). La Nedd4-2 régule également les canaux sodiques voltage-dépendants Nav (à la différence des canaux ENaC qui sont dépendants de l'amiloride) et les canaux potassiques KCNQ (pour « Potassium [**K**] **C**hannel, Voltage-Gated, **KQT**-like subfamily ») (Fotia et al. 2004b). La Nedd4-2 régule aussi les transporteurs de la dopamine (Sorkina et al. 2006). De plus, son interaction avec la protéine Dishevelled 3 (Dsl3), une protéine responsable de la polarisation cellulaire, l'impliquerait dans l'intégrité des jonctions cellulaires épithéliales (Van Campenhout et al. 2011).

3.3. *Les autres membres de la famille Nedd4*

Les autres membres de la famille Nedd4 sont les ubiquitine ligases Itch, WWP1 et WWP2, Smurf1 et Smurf 2, NEDL1 et NEDL2. Elles sont moins étudiées et donc moins connues. Cependant leurs fonctions et leurs cibles cellulaires sont toutes aussi variées et impliquées dans de multiples voies de signalisation. On les retrouve ainsi impliquées, dans la régulation du système immunitaire *via* par exemple la régulation des fonctions des cellules T, la réponse allergique, l'inflammation et la réponse innée antivirale. Elles régulent les suppresseurs de tumeur (la famille p53, PTEN) et sont impliquées dans la prolifération cellulaire, dans la réponse aux dommages à l'ADN ou dans le transport des métaux (Scheffner and Kumar 2014).

4. Les Nedd4 et les virus : des IPP virus/hôte communes

Comme décrit dans le chapitre 2, les virus possèdent des « late domains » dont fait partie le motif PPxY capable de se lier aux domaines WW des ubiquitine ligases de la famille Nedd4. Ces interactions permettent aux virus de recruter la machinerie cellulaire d'ubiquitylation nécessaire à la réplication des virus et aux étapes de trafic cellulaire ou dans le bourgeonnement des virus. Un grand nombre d'interactions entre les Nedd4 et les virus a été décrit et elles sont résumées dans le **Tableau 2**.

| Genre | Espèce | Protéine | Motif | Fonction générale | Interaction avec les membres de la famille Nedd4 | Ref. |
|------------------------------------------|-----------------------------|------------|-------|----------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>Adenoviridae (ADN, non-enveloppé)</i> | | | | | | |
| Adenovirus | Mastadenovirus | VI | PPSY | Protéine du virion | Nedd4, Nedd4-2, Itch, WWP1 | Wodrich, 2010 |
| | Mastadenovirus | penton | PPSY | Protéine du virion | Nedd4, WWP1 | Galinier, 2002 |
| <i>Herpesviridae (ADN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Simplexvirus | HSV 1 | UL56 | PPPY | Protéine du virion | Itch, Nedd4 | Ushijima, 2008, Ushijima, 2010 |
| Lymphocryptovirus | HSV 4 | LMP2A | PPPY | Protéine de membrane | Nedd4, Itch, WWP2 | Ikeda, 2000 |
| <i>Reoviridae (ARN, non-enveloppé)</i> | | | | | | |
| Orbivirus | Bluetongue virus | NS3 | PPSY | Protéine de membrane | Nedd4, Itch, WWP1 | Wirblich, 2006 |
| <i>Filoviridae (ARN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Ebola virus | Virus Ebola | VP40 | PPEY | Protéine du virion | Rsp5*, Nedd4, WWP1 | Harty, 2000, Yasida, 2003, Timmins, 2003, Martin-Serrano, 2005 |
| Marburgvirus | Virus de Marburg | VP40 | PPPY | Protéine du virion | Nedd4 | Urata, 2010 |
| <i>Rhabdoviridae (ARN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Vesiculovirus | VSV | M | PPPY | Protéine du virion | Rsp5, Nedd4 | Harty, 1999, Harty, 2001, Irie, 2004 |
| Lyssavirus | Virus de la rage | M | PPEY | Protéine du virion | Nedd4 | Harty, 1999, |
| <i>Arenaviridae (ARN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Arenavirus | Virus de Lassa | Protéine Z | PPPY | Protéine du virion | Nedd4 | Fehling, 2012 |
| <i>Retroviridae (ARN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Deltaretrovirus | HTLV | Gag | PPPY | Protéine du virion | Nedd4, Itch, WWP1, WWP2 | Sakurai, 2004, Heidecker, 2007, Martin-Serrano, 2011 |
| | Virus Mason-Pfizer du singe | Gag | PPPY | Protéine du virion | NEDL1 (ou BUL1) | Yasuda, 2002 |
| Alpharetrovirus | RSV | Gag | PPPY | Protéine du virion | LDI1* et LDI2* | Kikonyogo, 2001 |
| <i>Hepadnaviridae (ADN, enveloppé)</i> | | | | | | |
| Orthohepadnavirus | HBV | core | PPSY | Protéine du virion | Nedd4 | Rost, 2006 |

*Rsp5: homologue de Nedd4 chez la levure, LDI1 et LDI2: homologue de Nedd4 chez le poulet

Tableau 2: Les protéines virales interagissant avec les ubiquitine ligases de la famille Nedd4.

Chez les *Herpesviridae*, des virus à ADN enveloppés, la protéine UL56 du HSV-2 (Herpes simplex de type 2) interagit avec itch et Nedd4 (Ushijima et al. 2010) tout comme la protéine LMP2A du HSV-4 (EBV) qui interagit également avec WWP2 (Ikeda et al. 2000). Parmi les *reoviridae*, le BTV code pour une protéine non-structurale NS3 capable de lier Nedd4, WWP1 et itch (Wirblich, Bhattacharya, and Roy 2006). Dans la famille des *Filoviridae*, la protéine VP40 du virus Ebola est capable de lier la Nedd4 (Harty et al. 2000; Timmins et al. 2003) (Yasuda et al. 2003) et WWP1 (Martin-Serrano 2004), celle du virus de Marburg lie elle aussi la Nedd4 (Urata and Yasuda 2010). Les protéines de matrice du VSV et du virus de la rage (*Rhabdoviridae*), interagissent avec la Nedd4 (Irie et al. 2004). La protéine core de l'HBV, un *Hepadnaviridae*, interagit également avec Nedd4 (Rost et al. 2006). Chez les *Retroviridae*, le précurseur Gag du HTLV-1 lie Nedd4 (Sakurai et al. 2004), WWP1 (Heidecker et al. 2007), WWP2 et itch (Rauch and Martin-Serrano 2011) tandis que le précurseur Gag du RSV lie les homologues des Nedd4 chez le poulet (LDI-1 et 2) (Kikonyogo et al. 2001). On retrouve également une interaction entre le membre BUL1 (NEDL1) de la famille Nedd4 et la protéine Gag du MPMV décrite par Yasuda et al, en 2002 (Yasuda 2002). Le précurseur Gag du MLV peut également lier WWP1, WWP2 et itch (Martin-Serrano 2004). Enfin la protéine de penton des adénovirus lie la Nedd4 (Galinié et al. 2002) et, comme décrit dans le Chapitre 2, la protéine VI de capsid est capable de se lier à Nedd4-1, Nedd4-2, itch et WWP1 (Wodrich et al. 2010).

5. L'interaction motif PPxY/Nedd4 : une cible antivirale à large spectre

Comme décrit dans le Tableau 2, tous les types de virus, qu'ils soient à ADN, à ARN, enveloppés ou non, utilisent les ubiquitine ligases E3 de la famille Nedd4, *via* des interactions avec leurs « late domains » de type PPxY, pour permettre leur réplication. Ces interactions motif PPxY viral/Nedd4 sont nécessaires au recrutement de la machinerie d'ubiquitylation qui permet, de manière directe (en ubiquitylant les protéines) et/ou indirecte (en recrutant d'autres facteurs cellulaires), l'entrée, le trafic des particules, la réplication ou la libération des virus.

Ainsi l'interaction motif PPxY/Nedd4 est impliquée dans toutes les étapes de la réplication des virus et constitue donc une cible idéale pour un antiviral à large spectre.

Chapitre 5 : Les HTS biochimiques et la découverte de nouveaux antiviraux

La façon la plus rapide et la moins coûteuse pour trouver des inhibiteurs d'interaction protéine/protéine (IPP) s'appelle la « réorientation de médicament ». Cette stratégie consiste à réaliser un criblage sur des banques de composés chimiques possédant des activités biologiques connues ou des médicaments déjà approuvés par les agences de santé (de Chassey et al. 2012). La découverte d'inhibiteurs dans ces banques de composés a l'avantage d'accélérer leur utilisation car ces molécules sont déjà décrites comme biodisponibles et sans danger pour l'homme (des essais cliniques ont souvent été réalisés, les voies d'administration définies et les doses établies chez l'Homme).

1. Le criblage à haut débit (HTS)

1.1. *Le principe du HTS*

Tester un grand nombre de composés peut prendre beaucoup de temps et c'est pour cela que la recherche a vu naître les techniques de criblage de composés chimiques, biologiques ou génétiques à haut débit ou HTS pour « High-throughput screening » (Walters and Namchuk 2003). Le principe du HTS est qu'il soit automatisé et repose donc sur l'utilisation de plateformes techniques composées de robots pour la distribution des composés dans des microplaques ainsi que de machines spécifiques à la détection des signaux et l'analyse des résultats.

1.2. *Les banques de composés*

Il existe différentes banques de composés chimiques disponibles sur le marché allant de très grandes banques à près d'un million de composés (ex : la banque « Life Chemicals » de 930 000 composés) aux banques spécialisées ciblant un type de composé (ex : anti-infectieux en tout genre, inhibiteurs de kinase, ligands des canaux ioniques ou molécules impliquées dans la voie de l'autophagie). Parmi les banques les plus criblées dans la recherche d'antiviraux inhibiteurs d'IPP, on retrouve :

- La banque « Prestwick chemical library » de 1280 médicaments approuvés par les agences de santé américaines (FDA pour « Food and Drug Administration ») et/ou

européenne (ex : ANSM pour « Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé » en France).

- La banque de composés LOPAC pour « Library Pharmacologically Active Compounds » constituée de 1280 composés sélectionnés par des pharmaciens.
- La librairie NIH « Molecular Library Small Molecule Repository » de 307520 composés.
- La NIH « Clinical Collection » (NIHCC) composée essentiellement de médicaments en phase I à III des tests cliniques.
- La « MicroSource Spectrum collection » composée de 2320 petites molécules issues de médicaments, de produits naturels ou de molécules bioactives.
- L'« HitFinder Collection » comprenant 14400 composés issus de la banque « Maybridge Screening Collection », elle-même composée de 53000 molécules organiques synthétiques.

1.3. *Les méthodes d'HTS*

L'HTS est utilisé pour l'identification de biomarqueurs associés à des maladies (ex : marqueurs biochimiques tels que les hormones ou les métabolites) mais également pour la découverte de drogues anticancéreuses, antivirales, antibactériennes ou antiparasitaires par exemple. Des méthodes de HTS cellulaires ou biochimiques sont développées pour permettre la découverte de nouveaux composés.

i. Les méthodes d'HTS cellulaires

Les HTS cellulaires sont basés sur la détection des effets des composés chimiques, biologiques ou ARN interférents sur les voies de signalisation cellulaires par des tests de prolifération cellulaire, de changement de flux ionique ou par l'utilisation de gènes rapporteurs. Des expériences complémentaires doivent ensuite être menées afin de définir les cibles cellulaires de ces molécules. Grâce aux HTS cellulaires, des molécules régulatrices de la réplication des virus de la grippe (Inglese et al. 2007) ou de l'hépatite C (Hao et al. 2007) ou bien des molécules immunomodulatrices (Patel et al. 2012) ont pu être identifiées (de Chasse et al. 2012).

ii. Les méthodes d'HTS biochimiques

Les HTS biochimiques nécessitent la purification des partenaires protéiques dont on veut trouver des inhibiteurs. Je ne présenterai en détails que les méthodes d'HTS biochimiques les plus couramment utilisées pour la découverte d'inhibiteurs IPP. Elles comportent des techniques utilisant la fluorescence ou la luminescence (Inglese et al. 2007; Arkin et al. 2015).

Dans la description des techniques, seront notées « A » et « B » les protéines à l'origine de l'IPP que l'on souhaite dissocier à l'aide de nouveaux inhibiteurs (**Schéma 8**).

2. Les techniques d'HTS biochimiques

2.1. L'ELISA ou la DELFIA

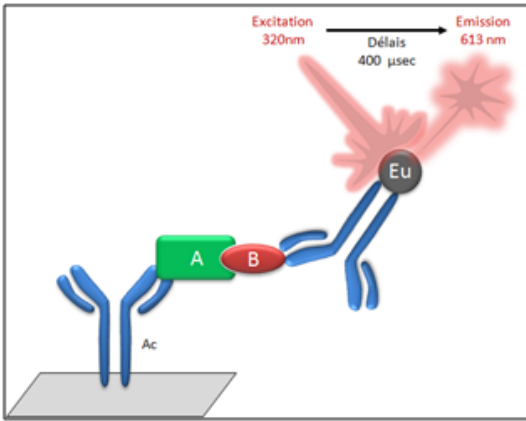
L'ELISA pour « **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** » est une méthode classique de dosage immunoenzymatique utilisant donc des anticorps liés à une enzyme permettant la détection d'une protéine. Ainsi une protéine « A » est fixée au fond des puits d'une microplaque. Après ajout de la seconde protéine « B », une étape de lavage est réalisée afin de supprimer les protéines non liées. Puis un anticorps spécifique de la protéine « B » est ajouté dans les puits. Une nouvelle étape de rinçage permet l'élimination des anticorps non liés. Le deuxième anticorps est lié à une enzyme qui, lorsque l'on ajoute son substrat dans le puits, produit un signal fluorescent ou chimioluminescent. Ainsi l'intensité du signal détecté est proportionnelle à la quantité de complexes « A-B » formés et ce signal diminue en présence d'inhibiteurs capables d'empêcher la formation du complexe protéique (**Schéma 8**).

Par un HTS ELISA, l'équipe de Malecka *et al.* a trouvé des inhibiteurs du complexe protéique E6/ubiquitine ligase E6AP formés par deux protéines du papillomavirus, capables de bloquer la dégradation du suppresseur de tumeur p53 (Malecka et al. 2014).

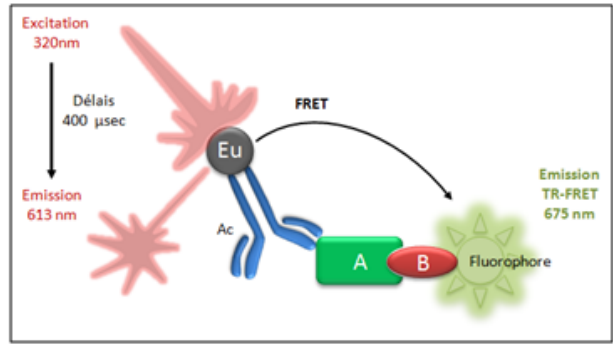
Le DELFIA, pour « **Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Assay** » est une version non enzymatique de l'ELISA. Cette technique utilise les propriétés de l'ion lanthanide (Ln) fixé sur l'anticorps qui permet un temps de fluorescence plus long. On parle de « time-resolved » fluorométrie. Cette technique permet de réduire significativement le bruit de fond (**Schéma 8A**).

Cependant ces techniques demandent plusieurs étapes de lavage, on parle alors d'essais en phase hétérogène. Les phases de lavage augmentent le temps des tests et ces techniques ne sont donc pas les plus optimales pour les criblages à haut débit mais leur grande fiabilité fait qu'elles sont largement utilisées.

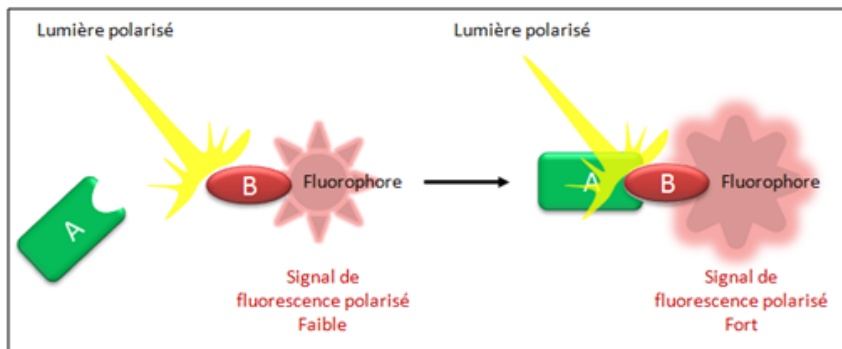
A - DELFIA



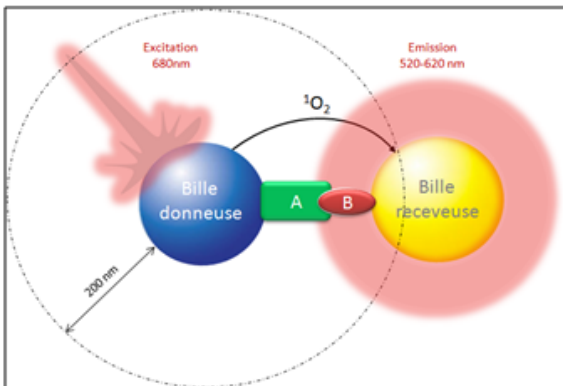
B - TR-FRET



C - FP « Fluorescence Polarization »



D - ALPHA



E - BRET

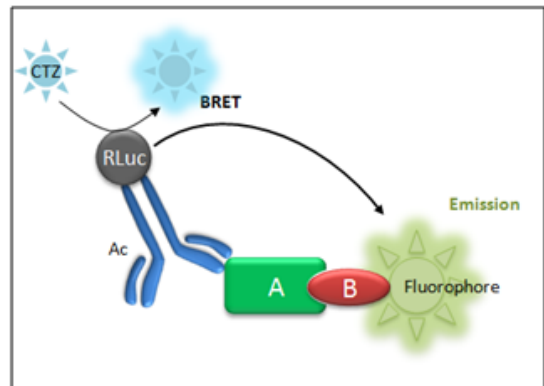


Schéma 8: Les techniques d'HTS biochimiques. Il existe différentes techniques d'HTS biochimique, les techniques les plus utilisées sont illustrées dans ce schéma. On peut observer différentes techniques: (A) le DELFIA, (B) le FRET (C) la FP et (D) l'ALPHA. Les protéines de l'interaction étudiée sont noté « A » (en vert) et « B » (en rouge).

2.2. *Le FRET et TR-FRET (aussi appelé LANCE ou HTRF)*

FRET pour « Fluorescence Resonance Energy Transfer » est une technique basée sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Contrairement au DELFIA, le FRET est réalisé en phase homogène, c'est-à-dire que la lecture des résultats se fait directement à partir du mélange réactionnel, sans l'intervention d'étapes de lavage. La protéine « A » donneuse est liée à un fluorophore (ex : protéines fluorescentes bleu BFP ou cyan CFP). La protéine « B » receveuse est quant à elle liée à un autre type de fluorochrome (ex : protéine fluorescente verte GFP ou jaune YFP). Les spectres d'excitation et d'émission des deux fluorophores doivent être compatibles. L'excitation de la molécule donneuse conduit à l'émission d'un signal fluorescent qui est transmis par résonance et permet l'excitation de la molécule receveuse qui émet un signal fluorescent. Ce signal a lieu à condition que les deux protéines soient assez proches (distance < 10 nm) pour permettre le transfert d'énergie. Un inhibiteur de l'interaction conduira à la diminution du signal fluorescent (**Schéma 8B**).

La technique du FRET a l'inconvénient d'émettre un signal qui peut être rapidement contaminé par l'auto-fluorescence des composés ou du milieu. De plus, l'analyse du signal est biaisée par le fait que les spectres d'absorption et d'émission des molécules donneuses et receveuses peuvent se chevaucher. Ainsi tout comme l'ELISA, la technique du FRET a été améliorée par la combinaison d'un ion lanthanide sur la protéine donneuse. On parle de « **Time-Resolved** » FRET ou TR-FRET. Plusieurs noms sont associés à cette technique en fonction des fournisseurs et des ions lanthanides utilisés, on retrouve alors la technique LANCE pour « Lanthanide Chelate Excite » utilisant des ions Eu^{3+} ou Tb^{3+} chélatés et distribués par Perkin Elmer ou la technique HTRF pour « **Homogenous Time Resolved Fluorescence** » utilisant des ions Eu^{3+} cryptates et distribuée par CisBio assays. Le temps d'émission du fluorophore de la molécule « A » est donc plus long ce qui conduit à un délai dans le temps d'émission du second fluorophore « B » et à la diminution du bruit de fond (**Schéma 8B**).

Un inhibiteur de l'IPP virus/hôte Vif/APOBEC3G, capable de réduire la réplication du VIH-1 a été identifié grâce à la technique de TR-FRET et au criblage plus de 300000 composés (Pery et al. 2015).

2.3. *La FP (« Fluorescence Polarization »)*

Cette technique est basée sur le principe qu'un fluorophore, lorsqu'il est excité par de lumière, va émettre à son tour de la lumière avec des intensités différentes en fonction de l'axe de polarisation. Le degré de polarisation est dépendant de la masse du fluorophore.

Ainsi, si une protéine « A » couplée à un fluorophore est excitée, elle va émettre une lumière non polarisée. Si elle se lie à une protéine « B », la masse associée au fluorophore est plus grande et la lumière émise va tendre à se polariser. Le signal de fluorescence polarisée sera donc fort lorsque le complexe « A-B » sera formé et faible lorsque la protéine « A » couplée au fluorophore sera seule ou dissociée par l'intermédiaire d'un composé inhibiteur (**Schéma 8C**).

L'équipe de Murkherjee *et al.* a identifié des inhibiteurs de l'hélicase NS3 du virus de l'hépatite C en réalisant un HTS de la banque LOPAC et la technique de FP sur l'interaction NS3/ADN viral (Mukherjee *et al.* 2012). Le criblage de plus de 30 000 composés a également permis de trouver des inhibiteurs se fixant à la protéine de nucléocapside du virus de la fièvre de la vallée du Rift, empêchant ainsi son interaction avec les molécules d'ARN (Ellenbecker, Lanchy, and Lodmell 2012). Cho *et al.* ont criblé 446 composés en FP et identifié des inhibiteurs de l'interaction ARNs/protéine virale NS1A du virus Influenza (Cho *et al.* 2012).

2.4. *Le BRET*

Tout comme le FRET, la technique du BRET (« **B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer ») utilise le transfert d'énergie entre deux molécules. Cependant ici, la protéine « A » donneuse est liée à une enzyme bioluminescente : la luciférase (issue de *Renilla reniformis*) (Pfleger, Seeber, and Eidne 2006). Cette enzyme est capable de catalyser la dégradation oxydative de la coelenterazine (un chromophore) lorsque ce substrat est ajouté au mélange. Cette dégradation permet l'émission de lumière bleue qui, après transmission par résonance, va permettre l'excitation du fluorophore couplé à la protéine « B » et l'émission de lumière par celui-ci, si les deux protéines sont liées ou rapprochées à une distance inférieure à 1 nm. Comme précédemment, une inhibition de l'interaction par un composé conduira à la diminution du signal fluorescent (**Schéma 8D**).

Si en 2005, Hu *et al.* ont développé un test d'interaction *in vitro* fonctionnel basé sur la technique de BRET afin de tester l'activité de la protéase du VIH-1 (Hu *et al.* 2005). Cependant aucun criblage d'inhibiteur n'a été décrit à ce jour par cette technique.

2.5. *L'ALPHA (AlphaScreen®/AlphaLISA)*

AlphaScreen® signifie « **A**mplified **L**uminescent **P**roximity **H**omogeneous **A**ssay **S**creen » en anglais et que l'on pourrait traduire comme le dosage homogène d'une luminescence amplifiée dépendante de la proximité (Ullman *et al.* 1994). Cette technologie

est basée sur une technique de diagnostic appelée LOCI (« **L**uminescent **O**xxygen **C**hanneling **A**ssay »). L'AlphaScreen® a été développé dans les années 2000 afin de permettre son utilisation comme HTS. Comme son nom l'indique, c'est une technique réalisée en phase homogène.

Le principe de cette technique repose sur une réaction enzymatique dépendante du transfert d'un singlet d'oxygène, sur une courte distance, entre deux billes conduisant à une cascade de réactions chimiques et à la production d'un signal lumineux (**Schéma 8E**). Cette méthode utilise des billes « donneuses » sur lesquelles est fixée la protéine « A » et des billes « receveuses » sur lesquelles est fixée la protéine « B ».

Les techniques d'AlphaScreen® et d'AlphaLISA diffèrent par leurs billes « receveuses ».

- Dans la technique d'AlphaScreen® les billes « receveuses » sont constituées de trois molécules réagissant avec l'oxygène : le thioxène, l'anthracène et le rubrène conduisant à l'émission de lumière à une longueur d'onde comprise entre 520 et 620 nm.
- Dans les billes « receveuses » de la technique d'AlphaLISA, développée à partir de 2006, l'anthracène et le rubrène sont remplacés par un ion lanthanide : l'euprium Eu^{3+} . Comme pour les techniques précédentes, l'utilisation de cette molécule conduit à l'émission de lumière à une longueur d'onde plus longue, à 615 nm, permettant de réduire le spectre d'émission de lumière et de ce fait les interférences produites par les composés ou le milieu d'interaction.

Dans les deux techniques, la bille « donneuse » contient un chromogène, la phtalocyanine.

Les billes « donneuses » et « receveuses » sont constituées d'hydrogels de latex sur lesquels sont présentés des aldéhydes permettant de fixer différents ligands à leur surface. Il existe différentes sortes de billes : certaines peuvent fixer les protéines grâce à des anticorps (ex : anti-étiquette protéique type GST ou poly-histidine), d'autres sont recouvertes de protéines ayant une forte affinité pour les anticorps (ex : protéine A, anti-IgG) ou pour les étiquettes des protéines (ex : billes de glutathion, de nickel) (*site internet de PerkinElmer*).

Lorsque la bille « donneuse » liée à la protéine « B » est excitée par un laser à une longueur d'onde de 690 nm alors la phtalocyanine transforme l'oxygène de la solution en une forme d'oxygène réduite (singlet d'oxygène). La demi-vie de cet oxygène est très courte (4 μs), il diffuse donc sur de courtes distances. Il va alors être transmis à la bille « receveuse » liée à la protéine « B », si les deux billes sont proches l'une de l'autre d'une distance inférieure à 200 nm. Les deux billes seront ainsi rapprochées par l'interaction protéique « A-B ». La bille « receveuse » contenant les dérivés de thioxène réagit avec le singlet d'oxygène

et produit de la lumière à une longueur d'onde d'environ 600 nm en fonction du type de bille « receveuse » (AlphaScreen® : 520-620 nm, AlphaLISA : 615 nm) (Eglen et al. 2008).

Les techniques d'AlphaScreen® et AlphaLISA ont déjà permis la découverte d'un grand nombre d'IPP virus/hôte mais depuis plusieurs années elles ont également permis la découverte d'inhibiteurs de ces IPP et potentiellement de futurs antiviraux.

Ainsi, en 2007, l'équipe de Sehr *et al.* a été la première à identifier des inhibiteurs du complexe protéique E6/ubiquitine ligase E6AP formé par deux protéines du papillomavirus (Sehr, Pawlita, and Lewis 2007). De la même manière, des inhibiteurs du complexe de réplication du virus de la vaccine (poxvirus) ont été identifiés par AlphaScreen® (Schormann et al. 2011).

En 2012, l'équipe de Kota *et al.* a trouvé, grâce à la combinaison des techniques de FRET et d'AlphaScreen®, le ML322 capable d'inhiber la dimérisation des protéines core du virus de l'hépatite C et sa réplication (Kota 2010). Grâce à la technique d'AlphaScreen®, il a été montré que le mifepristone inhibe le transport nucléaire de l'intégrase (IN) du VIH suite à sa découverte à l'issue du criblage de l'interaction IN/importines (α/β) cellulaires. Dans la même étude, l'ivermectin, un inhibiteur des importines α/β a été identifié (Wagstaff et al. 2011).

3. Les autres méthodes d'HTS

3.1. *L'ECL utilisant l'électrochemiluminescence*

Cette technique utilise deux molécules, le ruthenium (Ru) lié à une première protéine et la triptopropylamine (TPA) liée à une deuxième protéine. Lorsqu'un faible courant est appliqué à la solution, l'ion Ru réagit avec la TPA si les deux protéines sont liées et provoque l'émission de lumière à une longueur d'onde de 620 nm.

En 2013, Xu *et al.* ont mis en place un test d'interaction utilisant l'ECL et ont pu démontrer que des anticorps anti-CD4 étaient capables d'inhiber l'interaction entre la glycoprotéine gp120 du VIH et son récepteur cellulaire CD4 (Xu, Wen, and Brownlow 2013).

3.2. *Les méthodes informatiques : l'HTS virtuel ou in silico*

Une autre technique HTS est devenue, au cours des dernières années, la source majeure d'identification d'inhibiteurs d'IPP : le HTS virtuel ou *in silico*. En effet, cette méthode complémentaire à la technique d'HTS biochimique permet le criblage et la prédiction d'une grande quantité d'inhibiteurs sans nécessiter de manipulations expérimentales. Elle permet le

criblage de composés mais également la conception de nouvelles molécules inhibitrices (McInnes 2007).

Le criblage virtuel utilise différentes méthodes, certaines sont basées sur l'étude de la conformation spatiale du ligand (on parle de « Pharmacophore ») ou bien de son ancrage dans la molécule cible (on parle alors de « Docking »). La technique du « docking » est basée sur des algorithmes informatiques utilisant les principes de complémentarité stérique ou d'interaction moléculaire pour trouver parmi les composés d'une chimiothèque, une molécule ou une structure virtuellement capable de lier le site actif de la molécule d'intérêt.

Depuis 2013, une dizaine d'études utilisant l' HTS *in silico* d'inhibiteurs d'IPP du virus du VIH-1 a été publiée. En 2014, l'équipe de Han *et al.* a synthétisé des composés inhibiteurs de la réplication des filovirus après un HTS *in silico* de la IPP virus/hôte : motif PPxY/Nedd4 cellulaire (Han et al. 2014b). La vérification de la cible, la capacité à entrer dans la cellule, la biodisponibilité et les effets *in vivo* des molécules synthétiques nécessite l'utilisation de techniques complémentaires comme des techniques d'HTS biochimiques ou cellulaires. Ainsi en 2013, Pautus *et al.* ont combiné les techniques de « docking » et d'AlphaScreen[®] pour créer, tester et valider *in vitro* des inhibiteurs synthétiques de la sous-unité PB2 de la polymérase du virus de la grippe (Influenza) (Pautus et al. 2013). En 2012, l'équipe de Tintori *et al.* a combiné des techniques de criblage virtuel et d'AlphaScreen[®] et trouvé des inhibiteurs de la dimérisation de l'intégrase du VIH-1 (Tintori et al. 2012). Des inhibiteurs de l'interaction hôte-virus : LEDGF/p75-IN nécessaire à l'intégration du génome du VIH ont aussi été identifiés part HTS *in silico* et AlphaScreen[®] (Hou et al. 2008; Serrao et al. 2013; Harrison et al. 2015).

Les techniques d'HTS sont donc variées et offrent un large éventail d'options pour la conception d'un HTS afin de permettre la découverte de nouveaux inhibiteurs d'IPP antiviraux ou bien la réutilisation de médicaments. La combinaison des techniques d'HTS virtuels et biochimiques est la stratégie la plus employée à l'heure actuelle.

La quantité d'HTS pour identifier des inhibiteurs d'IPP virus/hôte a grandement augmenté au cours des dernières années et a permis d'identifier des dizaines de molécules capables d'inhiber la réplication d'une espèce ou d'une famille de virus.

4. Les techniques d'HTS et le développement d'antiviraux à large spectre

A l'heure actuelle 5 composés identifiés par HTS ont été testés *in vitro* et/ou *in vivo* et sont potentiellement des antiviraux à large spectre (Zhu et al. 2015).

4.1. L'antiviral FGI-104

En 2009 par l'équipe de Kinck *et al.* a découvert le FGI-104 par une combinaison d'HTS *in silico* et cellulaire. L'HTS *in silico* a permis de sélectionner les composés potentiellement capables d'inhiber les interactions entre la protéine cellulaire Tsg101 et ses ligands. Tsg101 est un composant de la machinerie cellulaire « ESCRT » responsable du trafic et du bourgeonnement vésiculaire *via* les « late domains » viraux (Cf. Chapitre 2). Cette protéine est recrutée par différents virus, notamment des virus enveloppés et constitue une cible de choix pour un antiviral à large spectre.

Le FGI-104 s'est révélé efficace *in vivo* contre l'HCV, l'HBV, le VIH, le virus Ebola, le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEE) un *Togaviridae*, le virus Cowpox (Poxviridae) ou encore le virus responsable de la PRRSV pour « Porcine Reproductive and respiratory Syndrome » (*Arteriviridae*).

Le FGI-104 bloquerait le détournement de la protéine cellulaire Tsg101 par les virus (Kinch et al. 2009), cependant le mécanisme d'action n'est pas connu.

4.2. L'antiviral A3 et le Cmp 1

L'équipe d'Hoffmann *et al.* en 2011 a réalisé un HTS cellulaire de plus de 60000 composés commercialisés et identifié la molécule A3 inhibant efficacement la réplication du virus Influenza testée dans ce crible. Elle est aussi capable d'inhiber *in vitro* la réplication de différents virus à ARN (VIH, virus de Newcastle [Paramyxovirus], VSV, HCV, virus de la Dengue, virus Sindbis [Togavirus] et le virus du Nil occidental [Flavivirus]). Elle est également active *in vitro* contre les virus à ADN : le virus de la vaccine ou les adénovirus.

Hoffmann *et al.* ont montré que la drogue avait un effet sur le métabolisme des pyrimidines et proposent l'hypothèse selon laquelle la molécule A3 serait une molécule inhibitrice de la dihydro-orotique acide déshydrogénase (DHODH), une enzyme clé de la synthèse *de novo* des bases pyrimidines et donc un inhibiteur de la synthèse d'acides nucléiques (Hoffmann et al. 2011). Les effets *in vivo* et le mécanisme d'action de cette drogue sont inconnus.

Deux ans après l'équipe de Marschall *et al.* a conçu le Cmp1 grâce à des techniques *in silico* et l'a ensuite testé biochimiquement comme inhibiteur de la DHODH. Ils ont ensuite montré qu'il était efficace sur la réplication du HCMV *in vivo* et de l'adénovirus *in vitro* (Marschall et al. 2013).

4.3. **L'antiviral « 5705213 »**

Les glycoprotéines à la surface de certains virus nécessitent d'être clivées par la cathepsine L (CatL), une protéase cellulaire, afin de permettre la fusion des membranes virale et lysosomale et la libération des particules dans le cytosol au cours de l'entrée dans la cellule. L'année dernière, l'équipe d'Elshabrawy *et al.* a réalisé le criblage HTS de 5000 molécules afin de trouver des inhibiteurs de l'activité protéasique de la CatL sur des peptides viraux contenant le site de clivage. Ils ont identifié le composé « 5705213 » et montré qu'il était efficace *in vitro* contre l'entrée du virus du SRAS (coronavirus), du virus Ebola, des virus de l'Hendra et de Nipah (famille des *Paramyxoviridae*) (Elshabrawy et al. 2014).

4.4. **Le Nitazoxanide**

Le Nitazoxanide est un exemple qui illustre le potentiel de la stratégie de « repositionnement » des médicaments. En effet, ce composé a initialement été identifié dans les années 70 comme antiparasitaire. Par la suite, il a été montré que le Nitazoxanide interfère avec la croissance de bactéries anaérobies en inhibant la pyruvate synthétase. Il a très récemment été testé contre les virus et est actuellement en phase clinique pour le traitement contre le virus Influenza. Il est également efficace *in vitro* contre le virus respiratoire syncytial, les coronavirus, les rotavirus, les norovirus, les virus de l'hépatite B et C, le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune, le virus de l'encéphalite japonaise (un *Flaviviridae*) et le VIH (Rossignol 2014). Cependant son mécanisme d'action reste à déterminer.

Ces cinq composés sont prometteurs. Cependant quatre d'entre eux sont des molécules de synthèse qui devront être caractérisées et testées en phase clinique ce qui prendra plusieurs années. Ainsi le « repositionnement de médicament » et donc le criblage d'inhibiteurs d'interactions virus/hôte communes à tous les virus à partir de médicaments déjà caractérisés, est une alternative plus rapide dans le développement d'antiviraux à large spectre.

Les objectifs de la thèse

De nos jours les stratégies antivirales visent à développer de nouveaux antiviraux à large spectre capables, à la manière des antibiotiques, de lutter efficacement contre un ensemble de virus appartenant à des familles différentes.

L'efficacité de ces nouveaux antiviraux repose sur le fait qu'ils doivent bloquer une cible commune à tous les virus sans interférer avec la physiologie de la cellule hôte.

Un très grand nombre de virus possède des « late domains », des motifs impliqués dans des interactions protéine-protéine (IPP) avec la machinerie cellulaire, leur permettant ainsi de détourner les voies cellulaires nécessaires à leur réplication.

Parmi ces « late domains », on retrouve le motif PPxY, qui interagit avec les domaines WW des ubiquitine ligases E3 de la famille Nedd4. L'interaction PPxY/Nedd4 a déjà été décrite dans huit familles de virus différentes et elle constitue par conséquent une cible idéale pour un antiviral à large spectre.

Depuis les années 2000, les méthodes de criblage à haut débit (HTS pour « High-Throughput Screening ») ont permis de tester un grand nombre de composés et d'identifier rapidement des inhibiteurs d'IPP.

Le but de ma thèse était donc d'utiliser l'interaction virus/hôte PPxY/Nedd4 comme cible d'antiviraux à large spectre. Pour cela, le motif PPxY de la protéine VI des Adénovirus et la Nedd4-2 ont été utilisés comme modèle pour le criblage d'inhibiteurs de l'interaction PPxY/Nedd4. En effet, l'inactivation génétique du motif PPxY de la protéine VI de l'AdV conduit à un important effet antiviral. Pour réaliser ce criblage nous avons utilisé la technique d'AlphaScreen[®] comme méthode biochimique de criblage HTS.

Une fois les candidats inhibiteurs identifiés, la suite de ma thèse consistait à caractériser l'effet des composés et leur mécanisme d'action sur la réplication des AdV. Pour conforter notre choix de cible pour identifier de nouveaux antiviraux à large spectre, nous avons déterminé l'effet des composés sur la réplication des Filovirus. Cette famille est très différente de celle des AdV (génome, structure) et de plus, elle est celle du virus Ebola.

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1 : Purification des protéines

1. Purification des His-Protéines VI sauvage et mutante M1

1.1. *Plasmides*

Les vecteurs d'expression bactériens pour la protéine VI-wt ou -M1 avec un tag poly-Histidine en C-terminal sont dérivés du plasmide pET-15b. Pour la protéine mutante His-VI-M1, la mutagenèse dirigée a été utilisée pour modifier les acides aminés 148-PPSY-151 en 148-PGAA-151.

1.2. *Transformation et culture bactérienne*

Des bactéries Rosetta compétentes ont été transformées avec les plasmides pET-15b-His-VI-wt ou pET-15b-His-VI-M1. Pour cela, 100 μ L de bactéries et 50 ng du plasmide d'intérêt sont incubés 30 min dans la glace puis 45 s à 42°C et enfin 2 min dans la glace. Neuf cents μ L de LB sont ajoutés aux bactéries transformées puis cultivées 1 h à 37°C sous agitation. Cent μ L des bactéries transformées sont étalés sur une boîte de LB/agar contenant les antibiotiques de sélection des plasmides pET-15b-His-VI-wt ou pET-15b-His-VI-M1 : 50 μ g/mL d'ampicilline et 35 μ g/ μ L de chloramphénicol, et incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie est inoculée dans 50 mL de LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline et 35 μ g/ μ L de chloramphénicol et incubée la nuit sous agitation à 37°C afin de réaliser une pré-culture. La pré-culture est ajoutée à 2 L de LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol et incubée sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) à 600 nm égale 0,8 (environ 2h30). L'expression des protéines recombinantes His-VI-wt ou His-VI-M1 est induite en ajoutant 1 mM d'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et 150 mM de chlorure de sodium (NaCl) afin de prévenir la lyse bactérienne, pendant 45 min à 37°C sous agitation. La culture est ensuite centrifugée à 2500 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 50 mL de tampon phosphate salin (PBS) contenant 10 % de glycérol et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) afin d'inactiver les protéases. La culture est de nouveau centrifugée à 2500 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et 40 mL de tampon de lyse commercial BugBuster Master Mix

(Novagen), complétement avec une tablette d'inhibiteur de protéases (Roche) sont ajoutés au culot et incubés 15 min à température ambiante. Le lysat est ensuite centrifugé à 10000 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré puis filtré sur des filtres de 0,45 µm. Dix pourcents de glycérol, 150 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole sont ajoutés au lysat filtré.

1.3. *Purification par chromatographie d'affinité Cobalt chélate*

La purification d'affinité est réalisée avec l'appareil de purification des protéines par chromatographie (AKTA1) au travers d'une colonne HiTrap de 1 mL (HiTrap™ Chelating HP Columns 1 mL HP-GE Healthcare) sur laquelle est fixé du cobalt. Après la mise en route de la machine, les pompes sont synchronisées et lavées à l'éthanol 20% puis à l'eau afin d'enlever les bulles du système. Les tuyaux sont rincés à l'eau puis avec une solution filtrée appelée «P-Buffer 0» et composée de 5 mM de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄), 30 mM NaCl et 10% glycérol avec un pH égal à 8. Le débit des pompes est défini à 0,5 mL/min et les embouts des pompes sont plongés dans les tampons de purification correspondants : A1 = «P-Buffer 0» et B1 = «P-Buffer 500», stockés dans la glace. « P-Buffer 500 » est composé de 5 mM de NaH₂PO₄, 30 mM NaCl, 500 mM d'imidazole et 10% glycérol à pH 8. A l'aide d'une seringue de 5 mL, la colonne HiTrap™ est lavée avec 5 mL d'H₂O milliQ puis 5 mL de 0,1 M chlorure de cobalt II sont injectés. Enfin la colonne est de nouveau lavée avec 5 mL d' H₂O milliQ puis installée sur l'appareil de purification des protéines par chromatographie (AKTA1).

L'équilibration du système de chromatographie se fait *via* un logiciel qui permet la circulation de 0% de « P-Buffer 500 », puis 100% de « P-Buffer 500 » (500 mM imidazole) et enfin 4% de « P-Buffer 500 » (20 mM imidazole). Après rinçage des embouts et du tube d'injection à l'eau, le lysat bactérien est ajouté dans la colonne d'injection stockée dans la glace.

Le lysat est injecté dans la colonne HiTrap pendant environ 1 h. Ensuite, les lavages de la colonne sont réalisés avec 4 % (20 mM imidazole) puis 8 % (40 mM imidazole) de « P-Buffer 500 ». L'élution est effectuée avec 50% (250 mM imidazole) puis 80% (400 mM imidazole) de la solution « P-Buffer 500 ». Les fractions correspondantes aux pics d'élution (observables sur l'histogramme d'élution de l'appareil) sont collectées, rassemblées et gardées dans la glace. Afin de vérifier que la protéine est bien présente dans les fractions récoltées, un test de Bradford est réalisé.

Les protéines recombinantes purifiées sont ensuite débarrassées de leurs contaminants par passage sur colonne de dessalage (PD MiniTrap G-25, GE healthcare) en utilisant un « tampon physiologique » ajusté à un pH de 7,3 composé de :

- 110 mM d'acétate de potassium ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$),
- 2 mM d'acétate de magnésium ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$),
- 2 mM de dithiothreitol (DTT),
- 20 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique)

Le « tampon physiologique » est complété avec 10% de glycérol et des inhibiteurs de protéases (tablette ou PMSF). Les protéines sont ensuite stockées à - 80°C.

1.4. *Vérification des protéines purifiées*

A chaque étape de la purification, des échantillons sont prélevés et les protéines sont quantifiées par Bradford (*Cf. Chapitre 1 3.*). Des extraits de chaque échantillon sont analysés par électrophorèse, coloration au bleu de Coomassie (*Cf. Chapitre 1 5.*) ou encore western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-pVI (*Cf. Chapitre 1 4.*).

2. Purification de la protéine GST-Nedd4-2

2.1. *Plasmide*

Le vecteur d'expression bactérien pGEX-GST-Nedd4-2 (ΔC2 , WW1, WW2) a été fourni par S. Kumar. Il code pour la protéine Nedd4-2 de souris, dont la région C2 et les deux premiers domaines WW sont absents mais qui conserve encore les domaines WW3 et WW4 lui permettant de lier les motifs [LP]PxY ainsi que son domaine HECT responsable de son activité catalytique et de sa capacité à ubiquityler des protéines (*Cf. Introduction Chapitre 4.*).

2.2. *Transformation et culture bactérienne*

Les bactéries BL21 compétentes ont été transformées avec le plasmide pGEX-GST-Nedd4-2 selon la même technique de transformation que celle utilisée pour la protéine VI recombinante, mais en présence uniquement d'ampicilline. A l'obtention d'une DO à 600 nm égale 0,6, l'expression de la protéine recombinante GST-Nedd4-2 est induite en ajoutant 0,8 mM d'IPTG pendant 3 h à 30°C sous agitation. La culture est ensuite centrifugée à 2500 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé, centrifugé, lysé, filtré et conservé selon les conditions précédemment décrites.

2.3. Purification en BATCH

La purification de la GST-Nedd4-2 recombinante est réalisée par chromatographie d'affinité en utilisant la technique de purification *en lot* ou « BATCH » sur billes de sépharose (Glutathion Sepharose 4B Media GE Healthcare) en suivant les recommandations du fournisseur.

2.4. Dialyse des protéines

Les protéines purifiées sont débarrassées de leurs contaminants par dialyse dans des cassettes de dialyse (Pierce, Slide-A-Lyzer dialysis cassette 10,000 MWCO) plongées dans du « tampon physiologique » contenant 10% de glycérol et des inhibiteurs de protéases. Les protéines sont ensuite stockées à - 80°C.

2.5. Vérification des protéines purifiées

De la même manière que pour les protéines VI-wt et VI-M1 purifiées, des échantillons sont prélevés à chaque étape de la purification et les protéines sont quantifiées par Bradford (*Cf. Chapitre 1 3.*). Des extraits de chaque échantillon sont analysés par électrophorèse, coloration au bleu de Coomassie (*Cf. Chapitre 1 5.*) ou encore western blot à l'aide d'anticorps de souris anti-GST (554805 BD BaculoGold™) ou un anticorps de lapin anti-Nedd4-2 (ab 46521, abcam) (*Cf. Chapitre 1 4.*).

3. Quantification des protéines par dosage de Bradford

Afin de déterminer la quantité de protéines, un test de Bradford est réalisé. Les protéines sont diluées dans du « tampon physiologique » et une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA pour « bovin serum albumin ») allant de 0 à 2 mg/mL est réalisée. Cinq µL de protéines à quantifier ou de gamme BSA sont ajoutés à 250 µL de solution de Bradford 1X, distribués dans les puits d'une plaque transparente de 96 puits et incubées 5 min à température ambiante puis la DO à 595nm est déterminée avec sur un lecteur de plaque (Lecteur ELISA Apollo1 Berthold Technology) par spectrophotométrie.

4. Détection des protéines par Western-blot

4.1. *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)*

Afin de séparer les protéines sur gel, des échantillons de protéines purifiées ou bien d'extraits cellulaires sont dilués dans du Laemmli 1X (8 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 40 % glycérol, 0,01 % bleu de bromophénol, 5 % β -mercaptoéthanol, 200 mM Tris à pH 6,8) auquel on ajoute 1 mM de DTT. Les échantillons sont chauffés 10 min à 100°C avant dépôt sur gel de polyacrylamide. Les gels SDS-PAGE sont composés d'un gel de concentration contenant 5 % d'acrylamide et d'un gel de séparation, où la quantité d'acrylamide dépend du spectre de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La migration des échantillons est réalisée dans du tampon Tris-Glycine-SDS (TGS : Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 1 %, pH 8,3) 1X à un voltage de 90 V dans le gel de concentration, puis de 130 V dans le gel de séparation.

4.2. *Transfert*

Après séparation des protéines dans le gel SDS-PAGE, celles-ci sont transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert en milieu liquide dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 15 %, pH 8,5). Le transfert est réalisé à 400 mA pendant 1h30. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration des protéines au Rouge Ponceau. La membrane est ensuite décolorée à l'eau.

4.3. *Saturation et anticorps*

La membrane est d'abord saturée, durant 30 min, à température ambiante et sous agitation, dans un tampon de saturation, tampon Tris salin TBS (Tris-Buffered Saline) 1 X, contenant 0,05 % de Tween-20 et 10 % de lait.

Puis la membrane est incubée toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine à détecter, dilué dans du tampon de saturation. Le lendemain, un lavage avec du NaCl 1 M suivi de deux lavages de la membrane dans le tampon de TBS 1X, Tween 0,05 %, sont réalisés pendant 10 min sous agitation pour chacun des lavages. Le lavage au NaCl 1 M permet l'élimination efficace des bandes aspécifiques. Ensuite la membrane est incubée pendant 30 min, à température ambiante et sous agitation, en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et spécifique de l'anticorps primaire utilisé (dilué dans la solution de TBS 1 X, Tween-20 0,05 %, lait 10 %). Deux lavages dans le

tampon de TBS 1 X, Tween 0,05 % puis un lavage en TBS 1X sont réalisés comme précédemment.

Liste des anticorps primaires

| Nom | Référence | Dilution WB | Dilution IF |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------|-------------|
| Mouse-anti-pVI | mAb 9F10 | 1/500-1/1000 | 1/50 |
| Rabbit anti-pVI | [Wodrich <i>et al</i> , EMBO, 2003] | 1/2000 | |
| Rabbit anti-Nedd4-2 | ab46521 (abcam) | 1/200 | |
| Mouse-anti-GST | 554805 BD BaculoGold™ | 1/1000 | |
| Rat anti-pVII | [H. Haruki <i>et al</i> , FEBS, 2003] | | 1/500 |
| Goat anti-VP40 | Fourni par O. Dolnik et S. Becker | 1/1500 | |
| Mouse anti-GAPDH | mAb 6C5 HyTest | 1/500-1/1000 | |

4.4. Révélation

La révélation du western-blot se fait par chimioluminescence à l'aide de kit ECL (pour ElectroChemiLuminescence »). Deux types d'ECL sont utilisés en fonction de la quantité de protéines à détecter. L'ECL Pico (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) est utilisé pour les grandes quantités et l'ECL femto (SuperSignal West Femto, Fisher scientific) pour les faibles quantités. Après quelques min d'incubation de la membrane avec l'ECL, la détection de la luminescence se fait soit grâce à des films radiographiques ou bien à l'aide d'une camera (ImageQuant™ LAS 4000).

5. Détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines sont détectées par coloration au bleu de Coomassie. Pour cela, le gel est introduit dans du tampon de coloration (éthanol 50%, acide acétique 10 % et bleu de Coomassie 0,25 %) pendant 30 min à température ambiante sous agitation puis plongé dans du tampon de décoloration (éthanol 10 %, acide acétique 10 %). Le bain de décoloration est changé autant de fois que nécessaire et la décoloration dure jusqu'à ce que seules les bandes correspondantes aux protéines apparaissent en bleu. Une image du gel coloré peut être acquise à l'aide d'une caméra (Biorad, GelDoc).

6. Test d'ubiquitylation *in vitro*

Un test d'ubiquitylation *in vitro* permet de vérifier que l'activité catalytique de la GST-Nedd4-2 purifiée est bien conservée. Le protocole est celui décrit par Ruben Martinez dans sa thèse (thèse n° 1973) et adapté de celui publié dans Wodrich et al. 2010.

Le mélange réactionnel de 25 μ L est composé de :

- 20 mM d'adénosine triphosphate (ATP),
- 100 mM de créatine phosphate (CP),
- 0,5 mg/mL de créatine kinase (CK),
- 1 μ g/ μ L d'ubiquitine (Ub),
- 20 nM d'enzyme E1 (Ubiquitin Activating Enzyme (UBE1), human recombinant, Euromedex),
- 660 nM d'enzyme E2 (UbcH5a, Euromedex),
- 40 ng/ μ l de GST-Nedd4-2 purifiée (enzyme E3),
- 28 ng/ μ L de His-VI-wt (substrat protéique).

Le mélange est dilué dans du « tampon physiologique » (110 mM d'acétate de potassium ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$), 2 mM d'acétate de magnésium ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), 2 mM de dithiothreitol (DTT) et 20 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) à pH 7,3). Le mélange est ensuite incubé 30 min à 30°C. Le milieu réactionnel est déposé sur gel d'acrylamide et un western blot avec des anticorps anti-protéine VI permet d'observer les différents types ubiquitylation (*Cf. Introduction Chapitre 4*) ajoutés par la GST-Nedd4-2 à la protéine His-VI-wt purifiée.

Chapitre 2 : Criblage d'inhibiteurs de l'interaction His-VI-wt/GST-Nedd4-2 en AlphaScreen®

Un protocole détaillé et imagé de la mise en place du criblage à haut débit d'inhibiteurs de l'interaction protéine/protéine entre le virus et l'hôte: His-VI-wt/GST-Nedd4-2 en utilisant la technique d'AlphaScreen® est décrit dans le chapitre du livre « Methods in molecular biology. SPRINGER Protocols. 'PROTEOSTASIS' » à paraître durant l'été 2016 (ANNEXE 2).

1. Test d'interaction His-VI-wt /GST-Nedd4-2 par AlphaScreen®

Le test d'AlphaScreen® est réalisé dans du tampon d'interaction (PBS 1X pH 7,4, 0,1% BSA, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 0,005% Tween-20) auquel sont ajoutées 1,75 pmol (15,62 ng) de protéine His-VI-wt ou de protéine His-VI-M1 mutante et 1,75 pmol (62,5 ng) de GST-Nedd4-2 dans une plaque de 384 puits. La plaque est incubée à 25°C pendant 30 min. Ensuite 0,5 µg de billes « donneuses » recouvertes de glutathion (AlphaScreen® Glutathione Donor beads, PerkinElmer) et 0,5 µg de billes « receveuses » recouvertes de nickel (Nickel Chelate AlphaLISA® Acceptor 45 Beads, PerkinElmer) sont ajoutés dans le mélange protéique de chacun des puits et incubés à 25°C pendant 1 h à l'abri de la lumière. La luminescence de la plaque est quantifiée par un lecteur de plaque (EnVision® Multilabel Reader).

2. Criblage d'inhibiteurs de l'IPP Protéine VI/Nedd4-2 par AlphaScreen®

Pour le criblage de la banque de composés chimiques Prestwick (« Prestwick Chemical Library »), 10 µM de chacun des 1280 composés de la banque sont distribués individuellement dans différents puits de 4 plaques de 384 puits. Ensuite la protéine His-VI-wt ou His-VI-M1 mutante et la protéine GST-Nedd4-2 ainsi que les billes « donneuses » et « receveuses » sont ajoutées et incubées comme décrit précédemment. Toutes les valeurs obtenues avec les différentes drogues sont normalisées par rapport à la condition sans drogue. Une limite égale à la moyenne du signal en absence de drogue moins trois fois l'écart-type, permet de sélectionner les composés inhibiteurs de l'interaction.

3. Elimination des inhibiteurs « faux-positifs » TruHit® test

La détection des composés « faux positifs » pour l'inhibition de l'interaction en AlphaScreen® est réalisée grâce au TruHit® test (PerkinElmer). Selon les recommandations du fournisseur. Le mélange de 25 µL est constitué de 20 µL de solution de billes « premix » (mélange de billes de streptavidine et de biotine) et de 10 µM de composé ou bien de tampon d'interaction (contrôle) et il est ajouté dans les puits d'une plaque de 384 puits. La plaque est incubée 10 min à température ambiante puis l'émission de lumière des puits de la plaque est mesurée par un lecteur de plaque (EnVision® Multilabel Reader).

4. Calcul du facteur Z'

Le calcul du facteur Z' permet de tester la robustesse de nos conditions expérimentales. Ce calcul, décrit par Zhang *et al.* (J.-H. Zhang 1999) est un paramètre statistique simple pour évaluer la qualité d'un test de criblage à haut débit à partir des valeurs des contrôles positifs et négatifs sur 30 répliques.

La formule pour calculer le facteur Z' est la suivante :

$$Z' = 1 - [3(\text{Moy.}_{Cp} + \text{Moy.}_{Cn}) / | \text{ET}_{Cp} - \text{ET}_{Cn} |]$$

avec Moy. : la moyenne, ET : l'écart-type, Cp : valeurs des contrôles positifs et Cn : valeurs des contrôles négatifs.

Une valeur égale à 1 indique que les paramètres sont idéaux pour le criblage ; si celle-ci est comprise entre 1 et 0,5, les conditions sont bonnes et si la valeur de Z' est inférieure à 0,5 alors les signaux des contrôles sont trop variables pour permettre la validation des conditions expérimentales.

Chapitre 3 : Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées sont des cellules épithéliales d'ostéosarcome humaines (U2OS), des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293 ou HEK293 $\alpha_v\beta_5$ lorsqu'elles surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_5$) et des cellules de carcinome hépatique humain (HuH-7).

Toutes les cellules sont cultivées dans un milieu de culture complet, le DMEM (« Dulbecco's modified Eagle's medium », Glutamax™, Gibco) contenant du Glutamax et supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine, dans une atmosphère à 5% de CO₂ et à 37°C.

Chaque semaine les flasques de cellules sont rincées avec du PBS 1 X. Chaque flasque est ensuite incubée en présence de 2mL de trypsine pendant 5 min à l'incubateur. Une fois que les cellules sont décollées, 8 mL de DMEM complet sont ajoutés. Afin d'inhiber la trypsine, les cellules sont ensuite diluées au $1/10$ avec du DMEM complet et les cellules sont remises en culture jusqu'au passage suivant.

Avant ensemencement pour les expériences, les cellules sont comptées à l'aide de cellules de Malassez afin d'obtenir des cellules à environ 70-80 % de confluence le lendemain pour commencer les expériences.

Chapitre 4 : Caractérisation des composés inhibiteurs identifiés en AlphaScreen[®]

1. Détermination de l'IC₅₀ des composés en AlphaScreen[®]

La concentration d'inhibiteurs nécessaire pour inhiber 50% du signal AlphaScreen[®] émis suite à l'interaction entre la protéine His-VI-wt et la protéine GST-Nedd4-2 est déterminée en ajoutant dans chacun des puits d'une plaque de 384 puits une dilution de 1 nM à 20 µM du composé à tester. Ensuite, la His-VI-wt ou His-VI-M1 mutante et la protéine GST-Nedd4-2 ainsi que les billes « donneuses » et « receveuses » sont ajoutées et incubées comme décrit précédemment (*Cf. Chapitre 2 1.*).

2. Test de cytotoxicité des composés dans les lignées cellulaires

La viabilité des cellules en présence de drogue est testée à l'aide du kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, $1,5 \times 10^4$ cellules U2OS sontensemencées dans une plaque de 96 puits à fond plat et opaque. Le lendemain, une gamme de drogue allant de 250 nM à 50 µM, diluée dans 100 µL de milieu DMEM est ajoutée dans chacun des puits et incubée durant 24 h ou 36 h à 37°C. Ensuite la plaque est laissée 30 min à température ambiante puis 100 µL de réactif CellTiter-Glo[®] sont ajoutés directement dans le milieu de culture. La plaque est ensuite mise à l'écart de la lumière sous agitation 2 min. Elle est incubée à température ambiante pendant 10 min. La lecture de la luminescence de la plaque se fait sur un lecteur de plaque (EnVision[®] Multilabel Reader).

Chapitre 5 : Purification des virus et vecteurs adénoviraux

1. Les virus et les vecteurs

Plusieurs types de virus et de vecteurs sont utilisés :

Les virus HH-Ad5-VI-wt et HH-Ad5-VI-M1 sont des Adénovirus humains de type 5 réplicatifs, délétés pour leur région E3 et codant respectivement pour la protéine VI sauvage ou pour la protéine VI dont le motif PPxY est muté en PGAA (mutant M1).

Les vecteurs Ad5-VI-wt-GFP et Ad5-VI-M1-GFP, sont des virus non réplicatifs dont le gène E1A est remplacé par le gène de la GFP sous la dépendance du promoteur du CMV. Le gène de la protéine VI est respectivement sauvage ou muté au niveau de son motif PPxY (mutant M1).

2. Amplification des virus et vecteurs

Les virus ou les vecteurs adénoviraux (virus non réplicatifs à cause de la délétion de la région E1 du génome) sont amplifiés dans des cellules HEK293 $\alpha_v\beta_5$ dans des boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre. A l'apparition des premiers signes d'effet cytopathique, elles sont récupérées et congelées à -80°C . Trois cycles de congélation/décongélation sont réalisés afin de lyser les cellules. Le lysat est ensuite centrifugé à $3500 \times g$ pendant 10 min à température ambiante. Puis le surnageant est utilisé pour infecter une nouvelle série de boîtes, plus importante que la précédente de façon à amplifier les virus/vecteurs. Pour la dernière amplification (20 boîtes de Pétri de 15 cm), après centrifugation, le culot de cellules infectées est repris dans 40 mL de milieu DMEM complet frais avant les 3 cycles de congélation/décongélation.

3. Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium

Les cellules lysées par les cycles de congélation/décongélation sont centrifugées 20 min à $3500 \times g$ à température ambiante. Six millilitres de surnageant sont ajoutés sur un gradient discontinu de chlorure de césium (CsCl) contenant 2 mL d'une solution de CsCl à 1,40 g/mL au fond d'un tube en polypropylène (Beckman), puis 2 mL d'une solution de CsCl à 1,25 g/mL. Les tubes sont centrifugés 2 h à 35 000 rpm à 18°C avec le rotor à godets SW41 (Beckman). Après centrifugation, la bande blanche correspondant aux particules virales est

prélevée à l'aide d'une seringue et transférée dans un nouveau tube à ultracentrifugation. Une solution de CsCl à 1,34 g/ml est ajoutée aux virus pour permettre la formation d'un gradient linéaire après centrifugation durant 18 h à 35 000 rpm à 18°C avec le même rotor que précédemment. Une nouvelle bande blanche se forme dans le gradient et est de nouveau récupérée à l'aide d'une seringue. Le virus purifié est ensuite introduit dans une cassette de dialyse (Pierce, Slide-A-Lyzer dialysis cassette 10,000 MWCO) préalablement réhydratée dans 500 mL PBS 1 X. La cassette est plongée dans un bain de PBS 1 X pendant 2 h sous agitation puis à nouveau dans 500 mL de PBS 1 X durant 3 h et enfin la dernière dialyse est réalisée dans 500 mL de PBS 1X contenant 10 % glycérol toute la nuit à température ambiante. Les virus sont ensuite récupérés avec une seringue et stockés à -80°C.

4. Marquage des virus et vecteurs purifiés

Le marquage des virus est réalisé en utilisant le kit « Micro-scale protein labeling kits » (Invitrogen) et en suivant les recommandations du fournisseur. Dans un premier temps, la solution de marquage est préparée en diluant les fluorophores Alexa (488 ou 594) dans 10 µL de DMSO. Ensuite, 5 µL du fluorophore Alexa sont dilués avec 100 µL de virus ou vecteurs purifiés et 12 µl d'une solution de bicarbonate de sodium à 1 M, pH 8,3. Le mélange réactionnel est incubé 1 h sous agitation à température ambiante. Ensuite, pour séparer les fluorophores non liés aux particules virales, le mélange réactionnel est passé sur une colonne de dessalage (Zeba spin, Thermo Scientific). La colonne est d'abord équilibrée 3 fois avec 300 µL de PBS 1 X contenant 10 % de glycérol et centrifugé 1 min à 1500 x g. Puis le mélange réactionnel est déposé sur la colonne et centrifugé 2 min à 1500 x g. Les virus ou vecteurs marqués sont récupérés en sortie de colonne et stockés à -80°C.

5. Quantification des virus et vecteurs purifiés

5.1. Estimation de la quantité d'ADN (DO 260 nm)

La mesure de la DO à 260 nm permet de mesurer la quantité d'ADN présent dans un échantillon et de déterminer la quantité de particules physiques purifiées. Pour cela 10 µL de virus purifiés sont ajoutés à 90 µL de tampon de lyse contenant 10 mM Tris pH 7,4, 0,1 % SDS et 1 mM EDTA. Le mélange est incubé 10 min à 56°C puis la DO à 260 nm est mesurée. La concentration de la préparation de virus est calculée en utilisant la formule suivante : 1 unité de $DO_{260} = 1,16 \times 10^{12}$ particules physiques / mL (pp/mL).

5.2. Dénombrement des plages de lyse

Un million de cellules HEK293 $\alpha_v\beta_5$ estensemencé dans les puits d'une plaque de 6 puits. Le lendemain, les cellules sont infectées avec différentes quantités de virus allant de 0,01 à 1 particule physique par cellule. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules sont recouvertes de DMEM complet contenant 1 % agarose (chauffé à 70°C) et incubées à 37°C. Au bout d'une semaine, les plages de lyse sont quantifiées, par microscopie à fluorescence quand il s'agit de vecteurs exprimant la GFP ou par microscopie classique quand il s'agit de virus répliatifs.

Chapitre 6 : Expériences d'immunofluorescence

1. Transfection de protéines fusionnées à eGFP/mRFP

Cent mille cellules sontensemencées dans une plaque de 12 puits contenant des lamelles de verre de 15 mm de diamètre. Le lendemain, les cellules sont transfectées par lipofection. Pour cela, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées avec du PBS 1X. Quatre-cents μL d'OptiMEM (Invitrogen) sont ajoutés dans chacun des puits. Deux cents nanogrammes à 1 μg de plasmide purifié (la quantité optimale de plasmide varie en fonction des protéines exprimées) sont dilués dans 200 μL d'OPTIMEM. Ensuite, 1,5 μL de lipofectamine 2000 sont dilués dans 200 μL d'OPTIMEM. Les 200 μL d'ADN dilués sont mélangés aux 200 μL de lipofectamine 2000 diluée, incubés 20 min à température ambiante puis ajoutés goutte à goutte sur les cellules. La plaque est ensuite incubée 3 h à 37°C. Enfin, le mélange est remplacé par du milieu complet et les cellules sont remises à 37°C pendant 24 h ou 48 h en fonction de l'expression de la protéine attendue.

2. Infection

Cinquante mille cellules sontensemencées dans des plaque 12 puits contenant des lamelles, 24 h avant l'infection avec 2500 particules physiques par cellule (pp/cell) de vecteurs marqués (Ad5-wt-GFP-A594 ou Ad5-M1-GFP-A594) ou de virus réplicatifs marqués (HH-Ad5-VI-wt-A488 ou HH-Ad5-VI-M1-A594) selon les conditions. L'infection est réalisée dans 150 μL de DMEM contenant ou non 5 μM de composés ou un volume équivalent de DMSO comme contrôle négatif de traitement.

2.1. *Marquage de la protéine VI durant l'entrée*

Après l'infection, les cellules sont incubées 30 min à 4°C en présence des vecteurs marqués pour permettre leur association à la surface des cellules et ainsi synchroniser l'infection. A t_0 , les lamelles sont rincées dans du PBS 1X et transférées dans 500 μL de milieu contenant ou non 5 μM de composés ou un volume équivalent de DMSO et mises à l'incubateur (5 % CO_2 , 37°C) pendant 10 min ou 1 h. A chaque temps, les lamelles sont récupérées, fixées et l'immuno-marquage de la protéine VI est réalisé selon le protocole décrit dans la partie suivante (partie 3.).

2.2. Marquage des génomes adénoviraux délivrés dans le noyau

Après 30 min d'incubation à 37°C, le milieu contenant les virus est enlevé et remplacé par 1 mL par puits de milieu frais contenant ou non 5 µM de composés ou un volume équivalent de DMSO. Les cellules sont ensuite remises à 37°C pendant 2 h. L'immuno-marquage indirect des génomes adénoviraux est réalisé grâce au marquage de la protéine VII et du noyau selon le protocole décrit dans la partie suivante.

3. Immunofluorescence

3.1. Fixation et perméabilisation des cellules

Avant la fixation des cellules, les lamelles sont rincées avec du PBS 1X. Elles sont ensuite déposées sur une goutte de paraformaldéhyde 4 % (PFA) pendant 20 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite plongées dans un bain de PBS 1X puis de nouveau déposées sur des gouttes de 50 µL de tampon d'IF (PBS 1 X, 10% de sérum de veau foetal (SVF), 0,5 % de saponine) et incubées 5 min à température ambiante.

3.2. Incubation des anticorps, marquage au DAPI et montage sur lame

Les anticorps primaires et secondaires couplés à des fluorophores (Cf. *Tableau de Liste des anticorps primaires et du MATERIEL ET METHODE Chapitre 1*) sont dilués séparément dans du tampon d'IF et centrifugés à 10 000 x g pendant 3 min pour enlever les agrégats. A nouveau les lamelles sont déposées sur des gouttes de 50 µL d'anticorps primaires dilués et incubées à 37°C pendant 1 h. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois pendant 5 min sous agitation dans du PBS 1X, puis redéposées sur des gouttes de 50 µL d'anticorps secondaire et incubés à 37°C pendant 30 min. Les lamelles sont de nouveau rincées 3 fois pendant 5 min sous agitation dans du PBS 1X, puis rincées dans de l'eau distillée et enfin dans de l'éthanol 100 % avant d'être séchées à l'air libre. Les lamelles sont ensuite déposées sur 6 µL de milieu de montage (DAKO) contenant 0,1 % de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) sur une lame de verre, préalablement nettoyée à l'éthanol. La lame avec les lamelles est mise à l'abri de la lumière toute la nuit.

Tableau des anticorps secondaires couplés à des fluorophores

| Nom | Référence | Dilution |
|----------------------------------------|------------------------|----------|
| Anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 | A21203 Invitrogen | 1/500 |
| Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | A21202 Invitrogen | 1/500 |
| Anti-rat IgG Alexa Fluor 594 | A11081 Invitrogen | 1/1000 |
| Anti-rat IgG Alexa Fluor 488 | A21208 Invitrogen | 1/1000 |
| Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | A21207 Invitrogen | 1/1000 |
| Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 | A21206 Life technology | 1/1000 |

4. Microscopie et analyse des images

L'acquisition des images est réalisée avec le microscope confocal Leica SP5 équipé du logiciel Metamorph™. L'épaisseur des "stacks" (les couches de l'acquisition) est définie à 0,3 µm avec une valeur de diaphragme égale à 1 pour tous les canaux des différents lasers afin d'obtenir la meilleure résolution. La taille des images utilisées est de 512x512 avec une taille de pixel de 96x96 µm. Les images sont ensuite analysées grâce au logiciel Image J. Le comptage du nombre de particules virales est réalisé grâce une macro permettant un comptage semi-automatique du signal de fluorescence selon un diamètre défini. Pour l'analyse des colocalisations telles que Ad5/protéine VI ou encore protéine VII/noyau, dans un premier temps les différents « stacks » des images de microscopie confocale sont projetés sur une seule image (« Z-projection ») pour chacun des canaux avec l'intensité maximum. Ensuite une macro est définie afin de quantifier semi-automatiquement le nombre de signaux qui colocalisent par rapport au signal total observé.

Chapitre 7 : Transduction de vecteurs

1. Test d'infection par quantification des cellules fluorescentes par FACS

Dans des plaques de 24 puits, 1×10^5 cellules U2OS sontensemencées. Le lendemain, les cellules sont prétraitées avec 1 mL de DMEM contenant ou non 5 μ M de composés ou un volume équivalent de DMSO seul pendant 1 h. Ensuite, les cellules sont transduites avec 50 pp/cellule de vecteur Ad5-VI-wt-GFP ou Ad5-VI-M1-GFP et incubées à 37°C pendant 3 h en présence ou non des drogues. Le milieu contenant les virus est enlevé et remplacé par du milieu DMEM frais contenant ou non les composés, puis les cellules sont incubées à 37°C. Vingt-quatre heures ou 48 h post-transduction, le milieu de culture est enlevé, les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis 200 μ L par puits de trypsine sont ajoutés. Une fois que les cellules sont détachées, 400 μ L de PBS 1X sont ajoutés à chacun des puits. Deux cents μ L du mélange de cellules en suspension sont déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits à fond rond. La plaque est ensuite analysée par cytométrie en flux (FACS pour « Fluorescence Activated Cell Sorting ») sur le cytomètre CantoII[®] (BD Biosciences). Les cellules positives pour la GFP sont dénombrées et leur proportion sur une population totale de 10000 cellules est quantifiée grâce au logiciel FACSDIVA[®] (BD Biosciences).

2. Test d'infection par dénombrement et mesure des plages fluorescentes

Selon le même protocole que décrit précédemment (*Cf. Chapitre 5 2.2*), des cellules HEK293 $\alpha_v\beta_5$ sontensemencées dans les puits d'une plaque de 6 puits, infectées avec 0,1 pp/cellule de vecteur Ad5-VI-wt-GFP ou Ad5-VI-M1-GFP et recouvertes de DMEM complet contenant 1% agarose avec ou sans drogue ou bien un volume équivalent de DMSO seul. Six jours après infection, le nombre de plages fluorescentes est déterminé par microscopie à épifluorescence (Microscope Zeiss).

Des photos des plages sont prises à l'aide d'une camera connectée au microscope à épifluorescence. La propagation du virus est estimée grâce à la mesure du diamètre des plages fluorescentes. Pour cela, trois mesures sont prises (3 diagonales) et la moyenne des trois mesures pour chaque plage est comparée en fonction des différentes conditions.

Chapitre 8 : Tests de réplication

1. Quantification du nombre de copies de génome AdV par qPCR

Cent mille cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées ou non avec 5 μ M de drogue ou un volume équivalent de DMSO seul, pendant 1 h. Ensuite les cellules sont infectées avec 50 pp/cell de virus répliatifs HH-Ad5-wt ou HH-Ad5-M1. Après 3 h d'incubation, l'inoculum est enlevé, du milieu DMEM frais contenant ou non 5 μ M de drogue ou un volume équivalent de DMSO est ajouté et les cellules sont remises à 37°C. Quarante-huit heures après infection, le surnageant est collecté et clarifié par centrifugation à 14000 x g pendant 4 min à température ambiante. Le génome adénoviral est extrait de chaque condition grâce au kit d'extraction des acides nucléique viraux « high pure viral nucleic extraction kit » (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Le nombre de génomes viraux est quantifié par PCR quantitative grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques du gène *hexon* (AQ1 et AQ2 [Heim A, 2003]) et l'agent fluorescent SYBR[®] Green (SYBR[®] Green supermix, Quanta Bioscience). Une dilution en série du plasmide pcDNA3.1 codant pour le gène de l'hexon des adénovirus, est utilisée pour obtenir la courbe standard de la quantification. Le nombre de copies de génome viral par mL pour chaque condition est calculé à partir de la valeur de Ct (nombre de cycles nécessaires pour dépasser le seuil de détection de l'appareil) en se référant aux valeurs de génomes de la courbe standard.

2. Quantification relative des ARN viraux et cellulaires par RT-qPCR

2.1. Infection

Un million de cellules U2OS estensemencé dans des puits de plaque 6 puits. Vingt-quatre heures après, les cellules sont infectées ou non (mock) avec 2000 pp/cell de virus répliatifs HH-Ad5-wt ou HH-Ad5-M1 dans un milieu de culture contenant ou non des drogues (5 μ M de chaque drogue ou bien DMSO). Les cellules sont incubées 30 min à 4°C en présence des virus pour permettre leur association à la surface des cellules et synchroniser l'infection. Ensuite les cellules sont incubées 4 h à 37°C. Comme contrôle négatif de l'infection (Mock), les cellules non infectées sont cultivées et incubées selon les mêmes conditions que pour l'infection.

2.2. *Extraction des ARN*

i. Extraction Phénol/Chloroforme

Les cellules infectées sont lavées dans du PBS 1X et lysées en présence de 500 μ L de Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.). Ensuite, une extraction phénol-chloroforme est réalisée. Pour cela, le lysat cellulaire est transféré dans des tubes et 100 μ L de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont ensuite agités vigoureusement pendant 15 sec, incubés 3 min à température ambiante et centrifugés 10 min, à 13000 x g, à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et de nouveau 100 μ L de chloroforme sont ajoutés, les tubes sont agités vigoureusement pendant 15 sec, incubés 3 min à température ambiante et centrifugés 10 min, à 13000 x g, à 4°C. Les ARN contenus dans la phase aqueuse prélevée sont précipités par ajout de 250 μ L d'isopropanol dans chaque tube. Après une incubation de 10 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés 10 min, à 12000 x g, à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec 400 μ L d'éthanol 80% suivi d'une centrifugation de 10 min, à 13000 x g, à 4°C. Ensuite les culots sont séchés à l'air libre 5 à 10 min et dissous dans 20 μ L d'eau DEPC (0,1 % diethylpyrocarbonate). Les extraits sont stockés à - 20°C ou directement traités à la DNase.

ii. Quantification et vérification de l'intégrité des ARN

La qualité de chaque échantillon d'ARN extrait est déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose et sur puce à ARN (Bioanalyzer Agilent). Leur concentration est déterminée par spectrophotométrie (NanoDrop) en mesurant les DO à 260 et 280 nm et en calculant le rapport 260/280 nm.

iii. Traitement DNase et précipitation au chlorure de lithium

Un traitement DNase est réalisé sur les extraits d'ARN purifiés afin de dégrader tous les fragments d'ADN restants. Aux 19 μ L d'ARN extraits restants, 1 μ L de DNase (DNase I kit, Invitrogen) et 2 μ L de tampon DNase I 10 X sont ajoutés et incubés 30 min à température ambiante. Ensuite, afin d'enlever toute trace de DNase, une précipitation des ARN au chlorure de lithium est réalisée. Pour cela un volume égal (22 μ L) d'une solution de chlorure de lithium (LiCl) filtrée est ajouté aux échantillons d'ARN extraits. Le mélange est incubé au moins 30 min ou toute la nuit, à -20°C. Ensuite, le mélange est centrifugé 15 min, à 13000 x g, à 4°C. Puis 200 μ L d'éthanol 80% sont ajoutés sur le culot et centrifugés 10 min, à 13000 x g, à 4°C. Ensuite les culots sont séchés à l'air libre 5 à 10 min et dissous dans 20 μ L d'eau

DEPC. Après une seconde quantification par spectrophotométrie, les concentrations des échantillons d'ARN extraits sont ajustées à 500 ng/μL et les extraits sont stockés à -80°C.

2.3. *Transcription inverse (RT-PCR)*

La transcription inverse (RT) des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) est effectuée avec le kit Superscript™ III (Invitrogen). Pour cela, 500 ng des ARN extraits (500 ng/μL) sont rétrotranscrits dans 19 μL de milieu réactionnel RT :

- 4 μL de FSBuffer 5X,
- 1 μL DTT 0,1 M,
- 1 μL RT Superscript III,
- 1,4 μL oligo DT (2,5 μg/μL),
- 1 μL dNTP 10 mM,
- 10,6 μL H₂O DEPC,

pendant 30 min à 50°C, 30 min à 55°C et 15 min à 70°C. Après la réaction de RT, les 20 μL d'ADNc sont dilués par ajout de 50 μL d'eau DEPC dans chacun des tubes (70 μL total).

2.4. *PCR quantitative (qPCR)*

La quantification des ADNc des gènes d'intérêt est réalisée par la technique de PCR en temps réel à l'aide de couples d'amorces spécifiques (*Cf. Tableau des amorces utilisées pour la RT-qPCR*) et de l'agent intercalant fluorescent SYBR® Green. Le mélange réactionnel pour l'amplification des ADNc est composé de 2 μL de chacune des amorces à 10 pmol/μL, 1 μL d'eau, 10 μL du mélange B-R SYBR® Green SuperMix (Quanta Bioscience) et 5 μL de l'échantillon d'ADNc. Les conditions d'amplification par PCR sont 10 min à 95°C, suivi de 45 cycles avec (10 s à 95°C, 30 s à 58°C et 30 s à 72°C), avec la mesure de la fluorescence à la fin de la polymérisation, enfin 30 s à 95°C, 1 min à 50°C et 10 s à 50°C avec une augmentation de 5°C pendant 100 cycles pour obtenir la réalisation de la courbe de fusion. La PCR est réalisée sur l'automate « MyIQ Temps réel » de Biorad ou bien sur le Thermocycler CFX96. Le Ct ainsi que la température de fusion T_m, sont déterminés pour chaque amplification.

Amorces utilisées pour la RT-qPCR

| Amorces | Séquences | Références |
|---------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| GAPDH fwd | 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CA-3' | [Schreiner <i>et al</i> , 2012] |
| GAPDH rev | 5'-CCA GTA GAG GCA GGG ATG AT-3' | [Schreiner <i>et al</i> , 2012] |
| E1B-55k fwd | 5'-GAG GGT AAC TCC AGG GTG CG-3' | * |
| E1B-55k rev | 5'-TTT CAC TAG CAT GAA GCA ACC ACA-3' | * |
| E4orf6/7 fwd | 5'-ACA GAA CCC TAG TAT TCA ACC TGC-3' | * |
| E4orf6/7 rev | 5'-GAC AGC GAC ATG AAC TTA AGT GAG-3' | * |
| E1A fwd | 5'-GGC TCA GGT TCA GAC ACA GGA CTG TAG-3' | [Schreiner <i>et al</i> , 2012] |
| E1A rev | 5'-TCC GGA GCC GCC TCA CCT TTC-3' | [Schreiner <i>et al</i> , 2012] |

* conçues par le Dr T. Komatsu et synthétisées par Eurofins MWG Operon.

2.5. Quantification relative avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$

L'analyse de l'expression des gènes d'intérêt par qPCR est réalisée selon une quantification relative par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les quantités d'ADNc du gène d'intérêt (exemple E1A) dans les cellules infectées sont normalisées par rapport 1/ aux quantités d'ADNc obtenues pour le gène de référence, ici le gène de ménage de la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et 2/ aux valeurs de ces deux gènes obtenues avec les ARN issus des cellules non infectées (mock). Ainsi, l'expression relative du gène d'intérêt est calculée par la formule :

$$2^{-[(Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ GAPDH}) \text{ cellule infectée} - (Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ GAPDH}) \text{ mock}]}$$

3. Test de répliation par dénombrement des plages de lyse

(Cf. Chapitre 5 2.2)

Chapitre 9 : Analyse de la libération des pseudoparticules de Filovirus

1. Transfection de la protéine de capsid VP40

Quatre millions de cellules HEK293 sont ensemencés dans des plaques 6 puits. Le lendemain un microgramme de plasmide codant pour la protéine de capsid des filovirus VP40 est transfecté dans les cellules HEK293 par lipofection avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans de l'OptiMem (Invitrogen) selon la méthode décrite précédemment (*Cf. Chapitre 5 1.*).

Différentes constructions sont transfectées :

| Plasmide | Protéine codée | « Late domain » sur la protéine |
|------------------------------|----------------|---------------------------------|
| pCAGGS_MARV_VP40_wt | VP40 Marburg | PPxY |
| pCAGGS_MARV_VP40_PPxA_mutant | VP40 Marburg | PPxA |
| pCAGGS_MARV_VP40_ELB | VP40 Marburg | PTAPPEY de VP40 Ebola |

Tous ces plasmides ont été fournis par le Dr Olga Dolnik. Le plasmide pcDNA3.1 est utilisé comme contrôle négatif. Trois heures après la transfection, le milieu OptiMem est remplacé par du milieu DMEM frais contenant des drogues ou un volume équivalent de DMSO comme contrôle négatif.

2. Concentration des pseudoparticules virales (VLP)

Vingt-quatre heures post-transfection, le milieu est récupéré, centrifugé à 2500 rpm pendant 10 min pour sédimenter les débris cellulaires. Puis le surnageant est déposé sur un coussin de saccharose à 20 % dans du tampon STE (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]). Il est ensuite centrifugé à 36000 rpm pendant 2 h à 4°C dans un rotor Beckman SW41 comme décrit dans l'article de Han et al, en 2014 (Han et al. 2014b). Le culot est directement repris dans 50 µL de tampon Laemmli 1 X, 1 mM DTT.

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X, décollées (mécaniquement avec un râteau ou chimiquement avec de la trypsine), centrifugées à 14000 rpm pendant 10 min, puis lysées dans du tampon IP (50 mM Tris [pH 7,5], 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % déoxycholate de sodium, 0,1 % SDS) contenant 1 mM de PMSF. Le surnageant contenant le

lysats cellulaire est repris dans 30 μ L de tampon Laemmli 1 X, 1 mM DTT. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 10 min puis stockés à -20°C.

3. Quantification des pseudoparticules virales sécrétées

Les lysats cellulaires et les pseudoparticules virales (VLP pour « virus-like particles ») concentrées sont déposés sur gel SDS-PAGE 11%, transférés sur membrane de nitrocellulose puis un western-blot est réalisé comme décrit précédemment (*Cf. Chapitre 1 4. Détection des protéines par Western-blot*). Pour le western blot, l'anticorps de chèvre anti-VP40 et l'anticorps de souris anti-GAPDH sont utilisés (*Cf. Tableaux anticorps*). Le signal spécifique de VP40 et de la GAPDH est révélé par chimioluminescence et l'intensité des bandes est quantifiée en utilisant la caméra LAS 4000 (GE Healthcare) et le logiciel Image J. La quantité de VLP sécrétée est ainsi normalisée et calculée selon les formules suivantes :

- Le signal de VP40 dans les lysats cellulaires est noté **VP40-Cell** en présence de drogue et **VP40-Cell_{Mock}** en présence de DMSO.
- Le signal de VP40 dans le surnageant, qui reflète la quantité de VP40 sécrétée, est noté **VP40-VLP** lorsqu'il s'agit d'une condition en présence de drogue et **VP40-VLP_{Mock}** en présence de DMSO.

Dans un premier temps le signal de VP40 est normalisé par rapport à la moyenne du signal GAPDH obtenue sur l'ensemble des conditions :

$$\text{Norm-VP40-Cell} = \text{VP40-Cell} / \text{GAPDH}_{\text{MOY}}$$

Enfin l'efficacité de sécrétion des VLP est calculée grâce à la formule :

$$\begin{aligned} & \% \text{ VLP sécrétées} \\ & = [(\text{VP40-VLP} - \text{VP40-VLP}_{\text{Mock}}) + [\text{Norm-VP40-Cell} - \text{Norm-VP40-Cell}_{\text{Mock}}]] \end{aligned}$$

Chapitre 10 : Analyse de séquences et génération de motifs

MEME

1. Répertoire des protéines virales contenant des motifs [LP]PxY

La liste des protéines virales contenant un ou plusieurs motifs de type [LP]PxY est générée à l'aide de l'outil Blastp (« Basic Local Alignment Search Tool in protein ») qui recherche au sein de banques de données de séquences protéiques (ex : GenBank) toutes les séquences demandées. La banque de données « Virus » est sélectionnée et les différentes combinaisons de motif [LP]PxY (exemple PPSY, LPPY, ...) sont entrées individuellement comme requête de recherche. Parmi les séquences de protéines proposées, seules les protéines caractérisées et provenant de virus pouvant infecter l'homme sont sélectionnées. Dans un deuxième temps, la même procédure est appliquée sur la base de données de PubMed, les doublons sont éliminés et les protéines non trouvées par Blastp sont ajoutées à la liste. L'analyse bibliographique des protéines possédant un « late domaine » permet d'inclure de nouvelles protéines ou de confirmer la présence de protéines virales possédant des motifs de type PPxY dans la liste. Toutes les séquences protéiques sélectionnées sont ensuite classées par famille de virus puis par genre. Chaque séquence est étudiée afin de référencer ses identifiants (numéro d'accèsion GenBank, référence de la séquence NCBI ou le numéro d'entrée dans UniProtKB/Swiss-Prot), ses différents noms et lorsque c'est possible, ses fonctions et les références des articles décrivant une interaction entre la protéine virale et la famille des ubiquitine ligases Nedd4. Pour éviter les redondances, un seul nom de protéine et une seule protéine sont conservés au sein d'un même genre si plusieurs virus la possèdent (exemple: ARN-dépendante ARN polymérase 3D du poliovirus humain, du Coxsackievirus ou des Rhinovirus). Le tableau qui en résulte est liste de 83 protéines virales contenant un ou plusieurs motifs [LP]PxY par protéine. Ensuite les protéines sont classées par fonction : protéines de virion, protéines de répllication, protéines de membrane ou protéines régulatrices (Cf. *RESULTATS Chapitre 1 pour les détails des fonctions*). Des diagrammes en camembert représentant la proportion des protéines en fonction des familles de virus ou de leur fonction sont réalisés à l'aide du logiciel Prism.

2. Génération de motif MEME

A partir des séquences FASTA des protéines virales contenant des motifs de type [LP]PxY appartenant à différentes familles, des séquences au format FASTA, de 12 acides aminés commençant 4 acides aminés avant le motif [LP]PxY et finissant 4 acides aminés après le motif sont réalisées. Toutes les « séquences-courtes FASTA » sont alignées grâce au logiciel ClustalW et analysées avec le logiciel MEME pour permettre la génération de motifs MEME. Ces motifs représentent, de manière proportionnelle en fonction de la hauteur des lettres, la fréquence de chaque acide aminé à une position donnée en fonction de l'alignement des séquences obtenu.

RESULTATS

Chapitre 1 : Motif [LP]PxY/Domaine WW, une interaction virus/hôte commune

1. Les protéines à motif [LP]PxY chez les virus humains

La machinerie cellulaire associée à la dégradation des protéines par le protéasome 26S mais aussi à l'endocytose et à la biosynthèse des protéines (Hicke 2001; Bonifacino and Traub 2003) (*via* le trafic des corps multi-vésiculaires) utilise des interactions protéine-protéine (IPP) de type motif [LP]PxY/domaine WW.

Le motif PPxY (où x désigne n'importe quel acide aminé) fait partie des « late domains » que l'on retrouve sur les protéines d'un grand nombre de virus enveloppés qui détournent la machinerie cellulaire afin de permettre leur bourgeonnement à la surface des cellules infectées (Bieniasz 2006) (*Cf. INTRODUCTION chapitre 2*). Les motifs de type [LP]PxY (LPxY ou PPxY) sont capables d'interagir avec les domaines WW des E3 ubiquitine ligases de la famille Nedd4 (Ingham et al. 2005) (*Cf. INTRODUCTION chapitre 4*). Notre laboratoire a également mis en évidence l'implication d'une interaction entre un motif [LP]PxY viral et un domaine WW de la protéine cellulaire Nedd4-2 dans l'entrée de l'adénovirus, un virus non-enveloppé (Wodrich et al. 2010) (*Cf. INTRODUCTION chapitre 3*).

Malgré de nombreuses études sur le rôle des motifs PPxY viraux, la représentation de ces motifs parmi les virus n'a pas été déterminée. Notre objectif étant d'utiliser l'interaction PPxY/Nedd4 comme cible, nous avons cherché à identifier toutes les protéines connues, possédant un ou plusieurs motifs [LP]PxY afin d'estimer la fréquence de ces motifs chez les virus capables d'infecter l'homme.

Dans un premier temps, nous avons regroupé toutes les informations publiées à ce sujet à partir des données de la littérature et des bases de données. Nous avons aussi cherché les protéines possédant les différents types de motifs [LP]PxY (*exemples: LPAY, LPCY... PPAY, PPCY*) dans les bases de données UniProt et GenBank par PubMed en limitant la recherche de séquences aux protéomes viraux. Nous avons également comparé les différents types de

motifs [LP]PxY à des banques de séquences protéiques avec le logiciel Blastp (Cf. *MATERIEL ET METHODES, Chapitre 10*).

Sur les 300 séquences protéiques obtenues, nous avons sélectionné les protéines de virus capables d'infecter l'homme (pathogènes des mammifères comprenant l'Homme et pathogènes humains exclusifs) ce qui a réduit à peu près de moitié le nombre de séquences. Parmi les séquences restantes, nous avons éliminé celles pour lesquelles aucune caractérisation n'a été publiée mais qui sont apparues dans notre analyse par simple similarité de séquence. Nous avons également regroupé sous un seul nom la même protéine, caractérisée chez différentes espèces au sein d'un même genre de virus.

Au final, nous avons identifié 83 protéines virales toutes caractérisées, possédant un ou plusieurs motifs [LP]PxY (**Tableau 3**) et appartenant à 22 familles de virus différentes (**Figure 1A**). Sachant qu'à l'heure actuelle, on dénombre 23 familles de virus pouvant infecter l'homme, cela signifie que la totalité des virus humains à l'exception de la famille des *Astroviridae* possède au moins une protéine avec un motif [LP]PxY et par conséquent, que ce motif est conservés chez les virus humains.

Par la suite, nous avons voulu estimer la proportion des protéines à motif [LP]PxY dans les protéomes viraux et humain afin de déterminer si il existait une éventuelle prédominance de ces motifs chez les virus. Une conservation du motif soulignerait sa fonction essentielle dans la réplication des virus.

Dans leur étude, l'équipe de Tapia *et al*, comptabilise environ 2000 protéines contenant des motifs PPxY dans le protéome humain (Tapia et al. 2010). Sachant que le protéome humain est constitué d'environ 60000 protéines, nous avons alors simplement estimé la proportion de protéines humaines possédant un motif de type PPxY à environ 3% (**Figure 2**). Ce pourcentage reste toutefois sous-estimé car il ne comptabilise pas les protéines humaines à motif de type LPxY ce qui induit un biais dans l'interprétation des résultats.

Nous avons utilisé la liste des 83 protéines virales possédant un motif [LP]PxY établie précédemment (**Tableau 3**) et les données du « FIELDS Virology » (6^e édition) pour estimer le pourcentage de protéines virales qui possèdent des motifs [LP]PxY dans chacun des protéomes de ces familles de virus.

Nous avons constaté une surreprésentation des motifs [LP]PxY dans le protéome des virus (**Figure 2**). En effet, plus de la moitié des protéomes des familles de virus étudiées est composée d'un minimum de 15% de protéines à motifs [LP]PxY contre 3% dans le protéome humain. Cependant, cette comparaison n'a pu nous donner que des indications qualitatives du

Tableau 3: Liste des protéines virales possédants un motif [LP]PxY.

| Genus | Species | Protein | Motif | General function | Access. No | Ref. NEDD4† |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| Adenoviridae family (ds DNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Adenovirus | Mastadenovirus D/F | hexon capsid protein | VEDELPNYCFPL | Virion protein | CAG34211.2 ¹ | Unknown |
| | Mastadenovirus D | membrane protein E3 RID-beta | PREDLPRYPLVN | Membrane protein | ABK35055.1 ¹ | Unknown |
| | Mastadenovirus B/D | control protein E4orf2 | IRETLPDVVSST | Oncoprotein | AGV32789.1 ¹ | Unknown |
| | Mastadenovirus C | membrane glycoprotein E3 CR1-beta; early E3A 11.6 kDa glycoprotein | RRARPPPIYRPII | Membrane protein | AGT75995.1 ¹ | Unknown |
| | Mastadenovirus A/B/C/D/E/F/G | capsid protein pVI | QIDEPPSYEEAL | Virion protein | AP_000174.1 ³ | KNOWN |
| Mastadenovirus C | penton base protein | EEGPPPSYESVV... PPFVPPRYLRPT | Virion protein | AAA42519.1 ¹ | KNOWN | |
| Poxviridae family (ds DNA, enveloped) | | | | | | |
| Parapoxvirus | Orf virus | late membrane protein | RDTRLPYCWWYA | Membrane protein | ABA00572.1 ¹ | Unknown |
| Orthopoxvirus | Cowpox virus | CPXV108 protein; entry-fusion complex protein O3L; late 16 kDa putative membrane protein | IDTRLPYCWWYE | Virion protein | NP_619893.1 ³ | Unknown |
| | | protein J5; protein F11 | IDTRLPYCWWYE | Virion protein | P07618.2 ³ | Unknown |
| | Vaccinia virus | protein C13; protein B23R | SNGGLPAYYRNG | Unknown | P17365.1 ³ | Unknown |
| | Vaccinia virus | protein B3 | IRQLPLYSLLL | Unknown | Q01226.1 ³ | Unknown |
| | Vaccinia virus ¹ , Cowpox virus, Monkeypoxvirus | iActA-like proline repeat-containing protein | RPRTPPSYEEIA | Unknown | AEY74991.1 ¹ | Unknown |
| | Variola virus | ankyrin-like protein | ISTMLPEYFYLG | Membrane protein | ABF23142.1 ¹ | Unknown |
| | Variola virus ¹ , Cowpox virus, Vaccinia virus | A-type inclusion protein | HEKPLPNYTFPR | Unknown | ABF26513.1 ¹ | Unknown |
| | Variola virus ¹ , Vaccinia virus | DNA pol. processivity factor component A20 | YYIFLPPVFGSV | Replication protein | P33843.1 ³ | Unknown |
| Variola virus | IMV membrane protein | IDTRLPYCWWYE | Virion protein | ABF23049.1 ¹ | Unknown | |
| Papillomaviridae family (ds DNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Alphapapillomavirus | Human papillomavirus (HPV) ** HPV 16 | L1 capsid protein | TPPRLPVYRTHI | Virion protein | ACK56400.1 ¹ | Unknown |
| | | E1 protein | DGDSLPTYKCVS | Replication protein | AFJ19827.1 ¹ | Unknown |
| | HPV 39 ¹ , HPV 67, HPV 68a | E4 protein | LLNLLPNYQTPP | Unknown | AGU90566.1 ¹ | Unknown |
| | HPV 53 | E7 early protein | NVPTLPQYIIEI | Oncoprotein | AET51808.1 ¹ | Unknown |
| Herpesviridae family (ds DNA, enveloped) | | | | | | |
| Varicellovirus | Human herpesvirus 3 | membrane ORF0 protein | PIPYLPTYAEAV... VADAPPPYRSRE | Replication protein | AGY33694.1 ¹ | Unknown |
| Simplexvirus | Human herpesvirus 1 | latency associated transcript (LAT) ORF-1 | NTAPPPSYHRAC | Pathway modulator | AAA45796.1 ¹ | Unknown |
| | Human herpesvirus 1 | UL56 Protein; tegument protein | FADPPPPYDLSL... PTDPPPPYSAGP... LLSGLPTYAEAM... MSDHPPTYATVV | Virion protein | Q90040 ³ | KNOWN |
| | Human herpesvirus 1 | ICP0 | NHVTPPEYPTAP | Replication protein | AER38009.1 ¹ | Unknown |
| Cytomegalovirus | Human herpesvirus 5 | membrane glycoprotein UL141 | GYRRLPTYDSYP | Membrane protein | AII80052.1 ¹ | Unknown |
| | Human herpesvirus 5 | envelope glycoprotein B; UL55 | VVDPLPPYLKGL... SLQAPPSYEEVS | Virion protein | P13201 ³ | Unknown |
| Roseolovirus | Human herpesvirus 6A | small capsid protein; uncharact. protein U32 | LGVFLPKYAKQN | Virion protein | NP_042925.1 ³ | Unknown |
| | Human herpesvirus 6A | U44; tegument protein | LLGLLPMYKKTG | Virion protein | AHK06973.1 ¹ | Unknown |
| | Human herpesvirus 7 | protein U24 | HETPPPSYNDVM | Pathway modulator | YP_073763.1 ³ | Unknown |
| | Human herpesvirus 7 | major capsid Scaffold Protein; U53.5 | NYHIPPYWYPS | Replication protein | AAC40768 ¹ | Unknown |
| Lymphocryptovirus | Human herpesvirus 4 | LMP2A; latent membrane protein 2A | NEEPPPPYEDPY... DGLPPPYSPRD | Membrane protein | CAA57375 ¹ | KNOWN |
| Polyomaviridae family (ds DNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Polyomavirus | BK polyomavirus ¹ , Merkel cell polyomavirus | VP1 protein | DRKMLPCYSTAR | Virion protein | AAL31866.1 ¹ | Unknown |
| Parvoviridae family (ss DNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Erythrovirus | Human parvovirus B19 | major capsid protein VP2 | WVYFPQYAYLT | Virion protein | AGT28125.1 ¹ | Unknown |
| Anelloviridae family (ss DNA, enveloped) | | | | | | |
| Alphatorquevirus | Torque teno virus | ORF1 | PYTIPPIYNKNN | Unknown | BAA94930.1 ¹ | Unknown |
| | Torque teno virus | ORF2 | MPWHPPGYNVQQ | Unknown | BAB79337.1 ¹ | Unknown |
| | Torque teno virus | ORF4 | YPGDPPFYWLP | Unknown | BAB79327.1 ¹ | Unknown |
| Reoviridae family (ds RNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Rotavirus | Human rotavirus A | VP6 major capsid protein | QLMRPPNYDTSC | Virion protein | ACE80913.1 ¹ | Unknown |
| | Human Rotavirus A | VP2 inner capsid protein | EPKQLPIYRANG | Virion protein | ABF50111.1 ¹ | Unknown |
| Orbivirus | Kemerovo virus | VP3 inner capsid protein | VEERLPVYRFE | Virion protein | AGW30382.1 ¹ | Unknown |
| | Orungo virus | NS3, glycoprotein | EMRGPPSYEPSG | Membrane protein | AFX73397.1 ¹ | KNOWN |
| Hepeviridae family (ss RNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Hepevirus | Hepatitis E virus | phosphoprotein; ORF3 | PVTELPLYPMPG | Pathway modulator | AFK65678.1 ¹ | Unknown |
| Caliciviridae family (ss RNA, non-enveloped) | | | | | | |
| Norovirus | Human norovirus Saitama | RNA dependent RNA polymerase | DRNLLPDYVND | Replication protein | BAD14502.1 ¹ | Unknown |
| | Human norovirus | capsid protein | QQWTLPPYAGQF | Virion protein | ADB81888.1 ¹ | Unknown |

| Picornaviridae family (ss RNA, non-enveloped) | | | | | | |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------|--------------|----------------|
| Enterovirus | Human poliovirus 2*, <i>Coxsackievirus A20</i> , <i>Rhinovirus C</i> | RNA-dependent RNA polymerase 3D | RALLPEYSTLY | Replication protein | AIU47690.1* | <i>Unknown</i> |
| | Human rhinovirus*, <i>Coxsackievirus A16</i> , <i>Enterovirus A71</i> | viral coat protein VP2 | LLGNLPIYPHQY | Virion protein | CAA87649.1* | <i>Unknown</i> |
| Flaviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Flavivirus | Dengue virus 4 | NS4A protein | EIASLPTYLSSR | Replication protein | NP_740322.1‡ | <i>Unknown</i> |
| | Dengue virus 5 | nonstructural protein NS2A | GAQALPVVLMTL | Replication protein | AAN38589.1* | <i>Unknown</i> |
| Hepadnavirus | Hepatitis C virus | NS5A | CFKTPPEYPPAL | Unknown | AGL46647.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hepatitis C virus | E1 envelope protein; | VVLVPPQYHEFT | Virion protein | AIN56484.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hepatitis C virus | core protein | RSWAPPGYPWPL | Virion protein | AIY22622.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hepatitis C virus | RNA-dependent RNA polymerase | CGNTLPSYLKAS | Replication protein | AIU47944.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hepatitis C virus | E2 protein | PALALPMYSQFY | Virion protein | AGN91967.1* | <i>Unknown</i> |
| Coronaviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Coronavirus | SARS coronavirus sf098 | spike glycoprotein, S protein | QDLFLPFYSNVT | Virion protein | AAS48582.1* | <i>Unknown</i> |
| | Human coronavirus OC43*, <i>Transmissible gastroenteritis virus</i> | membrane protein; M matrix; glycoprotein; pfam01635 | SLADLPAYMTVA | Virion protein | BAM16435.1* | <i>Unknown</i> |
| Togaviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Alphavirus | Ross River virus | E3 protein | PCSSPPCYPCCY | Virion protein | NP_740683.1‡ | <i>Unknown</i> |
| | Chikungunya virus | E1 envelope glycoprotein | KDKNLDPYSCKV | Virion protein | AFK33214.1* | <i>Unknown</i> |
| Rubivirus | Rubella virus | E1 envelope glycoprotein | LLNTPPPYQVSC | Virion protein | ABP73268.1* | <i>Unknown</i> |
| Filoviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Ebola-like viruses | Ebola virus | Matrix protein VP40 | LPTAPPEYMEAI... PPVQLPQYFTFD... IPVLLPKYIGLD | Virion protein | Q77DJ6.1‡ | KNOWN |
| Marburg-like viruses | Marburg virus*, <i>Ravn virus</i> | Matrix protein VP40 | QYLNPPPYADHG | Virion protein | Z29337‡ | KNOWN |
| Paramyxoviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Metapneumovirus | Human metapneumovirus | glycoprotein | DASSPPHYAQRG | Virion protein | AFI56763.1* | <i>Unknown</i> |
| Pneumovirus | Hu. respiratory syncytial virus | fusion glycoprotein F0 | YVVQLPIYVID | Virion protein | BAJ14139.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hu. respiratory syncytial virus | glycoprotein G | PTTTPPIYNSA | Virion protein | CAL64793.1* | <i>Unknown</i> |
| Rubulavirus | Mumps virus | small hydrophobic protein | PAIQPPLYLTLF | Membrane protein | AGT20054.1* | <i>Unknown</i> |
| Morbillivirus | Measles virus | L-protein, RNA dependent RNA polymerase | KAFRPPHYDVAK | Virion protein | BAB60955.1* | <i>Unknown</i> |
| Rhabdoviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Vesiculovirus | Vesicular stomatitis virus*, <i>Piry virus</i> , <i>Isfahan virus</i> , <i>Chandipura virus</i> | Matrix protein, protein M | KMGLPPPYDESC | Virion protein | M14553‡ | KNOWN |
| Lyssavirus | Mokola virus | nucleoprotein, protein N | ETAVPSPYFIHF | Virion protein | AAD54628.1* | <i>Unknown</i> |
| | Rabies virus*, <i>Mokola virus</i> , <i>Aravan virus</i> , <i>Irkut virus</i> | Matrix protein, protein M, Phosphoprotein M2 | LWLPPEYVPLK | Virion protein | P16287.1‡ | KNOWN |
| Orthomyxoviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Influenzavirus A | Influenza A virus | RNA-dependent RNA polymerase subunit PA | IPNGPPWYQRSQ | Replication protein | ABD59846.1* | <i>Unknown</i> |
| | Influenza A virus | NS1 | GRLPLPPYQKRK | Replication protein | AAT12118.1* | <i>Unknown</i> |
| Arenaviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Arenavirus | Junin virus | glycoprotein 1 | IAVLLPQYDVII | Virion protein | AAF81486.1* | <i>Unknown</i> |
| | Lymphocytic choriomeningitis virus*, <i>Lassa virus</i> , <i>Luna virus</i> , <i>Lunk virus</i> , <i>Dandenong virus</i> , <i>Mobala virus</i> , <i>Ippy virus</i> | Z protein, Ring Finger Protein | APSSPPPYEE | Virion protein | CAA10342‡ | KNOWN |
| Bunyaviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Bunyavirus | Batai virus | RNA-dependent RNA polymerase | NQIYLPPYFNAK | Replication protein | AID57444.1* | <i>Unknown</i> |
| Hantavirus | Dobrava-Belgrade virus | L protein, RNA dependent RNA polymerase | YVKNNPPYIPDY | Replication protein | CAA08824.1* | <i>Unknown</i> |
| Retroviridae family (ss RNA, enveloped) | | | | | | |
| Lentivirus | Human immunodeficiency virus 1*, <i>Human immunodeficiency virus 2</i> | envelope glycoprotein gp120 | FGASLPPYMPNS | Virion protein | AAF28081.1* | <i>Unknown</i> |
| | HIV-1 | vpu protein | MPPSYIAAI | Membrane protein | ADF97429.1* | <i>Unknown</i> |
| | HIV-1 | tat protein | RRGAPPEYPSNQ | Replication protein | ADF85662.1* | <i>Unknown</i> |
| | HIV-1 | nef protein, negative factor | ARELPPEYFKNY | Pathway modulator | AFJ32502.1* | <i>Unknown</i> |
| Deltaretrovirus | Human T-lymphotropic virus | envelope glycoprotein gp46 | APPLLPHYLDH | Virion protein | AAB19054.1* | <i>Unknown</i> |
| Alpharetrovirus | HTLV-1*, <i>HTLV-2</i> | gag protein | DPQIPPPYVEPT | Virion protein | AAP15540.1* | KNOWN |
| | Rous sarcoma virus*, <i>Rous associated virus</i> | gag protein | ASAPPPPYVGS | Virion protein | O92954.1‡ | KNOWN |
| Hepadnaviridae family (ds DNA, enveloped) | | | | | | |
| Orthohepadnavirus | Hepatitis B virus | core protein, HBcAg | DFPAPPSLYLRK | Virion protein | AGP08058.1* | KNOWN |
| | Hepatitis B virus | S protein, envelope protein, HBsAg | PTSCPPYIPNYH | Virion protein | AIW60917.1* | <i>Unknown</i> |
| | Hepatitis B virus | RNA-dependent DNA polymerase | GSSGLPGYVARL | Replication protein | ABI35160.1* | <i>Unknown</i> |

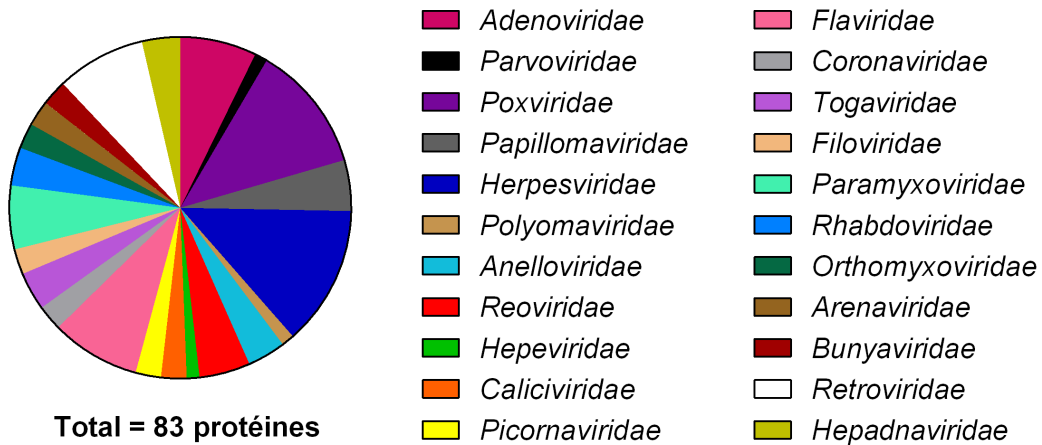
* If there is more than one species possessing the same protein, the sequence of the first listed species was used to describe the motif. The other species are written in *italic*.

** Type unspecified. † GenBank accession number. ‡ NCBI Reference Sequence. § UniProtKB/Swiss-Prot entry. ds: double-stranded, ss: single-stranded DNA/RNA

† cf. Tableau 2 for reference describing the interaction between the protein and the Nedd4-family of E3 ubiquitin ligases.

A

Familles de virus



B

Fonctions des protéines

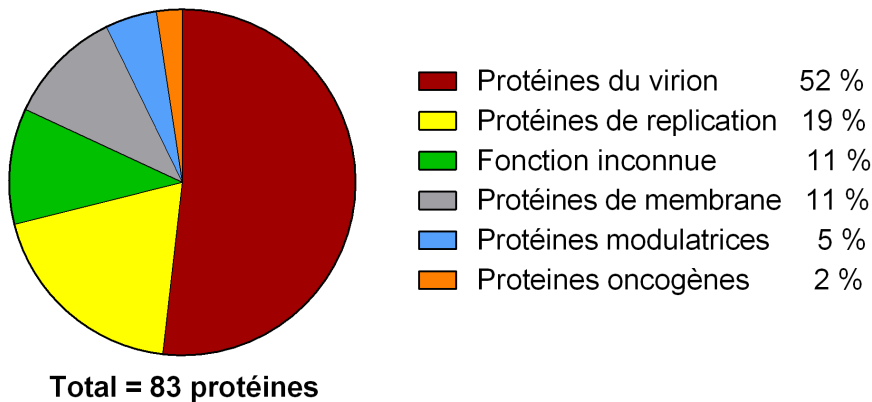
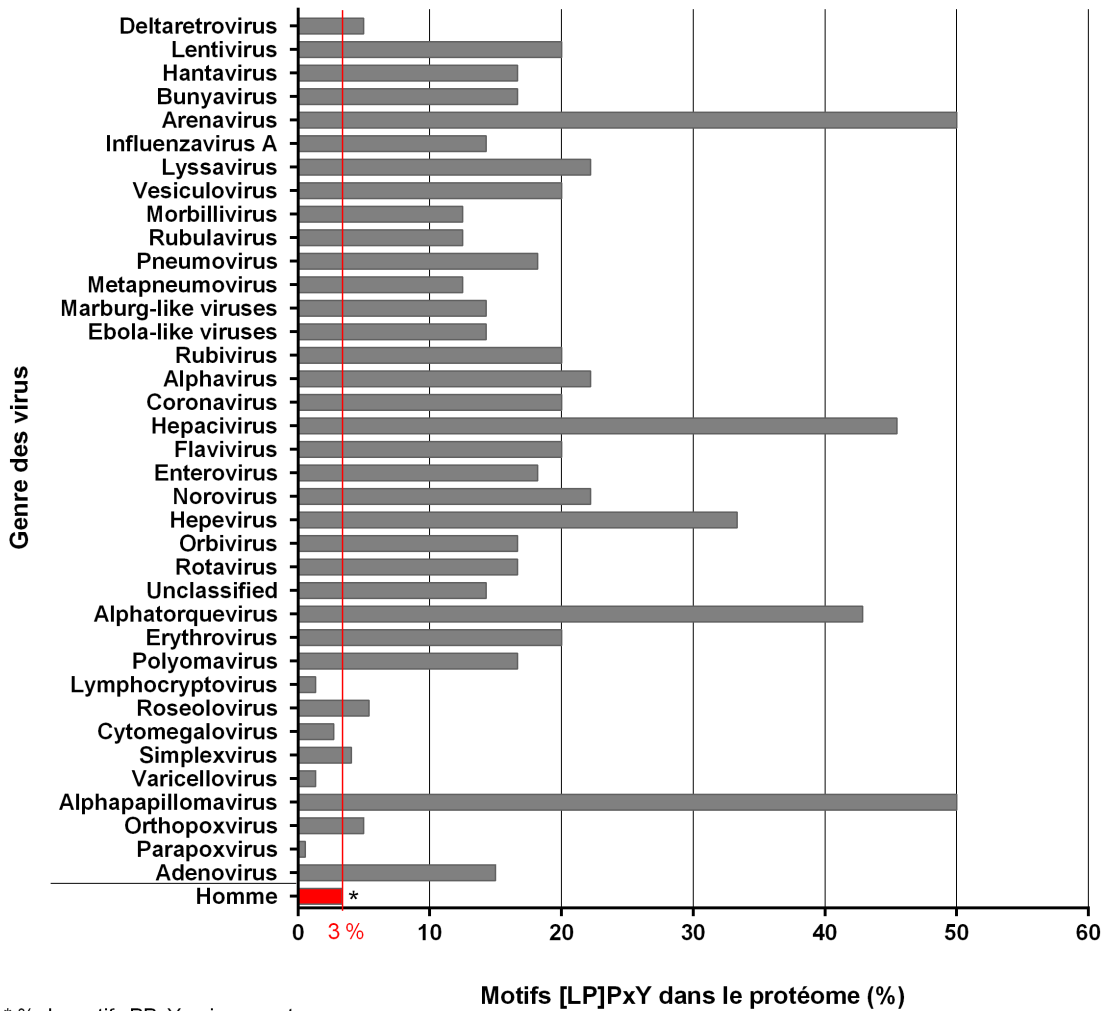


Figure 1: Distribution des motifs [LP]PxY des protéines virales. (A) Répartition des protéines virales avec un motif [LP]PxY listées dans le Tableau 3, en fonction de la famille des virus. (B) Répartition des protéines virales avec un motif [LP]PxY listées dans le Tableau 3, en fonction de leur propriété principale. « *protéines de virion* » : protéines de la capsid, du tégument, de la matrice et/ou d'enveloppe des virions. « *protéines de réplication* » : polymérases, cofacteurs viraux, hélicases, protéines de remodelage de la chromatine, activateurs de la transcription, protéases et protéines impliquées dans le transport ou dans l'épissage des ARN. « *protéines de membrane* » : glycoprotéines et protéines virales membranaires ne faisant pas partie de l'enveloppe virale. « *protéines régulatrices* » : protéines virales interférant avec les voies de signalisation cellulaire.



* % de motifs PPxY uniquement

Figure 2: Proportion des motifs [LP]PxY dans les protéomes viraux. La proportion des motifs [LP]PxY dans le protéome des différents genres de virus est représentée en pourcentage de protéines possédant un motif [LP]PxY par rapport aux protéines codées pour chacun des genres. La proportion de motifs PPxY dans le protéome humain est représentée (*en rouge*), estimée d'après les données de Tapia *et al* (2010).

fait des différents biais compris dans cette analyse. En effet, le manque d'information précise sur le nombre exact de protéines codées par chacun des protéomes viraux induit un biais et une sur- ou sous-estimation du pourcentage de protéines virales possédant un motif [LP]PxY.

Le fait que 22 familles de virus différentes possèdent des protéines avec des motifs [LP]PxY et leur prédominance par rapport au protéome humain soulignent l'importance du motif [LP]PxY, très probablement impliqué dans leur cycle de réplication. Les interactions mettant en jeu ce motif représentent donc des cibles de choix pour un antiviral. De plus, on retrouve ce type de motif chez tous les types de virus : à ARN, à ADN, enveloppés et non-enveloppés.

2. Etude des fonctions des protéines virales à motif [LP]PxY

Puisqu'il existe des protéines possédant un ou plusieurs motifs [LP]PxY chez la plupart des virus infectant l'homme, nous avons voulu savoir si ces 83 protéines partageaient une fonction commune. Il a été montré qu'entre 5 et 20% des cibles cellulaires étaient partagés par plusieurs familles de virus (Meyniel-Schicklin et al. 2012). Ainsi le motif [LP]PxY pourrait être à l'origine d'une IPP virus/hôte impliquée dans une voie commune à tous les virus.

Pour cela, chaque protéine a été classée en fonction de sa caractéristique fonctionnelle principale et/ou de sa localisation dans le virus, dans l'un des cinq grands groupes suivants :

- *Les protéines de virion* comprenant les protéines de la capsid, du tégument, de la matrice et de l'enveloppe dans le cas des virus enveloppés,

- *Les protéines de réplication* avec les polymérases virales et leurs cofacteurs, des hélicases virales, des protéines de remodelage de la chromatine, des activateurs de la transcription, des protéases et des protéines impliquées dans le transport ou dans l'épissage des ARN.

- *Les protéines de membrane* regroupant les glycoprotéines et les protéines virales membranaires (différentes des protéines d'enveloppe virale).

- *Les protéines régulatrices* avec les protéines virales interférant avec les voies de signalisation cellulaire.

- *Les protéines aux fonctions inconnues.*

Les protéines ayant une double fonction ont été classées dans le groupe associé à leur fonction principale, par exemple une protéine de capsid qui possède une activité transactivatrice aura été classée parmi les protéines de virion.

Les résultats montrent que plus de la moitié (52%) des protéines virales possédant un motif [LP]PxY sont des protéines du virion (**Tableau 3** et **Figure 1B**). On y retrouve les protéines de matrice des virus enveloppés dont le rôle des motifs [LP]PxY a été largement décrit dans le bourgeonnement de ces virus enveloppés (Bieniasz 2006). On retrouve également les protéines structurales de la capsidie des virus enveloppés et non-enveloppés. Ainsi la protéine VI de capsidie des adénovirus déjà décrite par notre laboratoire, est un exemple de protéine de virus non-enveloppé possédant un motif [LP]PxY capable d'interagir avec les ubiquitine ligase Nedd4 lors de l'entrée du virus dans la cellule (Wodrich et al. 2010). D'autres protéines de capsidie de virus non-enveloppés sont identifiées : la protéine L1 des papillomavirus, la protéine VP1 du BK virus, les protéines VP2, VP3 et VP6 des Rotavirus, la protéine VP2 des virus de la famille des *Picornaviridae* ou encore la protéine de capsidie des Norovirus. Cependant, le rôle du motif [LP]PxY dans les cycles de réplication de ces virus non-enveloppés reste encore à élucider.

L'autre fonction largement représentée est la réplication des virus qui comprend près de 19 % des protéines virales possédant un motif [LP]PxY. On retrouve ainsi les précurseurs Gag des rétrovirus, dont les « late domains » ont été décrits dans le recrutement de la machinerie ESCRT associée à l'étape de bourgeonnement des virus enveloppés (*Cf. Introduction, Chapitre 2*). Récemment l'équipe de Kuo *et al*, a mis en évidence l'implication de la Nedd4-2 dans la réplication des Entérovirus appartenant à la famille des *Picornaviridae* sans définir l'interaction en jeu (Kuo et al. 2015). Or dans notre analyse (**Tableau 3**), nous avons identifié un motif de type [LP]PxY sur la polymérase virale. Celui-ci pourrait être responsable du recrutement de la Nedd4-2.

Les 29 % restants sont principalement constitués par des protéines de membrane ou par des protéines aux fonctions inconnues.

Les motifs de type [LP]PxY sont présents chez tous les virus capables d'infecter l'Homme, qu'ils soient des virus à ARN, à ADN, enveloppés ou non. La plus grande partie des protéines virales possédant ce motif sont des protéines du virion suggérant un rôle des IPP impliquant ces motifs dans les étapes d'entrée, d'assemblage et de libération des virus. Cette hypothèse est confirmée par le fait que certaines d'entre elles sont déjà décrites comme impliquées dans les étapes d'entrée (ex : protéine VI de l'Adénovirus) ou de sortie des virus (ex : précurseurs Gag des Rétrovirus ou protéines VP40 des Filovirus). L'ensemble de ces résultats souligne le fait que les motifs [LP]PxY ne sont pas uniquement impliqués dans le bourgeonnement des virus enveloppés comme cela a été historiquement découvert, mais

également dans les phases précoces et tout au long du cycle de réplication des virus qu'ils soient enveloppés ou non. Ces motifs sont également présents dans un grand nombre de protéines virales impliquées dans les étapes de réplication des virus. Ce résultat renforce l'idée selon laquelle, les motifs de type [LP]PxY ont été conservés au cours de l'évolution dans le protéome des virus car ils seraient nécessaires aux IPP virus/hôte tout au long du cycle de réplication des virus de tout type.

3. Recherche de résidus conservés autour du motif [LP]PxY

Parmi les protéines virales identifiées dans notre analyse, treize protéines appartenant à huit familles différentes (*Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Reoviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Arenaviridae*, *Retroviridae* et *Hepadnavirus*) ont été décrites dans la littérature comme capables d'interagir avec les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 (Cf. *INTRODUCTION chapitre 2 et 4*) (**Tableau 3**). Nous nous sommes donc demandés si l'environnement en acides aminés autour du motif [LP]PxY était conservé au sein d'une même famille ou des différentes familles de virus.

La protéine VI des AdV et les protéines de matrice de certaines familles de virus, font partie des protéines dont l'interaction avec les Nedd4 a déjà été décrite (Wodrich et al. 2010), Harty et al. 2001, Harty et al. 2000). Nous avons donc choisi de sélectionner les séquences des protéines VI de toutes les espèces d'*Adenoviridae* et les séquences des protéines de matrice des *Filoviridae* et des *Rhabdoviridae*, chez qui les interactions avec la Nedd4 ont été décrites (Tableau 2). Nous avons également choisi de sélectionner les séquences des protéines de matrice des *Arenaviridae* car c'est dans cette famille et dans les précédentes, que nous avons trouvé le plus de genres de virus possédant une protéine commune avec un motif [LP]PxY. De plus, des interactions entre ces protéines et les domaines WW de la Nedd4 ont été décrites (Tableau 2).

A partir des séquences protéiques entières, des séquences courtes de 12 acides aminés comprenant 4 acides aminés avant et après le motif [LP]PxY ont été extraites. Chaque groupe de séquence a été aligné et la conservation des résidus autour des motifs a été analysée par génération de motifs MEME (**Figure 3**).

A *Adenoviridae*, Protéines VI de capsid, n=52



B *Rhabdoviridae*, Protéines de matrice, n=25



C *Arenaviridae*, Protéines Z de matrice, n=11



D *Filoviridae*, Protéines VP40 de matrice, n=28



Figure 3: Analyse des séquences autour des motifs [LP]PxY. Séquences de 12 acides aminés comprenant le motif [LP]PxY et 4 acides aminés avant et après le motif [LP]PxY. (A) Protéines de capsid VI des Adénovirus, (B) Protéines de matrice des Rhabdovirus, (C) Protéines de matrice Z des Arénavirus et (D) Protéines de matrice VP40 des Filovirus. Les séquences ont été alignées avec Clustal W et analysées avec le logiciel MEME. La taille de chaque acide aminé à chacune des positions sur la séquence est donnée en fonction de sa fréquence. Toutes ces séquences de 12 acides aminés sont listées dans le Tableau 3.

Le motif MEME généré à partir des séquences des motifs des protéines de capsid VI des différentes espèces d'AdV montre une conservation d'acides glutamiques et d'une alanine autour du motif : EPPSYEEA.

Cependant, aucune conservation d'acides aminés voisins du motif [LP]PxY n'est observée dans les protéines de matrice des *Rhabdoviridae*, des *Arenaviridae*, ni des *Filoviridae*. De ce fait, aucune conservation commune à l'ensemble de ces familles n'a pu être observée à l'exception du motif [LP]PxY lui même.

Il n'y a pas de conservation au niveau des séquences de chaque famille étudiée. Cela indique qu'il n'y a pas de d'interaction avec des partenaires cellulaires qui soit spécifique d'une famille de virus. Ces résultats suggèrent donc que la conservation du motif [LP]PxY seul, dans les protéines des différentes espèces et familles de virus, doit suffire pour permettre son interaction avec le système cellulaire. Ceci est confirmé par le fait que les « late domains » ont été décrits comme des éléments interchangeable. De plus, ils conservent leur fonctionnalité même si ils sont déplacés sur la séquence protéique à laquelle ils appartiennent (Zhadina and Bieniasz 2010).

De ce fait cibler ce motif ou bien les interactions mises en jeu permettrait d'inhiber une interaction hôte/pathogène commune et impliquée dans différentes étapes de la réplication des virus, constituant une cible antivirale idéale à large spectre.

4. Conclusion

Jusqu'en 2010, les motifs PPxY étaient uniquement décrits comme des « late domains » impliqués dans les étapes de bourgeonnement des virus enveloppés (Cf. *INTRODUCTION Chapitre 2*). En 2010, la découverte d'une nouvelle fonction des « late domains » chez un virus non-enveloppé, a été mise en évidence. En effet, la protéine VI de capsid des adénovirus, utilise son motif [LP]PxY pour permettre une entrée efficace du virus dans la cellule *via* une interaction avec le domaine WW de l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (Wodrich et al. 2010).

Suite à l'étude de la distribution des motifs [LP]PxY chez les virus capables d'infecter l'Homme, nos premiers résultats ont montré que la totalité des familles de virus à l'exception des *Astroviridae* possède des protéines à motifs [LP]PxY. On retrouve donc ces motifs chez tous les types de virus, principalement au niveau des protéines du virion ou celles impliquées dans les étapes de réplication. Les IPP misent en jeu par les motifs [LP]PxY semblent donc impliquées dans toutes les étapes du cycle de réplication des virus.

Dix pourcents des protéines virales possédant un motif [LP]PxY sont décrits comme interagissant avec les domaines WW des ubiquitine ligases de la famille Nedd4 (*cf. références Tableau 3*). La prédominance des motifs [LP]PxY dans le protéome des virus et le fait que chacun de ces motifs soit potentiellement capable d'interagir avec un domaine WW, fait de l'interaction motif [LP]PxY viral/Nedd4 une cible idéale pour un antiviral à large spectre.

Notre objectif a alors été de développer des inhibiteurs de l'interaction motif [LP]PxY viral/Nedd4 afin de trouver un antiviral à spectre large. Ces inhibiteurs nous auraient permis de mieux caractériser le rôle de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 dans le cycle de réplication de l'adénovirus.

Afin de répondre à ces deux objectifs, nous avons décidé d'utiliser l'interaction protéine VI/Nedd4-2 comme modèle d'étude de l'interaction motif [LP]PxY viral/Nedd4.

Chapitre 2 : Criblage d'inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2

Nos résultats précédents ont montré que l'interaction motif [LP]PxY viral/Nedd4 constituait une cible idéale pour un antiviral et nous avons choisi d'utiliser l'interaction protéine VI de l'AdV/ubiquitine ligase Nedd4-2 cellulaire comme modèle d'étude.

Nous avons alors choisi de développer un test d'interaction entre la protéine VI virale et la protéine Nedd4-2 cellulaire en utilisant la technique d'AlphaScreen[®]. Cette méthode de criblage à haut débit (*Cf. INTRODUCTION Chapitre 5*), a l'avantage de permettre des tests d'interaction miniaturisés et le criblage d'un grand nombre de composés inhibiteurs d'IPP (Eglen et al. 2008).

1. Purification des partenaires : protéines His-VI-wt et GST-Nedd4-2

Afin de réaliser le test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in-vitro*, nous avons d'abord dû purifier les protéines. Pour cela, nous avons décidé de produire des protéines étiquetées afin de faciliter leur purification par affinité et par la suite de pouvoir les fixer aux billes d'AlphaScreen[®].

La protéine VI-wt possédant une étiquette poly-histidine (His) en N-terminal a été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt. Comme contrôle négatif de l'interaction protéine VI/Nedd4-2, nous avons choisi de purifier selon le même protocole, la protéine VI-M1 mutante incapable d'interagir avec la Nedd4-2 (mutation du motif PPxY en PGAA). Les protéines His-VI-wt ou M1 ont été éluées par des concentrations croissantes d'imidazole (**Figure 4A**, *Fractions 1 et 2*). Les protéines purifiées dans les différentes fractions récupérées ont ensuite été passées sur colonne de dessalage afin de les débarrasser des contaminants et de l'excédent d'imidazole.

Les profils de purification des protéines His-VI-wt et M1 obtenus après coloration au bleu de Coomassie (**Figure 4B**) nous ont permis d'estimer la pureté de la purification. Ensuite le profil obtenu en western-blot avec un anticorps anti-protéine VI (**Figure 4C**) a confirmé que la protéine purifiée correspondait bien à la protéine His-VI. En effet, on peut observer une double bande correspondant aux protéines VI taguées entre 25 et 35 kDa (la masse théorique de la protéine VI est de 27 kDa et de 1 kDa pour l'étiquette poly-histidine). L'origine de cette

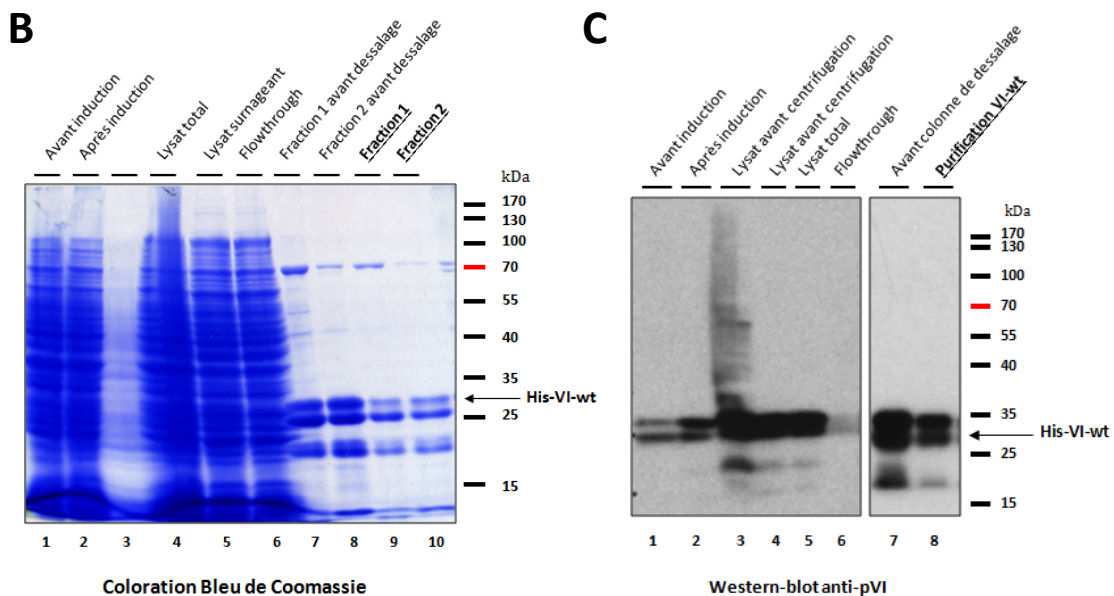
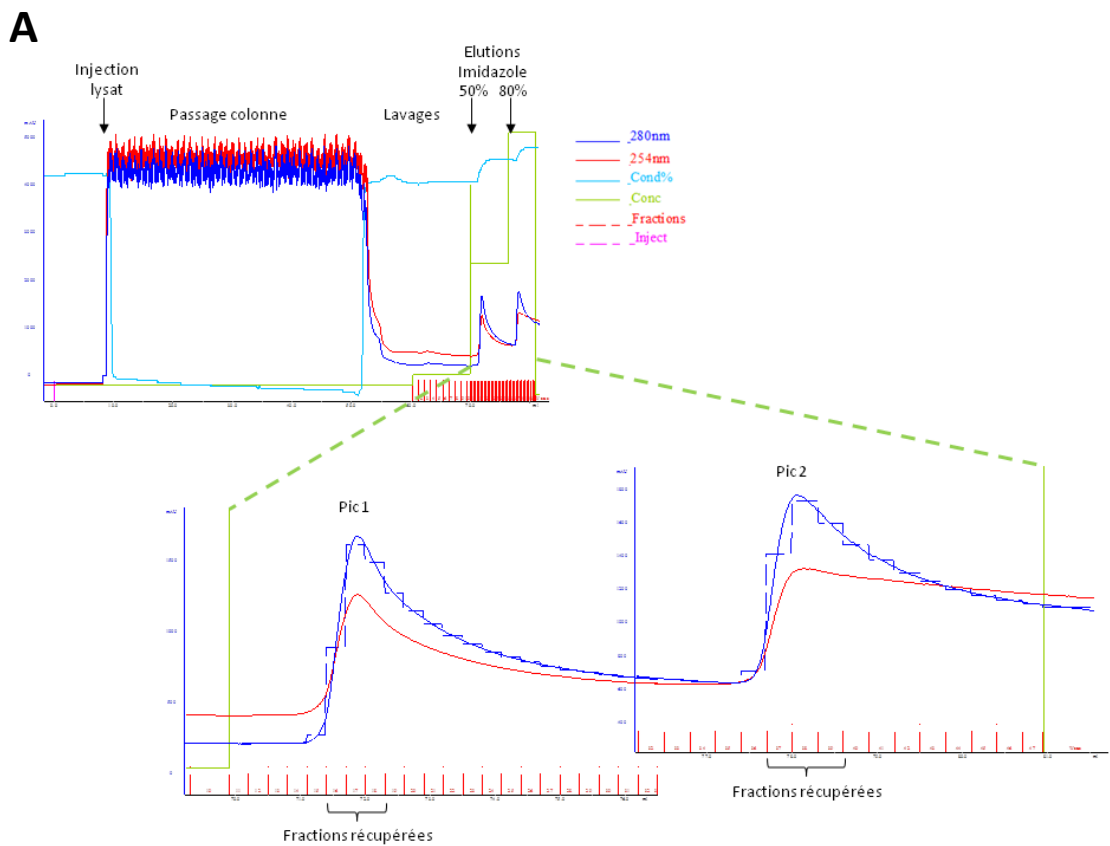


Figure 4: Purification de la protéine His-VI-wt. (A) Diagramme des différentes étapes de purification de la protéine His-VI-wt par chromatographie d'affinité sur colonne de cobalt, pics d'éluion de la protéine et les fractions récupérées. (B) Profils de migration des échantillons protéiques issus des différentes étapes de la purification obtenus après coloration au bleu de Coomassie. (C) Analyse des différents échantillons protéiques issus des différentes étapes de la purification obtenus après western-blot révélé avec des anticorps anti-protéine VI.

double bande est encore inconnue mais elle correspond au profil toujours obtenu avec la protéine VI. On remarque que l'utilisation de colonne de dessalage pour éliminer les contaminants a conduit à une dilution par deux des échantillons (**Figure 4B**, ligne 8 vs. 10. **Figure 4C**, ligne 7 vs. 8). Au final la protéine His-VI-wt et la protéine His-VI-M1 ont été purifiées avec des concentrations respectives de 558 ng/μL et 578 ng/μL soit un rendement d'environ 3 mg de protéine His-VI purifiée pour 2 litres de culture. Il est à noter qu'au dessus d'une concentration de 1 mg/mL, la protéine VI précipite.

En ce qui concerne la protéine Nedd4-2, nous avons utilisé la protéine GST-Nedd4-2 (Δ C2, WW1, WW2) de souris. Celle-ci est délétée pour la région C2 et les deux premiers domaines WW (mais elle conserve son activité catalytique) et elle est couplée à la glutathion S-transférase (GST) en C-terminal. Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur billes de glutathion.

Les profils de purification obtenus après coloration d'un gel SDS-PAGE au bleu de Coomassie (**Figure 5A**, bande à 85 kDa correspondant à la protéine GST-Nedd4-2 (Δ C2, WW1, WW2) : Nedd4-2 Δ 58 kDa + GST 27 kDa) et par western-blot anti-GST (**Figure 5B**) montrent que l'expression de la Nedd4-2-GST a bien été induite et la protéine purifiée. Cependant, la présence de nombreux contaminants, produits de dégradation ou de synthèse partielle est observable sur les profils de migrations plus larges (de 15 à 180 kDa) des western-blots anti-GST (**Figure 5C**, ligne 1) et anti-Nedd4-2 (**Figure 5C**, ligne 2).

Ainsi, une première purification de protéine GST-Nedd4-2 a permis de récupérer, après passage sur colonne de dessalage, une GST-Nedd4-2 purifiée à une concentration de 67 ng/μL soit 0,5 mg de protéines purifiées pour 2 litres de culture. Cette quantité était faible mais suffisante pour réaliser les tests en AlphaScreen[®]. Cependant, une seconde purification a tout de même été réalisée dans les mêmes conditions que la première mais la protéine GST-Nedd4-2 purifiée n'a pas été passée sur colonne de dessalage mais dialysée. Ainsi, nous avons pu récupérer la GST-Nedd4-2 purifiée à une concentration de 402 ng/μL soit 5 fois plus concentrée qu'après passage sur colonne de dessalage. Cette augmentation de la concentration a permis une meilleure conservation des échantillons.

Afin de vérifier que la protéine GST-Nedd4-2 purifiée possédait bien une activité catalytique, nous avons réalisé un test d'ubiquitylation (*Cf.* **Schéma 6**) *in vitro* de la protéine His-VI-wt purifiée. Pour cela, nous avons incubé la protéine His-VI-wt ou la protéine His-VI-M1 comme contrôle négatif, avec l'enzyme activatrice E1, l'enzyme E2, la GST-Nedd4-2 et un mélange énergétique composé d'ATP, de créatine phosphate et de créatine kinase. Ensuite

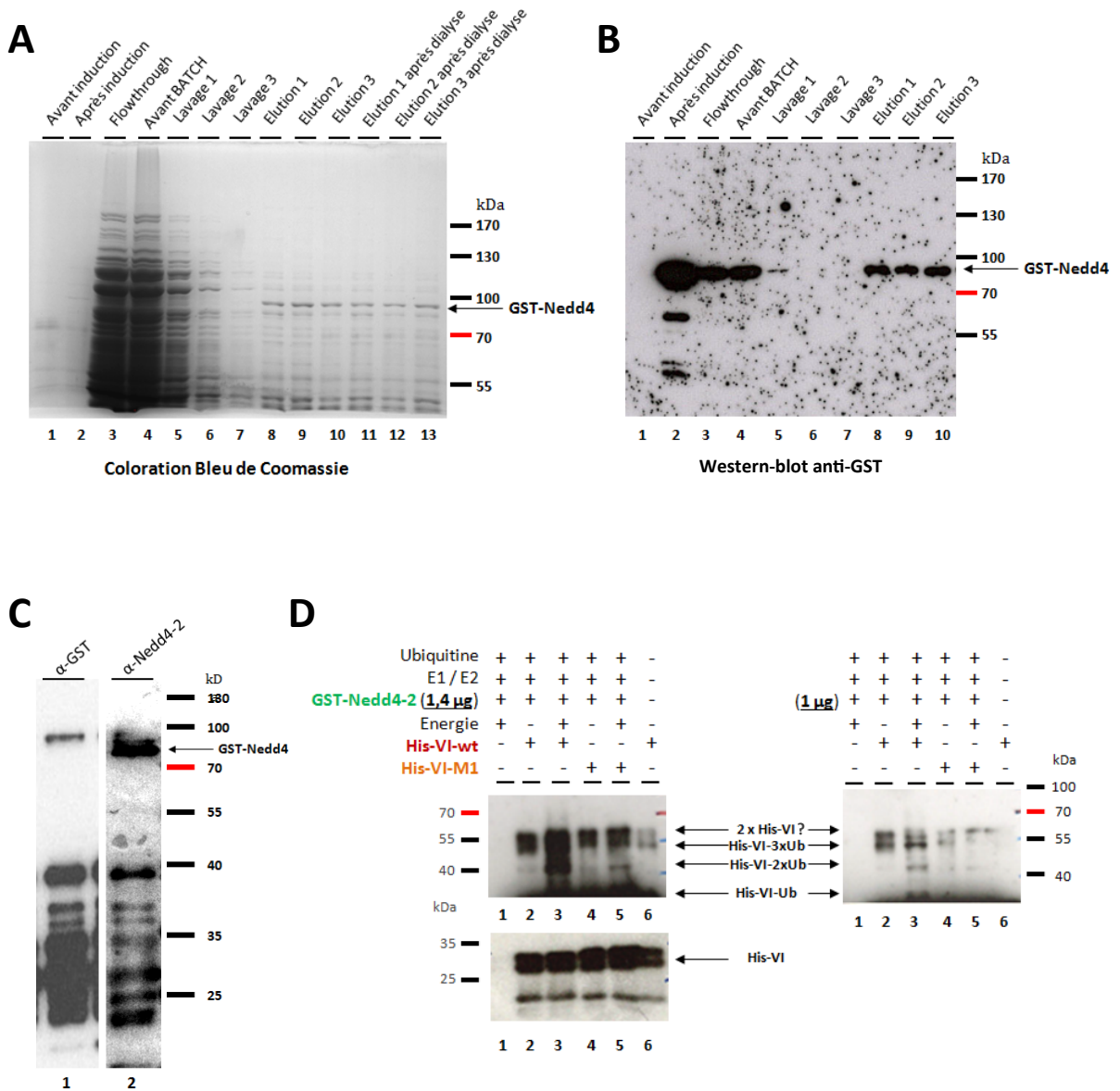


Figure 5: Purification de la protéine GST-Nedd4-2. (A) Profils de migration des échantillons protéiques issus des différentes étapes de la purification obtenus après coloration au bleu de Coomassie. (B) Analyse des différents échantillons protéiques issus des différentes étapes de la purification obtenus après western-blot révélé avec des anticorps anti-GST. (C) Profils de migration plus étendus qu'en (B) (de 180 à 25 kDa) de la protéine purifiée obtenue par western-blot révélé avec des anticorps anti-GST (*ligne 1*) et anti-Nedd4-2 (*ligne 2*). (D) Activité de la protéine GST-Nedd4-2 vérifiée par un test d'ubiquitylation *in vitro* avec 1,4 µg (*panel de gauche*) ou 1 µg (*panel de droite*) de GST-Nedd4-2 en présence (+) ou en absence (-) de protéine His-VI-wt ou M1, d'ubiquitine, des enzymes E1/E2 et d'énergie. La protéine VI est détectée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-protéine VI.

un western-blot avec un anticorps anti-protéine VI a été réalisé à partir des différentes conditions de réaction.

On peut voir sur le profil de la protéine His-VI-wt seule, une double bande au dessous de 35 kDa correspondant à la protéine VI non modifiée et une double bande au dessus de 55 kDa pouvant correspondre à un dimère de protéine VI (**Figure 5D**, *ligne 6*). Ce profil est identique lorsque l'on observe les profils des protéines His-VI-wt et M1 en présence de la GST-Nedd4-2, des enzymes E1 et E2 mais en absence d'énergie (**Figure 5D**, *ligne 2 et 4*).

On peut observer la présence d'une bande au dessus de 40 kDa correspondant à la forme di-ubiquitylée de la protéine His-VI-wt lorsque celle-ci est incubée avec les enzymes E1, E2, la GST-Nedd4-2 purifiée et le mélange énergétique (**Figure 5D**, *panel de gauche, ligne 3*). Il est difficile d'observer les bandes correspondant respectivement à l'état mono et tri-ubiquitylé de la protéine His-VI-wt à 35,5 et 52,5 kDa. En effet, la quantité importante de protéine VI rend la distinction des différentes bandes difficile. Cependant lorsque que l'on utilise une quantité plus faible de GST-Nedd4-2 pour le test et un temps d'exposition plus court, la bande correspondant à la forme tri-ubiquitylée de la protéine His-VI-wt à 52,5 kDa est visible (**Figure 5D**, *panel de droite, ligne 3*). Les résultats montrent donc que la Nedd4-2 purifiée est active car elle est capable d'ubiquityler la protéine VI-wt.

On remarque également que la protéine VI-M1 mutante est également, mais faiblement, ubiquitylée malgré son manque d'interaction avec la Nedd4-2 (**Figure 5D**, *ligne 4 vs 5*). Cependant la proximité des protéines dans ce système d'ubiquitylation *in vitro* pourrait expliquer l'apparition d'ubiquitylation « résiduelle ».

Le profil obtenu avec la protéine VI-M1 indique que la protéine mutante est cependant nettement moins ubiquitylée que la protéine VI-wt ce qui nous permet de valider l'utilisation de la protéine VI-M1 comme contrôle négatif de l'interaction.

1. Test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in vitro* en AlphaScreen®

La technologie AlphaScreen® a été utilisée pour développer un test biochimique d'interaction entre les protéines recombinantes GST-Nedd4-2 et His-VI-wt, en collaboration avec la plateforme dirigée par les Dr E. Chevet et S. Taouji à l'université de Bordeaux. Cette technique utilise des billes d'AlphaScreen® « donneuses » recouvertes de glutathion et donc capables de lier la protéine GST-Nedd4-2 et des billes d'AlphaLISA « receveuses » recouvertes de nickel et donc capables de lier de la protéine His-VI-wt ou M1. Ces billes « donneuses » sont capables d'activer des billes « receveuses » seulement si la protéine VI

interagit avec la Nedd4-2, rapprochant ainsi les deux billes à une distance inférieure à 200 nm. L'activation de la seconde bille, suite au transfert d'un radical d'oxygène, conduit à l'émission de lumière (Cf. *INTRODUCTION Chapitre 5*). Lorsque l'on utilise la protéine mutante M1, incapable de se lier à la Nedd4-2, les deux billes sont trop éloignées et il n'y a pas d'activation de la bille receveuse, ni d'émission de lumière (**Schéma 9**).

La stœchiométrie idéale de protéine à utiliser pour ce test avait déjà été déterminée, par Ruben Martinez au laboratoire (thèse n°1973). Ainsi 5 pmol de chacune des protéines en présence des billes et incubées pendant 1 h a permis la détection d'un signal lumineux supérieur à 10^6 unités de luminescence avec la GST-Nedd4-2 et la protéine His-VI-wt et un signal inférieur à 10^5 unités avec la GST-Nedd4-2 et la protéine His-VI-M1 mutante (**Figure 6A**). Cette différence significative ($<0,0001$) nous a permis de valider les conditions expérimentales mises en place précédemment avec les nouvelles purifications de protéines.

Ensuite différentes conditions de stockage ainsi que l'effet de plusieurs séries de congélation/décongélation des aliquots de protéines purifiées sur le signal obtenu en AlphaScreen[®] ont été testés.

Le fait de congeler/décongeler plusieurs fois les protéines GST-Nedd4-2 et His-VI-wt plutôt que d'utiliser des protéines fraîchement décongelées réduit le signal de luminescence émise mais la différence de signal entre le contrôle positif (Nedd4-2 + protéine VI-wt) et le contrôle négatif (Nedd4-2 + protéine VI-M1) reste significative (**Figure 6A, colonne 1 vs colonnes 2, 3 et 4**). Nous pouvons donc réaliser le test d'AlphaScreen[®] avec des protéines décongelées plusieurs fois. Cependant le volume des aliquots est un élément important de la conservation des protéines. Lorsqu'elles sont stockées dans des volumes inférieurs à 20 μ L elles se dégradent au cours du temps même lorsqu'elles sont stockées à -80°C et sont inutilisables en AlphaScreen[®] (*données non montrées*).

Après de nouvelles optimisations complémentaires (diminution de la quantité de protéines), nous avons choisi de travailler avec 2,5 pmol de protéines car la différence entre les signaux des contrôles positif et négatif reste significative (**Figure 6A, colonne 1 vs colonne 5**) tout en réduisant la quantité de protéine nécessaire.

Afin de tester la robustesse de nos conditions expérimentales, nous avons déterminé la valeur du facteur Z' . Ce facteur, décrit par Zhang et al. (Zhang 1999) est un paramètre statistique simple pour évaluer la qualité d'un test de criblage à haut débit à partir des valeurs des contrôles positifs et négatifs sur 30 répliques (**Figure 6B**). Une valeur égale à 1 indique que les paramètres sont idéaux pour le criblage ; si celle-ci est comprise entre 1 et 0,5, les

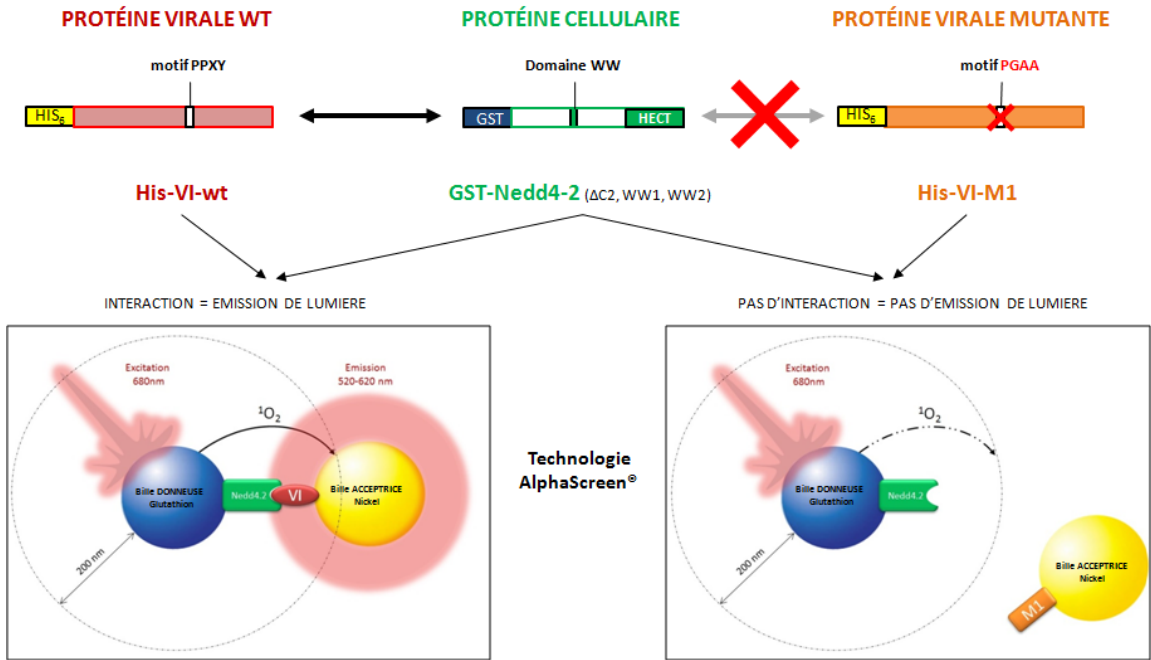


Schéma 9: Représentation du test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 avec la technologie AlphaScreen®. Le domaine WW de la GST-Nedd4-2 (*au centre*) lie la protéine His-VI-wt *via* son motif PPSY (*à gauche*) conduisant au transfert d'un radical d'oxygène entre les billes d'AlphaScreen® et à l'émission de lumière par la bille receveuse (*en bas, à gauche*). Le domaine WW de la GST-Nedd4-2 ne lie pas la protéine His-VI-M1 avec un motif muté en PGAA (*à droite*). Cette perte d'interaction empêche le rapprochement des billes d'AlphaScreen®, qui n'émettent pas de signal lumineux (*en bas, à droite*).

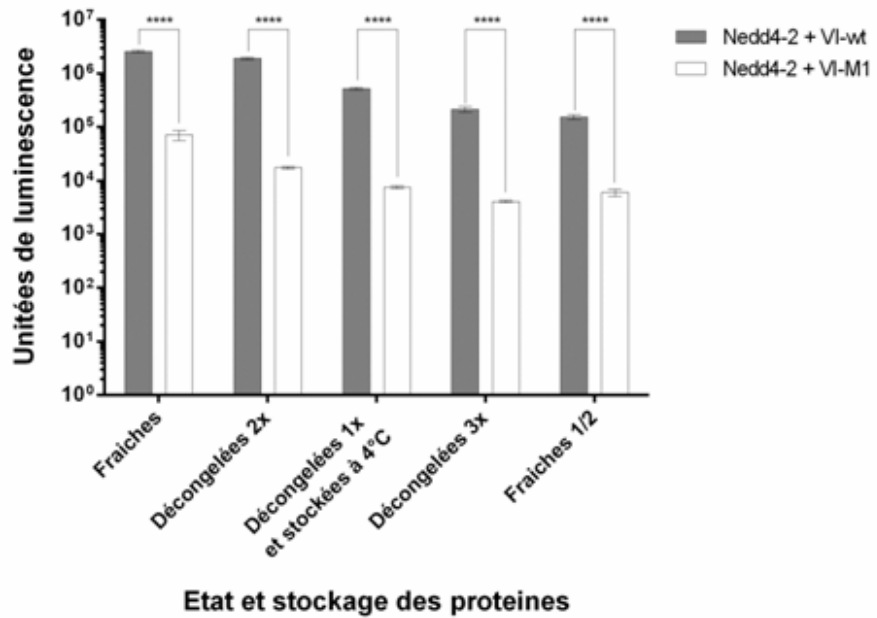
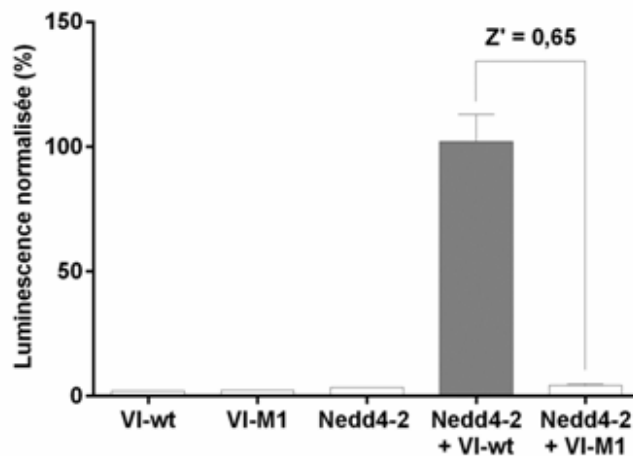
A**B**

Figure 6 : Mise en place du test d'IPP protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen®. (A) Test d'interaction en AlphaScreen® réalisé avec les protéine His-VI-wt (*barres grises*) ou M1 (*barres blanches*) et la protéine GST-Nedd4-2 toutes les deux fraîches, décongelées plusieurs fois ou diluées de moitié (1/2). (B) Détermination du facteur Z' . Les tests d'interaction ont été réalisés 30 fois. Les valeurs représentées sur le graphique sont les pourcentages de luminescence calculés après normalisation avec le contrôle positif (Nedd4-2 + protéine VI-wt).

* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$

conditions sont bonnes et si la valeur de Z' est inférieure à 0,5 alors les signaux des contrôles sont trop variables pour permettre la validation des conditions expérimentales.

Ainsi nous avons réalisé 30 tests d'interaction en AlphaScreen® en présence du contrôle positif (GST-Nedd4-2 + protéine His-VI-wt) ou négatif (GST-Nedd4-2 + protéine His-VI-M1 mutante).

Les signaux obtenus ont été normalisés par rapport au signal obtenu en présence de la protéine His-VI-wt et de la Nedd4-2-GST (contrôle positif). Les valeurs obtenues avec le contrôle négatif ou en présence d'une seule des deux protéines partenaires est proche de 0 %. Celle du contrôle négatif, protéine His-VI-M1 incubée avec la Nedd4-2-GST, est égale à 10% du signal du contrôle positif.

La valeur du Z' calculée est de 0,65 :

$$Z' = 1 - [(3 \times 15303 + 3 \times 907) / |144527 - 5967|] = 0,65$$

Cette valeur indique que nos conditions expérimentales sont compatibles avec un criblage à haut débit (*Cf. MATERIEL ET METHODES Chapitre 2*).

2. Criblage de la banque « Prestwick Chemical »

Nous avons ensuite réalisé un criblage de petits composés chimiques afin d'identifier des composés capables d'inhiber l'interaction protéine VI/Nedd4-2. Nous avons choisi la banque « Prestwick chemical ». Cette banque est constituée de 1280 petites molécules qui sont des médicaments déjà sur le marché et approuvés par diverses agences de santé telles que la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis ou l'EMA (European Medicines Agency) en Europe.

Dix micromolaires de chacun des composés ont été mélangés individuellement avec les billes d'AlphaScreen® « donneuses » et d'AlphaLISA « receveuses ». Puis, 2,5 pmol de protéines His-VI-wt et GST-Nedd4-2 ont été ajoutés et incubés à 25°C à l'abri de la lumière. Ensuite, l'intensité de la luminescence a été mesurée après 1 h et 4 h d'incubation.

Les valeurs de luminescence ont été corrigées par soustraction de la valeur de bruit de fond obtenue avec les billes ou les protéines + les billes seules. Ensuite les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle positif protéine His-VI-wt + GST-Nedd4-2 en absence de composé. Nous avons choisi un seuil égal à la moyenne (**Figure 7A, ligne noire**) moins 3 fois l'écart-type (**Figure 7A, ligne rouge**) pour sélectionner les composés conduisant à l'émission d'un signal lumineux inférieur à 20% du signal de luminescence obtenu avec le contrôle

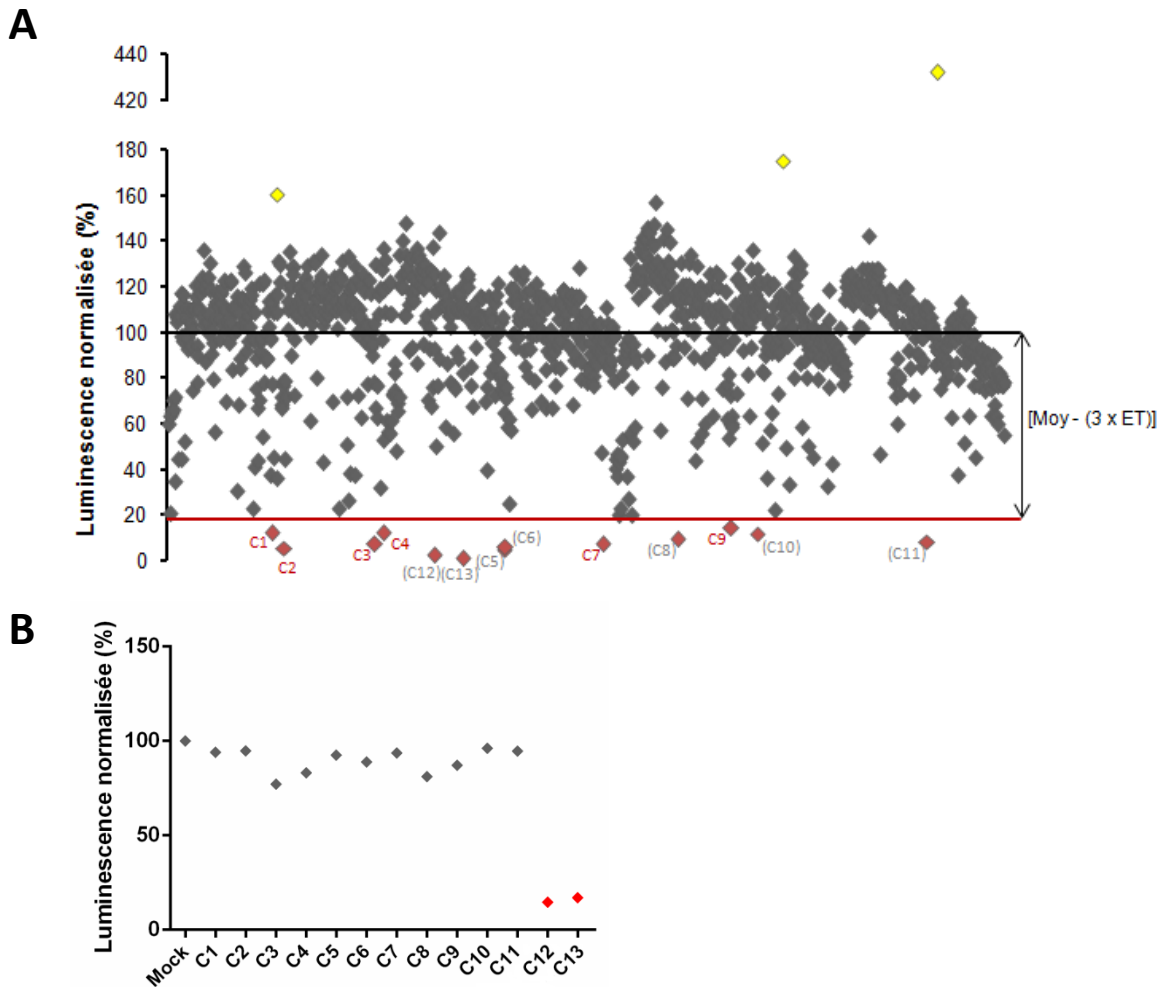


Figure 7: Criblage de la banque “Prestwick Chemical” an AlphaScreen®. Les 1280 de la banque “Prestwick Chemical” ont été criblés sur l’interaction protéine VI/Nedd4-2 par le test d’AlphaScreen®. **(A)** Les valeurs représentées sur le graphique sont les pourcentages de luminescence calculés après normalisation avec le contrôle positif en absence de composé (*ligne noire*). La ligne rouge représente trois fois l’écart-type en dessous de la moyenne. Les candidats inhibiteurs sélectionnés pour induire une inhibition supérieure à 80 % apparaissent sous forme de losanges rouges. **(B)** Test de TruHits®. Ce test permet d’exclure les faux inhibiteurs. Les composés n’interférant pas avec le contre-criblage sont considérés comme de vrais candidats inhibiteurs et sont représentés par des losanges gris. Les losanges rouges désignent les faux positifs.

positif. Les composés candidats sont donc capables d'inhiber 80% de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in vitro*.

Le résultat du criblage a permis de sélectionner 13 composés inhibiteurs (**Figure 7A**, représentés en rouge et notés de C1 à C13) et 3 composés « activateurs » ou *a priori* capables de renforcer l'interaction (**Figure 7A**, représentés en jaune).

Afin d'éliminer les faux composés inhibiteurs, nous avons utilisé le test du « truHit » (Perkin Elmer). Ce test permet de réaliser un contre-criblage en identifiant les composés capables de diffuser ou d'éteindre le signal lumineux. En effet, certaines molécules sont capables de fixer le radical d'oxygène nécessaire à la réaction ou bien de colorer la solution, diminuant la luminescence émise. Ce test est basé sur l'utilisation de billes recouvertes de streptavidine et d'autres recouvertes de biotine. Une fois incubées ensemble, les deux types de billes interagissent fortement ($K_{d_{\text{strept-biot}}} = 1 \times 10^{-15} \text{ M}$) et conduisent à l'émission de luminescence de manière constitutive car aucun composé n'est supposé interrompre cette interaction et donc la luminescence. Les composés capables de réduire ce signal sont alors considérés comme de faux inhibiteurs.

Les 13 composés sélectionnés ont été ajoutés individuellement au mélange de billes biotine/streptavidine et la luminescence a été analysée après 30 min d'incubation (**Figure 7B**). Les deux composés de couleur bleue, C12 (Prestw-385) et C13 (Prestw-425) ont ainsi été éliminés de la sélection car ils interféraient avec la luminescence du test.

Les 11 composés inhibiteurs restant ont été renommés de la façon suivante, afin de simplifier leur nomenclature :

| | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Prest-1474 = composé C1, | Prest-169 = composé C2, | Prest-299 = composé C3, |
| Prest-312 = composé C4, | Prest-485 = composé C5, | Prest-486 = composé C6, |
| Prest-627 = composé C7, | Prest-734 = composé C8, | Prest-810 = composé C9, |
| Prest-848 = composé C10 | et | Prest-1091 = composé C11. |

Les trois composés qui semblent renforcer l'interaction correspondent aux composés Prest-158, Prest-1510 et Prest-1105. Nous avons choisi de ne pas les étudier mais il serait tout de même intéressant de tester leur effet sur l'AdV car une stabilisation de l'interaction pourrait tout aussi bien conduire à un effet antiviral.

3. Caractérisation des composés : IC₅₀ *in vitro*, structure et cytotoxicité

Grâce à la base de données fournie avec la banque « Prestwick chemical », toutes les informations telles que le nom, le poids moléculaire, la formule chimique, la structure, le groupe thérapeutique et le mécanisme d'action des composés sélectionnés, ont été analysés et répertoriés dans le **Tableau 4**.

Nous avons donc identifié par ce criblage :

- un antimicrobien : la Chloroxine ou dichlorochinolol (composé C1),
- un antihypertenseur : l'Hydralazine (composé C2)
- un vasodilatateur : le Flunarizine (composé C4),
- un abortif : le Mifepristone ou RU 486 (composé C3),
- l'acide folique ou vitamine B9 (composé C7),
- un antifongique : le Sulconazole (composé C9).

Nous avons ensuite déterminé leurs IC₅₀ *in vitro*, soit la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen[®].

Pour cela nous avons de nouveau réalisé un test d'AlphaScreen[®] en présence des billes « donneuses » de glutathion et des billes « receveuses » de nickel, des protéines His-VI-wt, GST-Nedd4-2 et d'une concentration variable des composés sélectionnés allant de 250 nM à 50 μM.

Sur l'ensemble des composés dont l'IC₅₀ a été déterminée (**ANNEXE 2**), nous avons sélectionné les 6 composés présentant les IC₅₀ les plus faibles, comprises entre 2,97 et 15,53 μM (**Figure 8A**).

Le Sulconazole est un dérivé de l'imidazole et nous avons voulu vérifier que ce composé ne simulait pas un effet inhibiteur dans le test d'AlphaScreen[®] tout simplement en décrochant la protéine His-VI-wt des billes de nickel par compétition. Pour cela, nous avons déterminé l'IC₅₀ de l'imidazole en AlphaScreen[®]. La concentration d'imidazole nécessaire pour inhiber l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen[®] et donc pour éluer 50% des protéines His-VI des billes est égale à 2,79 mM (**Figure 8B**). Ces résultats indiquent que l'inhibition par le composé C9 est bien spécifique de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 et non due à ses propriétés chimiques.

La cytotoxicité des six composés a ensuite été évaluée dans différentes lignées cellulaires. Les cellules d'ostéosarcome humain (U2OS), les cellules d'épithélium rénal embryonnaire

| Composé | Nom | Structure | Formule | Groupe thérapeutique | Mécanisme d'action | IC ₅₀ (μM) | Cytotoxicité (μM) | |
|---------|-----------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------|
| | | | | | | | U2OS | HEK293 |
| C1 | Chloroxine | | C ₉ H ₅ Cl ₂ NO | Anti séborrhéique | | 4,59 | ≤ 10 | N.D. |
| C2 | Hydralazine hydrochloride | | C ₈ H ₉ ClN ₄ | Antihypertenseur | Antagoniste adrénergique | 6,43 | ≤ 50 | N.D. |
| C3 | Mifepristone | | C ₂₉ H ₃₅ NO ₂ | Abortif | Antagoniste récepteur progestérone | 6,1 | ≤ 10 | N.D. |
| C4 | Flunarizine dihydrochloride | | C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ F ₂ N ₂ | Vasodilatateur | Bloqueur canaux Na ⁺ et Ca ²⁺ | 8,96 | ≤25 | ≤5 |
| C7 | Folic acid | | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | Vitamine Bc ou M | - | 2,97 | ≤ 50 | N.D. |
| C9 | Sulconazole nitrate | | C ₁₈ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₃ S | Antifongique | Inhibiteur synthèse ergostérol | 15,53 | ≤ 10 | ≤ 5 |

N.D. Non Déterminé

Tableau 4: Caractéristiques des composés. Les composés C1, C2, C3, C4, C7 et C9 identifié par le criblage en AlphaScreen® de la banque « Prestwick Chemical » sont listés dans ce tableau. Le nom, la structure, la formule, le groupe thérapeutique, le mécanisme d'action ainsi que les valeurs d'IC₅₀ et de cytotoxicité dans les lignées cellulaires U2OS et HEK293 sont décrites. N.D. = non déterminé.

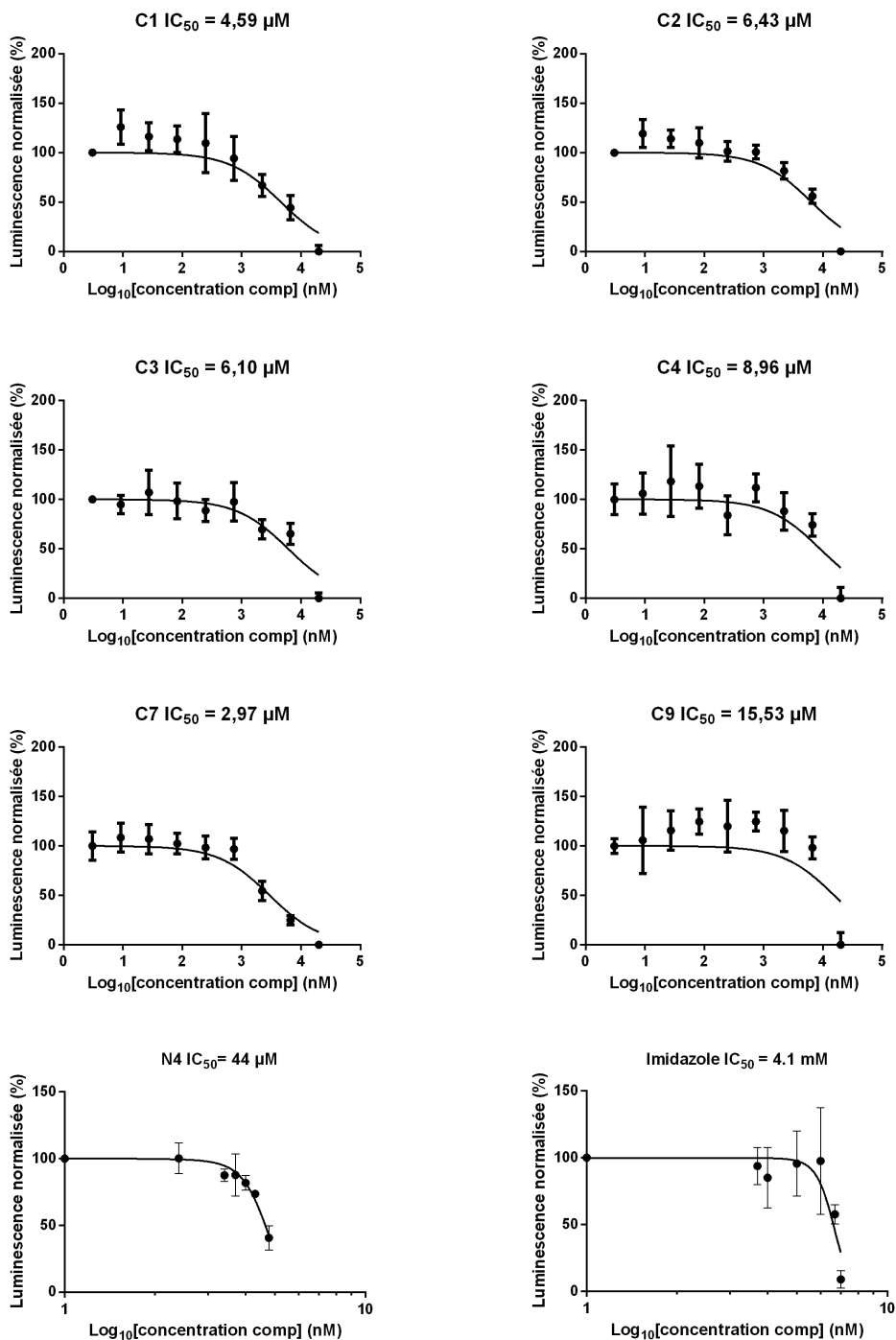


Figure 8: Détermination des IC₅₀ des composés C1 à C9, du N4 et de l'imidazole. Les composés ont été titrés à l'aide du test d'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen® en utilisant une gamme de concentration des composés comprise entre 1 nM et 20 μM. La concentration nécessaire pour inhiber 50 % du signal lumineux reflétant l'IPP protéine VI/Nedd4-2 du test AlphaScreen®, a été déterminée grâce à la génération de courbe de régression non-linéaire. Les valeurs de luminescence ont été normalisées par rapport à la condition avec 1 nM de composé. Les barres d'erreur correspondent à la variation de trois expériences.

humain (HEK293) et les cellules d'hépatocarcinome humain (HUH-7) ont été traitées avec du DMSO seul ou des concentrations croissantes des composés allant de 250 nM à 60 μ M durant 24 h.

Les résultats montrent une absence de cytotoxicité lorsque les drogues sont utilisées à une concentration inférieure à 10 μ M pour les U2OS (**Figure 9A**) et 5 μ M pour les HEK293 (**Figure 9B**) et les HuH-7 (**Figure 9C**).

4. Conclusion

Grâce à la technique d'AlphaScreen[®], nous avons développé un test biochimique d'interaction *in vitro* fonctionnel entre la protéine VI de l'AdV et la protéine Nedd4-2 cellulaire.

Le criblage à haut débit de 1280 petits composés chimiques a permis d'identifier 11 composés capables d'inhiber l'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in vitro*. Nous avons ensuite sélectionné les 6 candidats possédant l'IC₅₀ *in vitro* la plus faible et testé leur cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires. La concentration choisie pour la réalisation de nos tests *in cellulo* est de 5 μ M, concentration à laquelle aucun des composés ne présente d'effet cytotoxique dans les différentes lignées cellulaires.

Les 6 candidats sélectionnés représentent des antiviraux potentiels à large spectre. La suite des expériences consistait alors à déterminer si ces inhibiteurs étaient capables d'inhiber *in cellulo* la réplication de l'Adénovirus mais aussi d'autres virus.

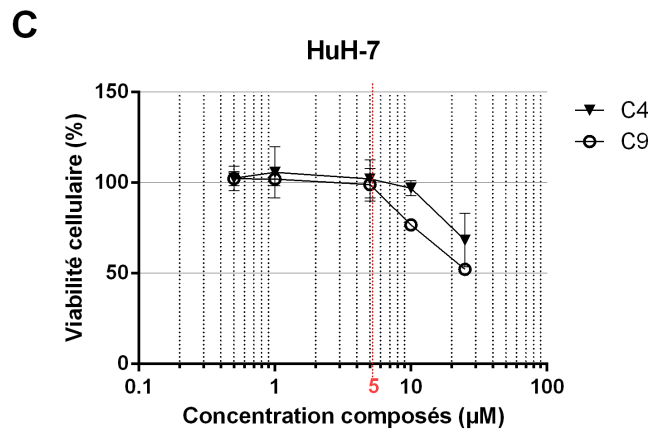
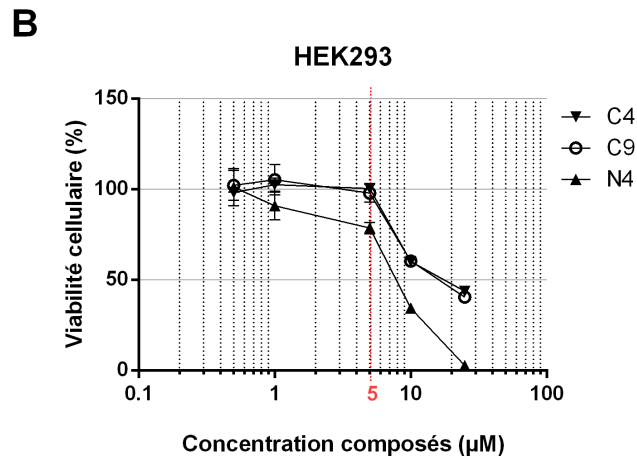
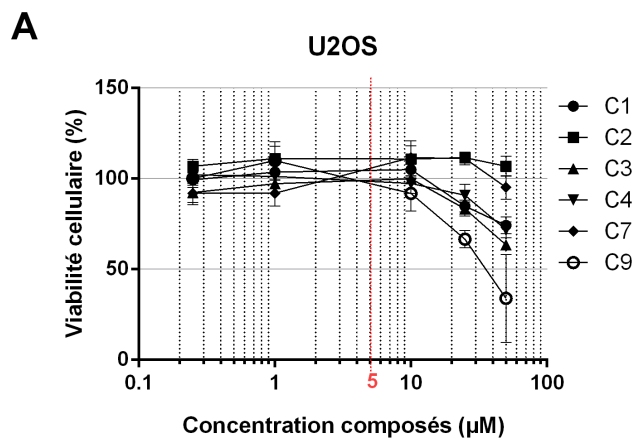


Figure 9 : Détermination de la cytotoxicité des composés. Viabilité des cellules (A) U2OS, (B) HEK293 ou (C) HuH-7 traitées pendant 24 h ou 36 h (pour les U2OS) avec une concentration de composé comprise entre 250 nM et 50 μM . La cytotoxicité a été déterminée par la détection d'ATP. La viabilité cellulaire a été normalisée par rapport au contrôle en absence de drogue. La moyenne des valeurs est issue d'une expérience avec chaque point en triplicata. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Chapitre 3 : Effets des inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 sur la réplication des AdV

Pendant nos travaux, l'équipe de R. Harty a identifié des inhibiteurs de l'interaction PPxY/Nedd4 par criblage HTS *in silico* (Han et al. 2014a) (Cf. Introduction Chapitre 5). Un de leurs composés synthétiques décrits, le composé Amp N°4 (notés N4 dans la suite du manuscrit) a un effet antiviral sur les virus à ARN enveloppés. En effet, il inhibe efficacement la libération de pseudoparticules Ebola et Marburg (Filovirus) et du virus de la fièvre de Lassa (LFV, Arénavirus) ainsi que le bourgeonnement du VSV et du virus de la rage (Rhabdovirus). Cependant aucun test n'avait été réalisé sur les virus à ADN et/ou non-enveloppés. Nous avons donc entrepris d'étudier l'action de ce composé sur la réplication de l'adénovirus en parallèle des composés que nous avons identifiés par AlphaScreen®. Ceci a pour objectif de confirmer la pertinence du ciblage de l'interaction [LP]PxY/Nedd4 pour l'identification d'un antiviral à large spectre qui soit efficace sur plusieurs familles de virus, qu'ils soient à ARN, à ADN, enveloppés ou non.

1. Effet des composés sur la propagation des adénovirus

Afin d'observer l'effet des composés sur la réplication des AdV, nous avons quantifié la propagation des adénovirus en présence des composés. Elle est observable grâce à la formation de plages de lyse fluorescentes suite à l'infection des cellules avec des vecteurs adénoviraux codant pour la protéine fluorescente GFP (pour « Green Fluorescent Protein »).

Pour cela, nous avons d'abord infecté des cellules HEK293 codant constitutivement pour le gène *EIA* manquant aux vecteurs adénoviraux afin de permettre aux vecteurs de se répliquer. Cinq micromolaires des composés C1, C2, C3, C7 et C9 ou 1 μ M des composés C4 et N4 ont été ajoutés dans l'agarose coulé par la suite sur les cellules afin de stopper la croissance des cellules et pouvoir observer au cours du temps, l'apparition de plages de lyse. Six jours post-infection, nous avons mesuré la taille des plages de lyse fluorescentes révélant la propagation des virus après plusieurs cycles de réplication en présence des composés (**Figure 10A**).

La quantification indique que la taille des plages est significativement réduite en présence des composés C4, C9 et N4 (**Figure 10A**). En effet, le composé C4 diminue de 20 % la taille des plages de lyse mesurées tandis que les composés C9 et N4 la diminuent de 50 %. On note une diminution de 10 % de la taille des plages en présence du composé C1 mais des tests

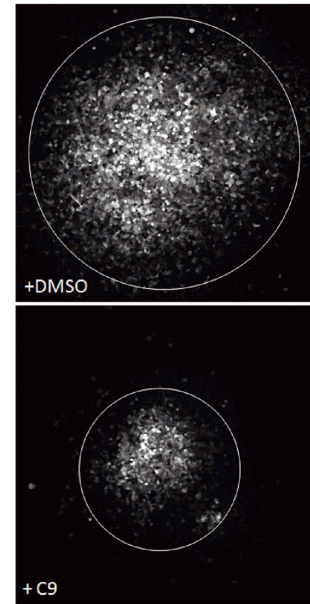
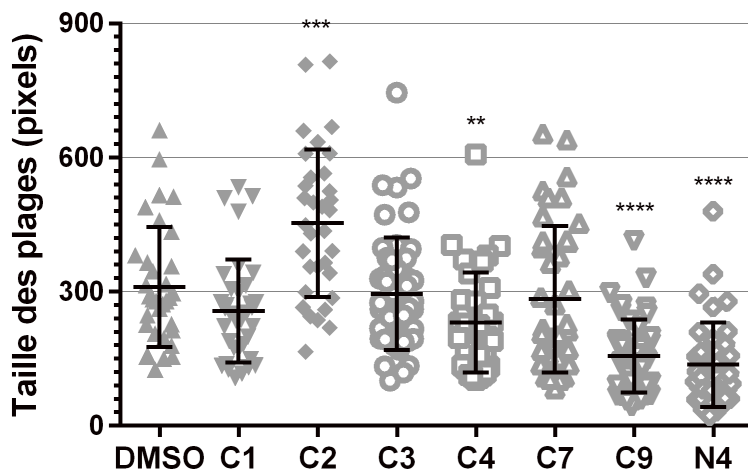


Figure 10: Effets des composés sur la propagation de l'AdV. Taille des plages de lyse fluorescentes des cellules HEK293 infectées avec 0,1 pp/cellule de vecteur adénoviral Ad5-GFP pendant 24 h puis traités pendant 6 jours avec 5 μ M des composés C1, C2, C3, C7, C9 ou 1 μ M de C4 ou N4, ou bien avec du DMSO seul. La taille des plage est exprimée en pixels et issus de l'analyse d'une trentaine de plaques par condition provenant d'une expérience avec chaque point en triplicata. Des photos des plages fluorescentes en présence de DMSO ou de 5 μ M de C9 sont présentées à droite du graphique.

statistiques montrent que cette différence n'est pas significative. Le composé C3, quant à lui, ne semble pas avoir d'effet sur la propagation des virus.

Le nombre de plages de lyse est très peu affecté par la présence des composés dans cette expérience (*données non montrées*). Cependant nous avons observé une variation du nombre de plages et de l'incidence des composés sur ce nombre d'une expérience à l'autre. Ces résultats non reproductibles ne nous permettent pas de pouvoir conclure sur les effets des composés sur le nombre de plages de lyse.

Ces résultats montrent cependant que la taille des plages de lyse est plus faible en présence des composés C4 et C9. Ces composés semblent donc inhiber la propagation des vecteurs adénoviraux. De la même façon, le composé N4 décrit comme capable d'inhiber le bourgeonnement de virus à ARN enveloppés *via* l'inhibition de l'interaction PPxY/Nedd4 est aussi capable d'inhiber la réplication des AdV, un virus à ADN, non-enveloppé.

2. Effets des composés sur production de particules adénovirales

Afin de caractériser les effets des composés sur le cycle de réplication des AdV nous avons commencé par tester l'effet des drogues sur la production de nouvelles particules infectieuses.

Ainsi, les cellules U2OS ont été prétraitées avec 5 μ M de chaque drogue (C1, C2, C3, C4, C7 ou C9) ou 1 μ M du composé synthétique N4 pendant 1 h puis infectées avec de l'adénovirus répliatif HH-Ad5 (déléte pour sa région E3). Quarante-huit heures post-infection, les surnageants contenant les nouveaux virions produits, ont été collectés et l'ADN viral extrait. Une PCR quantitative amplifiant le gène de l'hexon a permis d'estimer la quantité de génomes adénoviraux présents dans le milieu et donc la quantité de nouveaux virions produits (**Schéma 11**).

Les résultats montrent que les composés C2, C7 et N4 diminuent la production de nouvelles particules de 60 % (**Figure 11**). Les composés C1, C4 et C9 inhibent près de 40 % de la réplication tandis que le composé C3 semble avoir peu ou pas d'effet. Ainsi tous les composés à l'exception du composé C3 ont un effet inhibiteur sur la réplication virale. Ces résultats suggèrent des effets des composés à différents stades du cycle infectieux.

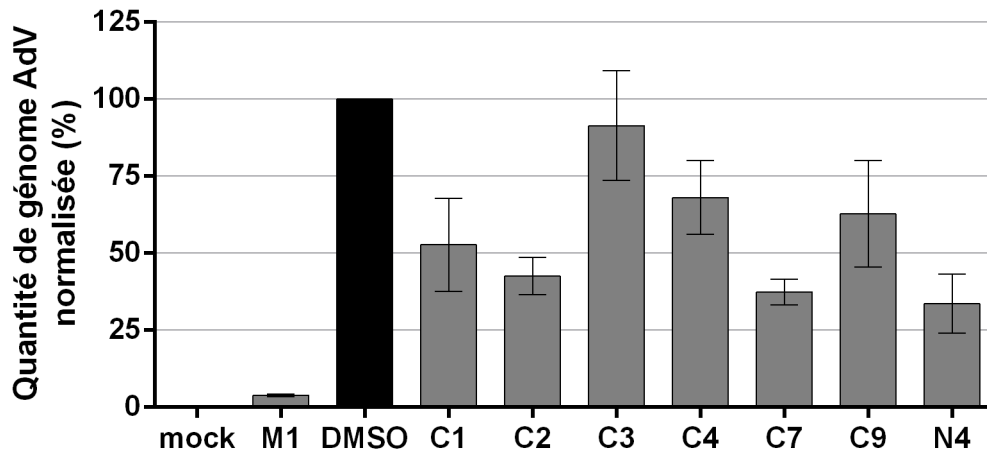


Figure 11: Effets des composés sur la production de particules d'AdV. Quantité de génomes AdV dans le surnageant de cellules U2OS prétraitées pendant 1 h avec 5 μ M des composés C1 à C9 ou 1 μ M du composé N4 puis infectées pendant 24 h avec du virus répliquatif HH-Ad5 sauvage (ou M1 lorsque précisé) en présence des composés. L'ADN viral du milieu de culture a été extrait et quantifié par PCR quantitative du gène de l'hexon. Les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle DMSO seul. Les barres d'erreur représentent la différence entre la moyenne des triplicatas de deux expériences.

3. Conclusion

L'ensemble des drogues, à l'exception du composé C3, semble avoir un effet sur la réplication des adénovirus. Les composés C4 et C9 sont également efficaces sur la propagation des virus (**Tableau 5**, *colonnes grises*). La différence d'efficacité des drogues C1, C2, C4, C7, C9 et N4 en fonction des tests réalisés suggère différents mécanismes d'action de ces composés tout au long du cycle de réplication des AdV. Nous avons donc cherché à déterminer quelle(s) étape(s) du cycle infectieux pouvait(aient) être inhibée(s) par les composés.

| Phases de répliation | Précoces | | | | | Tardives | |
|------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Endocytose | Echappement de l'endosome | Libération du génome | Expression des gènes précoces | Transduction | Libération des particules virales | Propagation |
| Technique | IF Ad5/cellule | IF Ad5/VI | IF pVII/noyau | RT-qPCR ARNm viraux (E1A, E1B, E4) | FACS Vecteur GFP | PCRq Génomes viraux | Tailles des plages de lyse |
| <i>Virus mutant M1</i> | = | - 80% | = | - 80% | - 80% | - 80% | ↘↘↘ |
| C1 | = | n.d. | = | = | = | - 50% | = |
| C2 | - 35% | n.d. | = | = | = | - 60% | ↗↗↗ |
| C3 | - 40% | n.d. | = | = | = | = | = |
| C4 | = | = | = | = | = | - 35% | ↘ (1 μM) |
| C7 | = | n.d. | = | = | = | - 60% | = |
| C9 | - 45% | = | ↘↘↘ | - 20% E1A - 45% E1B - 55% E4 | - 15% | - 40% | ↘↘↘ |
| N4 | = | n.d. | ↘↘↘ | = | = | - 60% | ↘↘↘ |

= : pas d'effet, ↘ : inhibition < 30 %, ↘↘ : inhibition d'environ 30 %,
 ↘↘↘ : inhibition d'environ 50 %, ↘↘↘↘ : inhibition > 50 %,
 ↗↗↗ : stimulation d'environ 50 %

Tableau 5: Bilan des effets des composés sur les étapes de répliation des AdV.

Chapitre 4 : Caractérisation de l'action des composés sur les étapes d'entrée de l'AdV

Puisque les composés inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 sélectionnés en AlphaScreen[®] étaient capables de réduire la réplication des adénovirus, nous avons cherché à caractériser à quelles étapes du cycle viral ils agissaient et quels étaient leurs mécanismes d'action.

Notre laboratoire a mis en évidence l'implication de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 durant l'entrée des adénovirus. Cette perte d'interaction provoque une diminution de l'efficacité de libération de la protéine VI des endosomes et un défaut d'accumulation du virus au niveau du MTOC conduisant à une réduction de l'efficacité d'infection (Wodrich et al. 2010) (*Cf. INTRODUCTION Chapitre 3*).

Nous avons donc réalisé différents tests d'infection en présence des composés afin de caractériser l'effet des drogues sur les étapes précoces du cycle infectieux des adénovirus. Ces étapes comprennent l'entrée du virus, la libération de la protéine VI, l'échappement de la particule virale des endosomes, la libération du génome dans le noyau et enfin l'expression des gènes viraux précoces.

1. Effets des composés sur l'infectiosité des AdV

1.1. Effet des composés sur la transduction de l'AdV dans les U2OS

Afin de savoir si les composés identifiés inhibaient l'entrée des adénovirus, nous avons testé leur effet sur la transduction de vecteurs adénoviraux exprimant la GFP. Ce test nous permet d'observer un effet global sur l'infectiosité du virus, allant de la reconnaissance du récepteur à la libération du génome dans le noyau. Le pourcentage de cellules fluorescentes et donc transduites, a été déterminé par cytométrie en flux (FACS).

Des expériences préliminaires (*données non montrées*) ont permis de déterminer les paramètres optimaux de transduction en FACS avec le vecteur Ad5-GFP-wt, en l'absence de drogue. Ces conditions sont les suivantes : des cellules sont infectées avec 50 pp/cellule et analysées après 24 h d'infection. Dans ce cas, le pourcentage de fluorescence est de 30 % ce qui permet de détecter plus facilement les variations de la fluorescence.

Afin de déterminer l'effet des composés sur la transduction par l'AdV, nous avons d'abord testé différents temps d'incubation des drogues sur les cellules, pour déterminer si la pré-incubation était nécessaire et quelle devait être sa durée afin d'obtenir un maximum d'inhibition de la transduction. Nous avons utilisé les drogues à une concentration de 50 μM pour les composés C1 à C7 et 20 μM pour le composé C9. Nous avons alors incubé les drogues durant 2 h, 6 h, 10 h ou toutes les 2 h (10 h) (en changeant le milieu contenant les drogues toutes les 2 h pendant 10 h) avant l'infection (**Figure 12A**).

Les résultats indiquent que l'augmentation du temps d'incubation semble favoriser l'inhibition de la transduction après traitement avec les composés C4 et C7, cependant leur inhibition de la transduction n'excède pas 10 %. L'effet majeur observé est celui obtenu avec le composé C9 qui réduit de 30 % le taux de transduction et cela indépendamment du temps de pré-incubation du composé sur les cellules. Après 6 h de pré-incubation avec les composés C1 et C3, la transduction est augmentée, suggérant un effet activateur des composés. Le fait de rajouter des drogues dans le milieu après l'infection pendant les 24 h qui précèdent l'analyse en FACS ne semble pas avoir d'effet additionnel (*données non montrées*). Une pré-incubation d'1 h est donc suffisante. La nécessité de cette pré-incubation laisse supposer une liaison préalable des drogues à la Nedd4, déjà présente avant la transduction.

Cependant, aucun effet drastique sur la transduction n'est observable en présence des drogues. De plus, la concentration utilisée des composés est trop importante à la vue des tests de cytotoxicité (**Figure 9**).

Nous avons donc testé différentes concentrations pour déterminer un éventuel effet dose/réponse des composés. Nous avons réalisé une pré-incubation des cellules pendant 1 h en présence de concentrations variables de composés allant de 50 nM à 50 μM . Ensuite, les cellules ont été infectées avec 50 pp/cellule pendant 3 h et le milieu a ensuite été changé et remplacé par du milieu frais contenant une concentration de drogues équivalente à celle utilisée pour la pré-incubation. Vingt-quatre heures après infection les cellules ont été d'abord observées afin de vérifier un éventuel effet cytotoxique des drogues. Puis la fluorescence des cellules a été analysée en cytométrie en flux (**Figure 12B**).

Une analyse visuelle nous a permis de confirmer un effet cytotoxique des composés pour des concentrations supérieures à 10 μM .

Les résultats de FACS indiquent que le composé C9 a un effet reproductible sur la transduction des vecteurs adénoviraux, avec une diminution de 15-20% lorsqu'il est utilisé à 5 μM (**Figure 12B**). Ces résultats laissent supposer un effet de cette drogue lors de l'entrée du virus dans les cellules. Le composé C4 semble diminuer d'environ 5% la transduction des

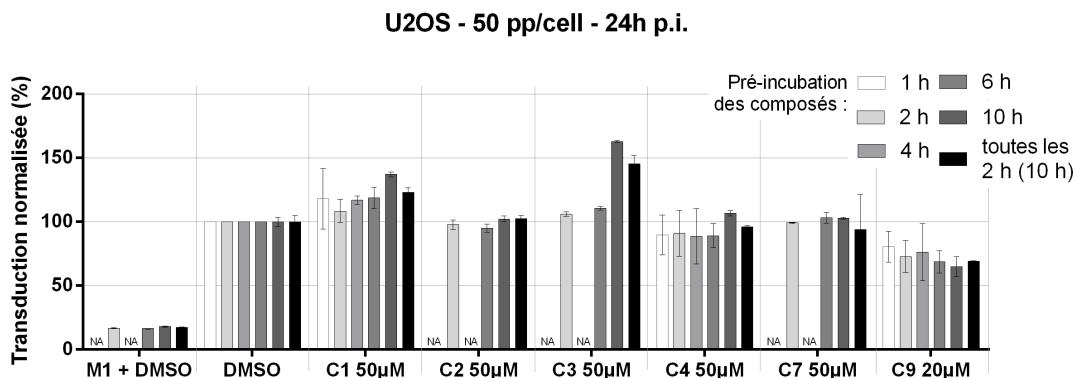
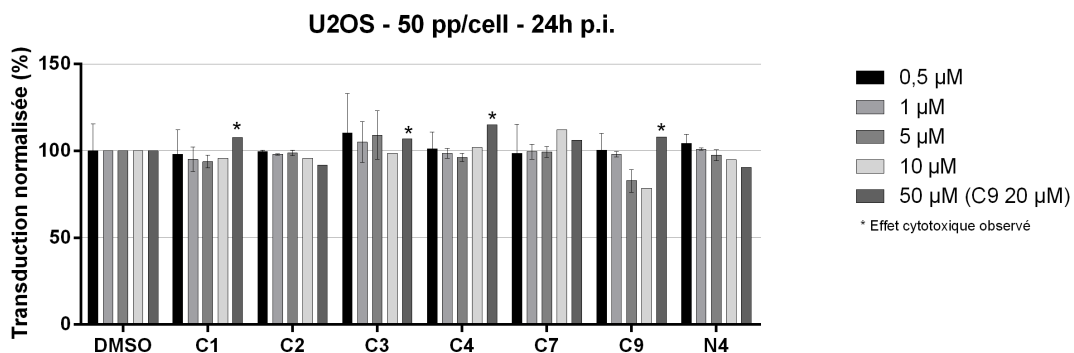
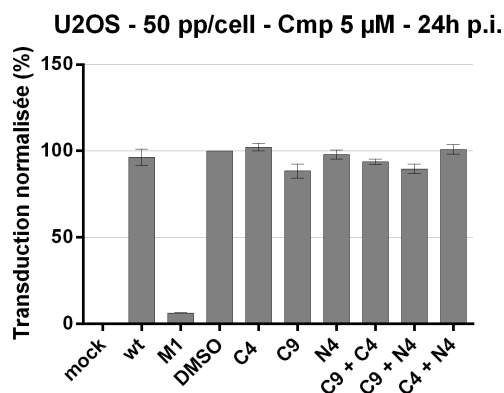
A**B****C**

Figure 12: Tests de transduction des AdV en présence des composés. Pourcentage de cellules U2OS fluorescentes (A) prétraitées pendant 1 h à 10 h en présence de drogue ou bien prétraitées pendant 2 h puis traitées pendant 10 h avec les drogues remplacées toutes les 2 h, (B) avec des concentrations de composés allant de 500 nM à 50 µM ou (C) une combinaison des composés pendant 1 h, puis infectées avec une 50 pp/cell de vecteur Ad5-GFP sauvage (ou M1 lorsque précisé) pendant 24 h. Après analyse par FACS, les pourcentages de cellules exprimant la GFP sont normalisés par rapport au contrôle DMSO seul.

vecteurs mais ce pourcentage est trop faible et pas assez reproductible pour permettre d'affirmer un effet. De plus, aucun effet additionnel n'a pu être observé lorsque l'on combine les deux composés C4 + C9 (**Figure 12C**).

1.2. Effet des composés sur la transduction de l'AdV dans différentes lignées cellulaires

Cette année, Narahara et Yasuda ont montré que la nécessité des « late domains » de type PSAP pour la réplication de certains virus était dépendante du type cellulaire (Narahara and Yasuda 2015). Nous avons donc souhaité savoir si l'importance du motif PPxY dans la transduction des AdV et l'effet du composé C9 étaient différents dans d'autres lignées cellulaires. Nous avons testé les drogues sur la transduction des vecteurs dans les cellules d'ostéosarcome humain (U2OS), les cellules issues de lignées cellulaires cancéreuses de poumon (H1299) et du col de l'utérus (HeLa), toutes étant des cellules humaines.

On peut observer que dans les cellules H1299, la transduction par le virus M1 pourtant muté pour son motif PPxY est semblable à celle du vecteur sauvage, contrairement à ce qui est observé dans les U2OS et les HeLa (**Figure 13**). Ces résultats suggèrent que l'implication des « late domains » de type PPxY de l'AdV dépend du type cellulaire. De manière intéressante mais sans explication évidente, les drogues réduisent plus efficacement la transduction des vecteurs adénoviraux dans la lignée cellulaire H1299.

L'analyse en FACS nous donne l'effet global des composés sur l'entrée sans définir l'étape mise en jeu, 24 h après infection. Ainsi un léger retard d'entrée n'est plus observable après 24 h. Nous avons donc supposé que l'effet de certaines drogues pouvait être sous-estimé par cette technique et nous avons voulu déterminer si les drogues avaient un effet durant les phases précoces de l'infection.

2. Effets des composés sur l'entrée des virus dans la cellule

Pour tester l'effet des composés sur l'entrée du virus, nous avons infecté des cellules avec du virus répliquatif marqué HH-Ad5-wt-A488 (adénovirus humain de type 5, possédant la protéine VI sauvage et dont la capsid est couplée au fluorochrome Alexa-488) en présence ou absence des différentes drogues et quantifié le nombre de virus dans les cellules par immunofluorescence après 2 h d'infection. Les cellules sont ensuite observées au microscope confocal.

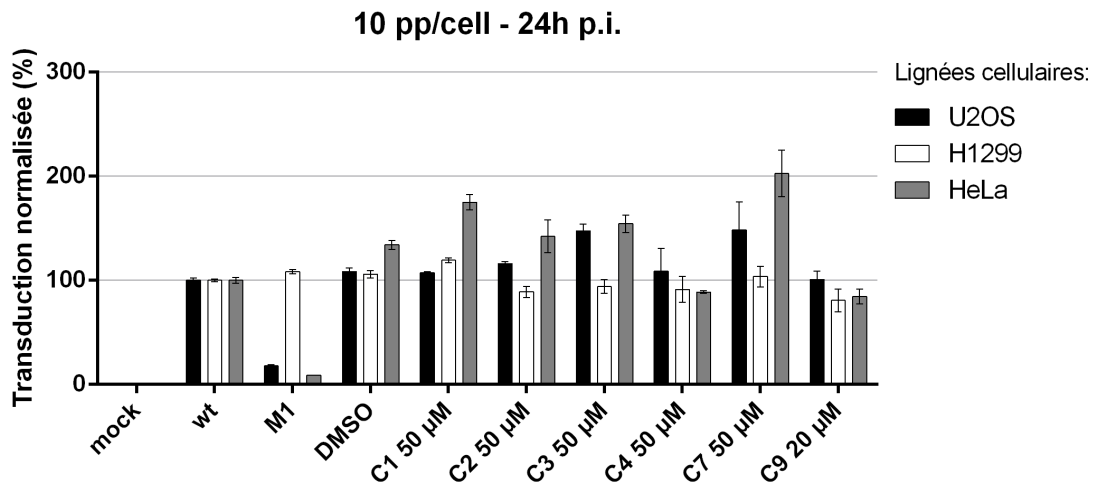


Figure 13: Variation des lignées cellulaires lors du test des effets des composés sur la transduction des AdV. Fluorescence des cellules U2OS, H1299 ou HeLa prétraitées pendant 1 h avec 50 µM des composés C1 à C7 et 20 µM du composé C9, puis infectées avec une 10 pp/cell de vecteur Ad5-GFP sauvage (ou M1 lorsque précisé) pendant 24 h. Après analyse par FACS, les pourcentages de cellules exprimant la GFP sont normalisés par rapport au contrôle DMSO seul.

Les quantifications réalisées sur les images d'immunofluorescence montrent qu'en présence des composés C2, C3 et C9 le nombre de virus dans les cellules est réduit de manière significative de plus de 35 % après 2 h d'infection (**Figure 14A**). Aucun effet significatif n'est observé en présence des composés C1, C4, C7 ou N4.

Ainsi le composé C9 provoque une réduction de l'entrée des virus dans la cellule ce qui est en accord avec les tests de transduction précédents. Les composés C2 et C3 semblent eux aussi inhiber l'entrée mais les résultats de transduction suggèrent que leur efficacité est moins importante que le C9. Le composé C4 ne semble pas avoir d'impact sur l'entrée du virus. Ce résultat et l'absence d'effet du composé C4 sur la transduction (**Figure 12**) laissent supposer un rôle plus tardif de la drogue dans le cycle de réplication du virus.

3. Effets des composés sur la libération du génome viral dans le noyau

Il a été montré au laboratoire que le motif PPSY de la protéine VI était impliqué dans le transport du virus jusqu'au noyau (Wodrich et al. 2010). Un défaut de trafic de l'AdV peut ainsi conduire à une diminution de la quantité de génome adénoviral libéré dans le noyau. Nous avons donc souhaité savoir si les composés affectaient la libération du génome viral dans le noyau.

La protéine VII des AdV est liée au génome adénoviral et permet la formation d'une structure similaire à la chromatine dans le virion (Haruki et al. 2003). Le marquage de cette protéine VII par immunofluorescence est un moyen indirect de détecter le génome viral libéré dans le noyau.

Ainsi, les cellules U2OS ont été infectées pendant 2 h avec des virus marqués HH-Ad5-wt-A488 ou HH-Ad5-M1-A488 en présence de 5 μ M des composés C1 à C9 ou 1 μ M de composé N4. Une immunofluorescence marquant la protéine VII du virus a été réalisée (**Figure 15A**). Les cellules ont été observées au microscope confocal. Le marquage de la protéine VII (*en rouge*) montre un signal sous forme de clusters fluorescents essentiellement nucléaires.

La quantification du nombre de protéine VII par noyau est présentée sous forme de boîtes à moustaches (**Figure 15B**). Les résultats révèlent que le composé C9 inhibe très significativement la libération du génome viral dans le noyau (**Figure 15B**). Ce défaut est également observé lorsque l'on traite les cellules avec le composé N4. Le composé C3 semble lui aussi inhiber la libération du génome mais ces résultats ne sont pas significatifs. Les autres

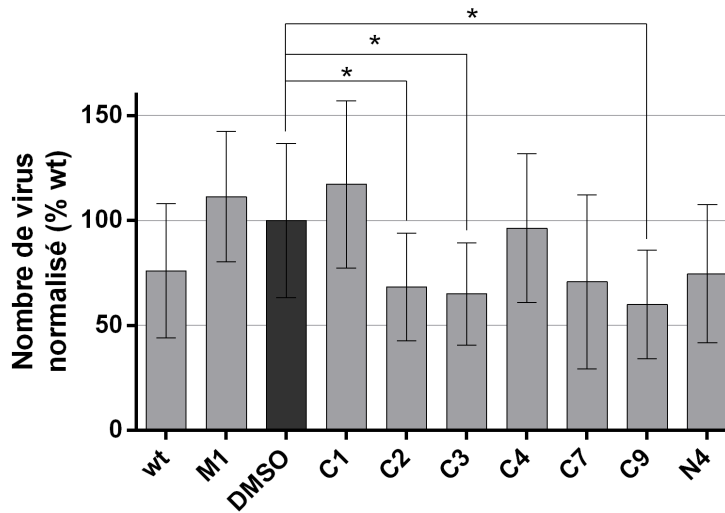


Figure 14: Effet des composés sur l'endocytose des AdV. Nombre de virus présents dans des cellules U2OS infectées avec 2500 pp/cellule de virus marqué Ad5-A488 sauvage (ou M1 lorsque précisé) pendant 2 h en présence de 5 μ M des composés C1 à C9, 1 μ M du composé N4 ou de DMSO comme contrôle. Le nombre moyen de virus par cellule a été déterminé par IF pour chaque condition puis normalisé par rapport au contrôle DMSO seul.

composés, les drogues C1, C2, C4 et C7 ne semblent pas avoir d'impact sur la libération des génomes viraux dans le noyau.

Il est à noter qu'un défaut d'entrée du virus dans les cellules conduit logiquement à une quantité plus faible de génomes viraux délivrés dans le noyau. Par conséquent, le pourcentage de pVII dans le noyau calculé indépendamment du nombre de virus présent dans la cellule comme montré précédemment, ne permet pas de discriminer un effet des composés sur l'entrée, les étapes post-entrée ou la libération du génome en elle-même.

Pour savoir si seule la libération du génome dans le noyau était affectée, nous avons normalisé le nombre de protéine VII quantifiées dans le noyau par rapport au nombre de virus par cellule.

Les résultats indiquent que le défaut de libération du génome dans le noyau en présence du composé C9 reste significatif puisqu'il inhibe plus de 40 % de la libération de génome normalisée (**Figure 15C**). Le résultat est semblable avec le composé N4 mais pas avec le composé C3.

L'ensemble de ces résultats suggère que le composé C9 inhibe à la fois l'entrée du virus dans la cellule (**Figure 14A**) mais aussi la libération du génome viral dans le noyau (**Figure 15C**). Le composé N4, lui n'a pas d'effet sur l'entrée des virus dans la cellule, mais il réduit l'efficacité de libération du génome dans le noyau.

Les autres composés C1, C2, C3, C4 et C7 n'ont pas d'effet sur la libération du génome dans le noyau. Cela laisse supposer un effet plus tardif des composés lors du cycle viral.

4. Effets des composés sur l'expression des gènes adénoviraux précoces

Enfin, nous avons voulu savoir si les composés affectaient l'expression des gènes viraux. Pour cela, nous avons choisi de quantifier les ARN messagers des gènes précoces E1A, E1B et E4 orf6/7 de l'adénovirus dans les cellules infectées.

Les cellules U2OS ont été infectées avec le virus répliquatif HH-Ad5-wt en présence de 5 μ M des composés C1 à C9, 1 μ M du composé N4 ou d'un volume équivalent de DMSO pendant 4 h. Nous avons ensuite extrait les ARN totaux, réalisé une transcription inverse des ARN messagers en ADN complémentaire (ADNc) puis une PCR quantitative. Les résultats obtenus ont été normalisés et analysés par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ qui permet une quantification relative des ADNc d'intérêts en fonction d'un gène de ménage, ici la

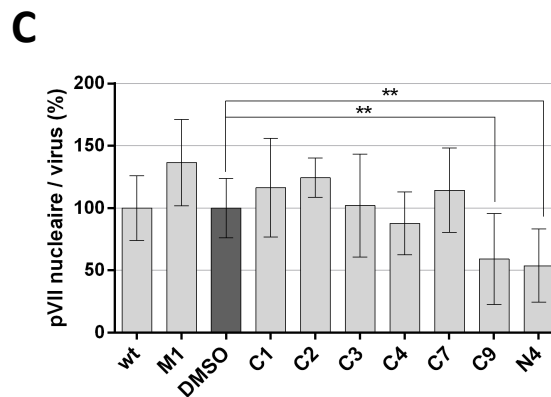
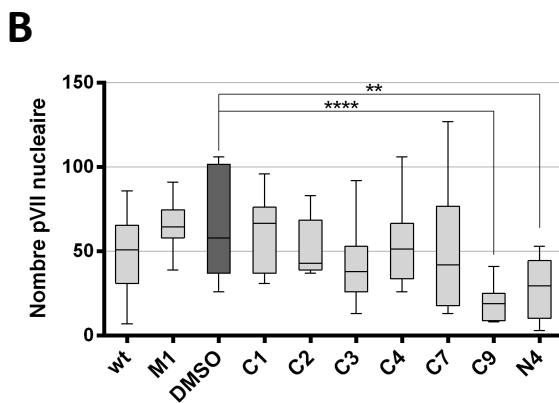
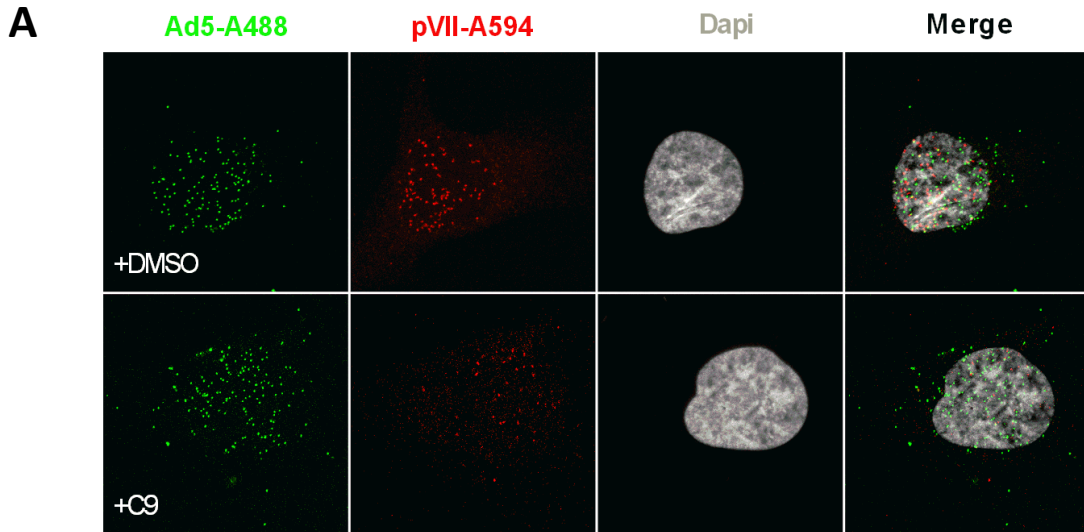


Figure 15: Effet des composés sur l'import nucléaire du génome de l'AdV. Nombre de protéine VII liée au génome viral dans les noyaux de cellules U2OS infectées avec 2500 pp/cellule de virus marqué Ad5-A488 (ou M1 lorsque précisé) pendant 2 h en présence de 5 μ M des composés C1 à C9, 1 μ M du composé N4 ou de DMSO comme contrôle. (A) Exemple d'images d'immunofluorescence avec les virus marqués (*en vert*), les protéines VII (*en rouge*) et le noyau marqué par du DAPI. Après immunomarquage des protéines VII, (B) le nombre de protéines VII nucléaires a été déterminé et est représenté en nombre absolu de protéine VII par noyau, dans une population de plus de 10 cellules par condition, et (C) le nombre de protéine VII par noyau a été normalisé en fonction du nombre de virus fluorescents par cellule. L'ensemble des valeurs obtenues a été normalisé en fonction du contrôle DMSO seul.

glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), et du contrôle non infecté (Livak and Schmittgen 2001).

Les résultats indiquent que seul le composé C9 inhibe significativement l'expression des trois gènes adénoviraux précoces étudiés. Ces résultats sont en accord avec le défaut de libération du génome observé (**Figure 16**).

Les résultats indiquent également que le composé N4, qui précédemment induisait un défaut de libération du génome (**Figure 16**) ne semble pas affecter l'expression des gènes précoces. Une des explications à ce résultat serait la fixation du composé N4 sur la protéine cellulaire Nedd4-2 plutôt que sur le motif PPSY de la protéine VI. En effet, notre laboratoire a mis en évidence l'implication du motif PPSY la protéine VI dans l'activation de l'expression du génome adénoviral (Schreiner et al. 2012) mais aucun rôle n'a encore été décrit pour la Nedd4-2. Si ce n'est pas la Nedd4-2 qui intervient dans ce mécanisme mais une autre ubiquitine ligase ou une autre protéine cellulaire avec un domaine WW, alors un ciblage de cette protéine n'aura pas d'impact sur l'activation de l'expression des gènes précoces adénoviraux.

5. Effet des composés sur l'échappement endosomal

Les résultats précédents indiquent que le composé C9 a un effet au niveau des phases précoces de l'infection tandis que le composé C4 inhibe plutôt les phases tardives du cycle viral. Pour continuer la caractérisation du composé C9, nous avons déterminé ses effets sur l'échappement endosomal du virus. Cette étape est détectée indirectement en immunofluorescence grâce à la quantification de la colocalisation entre les particules virales marquées et la protéine de capsid VI.

En effet, lors de l'entrée d'un AdV marqué dans la cellule, la protéine VI est localisée dans la capsid et seul le signal du virus est observable. Après désassemblage de la capsid, la protéine VI est libérée, devient accessible aux anticorps et son signal est observable, associée à la capsid dans l'endosome. Après la lyse de l'endosome, les deux signaux persistent mais la colocalisation virus/protéine VI diminue. Une partie des protéines VI reste associée avec la particule désassemblée qui est transportée jusqu'au noyau. L'autre partie des protéines VI est relocalisée ou dégradée par la cellule. En présence du virus M1, la colocalisation entre la particule virale et la protéine VI-M1 persiste plus longtemps, illustrant ainsi le défaut d'échappement des endosomes du mutant (Wodrich et al. 2010).

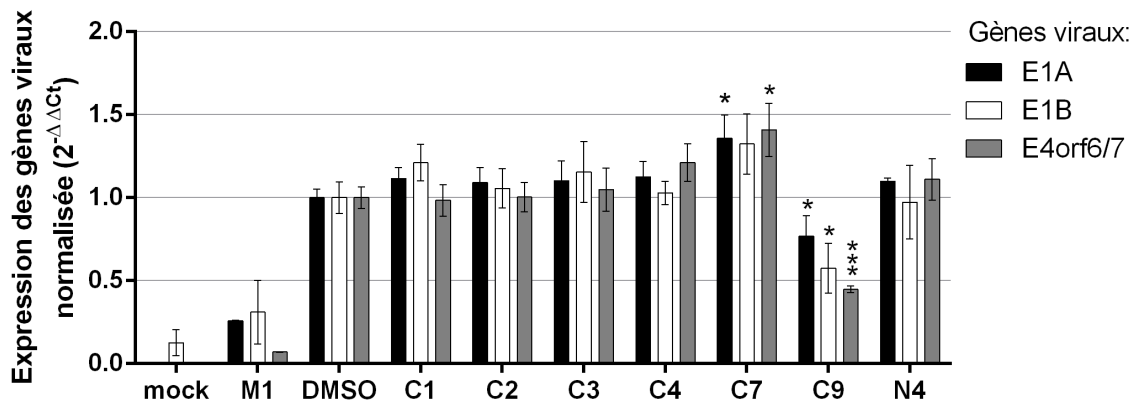


Figure 16: Effet des composés sur l'expression des gènes viraux précoces. Expression des gènes viraux dans les cellules U2OS infectées pendant 4 h avec le virus répliquatif HH-Ad5 sauvage (ou M1 lorsque précisé) en présence de 5 μ M des composés C1 à C9, de 1 μ M de composé N4 ou de DMSO comme contrôle. Après extraction et rétrotranscription des ARNm, l'expression des gènes viraux précoces E1A, E1B et E4 orf6/7 et du gène de ménage GAPDH est quantifiée par PCR quantitative. Les valeurs obtenues ont été normalisées par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les barres d'erreur représentent la variation des valeurs moyennes issues de chaque condition en triplicata de deux expériences.

Les cellules U2OS ont été infectées avec des virus marqués HH-Ad5-wt-A488 ou HH-Ad5-M1-A488 en présence de 5 μ M des composés C4, C9 ou d'un volume équivalent de DMSO. Les cellules ont été fixées après 10 et 60 min d'infection et la protéine VI a été détectée par immunofluorescence (Alexa-594). A partir des observations en microscopie confocale, le pourcentage de protéine VI colocalisant avec les particules virales a été déterminé.

En présence du composé C4, la colocalisation entre la protéine VI et le virus sauvage à 10 min et 1 h semble suivre la même cinétique qu'en présence de DMSO seul (**Figure 17**). Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas d'effet du composé C4 sur l'échappement endosomal du virus et confirment un effet plus tardif lors de l'infection.

Le profil du virus M1 montre une colocalisation deux fois moins importante après 10 min d'infection par rapport au virus sauvage, indiquant son défaut d'entrée. A 1 h le taux de colocalisation augmente et reste supérieur à celui du wt, confirmant le défaut d'échappement endosomal en absence de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 (**Figure 17**).

En présence du composé C9, on retrouve le même profil pour le virus sauvage traité et le virus M1 à 10 min (**Figure 17D**). Ces résultats confirment un effet du composé C9 sur l'entrée du virus. Cependant à 1 h, la cinétique de dissociation de la protéine VI avec le virus est semblable à celle du virus sauvage. Ces résultats indiquent que le composé C9 n'aurait pas d'effet sur l'échappement endosomal mais un effet sur l'endocytose du virus. Cependant le virus M1 incapable de lier la Nedd4-2 montre un défaut d'échappement endosomal. Ces résultats suggèrent donc l'implication de la Nedd4-2 et/ou du motif PPSY dans les étapes d'entrée en amont de l'échappement endosomal ou bien un effet intrinsèque du composé C9 lors de l'endocytose du virus.

6. Conclusion

Les drogues ont pu être divisées en deux groupes en fonction de leurs effets, récapitulés dans le **Tableau 5** et le **Schéma 10**.

Parmi les drogues ayant un effet sur les phases précoces de l'infection adénovirale, on retrouve les composés C2, C3, C9 et la molécule synthétique N4.

- Le composé C2 inhibe de 35% de l'étape d'endocytose des virus dans la cellule (**Figure 14A**) mais ne présente aucun effet sur les autres étapes d'entrée du virus telles que la libération du génome adénoviral dans le noyau. Son action sur la réplication du

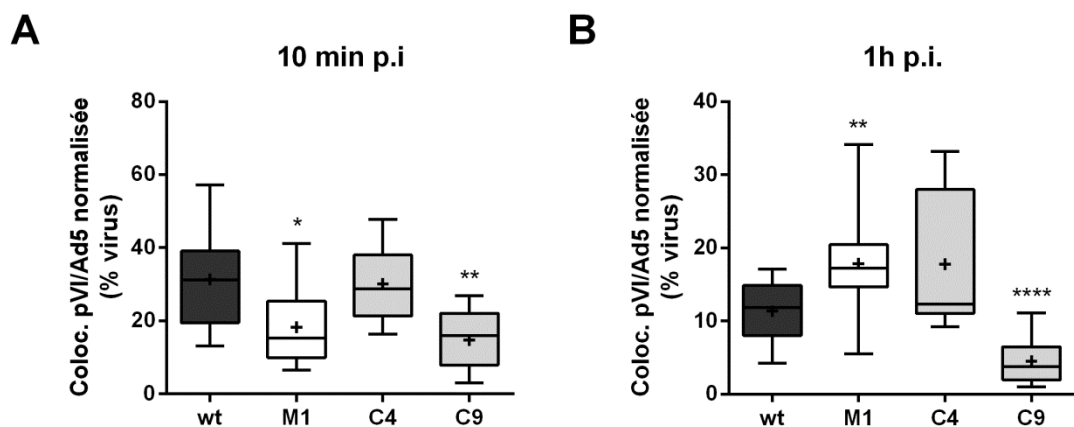


Figure 17: Effet des composés C4 et C9 sur l'échappement endosomal des AdV. Colocalisation des virus avec la protéine VI dans les cellules U2OS infectées avec 2500 pp/cellule de virus marqué Ad5-VI-A488 sauvage (wt) ou muté (M1) pendant (A) 10 min ou (B) 1 h en présence de 5 μ M des composés C4 ou C9 ou du contrôle DMSO seul. Après immunomarquage de la protéine VI, le nombre de protéines VI qui colocalisent avec les virus fluorescents wt ou M1 en présence de DMSO, du composé C4 ou C9 a été déterminé et est représenté en nombre absolu de colocalisation protéine VI/Ad5, dans une population d'au moins 10 cellules par condition. La moyenne apparaît sous la forme d'un + dans chaque boîte.

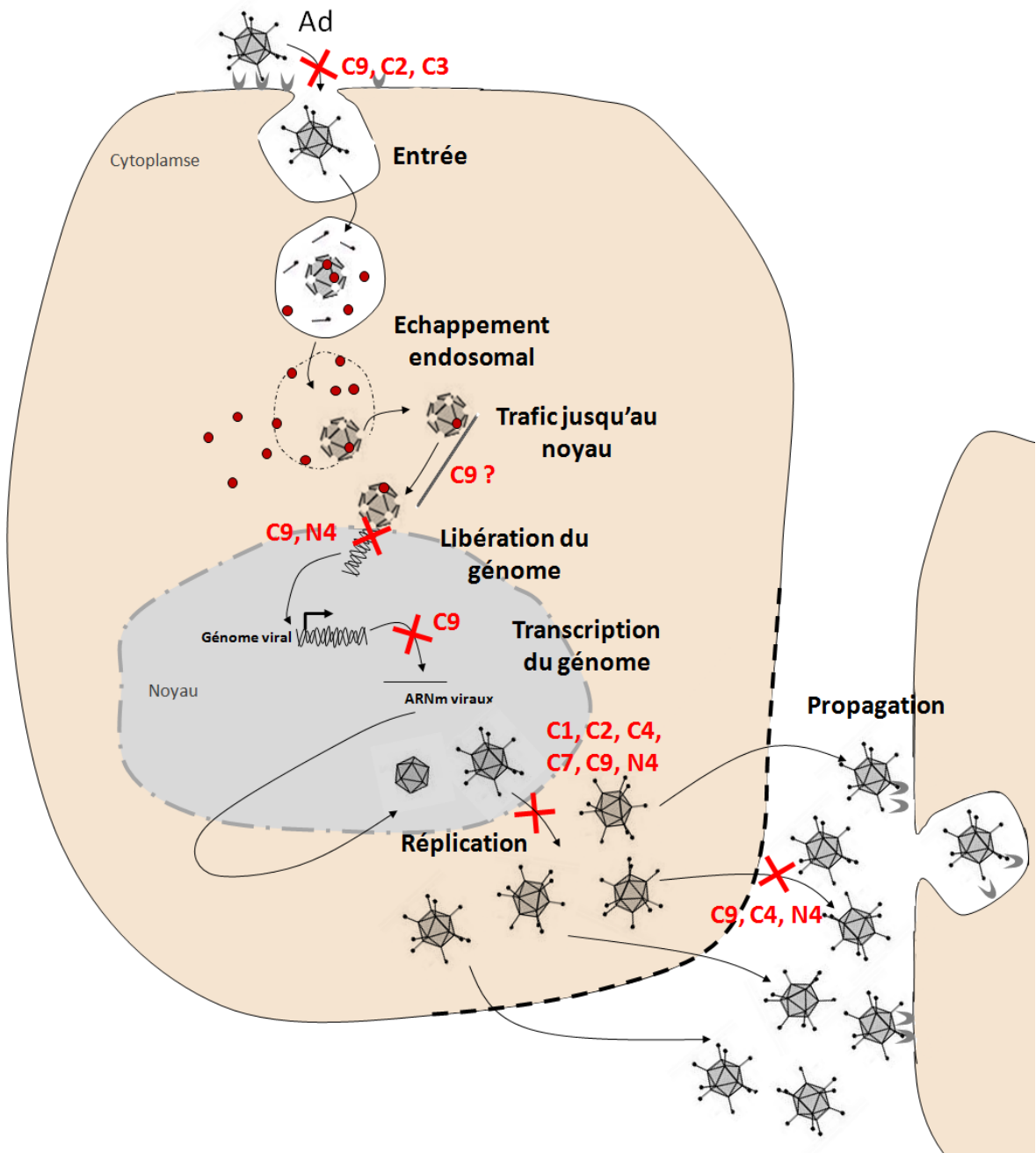


Schéma 10 : Schéma des effets des composés sur la réplication de l'AdV.

virus est litigieuse car le composé semble capable d'inhiber jusqu'à 60 % de la production de particules infectieuses mais augmente la capacité de propagation des virus de plus de la moitié. Il est donc difficile de conclure sur l'action exercée par ce composé sur l'infection adénovirale.

- Le composé C3 est capable lui aussi d'inhiber 40 % de l'endocytose des virus dans la cellule cependant son action serait transitoire car elle est sans répercussion sur la réplication du virus (**Figure 11**).
- L'ensemble des résultats suggère que le composé C9 inhibe l'endocytose du virus dans la cellule puisqu'après 2 h d'infection il y a 45 % de virus en moins dans la cellule par rapport au contrôle sans drogue (**Figure 14A**). S'il ne semble pas avoir d'effet sur l'échappement endosomal, il inhibe fortement la libération du génome dans le noyau et cela indépendamment de son effet sur l'endocytose (**Figure 15**) et il inhibe de 20 à 55 % l'expression des gènes adénoviraux. Cette inhibition peut être directement liée à l'inhibition de la libération du génome dans le noyau sans pour autant exclure un éventuel rôle du composé C9 sur l'expression des gènes adénoviraux. Ce composé est le plus efficace sur la transduction des vecteurs, qu'il inhibe d'environ 15%. Il reste à déterminer si la diminution de 40 % la réplication et de moitié la propagation des virus en présence du composé C9 est uniquement due à son action sur les phases précoces de l'infection ou s'il exerce également ses effets sur les phases plus tardives.
- La drogue de synthèse N4, mise au point par Han *et al*, ne semble pas avoir d'action sur l'endocytose des virus dans la cellule mais inhibe de moitié la libération du génome dans le noyau. Si cette inhibition ne semble pas avoir d'impact sur l'expression des gènes précoces adénoviraux, son effet conduit tout de même à une inhibition de 60 % de la réplication et de 50 % de la propagation des virus. Un effet de la drogue sur les étapes plus tardives de l'infection reste à définir. Ainsi un composé initialement identifié par Han *et al*, comme bloquant la libération de particules virales enveloppées est aussi capable de bloquer l'entrée d'un virus non-enveloppé.

Les composés C1, C4 et C7 ont un effet plus tardif sur le cycle viral :

- Les composés C1 et C7 inhibent de plus de 50 % la production de particules virales mais ont peu (10 % pour le composé C1) ou pas d'effet sur la propagation des virus. L'absence d'effet de ces drogues sur les étapes d'entrée testées, indique que ces drogues inhibent plutôt les phases tardives de l'infection. On sait que la protéine VI

est impliquée dans la formation et l'assemblage des nouveaux virions en fin de cycle. Aucun rôle de la protéine cellulaire Nedd4-2 n'a encore été décrit au cours de ses étapes. Nous pouvons cependant supposer que le ciblage de la protéine VI par ses composés suffirait, par encombrement, à affecter l'assemblage des nouveaux virions.

- Le composé C4 est capable de réduire la production de particules virales de 35 % et il inhibe également la propagation du virus. Aucun effet de la drogue n'est observable sur les étapes d'entrée du virus et son action se déroule *a priori* lors des phases tardives de l'infection adénovirale.

Les composés C4 et C9 identifiés par notre criblage, ciblent l'interaction protéine VI/Nedd4 et ont des effets sur plusieurs étapes du cycle des Adénovirus. Le composé C9 semble agir sur les étapes précoces tandis que le composé C4 agirait plutôt sur les étapes tardives de l'infection adénovirale.

L'IPP motif [LP]P_xY/Nedd4 est nécessaire à la réplication d'au moins huit familles de virus (*Cf. Chapitre 1*) et constitue donc la cible idéale d'un antiviral à large spectre. Nous avons donc par la suite, testé l'effet de ces composés sur la réplication de virus différents de l'AdV.

Chapitre 5 : Effets des composés sur les *Filoviridae*: une famille de virus à ARN enveloppés

Tester nos composés sur d'autres virus que l'AdV nous permettait de valider notre stratégie antivirale à large spectre mais également de potentiellement répondre à la nécessité d'un traitement anti-Ebola. En effet, suite à la récente épidémie d'Ebola en 2014, les recherches pour trouver un antiviral efficace contre les filovirus sont en pleine expansion. Cependant, la forte pathogénicité de ce virus limite son étude car elle doit se faire sous haute sécurité, en manipulant le virus dans un laboratoire P4 (nécessaire à la manipulation de micro-organismes très pathogènes), ce dont disposent très peu de laboratoires dans le monde.

A l'inverse des adénovirus, les filovirus sont des virus enveloppés à ARN négatif dont la réplication a entièrement lieu dans le cytoplasme. Leur bourgeonnement est dépendant d'une interaction de type motif [LP]PxY/Nedd4. En effet, les filovirus tels que les virus de Marburg ou d'Ebola, sont composés d'une protéine de matrice, appelée VP40 responsable de l'assemblage et du bourgeonnement des virus à la membrane et qui, à elle seule, suffit à la production de pseudoparticules (VLP pour « virus-like particles »). La protéine VP40 possède un motif PPxY lui permettant de lier la Nedd4-1 cellulaire (Urata and Yasuda 2010) (**Tableau 3**). C'est grâce à cette interaction que les virus détournent la machinerie cellulaire associée au trafic des corps vésiculaires et recrutent toutes les protéines cellulaires nécessaires au trafic, à l'assemblage, au bourgeonnement et à la libération des VLP et des virus répliquatifs enveloppés (**Schéma 11**).

1. Effets des composés sur la libération de pseudoparticules de filovirus

Les composés C9 et C4 sont les composés qui inhibent le plus efficacement la propagation des adénovirus. Nous avons donc testé l'effet de ces composés sur le bourgeonnement des Filovirus.

Pour des raisons de sécurité, nous avons choisi un modèle expérimental utilisant des pseudoparticules de virus de Marbourg. Grâce à la transfection d'un plasmide codant pour la protéine VP40 qui a la capacité de s'assembler (Panchal et al. 2003), on peut observer la libération de VLP non-infectieuses, composées uniquement de la membrane cellulaire enveloppant les protéines VP40 (**Figure 18A**). Ce modèle expérimental est celui employé par l'équipe de R. Harty pour montrer que le composé N4 inhibe la libération des pseudoparticules de virus à ARN enveloppés tels que les Filovirus (Han et al. 2014a).

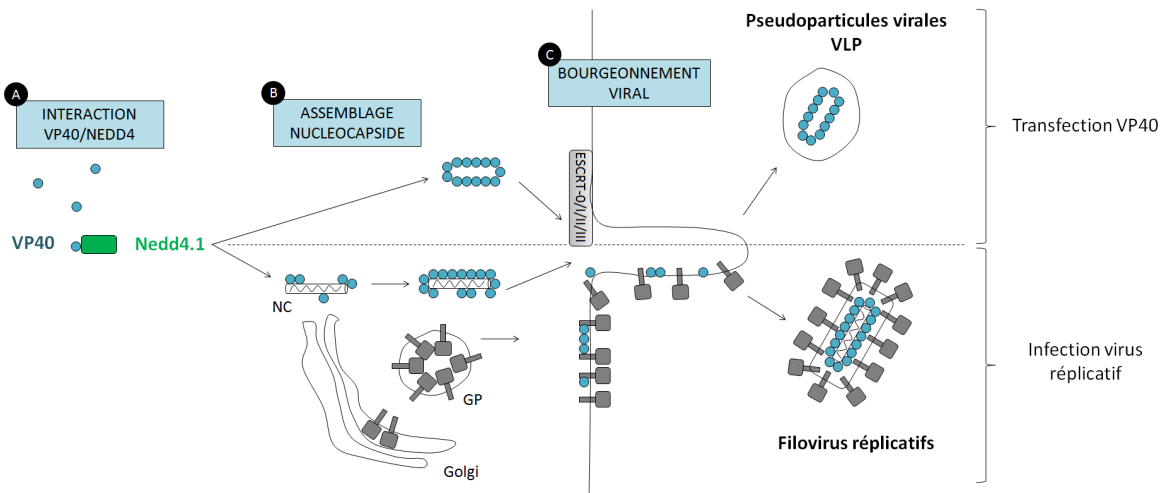


Schéma 11 : Rôle de l'interaction protéine VP40/Nedd4 dans le bourgeonnement des Filovirus. Le bourgeonnement des filovirus est dépendant de l'interaction VP40/Nedd4. La protéine de matrice VP40 des virus de Marburg ou d'Ebola possède un motif PPxY lui permettant de lier la Nedd4-1 cellulaire. Cette interaction permet l'assemblage et la libération de pseudoparticules (VLP) dans le cas d'une transfection de la protéine VP40 seule ou du bourgeonnement de virus réplcatif dans un contexte infectieux.

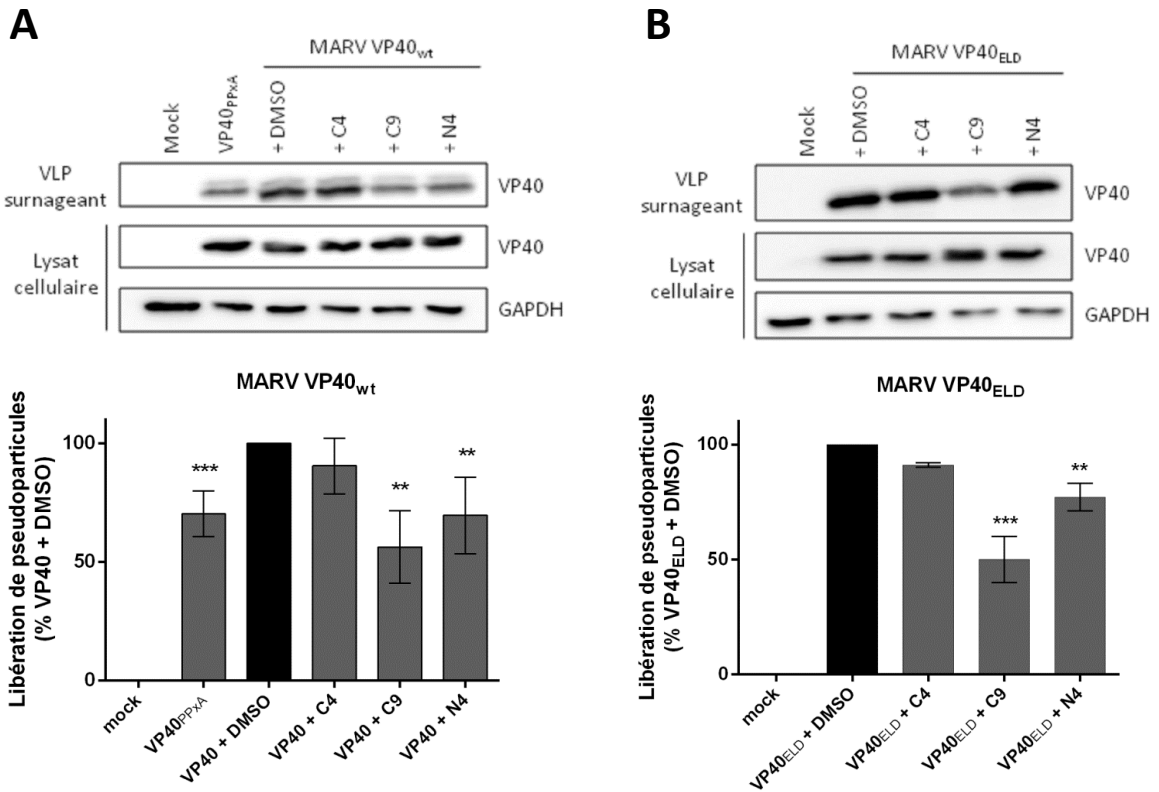


Figure 18: Effet des composés sur la libération des pseudoparticules (VLP) de VP40. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec (A) un plasmide codant pour la protéine VP40 du virus de Marburg sauvage (VP40_{WT}) ou avec un motif PPxY muté en PPxA (VP40_{PPxA}) ou (B) par un plasmide codant pour la protéine VP40 du virus de Marburg possédant le « late domains » (PTAPPEY) d’Ebola (VP40_{ELD}) ou par un plasmide vide. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec 5 μ M de C9, 1 μ M de C4, 1 μ M du contrôle N4 ou avec le contrôle DMSO seul. Les VLP (*en haut*) et les lysats cellulaires (*en bas*) ont été analysés par western-blot anti-VP40 et anti-GAPDH comme contrôle de charge. Les signaux ont été quantifiés et l’efficacité de libération des VLP a été calculée et représentée sous forme d’histogramme (*en dessous*). Les barres d’erreur représentent l’écart-type de trois expériences individuelles.

1.1. *Effets sur la libération des VLPs de VP40 du virus de Marburg*

Afin de tester nos composés sur la libération de pseudoparticules du virus de Marburg (VLP), des cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour la protéine VP40 du virus de Marburg (VP40_{WT}) ou pour la protéine VP40 dont le motif PPxY a été muté en motif PPPA (VP40_{PPXA}) comme contrôle négatif (**Figure 18A**). Les cellules transfectées ont ensuite été incubées en présence des composés C4, C9 ou de DMSO. Le composé synthétique N4 a également été utilisé comme contrôle positif d'inhibition de la libération des pseudoparticules (Han et al. 2014a). Vingt-quatre heures après transfection, les VLP libérées sont concentrées par centrifugation du milieu de culture et les cellules sont lysées. La quantité de VP40 des particules ou exprimé dans les cellules est analysée par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-VP40. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge et pour normaliser les quantités de VP40 exprimées.

Les quantifications indiquent que la protéine VP40 possédant un motif PPxY muté (en PPPA) présente un défaut de libération des VLP comme déjà décrit. De la même façon le composé contrôle N4 inhibe de 40 % la libération des VLP de la protéine VP40-wt en présence du composé N4 soit 40 % (**Figure 18A**). Le composé C9 inhibe de manière plus importante 50% de la libération de VLP de VP40 de Marburg. Le composé C4 quant à lui inhibe 10 % de la libération de VLP.

Ces résultats montrent que nos composés, capables d'inhiber l'infection d'un virus à ADN non-enveloppé, sont également capables de réduire la libération des filovirus en ciblant l'interaction motif [LP]PxY/Nedd4.

1.2. *Effets sur la libération des VLP contenant le « late domain » d'Ebola*

Le virus Ebola est proche de celui de Marburg mais leurs VP40 sont différentes. En effet, le motif de type [LP]PxY présent sur la protéine VP40 du virus Ebola possède une séquence différente correspondant à la superposition de deux « late domains » de type PSAP et PPxY : PTAPPEY. Grâce à ce domaine, le virus Ebola est non seulement capable de recruter les ubiquitine ligases Nedd4 mais il recrute aussi directement la machinerie ESCRT nécessaire à son bourgeonnement (*Cf. Introduction Chapitre 2*).

Afin de tester l'effet des composés sur la libération de VLP contenant le « late domain » de la protéine VP40 de virus d'Ebola, nous avons transfecté de la même manière que décrit précédemment, la protéine VP40 du virus de Marburg dont le motif PPxY a été remplacé par le motif PTAPPEY de la protéine VP40 du virus Ebola (VP40_{ELD}) (**Figure 18B**). Nous avons incubé les cellules en présence de 5 µM des composés C4 ou C9 ou d'un volume équivalent

de DMSO. Vingt-quatre heures après transfection, la quantité de VLP libérées a été analysée par western-blot.

Les mêmes résultats que précédemment ont été obtenus : le composé C9 inhibe la libération efficace des VLP (**Figure 18B**).

Cet effet inhibiteur de nos drogues sur la libération de VLP de Filovirus nous a encouragés à tester leur effet sur la réplication des virus infectieux.

2. Effet des composés sur la réplication du virus de Marburg

Afin de pouvoir tester nos drogues sur un Filovirus répliatif, nous avons fait appel au Docteur Olga Dolnik à l'université de Marburg en Allemagne qui travaille sur le virus de Marburg en laboratoire P4.

Les cellules HUH-7 ont été infectées avec le virus de Marburg:

- soit en présence de 1, 5 à ou 10 μM de composés C4 ou C9,
- soit en absence de drogues et les composés ont été ajoutés 5 h après infection.

Les surnageants ont ensuite été récupérés 24 h et 48 h après infection et les virus libérés ont été titrés par la technique des dilutions limites. Le titre est exprimé en TCID_{50} c'est à dire, la dilution de virus pour laquelle on observe un effet cytopathique dans 50 % des répliatifs d'une même dilution.

Les résultats indiquent que 24 h post-infection, le composé C9 diminue le titre de virus de Marburg de près de 10 fois, de manière dose dépendante (**Figure 19**). Les tests de cytotoxicité réalisés sur les cellules HUH-7 indiquent une absence d'effet cytotoxique du composé C9 sur les cellules lorsqu'il est utilisé à une concentration inférieure ou égale à 5 μM (**Figure 9**). En revanche, on peut observer un effet cytotoxique de la drogue C9 à 10 μM , il est donc difficile d'interpréter les résultats pour cette concentration. Le composé C4 diminue le titre de virus de Marburg de 10 à 100 fois et aussi de manière dose dépendante (**Figure 19**) et cela sans effet cytotoxique puisque les tests de cytotoxicité indiquent l'innocuité de ce composé sur les cellules HUH-7 avec des concentrations allant jusqu'à 10 μM (**Figure 9**).

Les effets du composé C9 semblent être indépendants du moment auquel la drogue a été ajoutée contrairement au composé C4. En effet, le titre viral est significativement réduit lorsque le composé C4 est ajouté au moment de l'infection et pas après 5 h d'infection ce qui suggère un effet durant l'entrée du virus à l'inverse de l'effet tardif observé sur l'AdV.

Après 48 h d'infection, les deux drogues ont une activité antivirale réduite en comparaison des données obtenues à 24 h laissant supposer un défaut de stabilité des drogues à long terme.

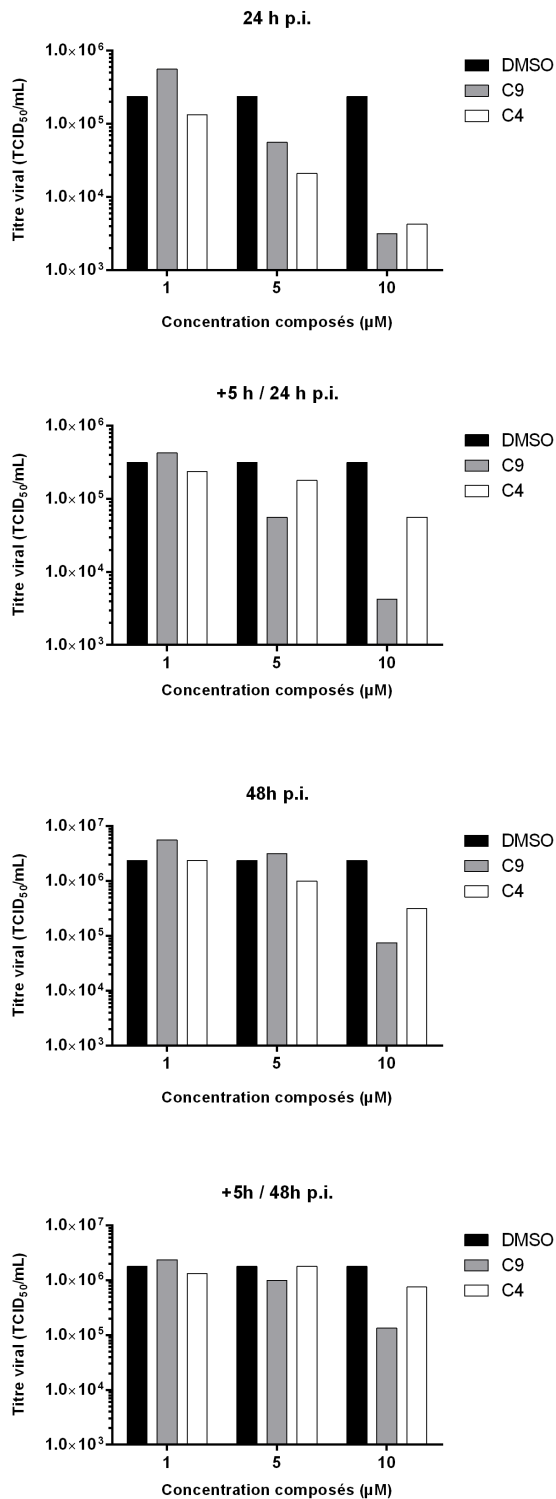


Figure 19: Effet des composés sur la réplication du virus de Marburg. Titre viral (exprimé en TCID₅₀/mL) de cellules HuH-7 infectées avec du virus de Marburg, en présence ou bien après 5 h de traitement (+5 h) avec 1, 5 ou 10 μM des composés C4 (barres blanches), C9 (barres grises) ou de DMSO (barres noires) pendant 24 h (graphiques du haut) ou 48 h (graphiques du bas).

3. Conclusion

Nous avons identifié les composés C4 et C9 comme capables d'inhiber *in vitro* une interaction de type motif [LP]PxY/Nedd4 impliquée dans l'entrée des adénovirus. Ces deux composés réduisent la réplication des adénovirus à plusieurs étapes du cycle viral. Le composé C9 semble agir sur les étapes précoces tandis que le composé C4 agirait plutôt sur les étapes tardives de l'infection adénovirale.

Puisque l'IPP motif [LP]PxY/Nedd4 est nécessaire à la réplication d'au moins huit familles de virus (*Cf. Chapitre 1*), nous avons testé l'effet de ces composés sur la réplication des Filovirus : des virus enveloppés, à ARN, nécessitant l'IPP [LP]PxY/Nedd4 pour leur bourgeonnement.

Ainsi les résultats des expériences ont montré que le composé C9 est celui qui réduit le plus efficacement la libération de VLP du virus de Marburg ainsi que sa réplication. Son action sur la réplication du virus de Marbourg est indépendante du moment auquel la drogue est ajoutée, ce qui suggère un rôle du composé dans les phases tardives de l'infection. Ces résultats corrélerent avec l'implication de l'interaction VP40/Nedd4-2 lors du bourgeonnement des virus en fin de cycle et suggèrent une inhibition de cette interaction par le composé C9. Cependant son action sur la réplication du virus de Marburg est moins efficace que l'effet observé en présence du composé C4.

En effet, le composé C4 réduit jusqu'à 2 log le titre viral du virus de Marburg et cela lorsque la drogue est ajoutée au moment de l'infection. Ces résultats suggèrent un effet du composé dans les phases précoces de l'infection des cellules par le virus de Marburg à l'inverse de son effet sur les phases tardives de l'infection adénovirale. Le rôle de la Nedd4-2 dans l'entrée des Filovirus n'a pas encore été établi mais pourrait expliquer les effets du composé C4.

Le composé C9 étant le composé le plus efficace, nous voulions connaître son mécanisme d'action. Nous avons d'abord cherché à déterminer si son efficacité été due aux propriétés intrinsèques de la molécule ou bien à sa structure. Nous nous sommes donc intéressés aux molécules analogues du composé C9 : le sulconazole. En effet, il existe de nombreux dérivés de l'imidazole qui forment avec le sulconazole, une grande famille d'antifongiques avec des structures similaires à celle du composé C9. Nous avons aussi collaboré avec le laboratoire de chimie du Professeur Pierre van de Weghe, afin de tenter d'améliorer les propriétés inhibitrices du composé C9 par la synthèse de composés dérivés.

Chapitre 6 : Effets des analogues du composé C9 sur la réplication des AdV

1. Les antifongiques de la banque « Prestwick Chemical »

Le composé C9 étant efficace sur toutes les étapes de l'infection adénovirale testées jusqu'alors, nous nous sommes demandés si des molécules analogues avaient les mêmes propriétés. Le composé C9 correspond au sulconazole, un antifongique dérivé imidazolé, inhibiteur de la synthèse d'ergostérol, un analogue du cholestérol chez les champignons. Ainsi nous avons répertorié tous les antifongiques de la banque « Prestwick chemical » et analysé les résultats obtenus lors de notre criblage en AlphaScreen®.

Sur les 16 inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol dénombrés dans la banque, 5 composés, en plus du composé C9, sont capables d'inhiber plus de 50% de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in vitro* (**Figure 20A**). Il s'agit de l'oxiconazole, de l'éconazole, du clotrimazole, du tioconazole et de l'isoconazole qui inhibaient respectivement 78%, 70%, 65%, 60% et 55% de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen®.

Lorsque l'on examine la structure de ces composés, on note que les deux composés les plus efficaces : l'oxiconazole et l'éconazole ont une structure similaire à celle du composé C9 (**Figure 20A**, structures en rouge et orange). En effet, les trois structures sont constituées d'une chaîne centrale contenant un atome de soufre pour le sulconazole, une liaison azote-oxygène pour l'oxiconazole et un atome d'oxygène pour l'éconazole, autour duquel s'articulent 3 cycles aromatiques. Ces trois cycles sont composés d'un noyau imidazole, qui est un hétérocycle azoté à 5 chaînons, ainsi que de deux cycles benzéniques substitués par un ou de deux atomes de chlore (**Tableau 6**). Le tioconazole, l'isoconazole, le miconazole et le butoconazole ont également une structure similaire. Cependant, lorsque l'on regarde la structure des 11 autres composés (**ANNEXES 3**), on remarque que les groupements sont différents (présence d'atome de fluor) ou bien que le nombre de cycles et la taille de la chaîne centrale sont plus importants. De ce fait, certaines de ces molécules sont donc plus grosses. Ces différences de structure et de taille pourraient expliquer l'absence d'inhibition efficace de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 par ces composés et soulignent l'importance d'une structure proche de celle du sulconazole pour l'inhibition.

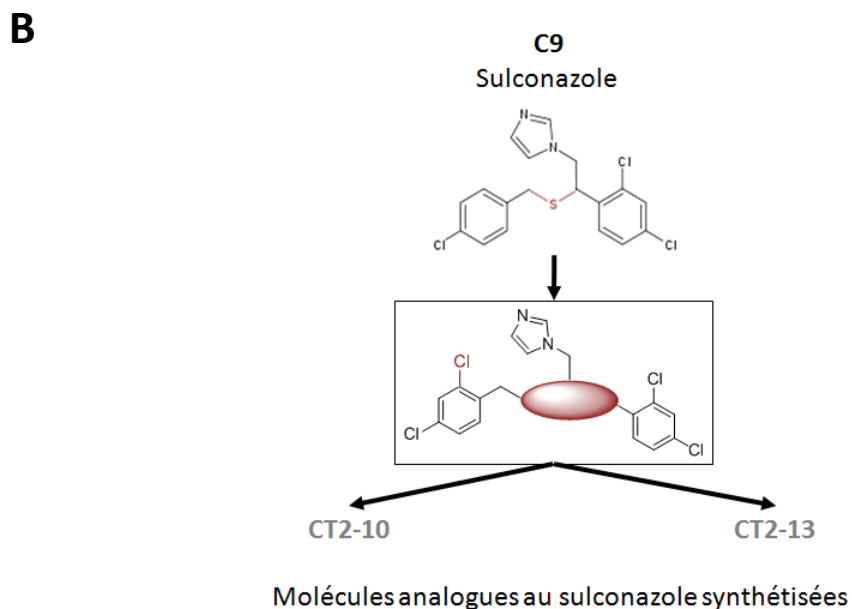
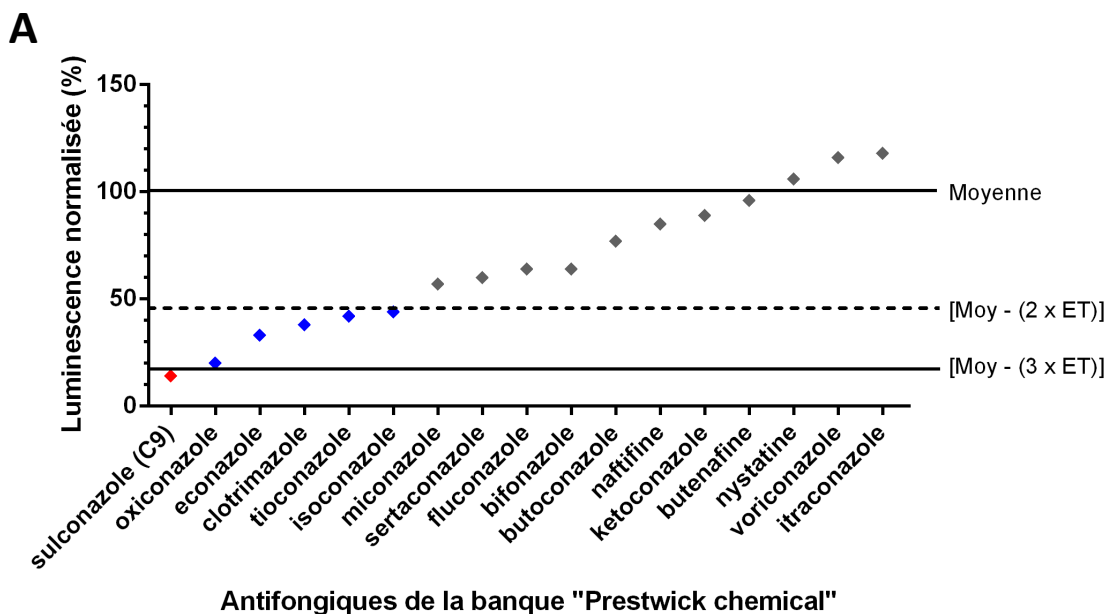


Figure 20: Les antifongiques de la banque “Preswick chemical” et les analogues synthétiques du Sulconazole. (A) Valeurs de luminescence de tous les antifongiques de la banque « Prestwick chemical » obtenues lors du criblage de l’interaction protéine VI/ Nedd4 en AlphaScreen® normalisée par rapport à la condition sans composé. Les composés ont été disposés par ordre décroissant d’efficacité d’inhibition en partant du composé C9 (*losange rouge*). Les composés situés sous la valeur arbitraire de deux fois l’écart-type en dessous de la moyenne (*ligne en pointillés, losanges bleus*) sont capables d’inhiber de plus de 50 % l’interaction. (B) Les composés CT2-10 et CT2-13 sont des composés synthétiques analogues du sulconazole avec une chaîne centrale modifiée.

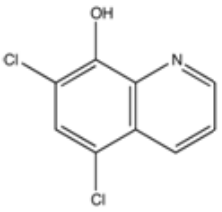
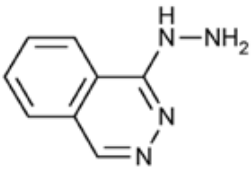
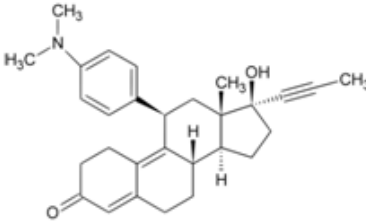
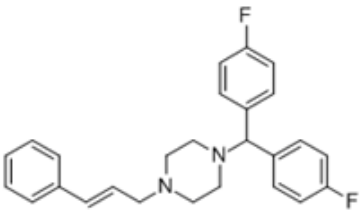
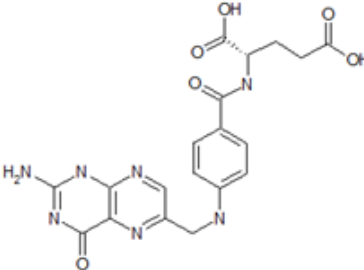
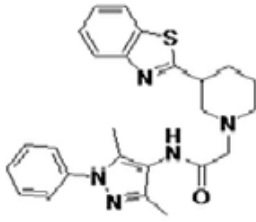
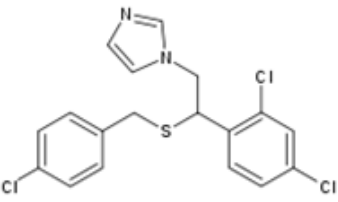
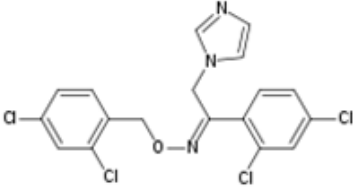
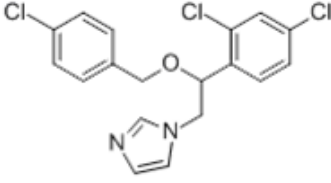
| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p style="text-align: center;">C1 Chloroxine</p>  | <p style="text-align: center;">C2 Hydralazine</p>  | <p style="text-align: center;">C3 Mifepristone</p>  |
| <p style="text-align: center;">C4 Flunarizine</p>  | <p style="text-align: center;">C7 Acide folic</p>  | <p style="text-align: center;">N4 (Amb123203)</p>  |
| <p style="text-align: center;">C9 Sulconazole</p>  | <p style="text-align: center;">Oxiconazole</p>  | <p style="text-align: center;">Econazole</p>  |

Tableau 6 : Structure chimique des composés. Structure des composés C1, C2, C3, C4, C7, C9 issus du criblage, du composé de synthèse N4 de Han *et al* (2014) et des antifongiques analogues du sulconazole présents dans la banque « Prestwick chemical », c'est à dire l'oxiconazole et l'éconazole.

Nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'oxiconazole, le composé antifongique analogue du composé C9 qui inhibe le plus efficacement l'interaction protéine VI/Nedd4-2 *in vitro*, après le composé C9.

Nous avons également souhaité déterminer si des modifications de la structure du composé C9, au niveau de la chaîne centrale, permettraient d'augmenter son efficacité d'inhibition de la réplication des AdV.

2. Synthèse et caractérisation des molécules analogues au sulconazole

Afin de permettre la synthèse de nouveaux analogues du composé C9, le sulconazole, nous avons fait appel au Professeur Pierre van de Weghe, chimiste à l'institut des sciences chimiques de Rennes. A partir de la structure du sulconazole, deux composés ont été synthétisés. Ainsi, le composé CT2-10 présente une chaîne centrale contenant un cycle benzénique autour duquel s'articulent un noyau imidazole et deux cycles benzéniques substitués par deux atomes de chlore. Puis, le composé CT2-13, semblable au composé CT2-10, possède une chaîne centrale formée par un noyau furane (hétérocycle oxygéné à 5 chaînons) (**Figure 20B**).

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité de ces nouvelles molécules synthétiques sur la lignée cellulaire U2OS. Les cellules ont donc été traitées avec du DMSO en contrôle ou une concentration croissante des composés CT2-10, CT2-13 ou bien d'oxiconazole, allant de 500 nM à 50 μ M durant 24 h. Comme pour le C9, aucune cytotoxicité n'est observée lorsque l'on traite les cellules U2OS avec une concentration inférieure à 10 μ M (**Figure 21**).

3. Effets des analogues du sulconazole sur l'infection adénovirale

3.1. Effet des analogues sur la transduction de vecteurs adénoviraux.

Dans un premier temps, pour voir s'ils avaient un effet sur les étapes d'entrée du virus, nous avons testé l'effet des composés analogues du C9 sur la transduction des vecteurs adénoviraux. Pour cela nous avons traité des cellules U2OS avec 5 μ M de drogues C9, d'oxiconazole, des composés synthétiques CT2-10 ou CT2-13 ou un volume équivalent de DMSO comme contrôle, pendant 1 h. Nous avons ensuite infecté les cellules avec 50 pp/cellule de vecteur Ad5-wt-GFP. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été analysées en

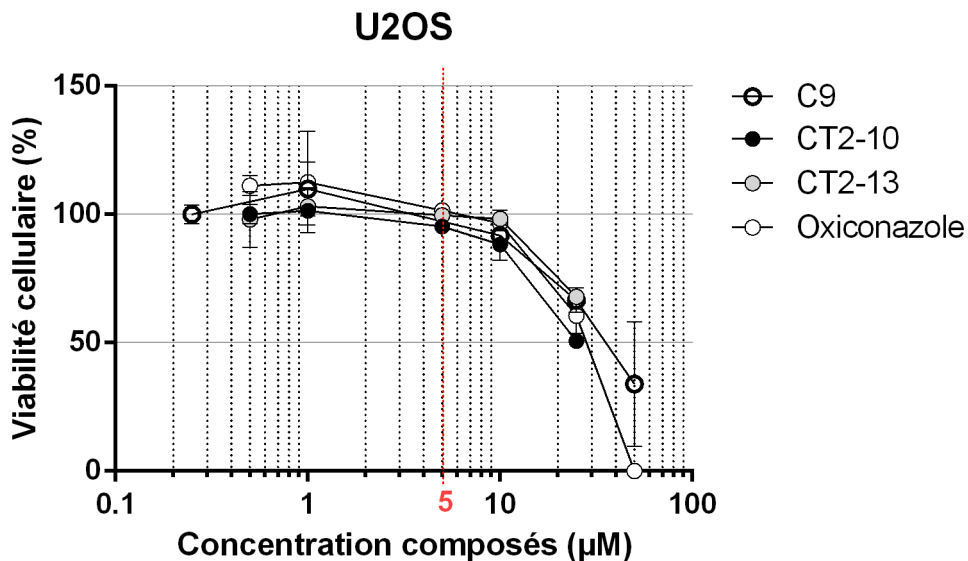


Figure 21: Détermination de la cytotoxicité des composés. Viabilité des cellules U2OS traitées pendant 24 h avec une concentration de composé C9, CT2-10, CT2-13 ou d'oxiconazole, comprise entre 250 nM et 50 μM. La cytotoxicité a été déterminée par la détection d'ATP. La viabilité cellulaire a été normalisée par rapport au contrôle DMSO seul. La moyenne des valeurs est calculée à partir d'une expérience avec chaque points en triplicata. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules fluorescentes obtenus pour chaque condition ont été normalisés par rapport au contrôle DMSO seul.

Les résultats montrent que le composé C9 inhibe de 15 % la transduction des vecteurs dans les cellules (**Figure 22A**, *barres noires*), confirmant les résultats observés précédemment. L'oxiconazole et le composé analogue synthétique CT2-13 n'ont pas d'effet sur la transduction des vecteurs sauvages. Cependant le composé analogue synthétique CT2-10 inhibe 10% de la transduction des vecteurs suggérant un effet similaire à celui du composé C9.

L'oxiconazole et le composé CT2-13 n'ont pas d'effet sur la transduction du vecteur wt. Cependant le composé CT2-10 inhibe la transduction de wt de 10 %, suggérant une conservation de l'effet du composé C9 durant l'entrée du virus pour ce dérivé.

3.2. *Spécificité des analogues : effets sur la transduction du vecteur mutant M1*

Afin de déterminer la spécificité de leur effet sur l'interaction protéine VI/Nedd4-2, nous avons testé l'impact de ces drogues sur la transduction du vecteur mutant M1. Ainsi tout effet des composés sur la transduction du vecteur M1 serait dû à une action différente ou additionnelle à celle exercée sur l'interaction protéine VI/Nedd4-2. Nous avons donc traité des cellules U2OS avec 5 μ M des drogues et infecté les cellules avec 250 pp/cellule de vecteur Ad5-M1-GFP. Puis les cellules ont été analysées en cytométrie en flux, 24 h après transduction. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport au contrôle DMSO en présence du vecteur Ad5-M1-GFP (*Cf. barres grises sur la Figure 22A*)

Les résultats indiquent que le composé C9 inhibe la transduction du vecteur wt mais pas celle du M1 et cette différence est significative, confirmant la spécificité de l'action du composé C9 sur l'interaction protéine VI/Nedd4-2 (**Figure 22A**, *barres grises*). L'oxiconazole semble augmenter la transduction du vecteur M1 de 10 %. Une différence significative entre les profils wt et M1 est observable en présence du composé synthétique CT2-10. Ces résultats suggèrent un effet spécifique du composé CT2-10 sur l'interaction protéine VI/Nedd4-2.

3.3. *Effet des analogues sur la libération du génome dans le noyau*

Nous avons souhaité déterminer l'effet des composés analogues sur les étapes précoces de l'infection en comptabilisant le nombre de génomes viraux par noyau après 2 h d'infection de la même manière que précédemment (*Cf. Chapitre 4. 3*) en présence de 1 ou 5 μ M des composés CT2-10, CT2-13 ou oxiconazole.

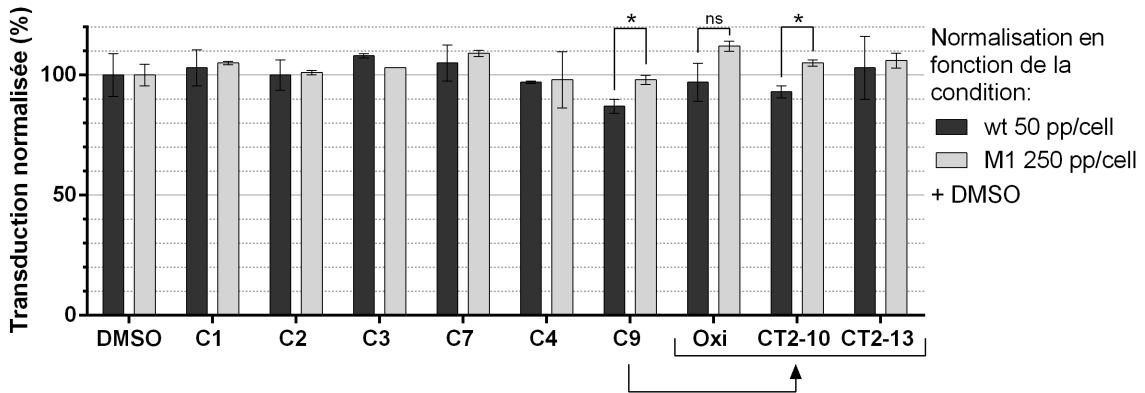
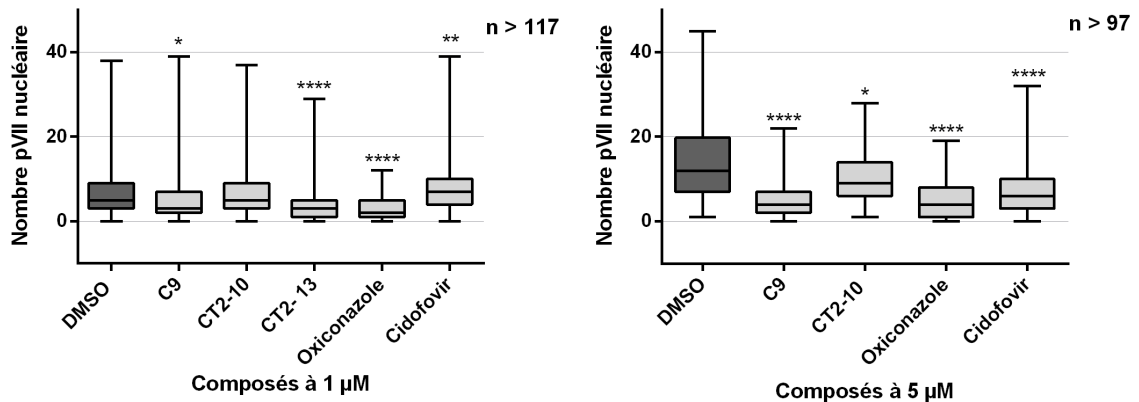
AU2OS - Cmp 5 μ M - 24 h p.i.**B**

Figure 22: Effets des analogues du sulconazole sur la transduction et l'import du génome de l'AdV. (A) Pourcentage de cellules U2OS fluorescentes prétraitées pendant 1 h avec 5 μ M de composé puis infectées avec une 50 pp/cell de vecteur Ad5-VI-GFP wt (*barres noires*) ou M1 (*barres grises*) pendant 24 h. Après analyse par FACS, les pourcentages de cellules exprimant la GFP sont normalisés par rapport au contrôle Ad5-VI-wt-GFP (*barres noires*) ou bien par rapport au mutant Ad5-VI-M1-GFP (*barres grises*) en présence de DMSO seul. (B) Nombre de protéines VII liées au génome viral dans les noyaux de cellules U2OS infectées avec 2500 pp/cellule de virus marqué Ad5-A488 pendant 2 h en présence de 1 ou 5 μ M des composés C9, CT2-10, CT2-13, d'oxiconazole, du contrôle positif Cidofovir ou du contrôle DMSO seul. Après immunomarquage des protéines VII, le nombre de protéines VII nucléaires a été déterminé et est représenté en nombre absolu de protéine VII par noyau, dans une population de plus de 95 cellules par condition.

Les résultats confirment ceux établis précédemment en présence du composé C9, qui réduit significativement le nombre de génomes délivrés dans le noyau à 5 μM mais aussi à 1 μM (**Figure 22B**). Le composé CT2-10 n'a pas d'effet significatif lorsqu'il est utilisé à 1 μM . Le composé CT2-13 et l'oxiconazole réduisent tous les deux, de manière très significative, le nombre de génomes présents dans le noyau et cela dès 1 μM .

Si le composé CT2-10 est le seul analogue capable de réduire la transduction du virus, il n'a pas d'effet sur la libération du génome adénoviral dans le noyau à l'inverse des composés CT2-13 et de l'oxiconazole qui reproduisent l'effet du composé C9.

3.4. *Effet des analogues sur la propagation des virus*

Par la suite, nous avons souhaité voir quels étaient les effets des composés analogues du C9 sur la propagation des virus. Nous avons également utilisé le Cidofovir en contrôle positif. En effet, il est l'antiviral de référence, utilisé actuellement en traitement contre les infections adénovirales. De la même manière que dans le Chapitre 3 (*Partie I*) de cette partie Résultats, nous avons infecté des cellules HEK293 avec le vecteur Ad5-wt-GFP sans composé puis les cellules ont été incubées 6 jours en présence de 5 μM des composés C9, oxiconazole, CT2-10 ou CT2-13, du contrôle positif Cidofovir ou du contrôle DMSO seul. La taille des plages de lyse fluorescentes a été déterminée, révélant la propagation des virus après plusieurs cycles de réplication (**Figure 23A**).

Comme dans les résultats précédents, le composé C9 réduit significativement la taille des plages de lyse et donc la propagation du virus. C'est également le cas, des composés CT2-13 et de l'oxiconazole. Le composé CT2-10 inhibe quant à lui, plus faiblement la propagation du virus. Le composé C4, qui dans les tests précédents inhibait la propagation des virus, n'a pas d'effet sur la taille des plages. Le Cidofovir n'a pas non plus d'effet sur la propagation des virus mais cela peut s'expliquer par le fait que l' IC_{50} du Cidofovir est comprise entre 17 et 35 μM (de Oliveira 1996).

Lors du dénombrement des plages lyse, nous avons remarqué que tous les composés analogues ainsi que le Cidofovir avaient un effet sur la réplication du virus (*données non montrées*). Cependant le manque de reproductibilité de cette observation d'une expérience à l'autre ne nous a pas permis de conclure sur l'effet des composés sur la réplication du virus.

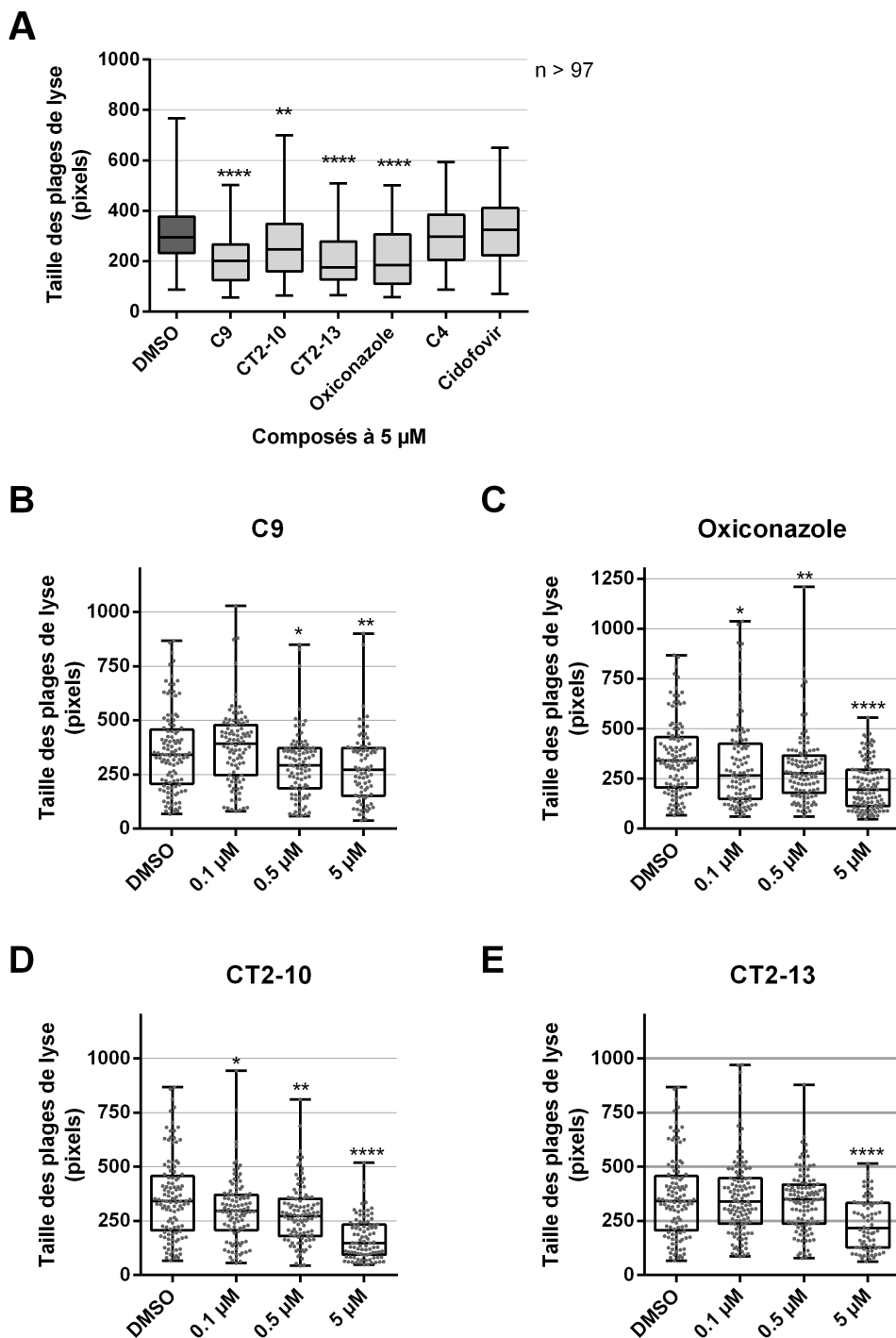


Figure 23: Effets des composés analogues du sulconazole sur la propagation de l'AdV. Taille des plages de lyse fluorescentes des cellules HEK293 infectées avec 0,1 pp/cellule de vecteur Ad5-GFP sauvage pendant 24 h puis traitées pendant 6 jours avec (A) 5 μM de composé C9, des analogues du sulconazole CT2-10 et CT2-13, de composé C4 ou de Cidofovir ou bien traitées pendant 6 jours avec une gamme allant de 0,1 à 5 μM des composés (B) C9, (C) Oxiconazole, (D) CT2-10, (E) CT2-13 ou du DMSO en contrôle. La taille des plage est exprimée en pixels et est issue de l'analyse d'une centaine de plaques par condition.

4. Conclusion

L'oxiconazole est un antifongique, dérivé imidazolé qui possède une structure similaire à celle du composé C9. Il est capable de réduire de plus de 75 % l'interaction protéine VI/Nedd4 *in vitro* en AlphaScreen® et son homologie de structure semble lui conférer les mêmes propriétés que le composé C9. En effet, s'il n'a pas d'effet sur la transduction à l'inverse du composé C9, il est aussi efficace que lui sur la propagation des virus. De plus l'oxiconazole réduit efficacement la libération du génome adénoviral dans le noyau ainsi que la propagation des virus avec une efficacité équivalente à celle du composé C9.

Les composés synthétiques, dérivés du composé C9, CT2-10 et CT2-13 semblent eux aussi avoir hérité des propriétés antivirales du composé C9. Si le composé CT2-10 est tout de même moins efficace que le composé C9 sur la propagation du virus, le composé CT2-13 semble être tout aussi efficace que le sulconazole (**Tableau 7** et **Schéma 12**).

Le sulconazole présente donc la structure de base pour le développement d'une nouvelle famille d'antiviraux, dérivés de l'imidazole, capables de cibler l'IPP virus/hôte commune à un grand nombre de virus [LP]PxY/Nedd4.

| Phases de répliation | Précoces | | | | Tardives | |
|-------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------|
| | Etape | Echappement de l'endosome | Libération du génome | Expression des gènes précoces | Transduction | Propagation |
| Technique | IF Ad5/VI | IF pVII/noyau | RT-qPCR ARNm viraux (E1A, E1B, E4) | FACS Vecteur GFP | Tailles des plages de lyse | |
| Antifongique dérivé imidazolé | C9 | = | ↘↘↘↘ | -20% E1A -45% E1B -55% E4 | -15% | ↘↘ |
| | Oxico. | n.d. | ↘↘↘↘ | n.d. | = | ↘↘ |
| | CT2-10 | n.d. | ↘ | n.d. | -10% | ↘ |
| | CT2-13 | n.d. | ↘↘ (1 μM) | n.d. | +10% | ↘↘ |
| Antiviral contre virus à ADN | Cido. | n.d. | ↘↘↘ | n.d. | n.d. | = |

= : pas d'effet, ↘ : inhibition < 30 %, ↘↘ : inhibition d'environ 30 %,
↘↘↘ : inhibition d'environ 50 %, ↘↘↘↘ : inhibition > 50%

Tableau 7: Bilan des effets des analogues du sulconazole sur les étapes précoces et la propagation des AdV.

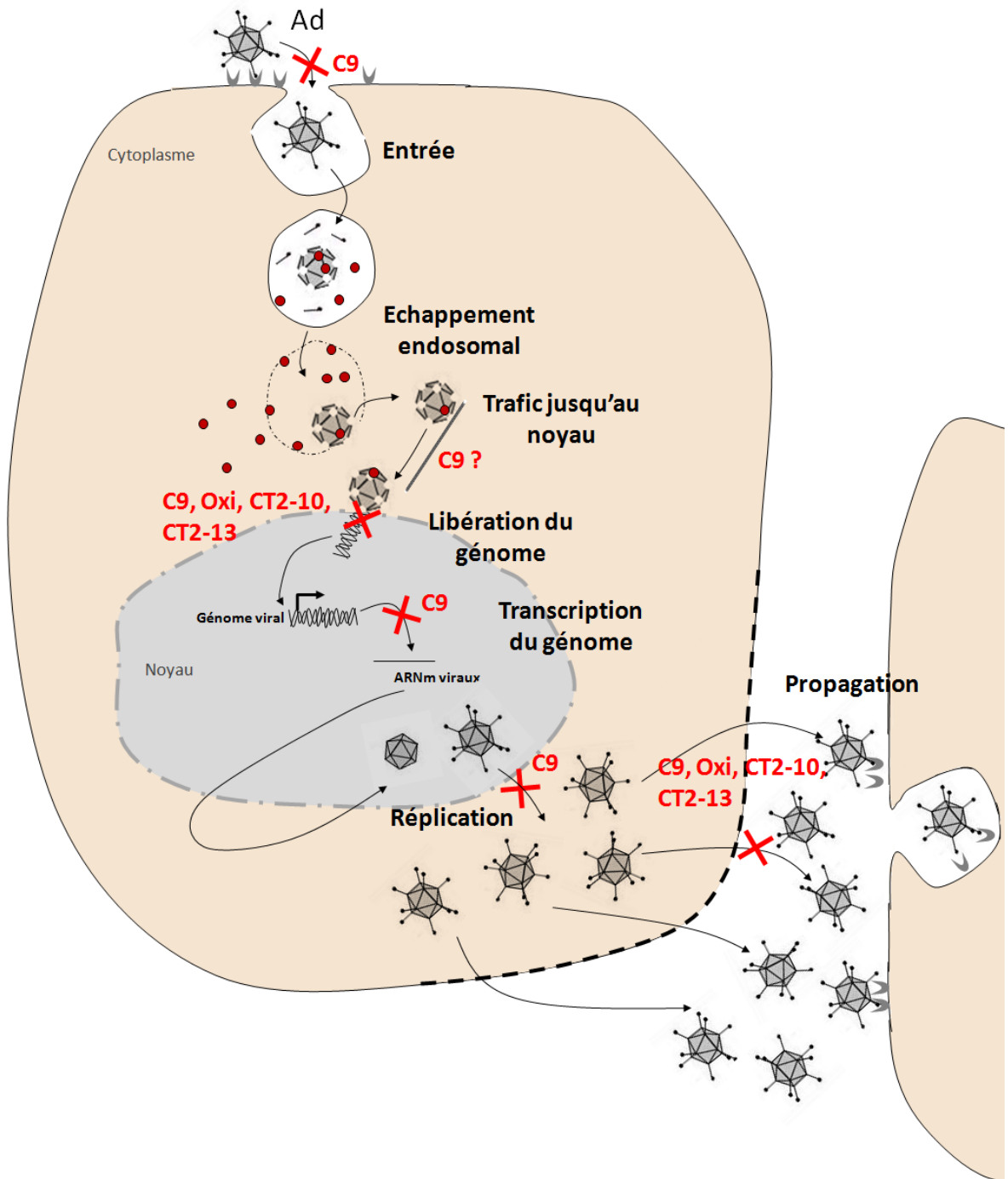


Schéma 12 : Effets des analogues du Sulconazole sur la répliation de l'AdV.

CONCLUSION GENERALE

L'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4 est commune aux virus à ARN et à ADN, qu'ils soient enveloppés ou non. Actuellement, on en dénombre 12 décrites chez l'Adénovirus, les virus Herpès de type 1 et 4, l'Orungo virus (Réovirus), les virus Ebola et Marburg, le VSV, le virus de la rage, l'HTLV, le RSV et le virus de l'hépatite B (**Tableau 3**). Cette interaction met en jeu les « late domains » de type PPxY impliqués dans les étapes tardives mais également précoces de la réplication des virus. Notre recherche de motifs [LP]PxY, capables de lier les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 dans les banques de données a montré la présence de ces domaines dans 22 familles de virus capables d'infecter l'Homme (**Tableau 3**). Notre étude montre également que seul le motif [LP]PxY est conservé dans les différentes familles et qu'il est *a priori* surreprésenté dans le protéome des virus en comparaison de celui de l'Homme. L'interaction [LP]PxY avec les ubiquitine ligases Nedd4 a été décrite pour 11 virus de 7 familles différentes. Cette forte conservation du motif et son interaction avec les Nedd4 suggèrent un rôle clef de cette interaction dans la réplication des virus humains.

Par conséquent, nous avons supposé que cette interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4 constituait une cible idéale pour la recherche d'un antiviral à large spectre.

Pour identifier des inhibiteurs de cette interaction, l'interaction protéine VI de l'AdV avec la Nedd4-2 a été choisie comme modèle pour la réalisation d'un criblage biochimique à haut débit d'inhibiteurs avec la technologie d'AlphaScreen[®]. Pour ce test, nous avons choisi de cribler une banque de composés issus de médicaments approuvés par les agences de santé « Prestwick chemical » afin de permettre le « repositionnement » de médicament et potentialiser l'utilisation rapide des candidats inhibiteurs chez l'Homme. Nous avons découvert 11 composés inhibiteurs dont 6 (les composés C1, C2, C3, C4, C7 et C9) présentent une IC50 *in vitro* inférieure à 15 µM et aucune cytotoxicité sur la lignée cellulaire U2OS à des concentrations inférieures à 5 µM.

Les composés C4 et C9 sont capables de limiter la réplication des Adénovirus. Différents tests de biologie cellulaire ont permis de montrer que le composé C9 affecte non seulement les phases précoces de l'infection en inhibant l'entrée, la libération et l'expression du génome dans le noyau mais aussi les phases tardives en inhibant la libération de nouvelles particules et la propagation du virus. En ce qui concerne le composé C4, nos données montrent que cet inhibiteur affecte les phases tardives du cycle viral.

Sachant que l'objectif de ce travail était d'identifier un antiviral à large spectre, nous avons testé nos drogues C4 et C9 sur la réplication d'un autre virus, différent de l'AdV. Le virus choisi a été un Filovirus, un virus enveloppé à ARN. Nos résultats montrent que les composés C4 et C9 inhibent aussi la libération de pseudoparticules du virus de Marburg mais également sa réplication (en collaboration avec le Dr O. Dolnik, Marburg, Allemagne).

L'effet inhibiteur des composés C4 et C9 observé à la fois chez l'AdV, un virus à ADN non enveloppé et chez le virus de Marburg, un virus à ARN enveloppé, conforte notre choix de l'interaction [LP]PxY/Nedd4 comme cible antivirale. Celle-ci constituerait un des talons d'Achille des virus.

En identifiant les composés C4, un antimigraineux, et C9, un antifongique, comme inhibiteurs de l'interaction [LP]PxY/Nedd4, notre étude permet de proposer le repositionnement de ces deux médicaments comme antiviraux potentiels.

Etant donné l'efficacité du composé C9 contre l'AdV et le virus de Marburg, nous avons analysé la structure de cet antifongique et choisi de tester l'oxiconazole, un autre antifongique, dérivé imidazolé comme le C9. L'oxiconazole inhibe l'interaction protéine VI/Nedd4 de plus de 70 % dans notre test AlphaScreen[®] ainsi que la propagation de l'AdV.

En collaboration avec le Dr Pierre van de Weghe et du Dr Cédric Tresse (Université de Rennes), de nouveaux dérivés du composé C9, le sulconazole, ont été conçus (CT2-10 et CT2-13) afin de proposer de nouvelles drogues potentiellement antivirales. Nos résultats ont montré que ces deux composés étaient aussi capables d'inhiber la propagation de l'AdV ce qui nous permet de proposer les dérivés imidazolés comme nouvelle classe d'antiviraux.

Pour résumer :

- 1) Nous avons réalisé un criblage biochimique contre l'IPP virus/hôte [LP]PxY/Nedd4 commune à différentes familles de virus et trouvé des candidats inhibiteurs.
- 2) Ces candidats sont issus d'une banque de composés approuvés par les agences de santé afin de limiter le risque d'effets secondaires.
- 3) Nous avons testé, caractérisé et validé leurs effets antiviraux par des expériences de biologie cellulaire sur deux familles de virus différentes. Des tests complémentaires pourront être réalisés sur d'autres familles de virus afin de déterminer le spectre d'action de ces antiviraux.

- 4) De plus, nous avons utilisé la chimie pour concevoir et synthétiser de nouvelles molécules dont la structure est proche du composé inhibiteur le plus actif et démontré que ces analogues étaient tout aussi efficaces que le composé lui-même sur la réplication de l'AdV. De futures modifications chimiques permettront potentiellement d'augmenter l'efficacité de cet antiviral.
- 5) Et puisque notre stratégie permet de prédire que les composés interfèrent avec l'interaction [LP]PxY/Nedd4, l'utilisation de techniques complémentaires (ex : SPR pour « **S**urface **P**lasmon **R**esonance », Thermophorèse sur microcanaux) permettra de déterminer avec lequel des deux partenaires les composés interagissent.

DISCUSSION

Chapitre 1 : Les antiviraux du futur

1. Les antiviraux ciblant les interactions virus/hôte

Les stratégies thérapeutiques utilisant la vaccination et la thérapie génique antivirale, sont très efficaces et largement développées, seulement elles ne ciblent qu'un virus ou qu'une famille de virus à la fois. De plus, le coût des traitements est souvent important et certains effets indésirables de la vaccination persistent, même si ils sont rares (ex : allergies, encéphalomyélite, thrombocytopenie) et alimentent l'argumentaire des personnes opposées à la vaccination.

Les antiviraux ciblant le virus sont les plus développés. Ils représentent plus de 80 % des antiviraux actuellement sur le marché. Souvent spécifiques d'un virus (ex : inhibiteurs de l'intégrase du VIH), ils peuvent cependant être efficaces contre plusieurs familles de virus (ex : analogues nucléosidiques efficaces sur les virus à ADN). Les risques associés à leur utilisation sont les possibilités d'adaptation et de mutation des virus qui deviennent alors résistants à ces antiviraux.

Les interférons (IFN), les protéines associées à la signalisation des IFN (ex : les IFIT) et les antiviraux immunomodulateurs ont l'avantage de stimuler la réponse cellulaire antivirale qui est, par définition, une réponse immunitaire à large spectre capable de réduire les infections causées par l'ensemble des virus de l'Homme. Cependant, ces traitements conduisent à de nombreux effets indésirables mineurs mais gênants pour le patient tels que la fatigue et la perte d'appétit, un état dépressif, une diminution du nombre de globules blancs et des plaquettes et plus rarement, des insuffisances de la glande thyroïde ce qui limite leur utilisation. Les antiviraux immunomodulateurs tels que les inhibiteurs du protéasome ont l'avantage d'être efficaces contre tous les virus mais leur utilisation peut être limitée par les effets pléiotropes qu'ils exercent sur la cellule et les effets secondaires qui en découlent.

La plus prometteuse des stratégies antivirales vise à cibler des interactions virus/hôte conservées (de Chassey et al. 2012) puisqu'en effet 5 et 20 % des cibles cellulaires sont communes à différentes familles de virus (Meyniel-Schicklin et al. 2012). Cependant le déficit de cette stratégie consiste à concevoir des drogues capables de réduire l'efficacité d'infection

des virus tout en n'interférant pas avec la fonction biologique de la cible cellulaire, limitant ainsi les effets secondaires.

2. La combinaison des techniques d'HTS

Les méthodes d'HTS ont permis la découverte ou le « repositionnement » de nombreuses molécules antivirales spécifiques d'un type ou d'une famille de virus et la découverte de quelques antiviraux à large spectre (Cf. *Introduction Chapitre 5*).

Les méthodes d'HTS cellulaires ont l'avantage de pouvoir directement sélectionner les molécules ayant un effet sur la réplication du virus dans un contexte cellulaire. Ce type d'HTS permet donc de ne sélectionner que les composés actifs dans les cellules et *a priori* non-cytotoxiques. Cependant, la réalisation du criblage dans un contexte cellulaire ne permet pas de déterminer quelles sont les cibles des antiviraux.

Les techniques d'HTS *in silico* ont l'avantage de ne nécessiter aucune technique expérimentale (pas de purification des interactants, ni de tests en culture). Elles permettent ainsi le criblage informatique d'un nombre très important de composés. Si ces méthodes sont rapides et permettent la conception de nouvelles molécules théoriquement capables d'interférer une IPP déterminée, rien n'assure que les molécules identifiées seront capables d'inhiber cette interaction *in vitro* ou dans la cellule. De plus, ces techniques ne nous permettent pas non plus de savoir si les composés seront capables d'entrer dans les cellules et ni de connaître leur cytotoxicité.

Les techniques d'HTS biochimiques comme la technique de l'AlphaScreen[®], permettent de trouver des inhibiteurs spécifiques d'une interaction spécifique car elles nécessitent la purification des partenaires protéiques. L'IPP ciblée est donc connue et la caractérisation du mécanisme d'action des drogues semble alors plus simple. Cependant, ces techniques ne permettent pas d'obtenir d'information sur la biodisponibilité ou la cytotoxicité des molécules trouvées.

L'avenir de la découverte des antiviraux à large spectre est le ciblage d'IPP virus/hôte commune et la combinaison des techniques d'HTS, de biologie cellulaire classique et de chimie. En effet, la combinaison de ces techniques offre la possibilité de trouver un inhibiteur spécifique d'une IPP virus/hôte commune puis de caractériser le mécanisme d'action de cette drogue sur les virus et son impact dans la signalisation cellulaire. Enfin, de modifier sa

structure chimiquement afin d'obtenir un antiviral plus efficace contre les virus et n'altérant pas les fonctions biologiques de l'hôte.

Chapitre 2 : Les dérivés imidazolés, une nouvelle classe d'antiviraux à large spectre ?

Le composé C9 (le sulconazole) et l'oxiconazole sont deux antifongiques dérivés imidazolés à la structure similaire. Nous avons montré qu'ils inhibent l'interaction protéine VI/Nedd4 et donc qu'ils sont potentiellement des antiviraux à large spectre. Nous avons aussi montré que deux nouveaux analogues synthétiques du sulconazole, CT2-10 et CT2-13, partageaient certaines propriétés antivirales de ce dérivé imidazolé.

1. L'effet des dérivés imidazolés sur les virus

Les dérivés azolés regroupent tous les composés constitués d'un cycle de 5 atomes dont au moins un atome d'azote. Les dérivés imidazolés sont, comme leur nom l'indique des dérivés de l'imidazole, un azolé avec 2 atomes d'azote.

D'après nos résultats, en AlphaScreen[®] les composés imidazolés sont les antifongiques qui inhibent le plus efficacement l'interaction protéine VI/Nedd4-2 (**ANNEXE 4**). Le sulconazole (C9) et l'oxiconazole, deux dérivés imidazolés, ainsi que les composés synthétiques CT2-10 et CT-13 analogues du sulconazole sont tous capables d'inhiber, avec des efficacités différentes, la propagation des Adénovirus (**Tableau 7**). De plus, nous avons montré que le sulconazole inhibe efficacement la libération de pseudoparticules ainsi que la réplication du virus de Marburg, un Filovirus. Ces données nous permettent de proposer les dérivés imidazolés comme une nouvelle classe d'antiviraux à large spectre.

Cette idée est confortée par les travaux de Sharma *et al*, qui ont montré que les composés imidazolés inhibent la réplication du virus de l'Herpès, du virus de la vaccine, du VSV, du virus Coxsackie B4 et du virus respiratoire syncytial (Sharma et al. 2009). De la même façon, une étude a révélé que le sulconazole, identifié lors notre criblage comme une substance antivirale, réduit jusqu'à 99,6 % l'activité d'hydrolase de la neuraminidase du virus Influenza, nécessaire à la libération des particules (Hung et al. 2009).

Nos résultats et les données de la littérature suggèrent que les dérivés imidazolés pourraient constituer une nouvelle classe d'antiviraux avec un fort potentiel d'inhibiteur à large spectre.

Pour la plupart des virus, on ne connaît pas le mécanisme d'action des dérivés imidazolés sur leur multiplication. Sachant que nous avons montré que le C9 inhibe l'interaction

[LP]PxY/Nedd4, il se pourrait que pour ces virus, ce soit une perturbation de l'IPP [LP]PxY/Nedd4 qui explique l'effet antiviral. Par exemple, le HSV et le VSV possèdent un domaine PPxY décrit comme interagissant avec les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 (**Tableau 2**) et notre étude a aussi identifié des motifs de type [LP]PxY sur les protéines du virus de la vaccine, du virus respiratoire syncytial et chez les Picornavirus (**Tableau 3**).

2. Les composés azolés : une classe d'antifongiques

Les médicaments azolés tels que le sulconazole (dérivé imidazolé) ou le fluconazole (dérivé triazolé) constituent une classe de médicaments aux propriétés antifongiques. Ils sont couramment utilisés pour le traitement des mycoses superficielles cutanées, des muqueuses ou des ongles, dues à des champignons (ex : famille des Dermatophytes) ou à la levure *Candida albicans* (Candidose).

Les antifongiques azolés bloquent la voie de biosynthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane des champignons. Pour cela, ils bloquent le site actif d'une l'enzyme, la lanostérol 14- α -déméthylase, appartenant à la famille du cytochrome P-450 des mitochondries fongiques. Cette inhibition bloque l'activation de l'enzyme et la déméthylation du lanostérol (14- α -méthyl stérol), le précurseur de l'ergostérol (**Schéma 13**). De cette façon, les antifongiques provoquent une inhibition de la croissance des champignons ainsi qu'une altération de leur membrane et une accumulation de stérols méthylés toxiques. Ils inhibent également la formation des filaments de *C. albicans* ce qui explique leur efficacité sur la levure.

3. Les dérivés imidazolés : le remède miracle ?

En plus des propriétés antifongiques pour lesquels ils ont d'abord été décrits et des propriétés antivirales nouvellement reconnues des dérivés imidazolés, il semblerait que ces molécules possèdent de multiples capacités anti-infectieuses.

Les travaux de Sharma *et al.* ont montré que les dérivés imidazolés ont une action antibactérienne *in vitro* contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (Sharma et al. 2009). Dans la même étude, l'équipe rappelle que les dérivés de l'imidazole ont de multiples propriétés médicinales. En effet, ils sont anticancéreux, inhibiteurs de la β -lactamase et de l'hème oxygénase, mais également des agents anti-âge, des anti-malariens ou encore anti-diabétiques (Sharma et al. 2009). La même équipe a montré que des dérivés de

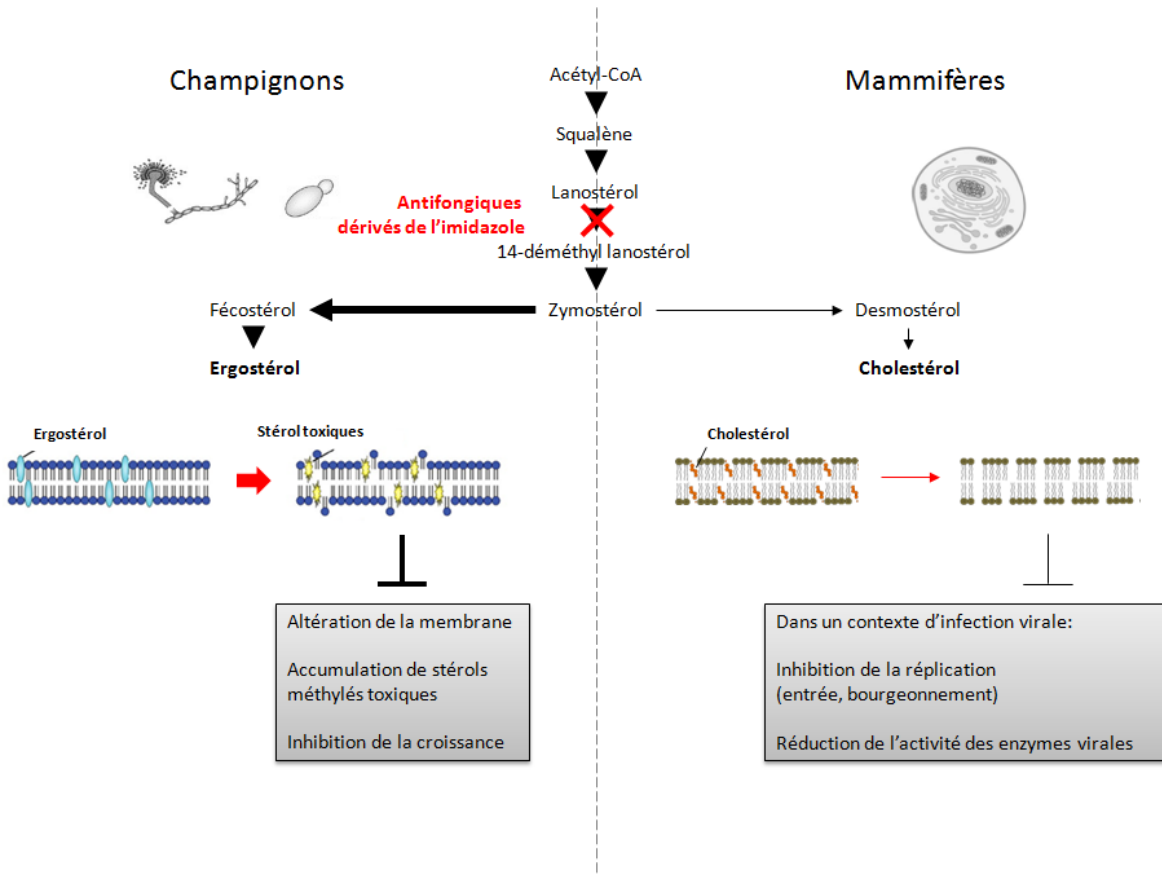


Schéma 13: Inhibition de la synthèse des stérols par les dérivés imidazolés. Les dérivés imidazolés antifongiques bloquent le site actif et l'activation de la lanostérol déméthylase qui conduit à la déméthylation du lanostérol (14- α -méthyl stérol) et inhibent la synthèse des stérols : de l'ergostérol chez les champignons (*panel de gauche*) et du cholestérol chez l'Homme (*panel de droite*). Chez les champignons, ils provoquent une altération de leur membrane et une accumulation de stérols méthylés toxiques qui inhibent leur croissance. Ils ont également un impact dans la synthèse du cholestérol et y compris sur le cholestérol présent au niveau des membranes des cellules. Le cholestérol joue un rôle clé dans de nombreuses infections virales et son altération conduit à une diminution des étapes d'entrée et de bourgeonnement des virus ainsi que la réduction de l'activité des certaines enzymes virales.

nitroimidazole, un autre dérivé de l'imidazole avec un groupement nitro (ANNEXE 4), a des propriétés antiparasitaires (contre *Trichomonas vaginalis*) et spermicides (Kumar et al. 2010).

L'imidazolone et ses dérivés sont des formes réduites de l'imidazole avec un groupement cétone (ANNEXE 4) possédant des propriétés anticancéreuses (Congiu, Cocco, and Onnis 2008).

Le benzimidazole et ses analogues sont des molécules formées par deux cycles aromatiques fusionnés : un cycle de benzène et un cycle imidazole (ANNEXE 4). Ces molécules ont entre autres, des propriétés anti-inflammatoires (Achar, Hosamani, and Seetharamareddy 2010), mais également des activités antituberculeuses (*Mycobacterium tuberculosis*), antibactériennes (*S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*), antifongiques (*C. albicans*, *Asperigillus fumigatus*) *in vitro* (Shingalapur, Hosamani, and Keri 2009) et également antivirales (VIH, VHC et H1N1) (Eldebss, 2015).

Les propriétés de l'imidazole et de nombreux de ses dérivés sont multiples et offrent une possibilité de traitement contre un large éventail d'infections microbiennes regroupant les champignons, les bactéries et les virus.

Afin de développer et d'augmenter le potentiel de ces dérivés, nous devons comprendre et déterminer quels sont les mécanismes biologiques expliquant leurs effets antibactériens et antiviraux.

4. Les mécanismes d'action des dérivés imidazolés

4.1. Lien entre trafic vésiculaire, Nedd4 et cholestérol

Certaines données permettent de supposer un lien entre le cholestérol et les ubiquitine ligases de la famille Nedd4. En effet, le cholestérol est nécessaire au trafic et à la stabilité de la protéine LAMP2A (pour « latent membrane protein 2A ») du virus Epstein-Barr. Celle-ci impliquerait l'ubiquitylation de LAMP2A par les E3 ligases de la famille Nedd4 (Ikeda et al. 2000) et la déplétion de cholestérol bloque cette ubiquitylation (Ikeda and Longnecker 2007). L'équipe de Lee *et al*, a montré que les canaux ENaC sont compartimentés dans des cavéoles car une déplétion en cholestérol provoque la destruction des radeaux lipidiques et une diminution du taux de canaux ENaC à la membrane. L'équipe a ainsi montré que la protéine cavéoline-1 régule l'activité des canaux ENaC par un mécanisme dépendant du cholestérol et de l'internalisation des canaux médiée par la Nedd4-2 *via* son interaction avec les motifs PPxY des sous-unités ENaC (Lee et al. 2009). Récemment, il a été montré que la Nedd4-1

permet la régulation post-traductionnelle du niveau de transporteurs ABCG1 et ABCG4 (pour « G subfamily of ABC transporters»), deux protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la cellule (Aleidi et al. 2015).

4.2. *Effet sur la synthèse du cholestérol et lien avec Rsp5*

L'ergostérol des champignons et le cholestérol chez l'Homme sont deux molécules structurellement très similaires et le lanostérol est un précurseur commun à la synthèse de ces deux stérols. Les dérivés imidazolés antifongiques sont capables d'inhiber les enzymes du cytochrome P450 des champignons mais également le cytochrome P450 CYP3A4 chez l'Homme. Ils ont donc un impact sur la synthèse du cholestérol. Il a été montré que les dérivés imidazolés pouvaient avoir des effets sur le cholestérol présent au niveau des membranes des cellules humaines (Wierzbicki 2003). En effet, le kétakonazole a des effets multiples sur la synthèse du cholestérol (Wierzbicki 2003).

Un lien direct entre la voie de synthèse de l'ergostérol chez la levure et l'homologue de la Nedd4, Rsp5 a été établi par Kaliszewski *et al.* En effet, chez la levure mutée pour Rsp5, le taux de stérol et les niveaux d'activateurs de la transcription des gènes de leur voie de synthèse sont réduits. Les taux d'ergostérol et de ses intermédiaires dérivés du lanostérol sont aussi réduits. Rsp5 régulerait donc la synthèse des stérols *via* la stimulation d'activateurs (Spt23 et Mga2) de la transcription des gènes de la synthèse des stérols et de l'ergostérol chez la levure (Kaliszewski and Zoladek 2008). De plus, il a été montré que l'enzyme Hmg2 impliquée dans l'initiation de la voie de synthèse des stérols peut être ubiquitylée et adressée au protéasome (Gardner, Shearer, and Hampton 2001). Ces résultats suggèrent un lien phylogénétique entre la Nedd4 et la voie de synthèse du cholestérol dans les cellules humaines.

5. Le cholestérol et les virus

Le cholestérol est un composant des « rafts » lipidiques de la membrane cellulaire et des structures associées (ex: cavéoles) (Silvius 2003). Ces données viennent appuyer nos résultats montrant que le sulconazole (C9) a un effet sur l'entrée des Adénovirus dans la cellule (**Figure 14**), suggérant un effet du composé sur la membrane cellulaire. Il a été montré que l'entrée des filovirus nécessitait des rafts lipidiques enrichis en cholestérol (Saeed et al. 2010).

Il se pourrait alors que le sulconazole (C9) ait également une action sur l'entrée et cela expliquerait le défaut de réplication du virus de Marburg observé en présence de C9.

De plus, le cholestérol joue un rôle critique dans de nombreuses infections virales. En effet, la déplétion du cholestérol des membranes plasmiques par traitement à la cyclodextrine (ou M β CD pour « methyl- β -cyclodextrin »), inhibe l'entrée du Rotavirus bovin (Cui et al. 2014) et la libération des ARN de Poliovirus dans la cellule (Danthi and Chow 2004). D'autres études ont montré que l'infection par le MLV (Lu, Xiong, and Silver 2002) ou le virus simien SV40 (Anderson, Chen, and Norkin 1996) est dépendante du cholestérol de la cellule. Récemment, le cholestérol a été impliqué dans les phases tardives de la réplication du virus de la Dengue (García Cordero et al. 2014), dans l'infection du VIH (Hawkes et al. 2015; Lin, Nadeau, and Mergia 2015), dans l'assemblage des virus Ebola et dans le détachement des cellules infectées par Ebola (Hacke et al. 2015) ou encore dans la fusion des membranes lors de l'entrée et la libération dans le cytoplasme des Hantavirus, des virus responsables de fièvres hémorragiques (Kleinfelter et al. 2015).

Le cholestérol est donc un composant essentiel à la réplication d'un grand nombre de virus et son altération *via* le ciblage des voies de régulation ou directement au niveau de sa voie de synthèse, peut constituer une cible antivirale à large spectre.

La Nedd4 semble être liée aux différentes voies de synthèse et de trafic vésiculaire impliquant le cholestérol au travers des mécanismes directs ou indirects.

6. Hypothèse sur le mécanisme d'action du Sulconazole sur les virus

Le sulconazole (C9) a un effet sur le cholestérol des membranes en agissant peut être *via* un mécanisme dépendant des ubiquitines ligases Nedd4 car nos résultats montrent qu'il inhibe efficacement les interactions de type [LP]PxY/Nedd4 ou directement sur sa voie de synthèse.

Ainsi l'inhibition de l'interaction [LP]PxY/Nedd4 et la perturbation du cholestérol par le sulconazole (C9) conduit à un défaut d'entrée des Adénovirus dans la cellule (**Schéma 14**) et à défaut d'entrée et de libération des pseudoparticules de virus de Marburg.

De futures expériences sont nécessaires pour permettre de comprendre quel est l'implication du cholestérol et le rôle de la Nedd4 dans les mécanismes d'entrée de l'Adénovirus.

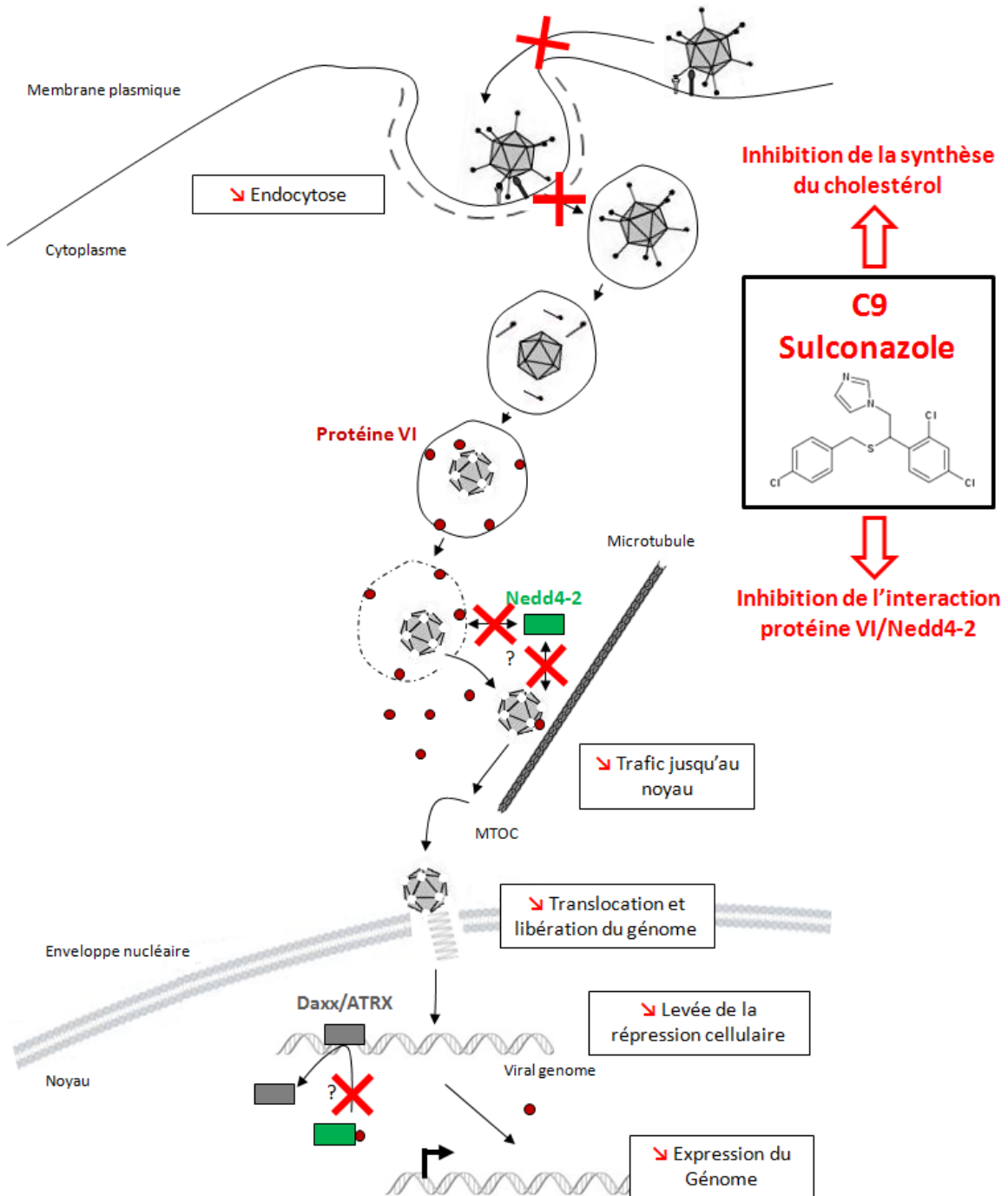


Schéma 14: Hypothèse sur les effets du composé C9 sur l'entrée des AdV. Le sulconazole a un effet sur le cholestérol des membranes en agissant probablement *via* un mécanisme dépendant des ubiquitines ligases Nedd4 et peut-être directement sur sa voie de synthèse, inhibant l'entrée des AdV dans la cellule. Par la suite, le composé C9 inhibe l'interaction protéine VI/Nedd4-2 et provoque une diminution du transport de la particule jusqu'au noyau ainsi qu'une réduction de la libération et de l'activation du génome AdV dans le noyau.

Chapitre 3 : Le calcium, une cible cellulaire pour un antivirale à large spectre

Le second composé issu de notre criblage, le plus efficace contre l'infection par l'Adénovirus et le virus de Marburg est le composé C4: la flunarizine.

1. La Flunarizine : un antimigraineux, inhibiteur des canaux calciques

La flunarizine est un agent antimigraineux aux propriétés vasodilatatrices, c'est un antagoniste de l'histamine H1 et surtout un inhibiteur de canaux sodiques et calciques (Ye et al. 2011). Il bloque directement les canaux Ca^{2+} , empêchant l'influx de calcium dans la cellule. La flunarizine est également capable de lier la Calmoduline, un cofacteur de la voie de signalisation du calcium. De manière intéressante, le composé C2 de notre criblage correspond à l'hydralazine, un antihypertenseur, antagoniste des récepteurs adrénergiques et lui aussi, un inhibiteur des canaux calciques.

2. La Nedd4-2 et le calcium

L'ubiquitine ligase Nedd4-2 est directement liée au calcium pour deux raisons.

Premièrement, l'activité des ubiquitine ligases Nedd4 dépend de la fixation du Ca^{2+} à leur domaine C2. Cette liaison inhibe l'auto-inhibition des Nedd4 exercée par le domaine C2 et permet leur fixation à la membrane cellulaire (Bruce et al. 2008; Wang et al. 2010).

Deuxièmement, Nedd4-2 intervient dans la voie de signalisation du calcium car elle régule l'endocytose des canaux calciques tels que CACNB1 (un canal calcique voltage-dépendant) (Persaud and Rotin 2011) ou TRPV6 (pour « Transient receptor potential Vanilloid 6) (Zhang et al. 2010).

L'entrée des Adénovirus, l'activation de Nedd4-2 et la régulation du calcium par les protéines virales ou Nedd4-2 sont des mécanismes qui semblent impliqués dans l'entrée des Adénovirus. On peut supposer que lors de l'entrée des Adénovirus, la protéine VI recrute la Nedd4-2 afin de moduler l'homéostasie du calcium dans la cellule. L'infection de la cellule par l'AdV peut aussi provoquer l'influx de Ca^{2+} permettant l'activation de la Nedd4-2.

Une collaboration de notre laboratoire et celui du Dr Jean-Francois Quignard (unité INSERM U1045 à l'université de Bordeaux) visait à étudier un modèle proposant un recrutement compétitif de la Nedd4-2 par la protéine VI et les canaux calciques voltage dépendant de type-T Cav3, durant l'infection adénovirale. En effet, des données préliminaires ont montré que la Nedd4-2 était capable de moduler le flux de calcium des canaux Cav3. Si des contraintes techniques ne nous ont pas permis de poursuivre ce projet, il serait tout de même intéressant de déterminer si cette régulation est dépendante du motif PPEY présent sur une sous-unité du canal et quel serait l'impact de la protéine VI sur l'homéostasie du calcium dans les cellules en condition d'infection.

Enfin, il a été montré que la flunarizine inhibe l'apoptose, induite par le glutamate dans les neurones de l'hippocampe (Sendrowski 2013). Le fait que Nedd4-2 régule le transporteur à glutamate EAAT1 (Boehmer et al. 2003), suggère un lien entre les mécanismes d'action de la flunarizine et de la Nedd4-2.

3. Les virus et le calcium

Le calcium est impliqué dans un grand nombre de voies de signalisation cellulaire dont l'apoptose, l'autophagie et la réponse antivirale.

Il semble donc évident que les virus ont besoin de moduler l'homéostasie du calcium dans les cellules qu'ils infectent. De manière générale, les virus provoquent une augmentation du calcium intracellulaire afin de permettre leurs étapes de réplication et diminuent ce taux afin de contrôler la viabilité cellulaire et la réponse immunitaire (Zhou, Frey, and Yang 2009). Pour ce faire, les virus utilisent différentes stratégies. Le VIH-1, l'HTLV-1, le virus de l'Herpès, les Rotavirus ou les virus de l'hépatite B et C, modulent directement les canaux calciques présents au niveau de la membrane cellulaire. D'autres virus induisent la libération de calcium depuis les sites de stockage cellulaires tels que les endosomes, les lysosomes, le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi ou les mitochondries. Ainsi le virus de l'Herpès est capable d'activer les canaux calciques du RE tandis que le virus Cocksackie perméabilise les membranes du RE et de l'appareil de Golgi en formant des pores. Le VIH, l'HTLV et le virus de l'hépatite B sont capables d'activer l'expression des gènes de la voie de signalisation du calcium. Un grand nombre de protéines virales est aussi capable de lier et de réguler les effecteurs de cette voie tels que la calmoduline ou la calréticuline (Zhou, Frey, and Yang 2009).

Le calcium joue aussi un rôle dans les étapes d'entrée, de décapsidation, d'assemblage, de trafic, de fusion et de bourgeonnement des virus (Clark and Eisenstein 2013). Il permet par exemple, la stabilisation de la capsid du virus Coxsackie et des Rotavirus ou l'entrée dans la cellule et dans le noyau ainsi que l'assemblage du virus simien SV40 (Zhou, Frey, and Yang 2009). Chami *et al*, décrivent l'existence d'interactions entre la voie de signalisation du calcium et les virus HSV-7, CMV et Adénovirus, sans pour autant connaître les mécanismes mis en jeu (Chami, Oulès, and Paterlini-Bréchet 2006). Il a été montré que l'endocytose dépendante de la clathrine de l'AdV-7 était également dépendante du calcium (Wu et al. 2006).

Le calcium semble donc être un facteur clef dans la réplication d'un grand nombre de virus.

4. Le repositionnement des inhibiteurs de canaux Ca^{2+} comme antiviraux

4.1. *Les inhibiteurs de canaux calciques*

Puisque le calcium est utilisé par tous les virus lors de leur réplication, l'idée de repositionner des inhibiteurs de canaux calciques comme antiviraux a été proposée par Clark et Eisenstein en 2013 (Clark and Eisenstein 2013).

Ainsi un criblage de médicaments approuvés par la FDA a permis à l'équipe de Johansen *et al*, de repositionner le Bébripil, un inhibiteur de calcium utilisé dans la prise en charge d'angine de poitrine, comme inhibiteur des étapes tardives de l'infection du virus Ebola (Johansen et al. 2015). Il a également été montré que le Verapamil et la Tetrandine, deux médicaments inhibiteurs des canaux calciques ciblant les TCP (pour « two-pore channels ») de la membrane des endosomes et des lysosomes, inhibent l'entrée du virus Ebola. Ces données suggèrent que l'entrée du virus Ebola est dépendante des TPC (Sakurai et al. 2015) et que les inhibiteurs de calcium sont utilisables comme agents antiviraux.

L'inhibition de la réplication du virus de Marburg par le composé C4 (flunarizine) pourrait être expliquée par une modification des flux de calcium nécessaires à l'entrée et/ou les étapes tardives de réplication du Filovirus. La régulation des TCP pourrait impliquer Nedd4-2.

4.2. *La Flunarizine, un antiviral à large spectre ?*

La flunarizine est également capable de réduire l'infection du virus de l'Hépatite C (Chockalingam et al. 2010) en inhibant la fusion des membranes, nécessaire à l'entrée et à la libération dans le cytoplasme des particules virales (Prigozhin and Modis 2015).

Le ciblage du calcium est une stratégie antivirale permettant d'inhiber différentes étapes de l'infection d'un grand nombre de virus (Clark and Eisenstein 2013). La Flunarizine serait donc un médicament dont le « repositionnement » permettrait l'obtention d'un antiviral à large spectre.

5. Hypothèse sur le mécanisme d'action du composé C4 sur l'AdV

La flunarizine bloque les efflux de calcium nécessaires à la réplication des virus et elle est capable, selon notre étude, d'inhiber les interactions de type [LP]PxY/Nedd4. La Nedd4-2 régule certains canaux calciques et peut également lier le calcium et interagir avec les « late domains » de type PPxY.

Puisque l'interaction protéine VI/Nedd4 a une fonction provirale durant l'infection adénovirale, on peut supposer que la flunarizine interagit avec Nedd4-2 et bloque l'entrée de calcium dans la cellule, l'activation de Nedd4-2 et son interaction avec la protéine VI de manière directe et indirecte, conduisant à une réduction de l'infection. On peut aussi supposer que la fixation du composé C4 sur la Nedd4-2 conduit à l'inhibition de plusieurs interactions [LP]PxY/Nedd4 de type protéine VI/Nedd4-2 et canaux calciques/Nedd4-2 (**Schéma 15**).

Afin de tester cette hypothèse, des expériences d'infection en absence de calcium ou présence de Nedd4 inactive permettraient de déterminer quels sont les mécanismes cellulaires reliant le calcium, la Nedd4-2, les « late domains » de type PPxY et la protéine VI durant l'entrée des Adénovirus. Des expériences complémentaires telles que des tests de thermophorèse en microcanaux avec les protéines VI et Nedd4-2 purifiées en présence du composé C4 permettraient de déterminer avec quelle protéine du complexe protéine VI/Nedd4 la flunarizine interagit.

Pour les virus avec des « late domains » de type « LYPX_n » qui lient la protéine ALIX, il existe aussi un lien avec le Ca²⁺ qui laisserait supposer un effet du composé C4 sur ces virus. En effet, la protéine ALIX interagit avec la protéine ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) capable de lier le calcium. De plus, il a été montré que l'infection par le VSV nécessite le recrutement d'ALIX de manière dépendante de son interaction avec LBPA (pour « lysobisphosphatidic

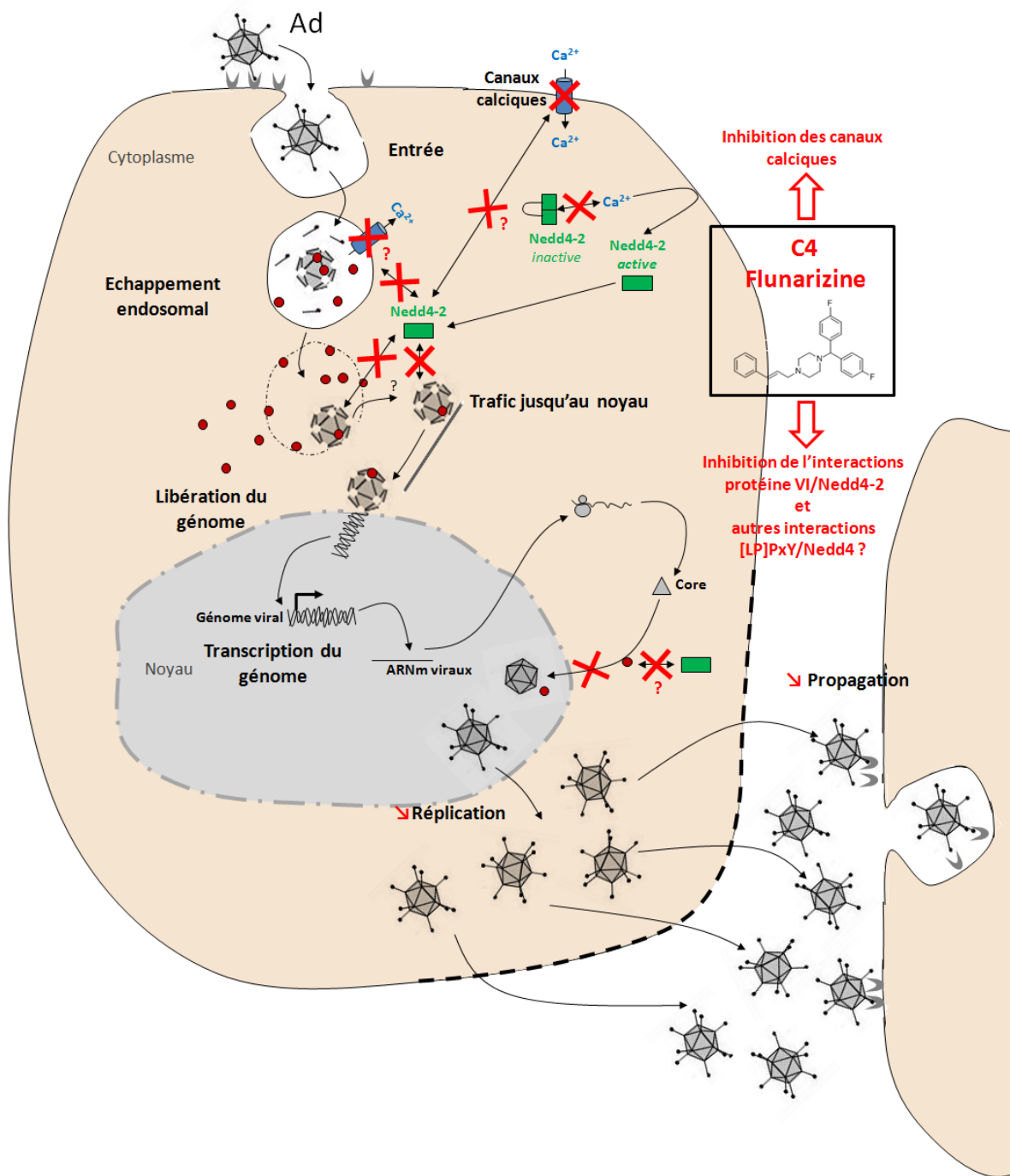


Schéma 15 : Hypothèse sur les effets du composé C4 sur la réplication des AdV. La flunarizine permettrait l'inhibition des interactions canaux calciques/Nedd4-2 et protéine VI/Nedd4-2 en interagissant avec la Nedd4-2. Ces inhibitions pourraient bloquer l'activation de la Nedd4-2 et l'entrée de calcium dans la cellule de manière directe ou *via* son inhibition de la Nedd4-2. L'inhibition de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 par la flunarizine conduirait à une réduction des phases tardives de la réplication des virus qui pourrait être expliquée par un rôle de Nedd4-2 dans l'étape d'assemblage des particules, dépendante de la protéine VI ou bien dans l'homéostasie du calcium dans les phases tardives.

acid »), un phospholipide retrouvé dans les membranes des endosomes tardifs et dans les corps multivésiculaires, avec le calcium et avec la machinerie ESCRT. Bissig *et al*, proposent un modèle dans lequel la protéine ALIX est recrutée dans les endosomes *via* le lipide LBPA, puis recrute ESCRT-I et II pour permettre la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme lors de l'entrée du virus (Bissig et al. 2013). Ainsi on peut supposer que la flunarizine, en bloquant les efflux de calcium, inhibe le recrutement d'ALIX et de la machinerie ESCRT, empêchant la libération des virus enveloppés prisonniers des endosomes après endocytose.

Chapitre 4 : Caractérisation du rôle la Nedd4-2 dans la répllication des Adénovirus

1. Les composés C4 et C9 des outils de biologie cellulaire

Les composés C4 et C9 ont été identifiés dans notre criblage comme des inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4.

En plus de constituer des agents antiviraux, potentiellement à large spectre, ces deux composés sont des outils de biologie cellulaire importants pour la caractérisation du cycle de répllication de l'Adénovirus.

Les virus mutants, tels que le virus ts1 à la capsid hyperstable et le virus L40Q dont l'hélice amphipatique de la protéine VI est mutée, restent bloqués dans les endosomes. Le virus mutant M1 dont le motif PPxY de la protéine VI est muté en PGAA, n'est pas capable de s'échapper efficacement des endosomes rompus et présente un défaut de transport jusqu'au noyau. Tous ces mutants représentent des outils puissants qui ont permis de mieux comprendre certaines étapes d'entrée de l'Adénovirus.

Etant donné que les composés C4 et C9 ciblent l'interaction protéine VI/Nedd4 et présentent des effets semblables à ceux observés avec le virus M1, cela fait de ces drogues et notamment du composé C9, des outils précieux pour l'étude du rôle de la Nedd4-2 dans l'entrée des Adénovirus. Le fait que le composé C4 ait un effet sur les phases tardives de la répllication, suggère un rôle de l'interaction protéine VI/Nedd4 ou plus généralement motif [LP]PxY/domaine WW dans les phases tardives du cycle viral. L'utilisation du composé C4 nous permettrait de caractériser le rôle de cette interaction dans les phases tardives de la répllication des AdV.

Il est à noter que l'effet des composés est cependant moins important que celui observé avec le virus M1 suggérant que l'inactivation génétique est bien plus efficace et que d'autres tests d'optimisation des composés seront à effectuer afin d'essayer d'augmenter leur efficacité.

D'après les données précédentes, nous pouvons supposer que le composé C4 interagit avec la Nedd4-2 pour bloquer les interactions [LP]PxY/Nedd4. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de confirmer cela et aussi de déterminer sur quel partenaire du complexe [LP]PxY/Nedd4 se lie le composé C9.

Pour cela, nous souhaitons utiliser la technique de thermophorèse dans des microcanaux (Microscale thermophoresis, MST) en collaboration avec le Dr G. Laengst (Université de Ratisbonne, Allemagne). Le principe de cette technique est d'utiliser la force thermophorétique pour séparer ou empêcher l'interaction entre les protéines d'un complexe. Un gradient de chaleur provoque un changement de structure et de conformation des protéines qui conduit à une modification de leur couche d'hydratation, modifiant leur trajectoire en solution. Ainsi la protéine VI seule, Nedd4-2 seule ou bien le complexe protéine VI/ Nedd4-2 se déplaceront de manière différente lorsqu'ils seront soumis au même gradient de température. Cette technologie a l'avantage de ne pas nécessiter l'immobilisation des protéines sur une surface, à l'inverse de la SPR (pour « Surface Plasmon Resonance »). Cette technique permettrait également de déterminer les constantes d'affinité du complexe et des composés avec le complexe. Nous avons donc commencé la purification de la Nedd4-2 fusionnés à la GFP. Le but étant de suivre le déplacement de la Nedd4-2-GFP seule, associée à la protéine VI ou en présence des composés. En comparant les profils des différentes conditions, nous pourrions déterminer si les composés se lient ou non à la Nedd4-2.

2. Hypothèses sur le rôle de la Nedd4-2 dans l'entrée

Le délai observé entre la rupture de la membrane et l'échappement endosomal pourrait être dû au recrutement de facteurs cellulaires nécessaires à la rupture membranaire (Maier et al. 2012).

2.1. *La rupture de l'endosome*

Pour expliquer la rupture de la membrane endosomale après l'induction des courbures membranaires par la protéine VI, Oana Maier, dans sa thèse, propose le recrutement de plusieurs candidats. Elle suggère tout d'abord, qu'une interaction avec les microtubules permettrait de « décoller » la membrane endosomale et permettrait donc l'échappement du virus. Dans une seconde hypothèse, elle propose que la courbure membranaire induite par la protéine VI entraîne le recrutement des protéines SNX 1 et 2 (pour « sorting nexin »). Notre équipe a montré que ces protéines capables de lier les membranes, sont aussi capables de colocaliser avec la protéine VI. Ce recrutement faciliterait la rupture de l'endosome.

Puisque le virus M1 ne présente pas de défaut de rupture de l'endosome, le rôle de la Nedd4-2 a lieu au moment de l'échappement et du trafic de la particule jusqu'au noyau.

2.2. *L'échappement endosomal*

Le délai observé entre la rupture de la membrane et l'échappement endosomal pourrait aussi être dû au recrutement de facteurs cellulaires nécessaires à l'échappement endosomal (Maier et al. 2012; Martinez et al. 2013). Le rôle de la Nedd4-2 dans l'échappement endosomal reste à déterminer mais plusieurs hypothèses sont possibles.

L'interaction de la Nedd4-2 avec la protéine VI pourrait permettre de recruter des facteurs cellulaires capables de lier Nedd4-2 ou bien des facteurs reconnaissant la protéine VI ubiquitylée par Nedd4-2. Ces facteurs permettraient « d'extirper » la protéine VI des endosomes, agrandissant ainsi les pores et permettant l'échappement endosomal de la capsid. Un des facteurs susceptibles de pouvoir réaliser cette extraction est la protéine p97 ou VCP (pour « valosin-containing protein »), une ATPase, dont l'une des fonctions est d'extraire des protéines cellulaires de la membrane du RE (Morris et al. 2014) (**Schéma 16**). Des résultats préliminaires indiquent que la protéine VCP est probablement impliquée dans l'entrée des AdV car une inhibition de VCP conduit à une diminution d'environ 30 % de la transduction des vecteur AdV (*données non montrées*). De manière intéressante, VCP régule l'extraction et donc l'adressage au protéasome d'une enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol (Morris et al. 2014).

Le recrutement de la Nedd4-2 au niveau des endosomes rompus pourrait également permettre de moduler le calcium intracellulaire *via* l'inhibition compétitive de la Nedd4-2 ou bien *via* son recrutement au niveau des canaux de l'endosome (**Schéma 15**).

2.3. *Le transport jusqu'au MTOC*

La Nedd4-2 semble également être impliquée dans le trafic de la particule jusqu'au noyau. Ici encore le mécanisme d'action de Nedd4-2 est inconnu mais plusieurs hypothèses pourraient expliquer le rôle de Nedd4-2 dans le trafic de la particule virale.

La Nedd4-2 pourrait « confondre » la protéine VI liée aux membranes endosomales rompues avec une protéine membranaire qu'elle ubiquitylerait, constituant ainsi un signal d'adressage *via* le trafic vésiculaire. Cela permettrait à l'endosome rompu contenant la particule virale et la protéine VI d'être amené jusqu'à la périphérie nucléaire ou la particule devra alors échapper à la fusion avec le lysosome selon un mécanisme indépendant de Nedd4-2. Des données indiquant que l'adénovirus rompt la membrane des endosomes proches de la surface cellulaire mais ne s'échappe des endosomes que lorsqu'il est proche du noyau (Maier et al. 2012; Martinez et al. 2013), alimentent cette hypothèse.

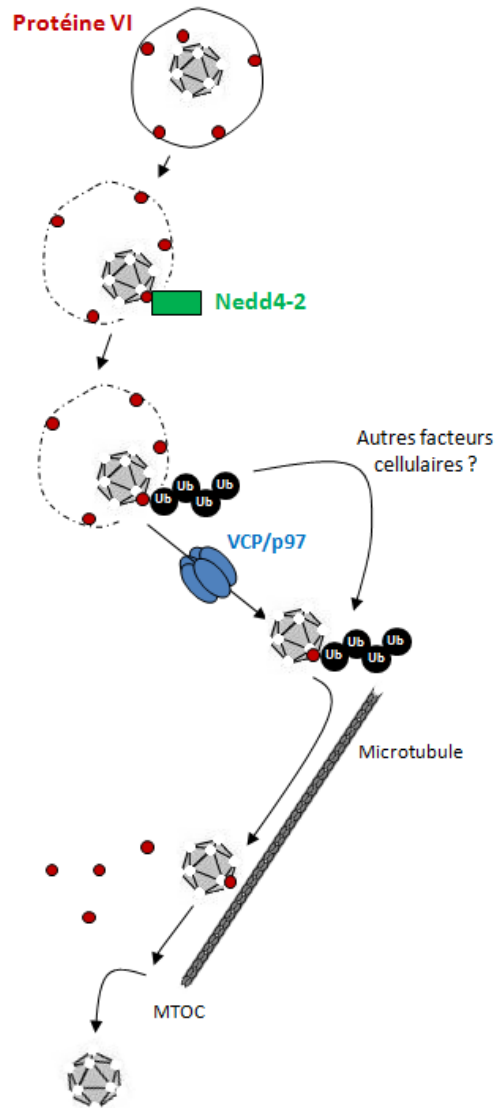


Schéma 16: Une des hypothèses sur le rôle de Nedd4-2 dans l'entrée. L'interaction de la Nedd4-2 avec la protéine VI pourrait permettre de recruter des facteurs cellulaires capables de lier la Nedd4-2 ou bien des facteurs reconnaissant la protéine VI ubiquitylée par Nedd4-2. Ces facteurs permettraient « d'extirper » la protéine VI des endosomes, agrandissant ainsi les pores et permettant l'échappement endosomal de la capside. Un des facteurs susceptibles de pouvoir réaliser cette extraction est l'ATPase p97 ou VCP (pour « valosin-containing protein »).

La liaison de la protéine VI avec la Nedd4-2 pourrait également permettre le recrutement de la machinerie d'autophagie. En effet, la machinerie de l'autophagie est capable de reconnaître les membranes rompues et la Nedd4-2 est capable d'ubiquityler un cofacteur essentiel de l'autophagie, la protéine Beclin-1 (Platta et al. 2012) (**Schéma 17**).

D'autres expériences de biologie cellulaire utilisant des virus mutants ou bien les composés du criblage permettront de mieux caractériser le rôle de la Nedd4-2 dans les étapes d'échappement endosomal et de trafic de la particule AdV jusqu'au noyau.

Chapitre 5 : Une nouvelle interaction motif [LP]PxY adénoviral/domaine WW

1. BAG3 : une chaperonne cellulaire possédant un domaine WW

BAG3 (pour « Bcl2-associated athanogene 3 ») fait partie de la famille des co-chaperonnes cellulaires BAG. Les six membres de famille BAG sont caractérisés par la présence d'un domaine BAG en C-terminal leur permettant de lier la chaperonne Hsc/Hsp70 (pour « heat shock protein »). BAG3 est le seul membre à posséder en plus, un domaine WW capable de lier les motifs [LP]PxY. Il est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques tels que l'apoptose, le développement cellulaire, l'organisation du cytosquelette ou l'autophagie (Rosati et al. 2011).

BAG3 est capable d'interagir avec la chaperonne cytosolique CTT (pour « chaperonin containing TCP-1 ») et réguler ainsi le « folding » de l'actine et de ce fait le trafic des membranes et la dynamique des organelles (Fontanella et al. 2010).

De plus, BAG3 est impliqué dans la régulation de la dégradation des substrats ubiquitylés par le protéasome et donc le système UPS (pour « Ubiquitine-Proteasome System »). En effet, BAG1 permet avec Hsp70 l'activation de la voie UPS. Cependant, lorsque BAG3 est exprimé, il entre en compétition avec BAG1 et permet de réguler négativement l'adressage des protéines ubiquitylées au protéasome. Pour cela, BAG3 contrôle, avec l'aide du complexe p62/SQSTM1, la séquestration des protéines poly-ubiquitylées dans les corps d'inclusion pour induire leur dégradation par autophagie (Gamerding et al. 2009) (**Schéma 17**).

Ainsi BAG3 est impliqué dans la régulation du trafic vésiculaire et de la dégradation protéique, deux voies utilisées ou contournées par les virus, suggérant l'implication de BAG3 dans un grand nombre d'interactions virus/hôte.

2. Un facteur impliqué dans la régulation de nombreux virus

Plusieurs études ont montré que BAG3 est un facteur essentiel à la réplication d'un grand nombre de virus. On le retrouve impliqué dans la réplication du coronavirus responsable du SARS (Zhang et al. 2010) et du virus de la varicelle (Kyratsous and Silverstein 2007). BAG3 régule l'expression des gènes du HSV à la manière de l'ubiquitine ligase virale ICP0 (Kyratsous and Silverstein 2008) et diminue l'expression du génome du VIH (Rosati et al.

2009). Tout comme avec le VIH, BAG3 est induit suite à l'infection avec le virus Epstein-Barr dont la protéine EBNA3A est capable d'interagir avec un complexe de chaperonne/co-chaperonne incluant BAG3 (Young et al. 2008). De plus, le niveau d'expression de BAG3 est diminué par la protéine virale T-Ag (pour « T-Antigène ») suite à l'infection par le polyomavirus JC permettant une régulation de la réponse apoptotique par le virus (Basile et al. 2009). On retrouve donc la co-chaperonne BAG3 impliquée dans la réplication de six virus différents.

3. BAG 3 interagit avec les motifs PPxY de l'AdV

3.1. *BAG 3 interagit avec la protéine penton*

Il a été montré que BAG3 était capable d'interagir avec les motifs [LP]PxY du penton des Adénovirus. Ainsi la déplétion de BAG3 conduit à une réduction de l'entrée des virus et de la production de nouvelles particules dans les cellules infectées (Gout et al. 2010).

Ces résultats suggèrent un rôle important de BAG3 dans le cycle de réplication de l'Adénovirus.

3.2. *Mise en évidence de l'interaction protéine VI/BAG3*

Puisque la protéine VI possède un domaine PPxY impliqué dans l'entrée du virus et capable d'interagir avec les domaines WW des ubiquitine ligases Nedd4, nous nous sommes demandés si BAG3 était également capable d'interagir avec le motif PPxY de la protéine VI.

Nous avons donc réalisé des expériences de fluorescence en transfectant des cellules U2OS avec des plasmides codant pour la protéine VI-wt-mRFP ou VI-M1-mRFP ainsi que la protéine BAG3-GFP. Vingt-quatre heures après transfection, la fluorescence a été analysée (**Figure 24**).

Les résultats indiquent que la co-chaperonne BAG3 colocalise avec la protéine VI-wt mais pas avec la protéine VI-M1. Nous pouvons donc supposer que BAG3 interagit spécifiquement avec la protéine VI *via* une interaction motif PPSY/domaine WW.

L'interaction BAG3/protéine VI constitue un autre exemple d'interaction de type motif [LP]PxY/domaine WW.

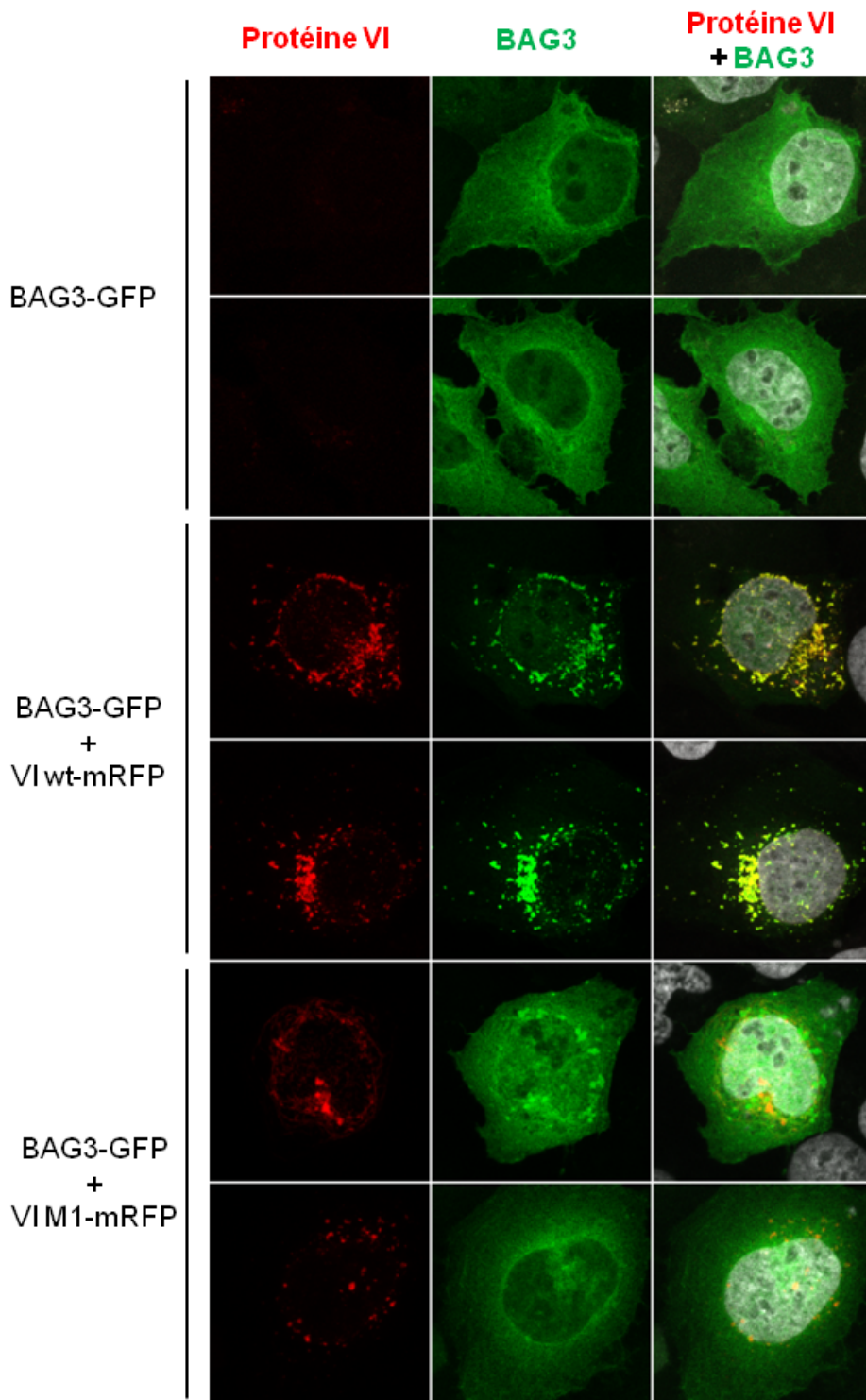


Figure 24: L'interaction protéine VI/BAG3 est dépendante du motif PPSY de la protéine VI. Images de microscopie confocale de cellules U2OS cotransfectées avec les plasmides codant pour la protéine VI-wt-mRFP ou VI-M1-mRFP (*en rouge*) et pour la protéine BAG3-GFP (*en vert*) pendant 24 h.

4. Quel serait l'effet des composés sur l'interaction protéine VI/BAG3 ?

Les composés C4 et C9 sont capables d'inhiber l'interaction protéine VI/Nedd4. Les effets des composés C4 et C9 sur la réplication du virus de Marburg, mettant en jeu l'interaction VP40/Nedd4 nous permettent de dire que ces composés sont capables d'inhiber les interaction de types [LP]PxY/Nedd4 indépendamment de la protéine portant le motif [LP]PxY.

Cependant, pour l'instant nous ne savons pas si cette inhibition est spécifique de Nedd4 ou bien seulement de son domaine WW. Et puisque l'interaction BAG3/protéine VI constitue un autre exemple d'interaction de type motif [LP]PxY/domaine WW, tester l'effet des composés sélectionnés en AlphaScreen® sur cette interaction nous permettrait de déterminer si les composés sont spécifiques de l'interaction motif [LP]PxY/Nedd4 ou bien plus généralement, de l'interaction motif [LP]PxY/domaine WW.

Des expériences préliminaires de l'effet des composés sur la colocalisation des protéines VI et BAG3 transfectées ne nous ont pas permis de conclure (*données non montrées*). Des tests de co-immunoprécipitation ou la mise en place d'un nouveau test en AlphaScreen® de l'interaction protéine VI/BAG3 en présence des composés permettront de répondre à ces questions.

5. BAG3 : le chaînon manquant ?

Nous avons découvert une nouvelle interaction de type motif [LP]PxY/domaine WW impliquant la protéine VI des adénovirus et la co-chaperonne cellulaire BAG3. Cette interaction fait de BAG3 un nouveau partenaire et effecteur cellulaire potentiellement impliqué dans les étapes d'entrée du virus. La détermination du rôle de BAG3 dans les étapes de l'infection nous permettrait de mieux caractériser le cycle de l'adénovirus.

BAG3 est impliqué dans l'autophagie (Merabova et al. 2015) et permet de supposer une nouvelle fois un lien avec l'autophagie durant l'entrée des adénovirus.

Les voies de signalisation du transport vésiculaire et de l'autophagie sont très complexes, nous pouvons proposer un modèle, très schématique, du mécanisme de transport de l'adénovirus jusqu'au MTOC en faisant intervenir les facteurs cellulaires : Nedd4-2 et BAG3.

Le virus pourrait utiliser sa protéine VI afin de rompre les endosomes et permettre ainsi d'échapper à la dégradation lysosomale. La protéine VI recruterait ensuite des facteurs cellulaires tels que Nedd4-2 et BAG3 *via* des interactions [LP]PxY/domaine WW. Ces

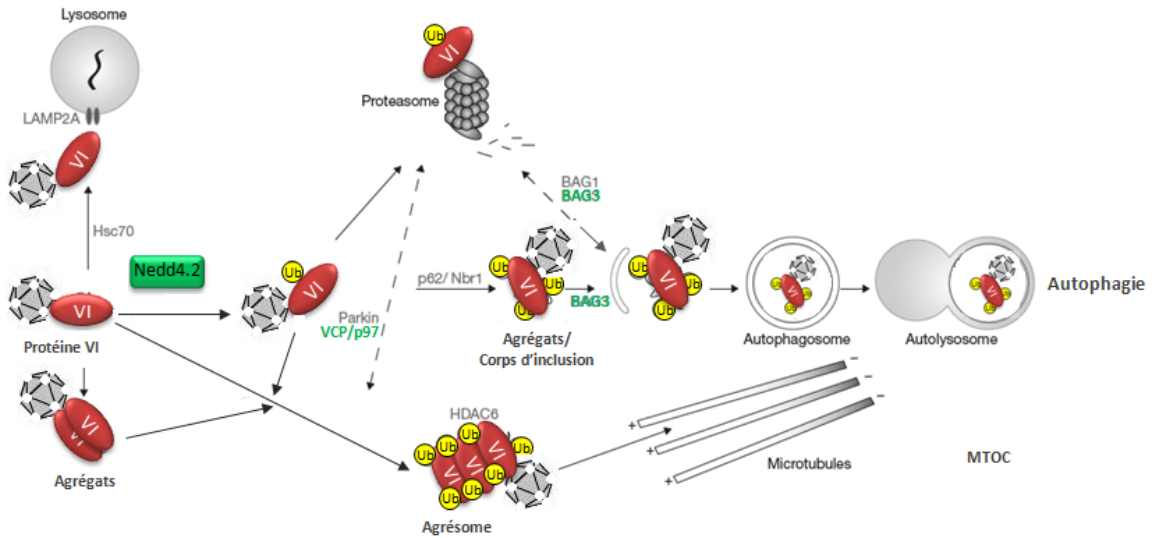


Schéma 17: Modèle de l'implication de Nedd4-2, BAG3 et VCP/p97 dans l'entrée de l'AdV. L'Adénovirus utiliserait sa protéine VI afin de rompre les endosomes et permettre ainsi d'échapper à la dégradation lysosomale. La protéine VI recruterait la Nedd4-2 afin d'être poly-ubiquitylée et par la suite, son interaction avec BAG3 lui permettrait d'inhiber sa dégradation par la voie de l'autophagie. Le recrutement de BAG3 et d'autres facteurs cellulaires tels que l'ATPase VCP/p97 pourrait permettre à la protéine VI, associée à la capsid, d'utiliser la voie de transport jusqu'aux agrésomes pour atteindre le MTOC. Schéma modifié d'après Kraft *et al* (2010) .

interactions permettraient au virus d'utiliser la machinerie d'ubiquitylation et d'échapper à la voie de dégradation de l'autophagie. Le virus pourrait alors utiliser la voie de transport jusqu'aux agrésomes pour atteindre le MTOC (**Schéma 17**). Les agrésomes sont des structures regroupant des agrégats de protéines mal repliées.

Pour cela la protéine VI, liée à la capsid, recruterait la Nedd4-2 afin d'être poly-ubiquitylée sur la lysine K63 et échapper ainsi à la dégradation par le protéasome. Elle serait donc adressée vers la voie de trafic vésiculaire. Mais, cette dernière conduirait au recrutement de l'autophagie du fait de la présence de membranes rompues. La protéine VI serait alors capable de recruter et d'inhiber la protéine BAG3, nécessaire à l'induction de l'autophagie (Gamerding et al. 2009; Gamerding, Carra and Behl 2011). Ainsi, la protéine VI associée au virus inhiberait sa dégradation par la voie autophagique.

De plus, BAG3 joue un rôle dans la formation des agrésomes. La protéine VI, associée à la capsid, pourrait détourner la voie d'adressage vers les agrésomes pour être transportée le long des microtubules jusqu'au MTOC où sont rassemblés les agrésomes. Des expériences ont montré qu'au cours de l'entrée, les adénovirus se retrouvent concentrés au niveau du MTOC (Wodrich et al. 2010).

La protéine VCP pourrait aussi jouer un rôle dans ce mécanisme car elle est impliquée dans la dégradation protéasomale et dans la formation des agrésomes (Kraft, Peter, and Hofmann 2010).

Ainsi la protéine VI du virus mutant M1 qui n'est pas ou peu ubiquitylée du fait de son défaut d'interaction avec Nedd4-2, ne pourrait pas interagir et inhiber les fonctions de BAG3 et le virus M1 se retrouverait dégradé par la voie de dégradation autophagique (**Schéma 17**).

Cependant, en supposant que l'hypothèse de l'adressage vers les agrésomes soit juste, le virus devra encore trouver un moyen d'échapper aux mécanismes de dégradation cellulaire recrutés par les agrésomes. Le détournement de la machinerie cellulaire d'import nucléaire et du récepteur protéique CRM1 pourrait permettre à la particule d'être rapidement transloquée vers les pores nucléaires afin d'atteindre son site de réplication.

REFERENCES

Accola, Molly A., Bettina Strack, and Heinrich G. Göttlinger. 2000. "Efficient Particle Production by Minimal Gag Constructs Which Retain the Carboxy-Terminal Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid-p2 and a Late Assembly Domain." *Journal of Virology* 74 (12): 5395–5402.

Achar, Kavitha C.S., Kallappa M. Hosamani, and Harisha R. Seetharamareddy. 2010. "In-Vivo Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Newly Synthesized Benzimidazole Derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (5): 2048–54. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.029.

Aleidi, Shereen M., Vicky Howe, Laura J. Sharpe, Alryel Yang, Geetha Rao, Andrew J. Brown, and Ingrid C. Gelissen. 2015. "The E3 Ubiquitin Ligases, HUWE1 and NEDD4-1, Are Involved in the Post-Translational Regulation of the ABCG1 and ABCG4 Lipid Transporters." *Journal of Biological Chemistry* 290 (40): 24604–13. doi:10.1074/jbc.M115.675579.

Anderson, H. A., Y. Chen, and L. C. Norkin. 1996. "Bound Simian Virus 40 Translocates to Caveolin-Enriched Membrane Domains, and Its Entry Is Inhibited by Drugs That Selectively Disrupt Caveolae." *Molecular Biology of the Cell* 7 (11): 1825–34.

Arkin, M. R., P. R. Connor, R. Emkey, and others. 2015. "NCBI Bookshelf." Accessed October 24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/n/assayguide/ppi/?report=reader>.

Balzarini, J., K. Van Laethem, S. Hatse, K. Vermeire, E. De Clercq, W. Peumans, E. Van Damme, A.-M. Vandamme, A. Bohlstedt, and D. Schols. 2004. "Profile of Resistance of Human Immunodeficiency Virus to Mannose-Specific Plant Lectins." *Journal of Virology* 78 (19): 10617–27. doi:10.1128/JVI.78.19.10617-10627.2004.

Barlan, A. U., T. M. Griffin, K. A. Mcguire, and C. M. Wiethoff. 2011. "Adenovirus Membrane Penetration Activates the NLRP3 Inflammasome." *Journal of Virology* 85 (1): 146–55. doi:10.1128/JVI.01265-10.

Basile, A., N. Darbinian, R. Kaminski, M. K. White, A. Gentilella, M. C. Turco, and K. Khalili. 2009. "Evidence for Modulation of BAG3 by Polyomavirus JC Early Protein." *Journal of General Virology* 90 (7): 1629–40. doi:10.1099/vir.0.008722-0.

B Clark, Kevin, and E. M Eisenstein. 2013. "Targeting Host Store-Operated Ca²⁺ Release to Attenuate Viral Infections." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13 (16): 1916–32.

Benevento, M., S. Di Palma, J. Snijder, C. L. Moyer, V. S. Reddy, G. R. Nemerow, and

A. J. R. Heck. 2014. "Adenovirus Composition, Proteolysis, and Disassembly Studied by In-Depth Qualitative and Quantitative Proteomics." *Journal of Biological Chemistry* 289 (16): 11421–30. doi:10.1074/jbc.M113.537498.

Berciaud, S., F. Rayne, S. Kassab, C. Jubert, M. Faure-Della Corte, F. Salin, H. Wodrich, and M.E. Lafon. 2012. "Adenovirus Infections in Bordeaux University Hospital 2008–2010: Clinical and Virological Features." *Journal of Clinical Virology* 54 (4): 302–7. doi:10.1016/j.jcv.2012.04.009.

Bergelson, Jeffrey M. 1997. "Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5." *SCIENCE*.

Bhattacharya, Bishnupriya, Cristina Celma, and Polly Roy. 2015. "Influence of Cellular Trafficking Pathway on Bluetongue Virus Infection in Ovine Cells." *Viruses* 7 (5): 2378–2403. doi:10.3390/v7052378.

Bieniasz, Paul D. 2006. "Late Budding Domains and Host Proteins in Enveloped Virus Release." *Virology* 344 (1): 55–63. doi:10.1016/j.virol.2005.09.044.

Bissig, Christin, Marc Lenoir, Marie-Claire Velluz, Irina Kufareva, Ruben Abagyan, Michael Overduin, and Jean Gruenberg. 2013. "Viral Infection Controlled by a Calcium-Dependent Lipid-Binding Module in ALIX." *Developmental Cell* 25 (4): 364–73. doi:10.1016/j.devcel.2013.04.003.

Blot, V. 2004. "Nedd4.1-Mediated Ubiquitination and Subsequent Recruitment of Tsg101 Ensure HTLV-1 Gag Trafficking towards the Multivesicular Body Pathway prior to Virus Budding." *Journal of Cell Science* 117 (11): 2357–67. doi:10.1242/jcs.01095.

Boehmer, Christoph, Ferah Okur, Iwan Setiawan, Stefan Bröer, and F Lang. 2003. "Properties and Regulation of Glutamine Transporter SN1 by Protein Kinases SGK and PKB." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (1): 156–62. doi:10.1016/S0006-291X(03)00921-5.

Bolhassani, Azam, and Sima Rafati Yazdi. 2009. "DNA Immunization as an Efficient Strategy for Vaccination." *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 1 (2): 71.

Bonifacino, Juan S., and Linton M. Traub. 2003. "SIGNALS FOR SORTING OF TRANSMEMBRANE PROTEINS TO ENDOSOMES AND LYSOSOMES." *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 395–447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.

Bouamr, F., J. A. Melillo, M. Q. Wang, K. Nagashima, M. de Los Santos, A. Rein, and S. P. Goff. 2003. "PPPYEPTAP Motif Is the Late Domain of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gag and Mediates Its Functional Interaction with Cellular Proteins Nedd4 and Tsg101." *Journal of Virology* 77 (22): 11882–95. doi:10.1128/JVI.77.22.11882-11895.2003.

Bremner, K. Helen, Julian Scherer, Julie Yi, Michael Vershinin, Steven P. Gross, and Richard B. Vallee. 2009. "Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit." *Cell Host & Microbe* 6 (6): 523–35. doi:10.1016/j.chom.2009.11.006.

Bruce, M. Christine, Voula Kanelis, Fatemeh Fouladkou, Anne Debonneville, Olivier Staub, and Daniela Rotin. 2008. "Regulation of Nedd4-2 Self-Ubiquitination and Stability by a PY Motif Located within Its HECT-Domain." *Biochemical Journal* 415 (1): 155. doi:10.1042/BJ20071708.

Burckhardt, Christoph J., Maarit Suomalainen, Philipp Schoenenberger, Karin Boucke, Silvio Hemmi, and Urs F. Greber. 2011. "Drifting Motions of the Adenovirus Receptor CAR and Immobile Integrins Initiate Virus Uncoating and Membrane Lytic Protein Exposure." *Cell Host & Microbe* 10 (2): 105–17. doi:10.1016/j.chom.2011.07.006.

Burke, J. D., and E. N. Fish. 2009. "Antiviral Strategies: The Present and beyond." *Current Molecular Pharmacology* 2 (1): 32–39.

Calistri, Arianna, Claudia Del Vecchio, Cristiano Salata, Michele Celestino, Marta Celegato, Heinrich Göttlinger, Giorgio Palù, and Cristina Parolin. 2009. "Role of the Feline Immunodeficiency Virus L-Domain in the Presence or Absence of Gag Processing: Involvement of Ubiquitin and Nedd4-2s Ligase in Viral Egress." *Journal of Cellular Physiology* 218 (1): 175–82. doi:10.1002/jcp.21587.

Cao, X. R., N. L. Lill, N. Boase, P. P. Shi, D. R. Croucher, H. Shan, J. Qu, et al. 2008. "Nedd4 Controls Animal Growth by Regulating IGF-1 Signaling." *Science Signaling* 1 (38): ra5–ra5. doi:10.1126/scisignal.1160940.

Cassany, Aurélie, Jessica Ragues, Tinglu Guan, Dominique Bégu, Harald Wodrich, Michael Kann, Glen R. Nemerow, and Larry Gerace. 2015. "Nuclear Import of Adenovirus DNA Involves Direct Interaction of Hexon with an N-Terminal Domain of the Nucleoporin Nup214." Edited by M. J. Imperiale. *Journal of Virology* 89 (3): 1719–30. doi:10.1128/JVI.02639-14.

Chami, Mounia, Bénédicte Oulès, and Patrizia Paterlini-Bréchet. 2006. "Cytobiological Consequences of Calcium-Signaling Alterations Induced by Human Viral Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763 (11): 1344–62. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.025.

Chau, Vincent, John W. Tobias, Andreas Bachmair, David Marriott, David J. Ecker, David K. Gonda, and Alexander Varshavsky. 1989. "A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein." *Science* 243 (4898): 1576–83.

Chockalingam, K., R. L. Simeon, C. M. Rice, and Z. Chen. 2010. "A Cell Protection Screen Reveals Potent Inhibitors of Multiple Stages of the Hepatitis C Virus Life Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (8): 3764–69. doi:10.1073/pnas.0915117107.

Cho, E. J., S. Xia, L.-C. Ma, J. Robertus, R. M. Krug, E. V. Anslyn, G. T. Montelione, and A. D. Ellington. 2012. "Identification of Influenza Virus Inhibitors Targeting NS1A Utilizing Fluorescence Polarization-Based High-Throughput Assay." *Journal of Biomolecular Screening* 17 (4): 448–59. doi:10.1177/1087057111431488.

Chua, H.-H., H.-H. Lee, S.-S. Chang, C.-C. Lu, T.-H. Yeh, T.-Y. Hsu, T.-H. Cheng, J.-T. Cheng, M.-R. Chen, and C.-H. Tsai. 2007. "Role of the TSG101 Gene in Epstein-Barr Virus Late Gene Transcription." *Journal of Virology* 81 (5): 2459–71. doi:10.1128/JVI.02289-06.

Clercq, Erik De. 2004. "Antivirals and Antiviral Strategies." *Nature Reviews Microbiology* 2 (9): 704–20. doi:10.1038/nrmicro975.

Cohen, C. J. 2001. "Multiple Regions within the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Cytoplasmic Domain Are Required for Basolateral Sorting." *Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 25392–98. doi:10.1074/jbc.M009531200.

Congiu, Cenzo, Maria Teresa Cocco, and Valentina Onnis. 2008. "Design, Synthesis, and in Vitro Antitumor Activity of New 1,4-Diarylimidazole-2-Ones and Their 2-Thione Analogues." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (3): 989–93. doi:10.1016/j.bmcl.2007.12.023.

Coux, Olivier. 2011. *Protéasome, Ubiquitine et Protéines Apparentées à L'ubiquitine*. Éditions Lavoisier.

Craven, Rebecca C., Ronald N. Harty, Jason Paragas, Peter Palese, and John W. Wills. 1999. "Late Domain Function Identified in the Vesicular Stomatitis Virus M Protein by Use of Rhabdovirus-Retrovirus Chimeras." *Journal of Virology* 73 (4): 3359–65.

Crowder, Scott, and Karla Kirkegaard. 2005. "Trans-Dominant Inhibition of RNA Viral Replication Can Slow Growth of Drug-Resistant Viruses." *Nature Genetics* 37 (7): 701–9. doi:10.1038/ng1583.

Cui, Jin, Xinliang Fu, Jiexiong Xie, Ming Gao, Malin Hong, Yao Chen, Shuo Su, and Shoujun Li. 2014. "Critical Role of Cellular Cholesterol in Bovine Rotavirus Infection." *Virology Journal* 11 (1): 1–7.

Danthi, P., and M. Chow. 2004. "Cholesterol Removal by Methyl-β-Cyclodextrin Inhibits Poliovirus Entry." *Journal of Virology* 78 (1): 33–41. doi:10.1128/JVI.78.1.33-41.2004.

Debonneville, Christophe. 2001. "Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 Regulates

Epithelial Na⁺ Channel Cell Surface Expression.” *The EMBO Journal*.

de Chasse, Benoît, Laurène Meyniel-Schicklin, Anne Aublin-Gex, Patrice André, and Vincent Lotteau. 2012. “New Horizons for Antiviral Drug Discovery from Virus–host Protein Interaction Networks.” *Current Opinion in Virology* 2 (5): 606–13. doi:10.1016/j.coviro.2012.09.001.

de Chasse, Benoît, Laurène Meyniel-Schicklin, Jacky Vonderscher, Patrice André, and Vincent Lotteau. 2014. “Virus-Host Interactomics: New Insights and Opportunities for Antiviral Drug Discovery.” *Genome Medicine* 6 (11): 115.

De Clercq, Erik. 2002. “Cidofovir in the Treatment of Poxvirus Infections.” *Antiviral Research* 55 (1): 1–13.

De Clercq, Erik. 2015a. “Ebola Virus (EBOV) Infection: Therapeutic Strategies.” *Biochemical Pharmacology* 93 (1): 1–10. doi:10.1016/j.bcp.2014.11.008.

Demirov, Dimiter G., Akira Ono, Jan M. Orenstein, and Eric O. Freed. 2002. “Overexpression of the N-Terminal Domain of TSG101 Inhibits HIV-1 Budding by Blocking Late Domain Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2): 955–60.

de Oliveira, Clarissa B. R. 1996. “Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against Adenovirus Type 5 Infection in Vitro and in a New Zealand Rabbit Ocular Model.” *Antiviral Research*.

Dharmapuri, Sridhar, Daniela Peruzzi, and Luigi Aurisicchio. 2009. “Engineered Adenovirus Serotypes for Overcoming Anti-Vector Immunity.” *Expert Opinion on Biological Therapy* 9 (10): 1279–87. doi:10.1517/14712590903187053.

Diamond, Michael S., and Michael Farzan. 2012. “The Broad-Spectrum Antiviral Functions of IFIT and IFITM Proteins.” *Nature Reviews Immunology* 13 (1): 46–57. doi:10.1038/nri3344.

Dolnik, O., L. Kolesnikova, L. Stevermann, and S. Becker. 2010. “Tsg101 Is Recruited by a Late Domain of the Nucleocapsid Protein To Support Budding of Marburg Virus-Like Particles.” *Journal of Virology* 84 (15): 7847–56. doi:10.1128/JVI.00476-10.

Dolnik, Olga, Larissa Kolesnikova, Sonja Welsch, Thomas Strecker, Gordian Schudt, and Stephan Becker. 2014. “Interaction with Tsg101 Is Necessary for the Efficient Transport and Release of Nucleocapsids in Marburg Virus-Infected Cells.” Edited by Christopher F. Basler. *PLoS Pathogens* 10 (10): e1004463. doi:10.1371/journal.ppat.1004463.

Dolnik, Olga, Lea Stevermann, Larissa Kolesnikova, and Stephan Becker. 2015. “Marburg Virus Inclusions: A Virus-Induced Microcompartment and Interface to Multivesicular Bodies and the Late Endosomal Compartment.” *European Journal of Cell*

Biology 94 (7-9): 323–31. doi:10.1016/j.ejcb.2015.05.006.

Drinjakovic, Jovana, Hosung Jung, Douglas S. Campbell, Laure Strohlic, Asha Dwivedy, and Christine E. Holt. 2010. “E3 Ligase Nedd4 Promotes Axon Branching by Downregulating PTEN.” *Neuron* 65 (3): 341–57. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.017.

Dudek, S. E., C. Luig, E.-K. Pauli, U. Schubert, and S. Ludwig. 2010. “The Clinically Approved Proteasome Inhibitor PS-341 Efficiently Blocks Influenza A Virus and Vesicular Stomatitis Virus Propagation by Establishing an Antiviral State.” *Journal of Virology* 84 (18): 9439–51. doi:10.1128/JVI.00533-10.

Echavarria, M. 2008. “Adenoviruses in Immunocompromised Hosts.” *Clinical Microbiology Reviews* 21 (4): 704–15. doi:10.1128/CMR.00052-07.

Eglen, Richard M., Terry Reisine, Philippe Roby, Nathalie Rouleau, Chantal Illy, Roger Bossé, and Martina Bielefeld. 2008. “The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status.” *Current Chemical Genomics* 1: 2.

Ellenbecker, M., J.-M. Lanchy, and J. S. Lodmell. 2012. “Identification of Rift Valley Fever Virus Nucleocapsid Protein-RNA Binding Inhibitors Using a High-Throughput Screening Assay.” *Journal of Biomolecular Screening* 17 (8): 1062–70. doi:10.1177/1087057112448100.

Elshabrawy, H. A., J. Fan, C. S. Haddad, K. Ratia, C. C. Broder, M. Caffrey, and B. S. Prabhakar. 2014. “Identification of a Broad-Spectrum Antiviral Small Molecule against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Ebola, Hendra, and Nipah Viruses by Using a Novel High-Throughput Screening Assay.” *Journal of Virology* 88 (8): 4353–65. doi:10.1128/JVI.03050-13.

Fehling SK, Lennartz F, Strecker T. 2012. "Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z" *Viruses* 2973-3011. doi: 10.3390/v4112973.

Feng, Zongdi, Lucinda Hensley, Kevin L. McKnight, Fengyu Hu, Victoria Madden, LiFang Ping, Sook-Hyang Jeong, Christopher Walker, Robert E. Lanford, and Stanley M. Lemon. 2013. “A Pathogenic Picornavirus Acquires an Envelope by Hijacking Cellular Membranes.” *Nature* 496 (7445): 367–71. doi:10.1038/nature12029.

Feucht, Judith, Kathrin Opherk, Peter Lang, Simone Kayser, Lena Hartl, Wolfgang Bethge, Susanne Matthes-Martin, et al. 2015. “Adoptive T-Cell Therapy with Hexon-Specific Th1 Cells as a Treatment of Refractory Adenovirus Infection after HSCT.” *Blood* 125 (12): 1986–94.

Florescu, Diana F, and Megan A Keck. 2014. “Development of CMX001 (Brincidofovir) for the Treatment of Serious Diseases or Conditions Caused by dsDNA Viruses.” *Expert*

Review of Anti-Infective Therapy 12 (10): 1171–78. doi:10.1586/14787210.2014.948847.

Fontanella, Bianca, Leila Birolo, Giuseppe Infusini, Claudia Cirulli, Liberato Marzullo, Pietro Pucci, Maria Caterina Turco, and Alessandra Tosco. 2010. “The Co-Chaperone BAG3 Interacts with the Cytosolic Chaperonin CCT: New Hints for Actin Folding.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (5): 641–50. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.008.

Fotia, A. B., J. Ekberg, D. J. Adams, D. I. Cook, P. Poronnik, and S. Kumar. 2004a. “Regulation of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by the Ubiquitin-Protein Ligases Nedd4 and Nedd4-2.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 28930–35. doi:10.1074/jbc.M402820200.

Fotia, A. B., J. Ekberg, D. J. Adams, D. I. Cook, P. Poronnik, and S. Kumar. 2004b. “Regulation of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by the Ubiquitin-Protein Ligases Nedd4 and Nedd4-2.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 28930–35. doi:10.1074/jbc.M402820200.

Fouladkou, F., C. Lu, C. Jiang, L. Zhou, Y. She, J. R. Walls, H. Kawabe, et al. 2010. “The Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Is Required for Heart Development and Is a Suppressor of Thrombospondin-1.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (9): 6770–80. doi:10.1074/jbc.M109.082347.

Freed, E. O. 2002. “Viral Late Domains.” *Journal of Virology* 76 (10): 4679–87. doi:10.1128/JVI.76.10.4679-4687.2002.

Frisch, Steven M., and Joe S. Mymryk. 2002. “Adenovirus-5 ϵ 1a: Paradox and Paradigm.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (6): 441–52. doi:10.1038/nrm827.

Galinier, Richard, Evelyne Gout, Hugues Lortat-Jacob, Jonathan Wood, and Jadwiga Chroboczek. 2002. “Adenovirus Protein Involved in Virus Internalization Recruits Ubiquitin-Protein Ligases[†].” *Biochemistry* 41 (48): 14299–305. doi:10.1021/bi020125b.

Gamerding, Martin, Serena Carra, and Christian Behl. 2011. “Emerging Roles of Molecular Chaperones and Co-Chaperones in Selective Autophagy: Focus on BAG Proteins.” *Journal of Molecular Medicine* 89 (12): 1175–82. doi:10.1007/s00109-011-0795-6.

Gamerding, Martin, Parvana Hajieva, A. Murat Kaya, Uwe Wolfrum, F. Ulrich Hartl, and Christian Behl. 2009. “Protein Quality Control during Aging Involves Recruitment of the Macroautophagy Pathway by BAG3.” *The EMBO Journal* 28 (7): 889–901.

García Cordero, Julio, Moisés León Juárez, Jorge A. González-Y-Merchand, Leticia Cedillo Barrón, and Benito Gutiérrez Castañeda. 2014. “Caveolin-1 in Lipid Rafts Interacts with Dengue Virus NS3 during Polyprotein Processing and Replication in HMEC-1 Cells.”

Edited by Tianyi Wang. *PLoS ONE* 9 (3): e90704. doi:10.1371/journal.pone.0090704.

Gardner, R. G., A. G. Shearer, and R. Y. Hampton. 2001. “In Vivo Action of the HRD Ubiquitin Ligase Complex: Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Quality Control and Sterol Regulation.” *Molecular and Cellular Biology* 21 (13): 4276–91. doi:10.1128/MCB.21.13.4276-4291.2001.

Garrus, Jennifer E., Uta K. von Schwedler, Owen W. Pornillos, Scott G. Morham, Kenton H. Zavitz, Hubert E. Wang, Daniel A. Wettstein, et al. 2001. “Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding.” *Cell* 107 (1): 55–65.

Gehring, G., K. Rohrmann, N. Atenchong, E. Mittler, S. Becker, F. Dahlmann, S. Pohlmann, et al. 2014. “The Clinically Approved Drugs Amiodarone, Dronedarone and Verapamil Inhibit Filovirus Cell Entry.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (8): 2123–31. doi:10.1093/jac/dku091.

Geyeregger, René, Christine Freimüller, Stefan Stevanovic, Julia Stemberger, Gabor Mester, Jasmin Dmytrus, Thomas Lion, et al. 2013. “Short-Term In-Vitro Expansion Improves Monitoring and Allows Affordable Generation of Virus-Specific T-Cells against Several Viruses for a Broad Clinical Application.” Edited by Natalia Lapteva. *PLoS ONE* 8 (4): e59592. doi:10.1371/journal.pone.0059592.

Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F. Macleod. 2010. “Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms.” *The Journal of Pathology* 221 (1): 3–12. doi:10.1002/path.2697.

Göttlinger, H. G., Tatyana Dorfman, Joseph G. Sodroski, and William A. Haseltine. 1991. “Effect of Mutations Affecting the p6 Gag Protein on Human Immunodeficiency Virus Particle Release.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (8): 3195–99.

Gottwein, E., J. Bodem, B. Muller, A. Schmechel, H. Zentgraf, and H.-G. Krausslich. 2003. “The Mason-Pfizer Monkey Virus PPPY and PSAP Motifs Both Contribute to Virus Release.” *Journal of Virology* 77 (17): 9474–85. doi:10.1128/JVI.77.17.9474-9485.2003.

Gottwein, E., S. Jager, A. Habermann, and H.-G. Krausslich. 2006. “Cumulative Mutations of Ubiquitin Acceptor Sites in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Cause a Late Budding Defect.” *Journal of Virology* 80 (13): 6267–75. doi:10.1128/JVI.02177-05.

Gout, E., M. Gutkowska, S. Takayama, J.C. Reed, and J. Chroboczek. 2010. “Co-Chaperone BAG3 and Adenovirus Penton Base Protein Partnership.” *Journal of Cellular Biochemistry* 111 (3): 699–708. doi:10.1002/jcb.22756.

Guo, Chunhe, Luxi Chen, Delin Mo, Yaosheng Chen, and Xiaohong Liu. 2015. “DRACO Inhibits Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication in Vitro.” *Archives of Virology* 160 (5): 1239–47. doi:10.1007/s00705-015-2392-4.

Hacke, Moritz, Patrik Björkholm, Andrea Hellwig, Patricia Himmels, Carmen Ruiz de Almodóvar, Britta Brügger, Felix Wieland, and Andreas M. Ernst. 2015. “Inhibition of Ebola Virus Glycoprotein-Mediated Cytotoxicity by Targeting Its Transmembrane Domain and Cholesterol.” *Nature Communications* 6 (July): 7688. doi:10.1038/ncomms8688.

Han, Z., J. Lu, Y. Liu, B. Davis, M. S. Lee, M. A. Olson, G. Ruthel, et al. 2014. “Small-Molecule Probes Targeting the Viral PPxY-Host Nedd4 Interface Block Egress of a Broad Range of RNA Viruses.” *Journal of Virology* 88 (13): 7294–7306. doi:10.1128/JVI.00591-14.

Han, Z., J. J. Madara, Y. Liu, W. Liu, G. Ruthel, B. D. Freedman, and R. N. Harty. 2015. “ALIX Rescues Budding of a Double PTAP/PPEY L-Domain Deletion Mutant of Ebola VP40: A Role for ALIX in Ebola Virus Egress.” *Journal of Infectious Diseases*, March. doi:10.1093/infdis/jiu838.

Hao, W., K. J. Herlihy, N. J. Zhang, S. A. Fuhrman, C. Doan, A. K. Patick, and R. Duggal. 2007. “Development of a Novel Dicistronic Reporter-Selectable Hepatitis C Virus Replicon Suitable for High-Throughput Inhibitor Screening.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (1): 95–102. doi:10.1128/AAC.01008-06.

Harper, J. Wade, and Brenda A. Schulman. 2006. “Structural Complexity in Ubiquitin Recognition.” *Cell* 124 (6): 1133–36. doi:10.1016/j.cell.2006.03.009.

Harrison, Angela T., Frederik H. Kriel, Maria A. Papathanasopoulos, Salerwe Mosebi, Shaakira Abrahams, and Raymond Hewer. 2015. “The Evaluation of Statins as Potential Inhibitors of the LEDGF/p75-HIV-1 Integrase Interaction.” *Chemical Biology & Drug Design* 85 (3): 290–95. doi:10.1111/cbdd.12384.

Harty, R. N., M. E. Brown, J. P. McGettigan, G. Wang, H. R. Jayakar, J. M. Huibregtse, M. A. Whitt, and M. J. Schnell. 2001. “Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: A Budding Interaction.” *Journal of Virology* 75 (22): 10623–29. doi:10.1128/JVI.75.22.10623-10629.2001.

Harty, Ronald N., Melissa E. Brown, Guangli Wang, Jon Huibregtse, and Felicia P. Hayes. 2000. “A PPxY Motif within the VP40 Protein of Ebola Virus Interacts Physically and Functionally with a Ubiquitin Ligase: Implications for Filovirus Budding.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25): 13871–76.

Harty, Ronald N., Jason Paragas, Marius Sudol, and Peter Palese. 1999. “A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding.” *Journal of Virology* 73 (4): 2921–29.

Haruki, Hirohito, Bela Gyurcsik, Mitsuru Okuwaki, and Kyosuke Nagata. 2003. “Ternary

Complex Formation between DNA-Adenovirus Core Protein VII and TAF-I β /SET, an Acidic Molecular Chaperone.” *FEBS Letters* 555 (3): 521–27. doi:10.1016/S0014-5793(03)01336-X.

Hawkes, David, Kate L. Jones, Redmond P. Smyth, Cândida F. Pereira, Robert Bittman, Anthony Jaworowski, and Johnson Mak. 2015. “Properties of HIV-1 Associated Cholesterol in Addition to Raft Formation Are Important for Virus Infection.” *Virus Research* 210 (December): 18–21. doi:10.1016/j.virusres.2015.06.023.

He, Hongxuan. 2013. “Vaccines and Antiviral Agents.” In *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*, edited by Victor Romanowski. InTech. <http://www.intechopen.com/books/current-issues-in-molecular-virology-viral-genetics-and-biotechnological-applications/vaccines-and-antiviral-agents>.

Heidecker, G., P. A. Lloyd, F. Soheilian, K. Nagashima, and D. Derse. 2007. “The Role of WWP1-Gag Interaction and Gag Ubiquitination in Assembly and Release of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1.” *Journal of Virology* 81 (18): 9769–77. doi:10.1128/JVI.00642-07.

Heim, Albert. 2011. “Advances in the Management of Disseminated Adenovirus Disease in Stem Cell Transplant Recipients: Impact of Adenovirus Load (DNAemia) Testing.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 9 (11): 943–45. doi:10.1586/eri.11.113.

Hein, Claudine, Jean-Yves Springael, Christiane Volland, Rosine Haguenaer-Tsapis, and Bruno André. 1995. “NPI1, an Essential Yeast Gene Involved in Induced Degradation of Gap1 and Fur4 Permeases, Encodes the Rsp5 Ubiquitin—protein Ligase.” *Molecular Microbiology* 18 (1): 77–87.

Helliwell, Stephen B., Sascha Losko, and Chris A. Kaiser. 2001. “Components of a Ubiquitin Ligase Complex Specify Polyubiquitination and Intracellular Trafficking of the General Amino Acid Permease.” *The Journal of Cell Biology* 153 (4): 649–62.

Hicke, Linda. 2001. “A New Ticket for Entry into Budding Vesicles—ubiquitin.” *Cell* 106 (5): 527–30.

Hicke, Linda, and Rebecca Dunn. 2003. “Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (1): 141–72. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617.

Hoffmann, Hans-Heinrich, Andrea Kunz, Viviana A. Simon, Peter Palese, and Megan L. Shaw. 2011. “Broad-Spectrum Antiviral That Interferes with de Novo Pyrimidine Biosynthesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (14): 5777–82.

Hou, Y., D. E. Mcguinness, A. J. Prongay, B. Feld, P. Ingravallo, R. A. Ogert, C. A. Lunn, and J. A. Howe. 2008. “Screening for Antiviral Inhibitors of the HIV Integrase--LEDGF/p75 Interaction Using the AlphaScreenTM Luminescent Proximity Assay.” *Journal*

of Biomolecular Screening 13 (5): 406–14. doi:10.1177/1087057108317060.

Huibregtse, Jon M., Martin Scheffner, Sylvie Beaudenon, and Peter M. Howley. 1995. “A Family of Proteins Structurally and Functionally Related to the E6-AP Ubiquitin-Protein Ligase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (7): 2563–67.

Hu, Kimberly, Jean-Francois Clément, Levon Abrahamyan, Klaus Strebler, Michel Bouvier, Lawrence Kleiman, and Andrew J. Mouland. 2005. “A Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Biosensor Assay Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer.” *Journal of Virological Methods* 128 (1-2): 93–103. doi:10.1016/j.jviromet.2005.04.012.

Hung, Hui-Chen, Ching-Ping Tseng, Jinn-Moon Yang, Yi-Wei Ju, Sung-Nain Tseng, Yen-Fu Chen, Yu-Sheng Chao, Hsing-Pang Hsieh, Shin-Ru Shih, and John T.-A. Hsu. 2009. “Aurintricarboxylic Acid Inhibits Influenza Virus Neuraminidase.” *Antiviral Research* 81 (2): 123–31. doi:10.1016/j.antiviral.2008.10.006.

Hütter, Sylvia, Irena Zurnic, and Dirk Lindemann. 2013. “Foamy Virus Budding and Release.” *Viruses* 5 (4): 1075–98. doi:10.3390/v5041075.

Ikeda, Masato, Akiko Ikeda, Luz C. Longan, and Richard Longnecker. 2000. “The Epstein–Barr Virus Latent Membrane Protein 2A PY Motif Recruits WW Domain-Containing Ubiquitin-Protein Ligases.” *Virology* 268 (1): 178–91. doi:10.1006/viro.1999.0166.

Ikeda, Masato, and Richard Longnecker. 2007. “Cholesterol Is Critical for Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Trafficking and Protein Stability.” *Virology* 360 (2): 461–68.

Inabe, Kazunori, Masako Nishizawa, Shigeru Tajima, Kazuyoshi Ikuta, and Yoko Aida. 1999. “The YXXL Sequences of a Transmembrane Protein of Bovine Leukemia Virus Are Required for Viral Entry and Incorporation of Viral Envelope Protein into Virions.” *Journal of Virology* 73 (2): 1293–1301.

Ingham, R. J., K. Colwill, C. Howard, S. Dettwiler, C. S. H. Lim, J. Yu, K. Hersi, et al. 2005. “WW Domains Provide a Platform for the Assembly of Multiprotein Networks.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (16): 7092–7106. doi:10.1128/MCB.25.16.7092-7106.2005.

Inglese, James, Ronald L Johnson, Anton Simeonov, Menghang Xia, Wei Zheng, Christopher P Austin, and Douglas S Auld. 2007. “High-Throughput Screening Assays for the Identification of Chemical Probes.” *Nature Chemical Biology* 3 (8): 466–79. doi:10.1038/nchembio.2007.17.

Irie, T., J. M. Licata, J. P. McGettigan, M. J. Schnell, and R. N. Harty. 2004. “Budding of PPxY-Containing Rhabdoviruses Is Not Dependent on Host Proteins TGS101 and VPS4A.”

Journal of Virology 78 (6): 2657–65. doi:10.1128/JVI.78.6.2657-2665.2004.

Irie, T., Y. Shimazu, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2007. “The YLDL Sequence within Sendai Virus M Protein Is Critical for Budding of Virus-Like Particles and Interacts with Alix/AIP1 Independently of C Protein.” *Journal of Virology* 81 (5): 2263–73. doi:10.1128/JVI.02218-06.

Ishov, A. M. 2004. “Heterochromatin and ND10 Are Cell-Cycle Regulated and Phosphorylation-Dependent Alternate Nuclear Sites of the Transcription Repressor Daxx and SWI/SNF Protein ATRX.” *Journal of Cell Science* 117 (17): 3807–20. doi:10.1242/jcs.01230.

Isoorce, Nathalie, Julie Lucifora, Fabien Zoulim, and David Durantel. 2015. “Immune-Modulators to Combat Hepatitis B Virus Infection: From IFN- α to Novel Investigational Immunotherapeutic Strategies.” *Antiviral Research* 122 (October): 69–81. doi:10.1016/j.antiviral.2015.08.008.

Itani, Omar A., Jason R. Campbell, Juan Herrero, Peter M. Snyder, and Christie P. Thomas. 2003. “Alternate Promoters and Variable Splicing Lead to hNedd4–2 Isoforms with a C2 Domain and Varying Number of WW Domains.” *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 285 (5): F916–29. doi:10.1152/ajprenal.00203.2003.

Jadwin, J. A., V. Rudd, P. Sette, S. Challa, and F. Bouamr. 2010. “Late Domain-Independent Rescue of a Release-Deficient Moloney Murine Leukemia Virus by the Ubiquitin Ligase Itch.” *Journal of Virology* 84 (2): 704–15. doi:10.1128/JVI.01319-09.

Jayakar, Himangi R., K. Gopal Murti, and Michael A. Whitt. 2000. “Mutations in the PPPY Motif of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Reduce Virus Budding by Inhibiting a Late Step in Virion Release.” *Journal of Virology* 74 (21): 9818–27.

Johansen, Lisa M., Lisa Evans DeWald, Charles J. Shoemaker, Benjamin G. Hoffstrom, Calli M. Lear-Rooney, Andrea Stossel, Elizabeth Nelson, et al. 2015. “A Screen of Approved Drugs and Molecular Probes Identifies Therapeutics with anti-Ebola Virus Activity.” *Science Translational Medicine* 7 (290): 290ra89–290ra89.

Kalin, S., B. Amstutz, M. Gastaldelli, N. Wolfrum, K. Boucke, M. Havenga, F. DiGennaro, N. Liska, S. Hemmi, and U. F. Greber. 2010. “Macropinocytotic Uptake and Infection of Human Epithelial Cells with Species B2 Adenovirus Type 35.” *Journal of Virology* 84 (10): 5336–50. doi:10.1128/JVI.02494-09.

Kaliszewski, Pawel, and Teresa Zoladek. 2008. “The Role of Rsp5 Ubiquitin Ligase in Regulation of Diverse Processes in Yeast Cells.” ABP.

Kanelis, Voula, Daniela Rotin, and Julie D. Forman-Kay. 2001. “Solution Structure of a Nedd4 WW domain–ENaC Peptide Complex.” *Nature Structural & Molecular Biology* 8 (5):

407–12.

Kasanov, Jeremy, Gregorio Pirozzi, Albert J. Uveges, and Brian K. Kay. 2001. “Characterizing Class I WW Domains Defines Key Specificity Determinants and Generates Mutant Domains with Novel Specificities.” *Chemistry & Biology* 8 (3): 231–41.

Katzmann, David J., Markus Babst, and Scott D. Emr. 2001. “Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I.” *Cell* 106 (2): 145–55.

Key, Jules M. 1965. “Use of 5-IODO-2' Deoxyuridine (Idoxuridine) in Cutaneous Herpes Simplex.” *California Medicine* 103 (4): 247.

Kikonyogo, Alexandra, Fadila Bouamr, Marcy L. Vana, Yan Xiang, Ashok Aiyar, Carol Carter, and Jonathan Leis. 2001. “Proteins Related to the Nedd4 Family of Ubiquitin Protein Ligases Interact with the L Domain of Rous Sarcoma Virus and Are Required for Gag Budding from Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (20): 11199–204.

Kim, H. C., and J. M. Huibregtse. 2009. “Polyubiquitination by HECT E3s and the Determinants of Chain Type Specificity.” *Molecular and Cellular Biology* 29 (12): 3307–18. doi:10.1128/MCB.00240-09.

Kinch, Michael S., Abdul S. Yunus, Calli Lear, Hanwen Mao, Hanson Chen, Zena Fesseha, Guangxiang Luo, et al. 2009. “FGI-104: A Broad-Spectrum Small Molecule Inhibitor of Viral Infection.” *American Journal of Translational Research* 1 (1): 87.

Kleinfelter, Lara M., Rohit K. Jangra, Lucas T. Jae, Andrew S. Herbert, Eva Mittler, Katie M. Stiles, Ariel S. Wirchnianski, et al. 2015. “Haploid Genetic Screen Reveals a Profound and Direct Dependence on Cholesterol for Hantavirus Membrane Fusion.” *mBio* 6 (4): e00801–15. doi:10.1128/mBio.00801-15.

Kota, Smitha. 2010. *ML322, A Small Molecule Inhibitor of Dimerization of the Core Protein of Hepatitis C Virus (HCV)*. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. NCBI Bookshelf.

Kraft, Claudine, Matthias Peter, and Kay Hofmann. 2010. “Selective Autophagy: Ubiquitin-Mediated Recognition and beyond.” *Nature Cell Biology* 12 (9): 836–41.

Krishna, N. K., and J. W. Wills. 2001. “Insertion of Capsid Proteins from Nonenveloped Viruses into the Retroviral Budding Pathway.” *Journal of Virology* 75 (14): 6527–36. doi:10.1128/JVI.75.14.6527-6536.2001.

Kuang, Ersheng, Jianfei Qi, and Ze'ev Ronai. 2013. “Emerging Roles of E3 Ubiquitin Ligases in Autophagy.” *Trends in Biochemical Sciences* 38 (9): 453–60. doi:10.1016/j.tibs.2013.06.008.

Kudchodkar, Sagar B., and Beth Levine. 2009. "Viruses and Autophagy." *Reviews in Medical Virology* 19 (6): 359–78. doi:10.1002/rmv.630.

Kumar, Lalit, Amit Sarswat, Nand Lal, Vishnu L. Sharma, Ashish Jain, Rajeev Kumar, Vikas Verma, Jagdamba P. Maikhuri, Awanit Kumar, and Praveen K. Shukla. 2010. "Imidazole Derivatives as Possible Microbicides with Dual Protection☆" *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2): 817–24. doi:10.1016/j.ejmech.2009.10.021.

Kumar, S. 1992. "Identification of a Set of Genes with Developmentally down-Regulated Expression in the Mouse Brain," Biochem Biophys Res Commun. edition.

Kuo, L., and E. O. Freed. 2012. "ARRDC1 as a Mediator of Microvesicle Budding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (11): 4025–26. doi:10.1073/pnas.1201441109.

Kuo, Rei-Lin, Ya-Han Lin, Robert Yung-Liang Wang, Chia-Wei Hsu, Yi-Ting Chiu, Hsing-I Huang, Li-Ting Kao, Jau-Song Yu, Shin-Ru Shih, and Chih-Ching Wu. 2015. "Proteomics Analysis of EV71-Infected Cells Reveals the Involvement of Host Protein NEDD4L in EV71 Replication." *Journal of Proteome Research* 14 (4): 1818–30. doi:10.1021/pr501199h.

Kyratsous, C. A., and S. J. Silverstein. 2007. "BAG3, a Host Cochaperone, Facilitates Varicella-Zoster Virus Replication." *Journal of Virology* 81 (14): 7491–7503. doi:10.1128/JVI.00442-07.

Kyratsous, Christos A., and Saul J. Silverstein. 2008. "The Co-Chaperone BAG3 Regulates Herpes Simplex Virus Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (52): 20912–17.

Lee, I.-H., C. R. Campbell, S.-H. Song, M. L. Day, S. Kumar, D. I. Cook, and A. Dinudom. 2009. "The Activity of the Epithelial Sodium Channels Is Regulated by Caveolin-1 via a Nedd4-2-Dependent Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12663–69. doi:10.1074/jbc.M809737200.

Leen, Ann M., Helen E. Heslop, and Malcolm K. Brenner. 2014. "Antiviral T-Cell Therapy." *Immunological Reviews* 258 (1): 12–29. doi:10.1111/imr.12138.

Licata, J. M., M. Simpson-Holley, N. T. Wright, Z. Han, J. Paragas, and R. N. Harty. 2003. "Overlapping Motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola Virus VP40 Protein Function Independently as Late Budding Domains: Involvement of Host Proteins TSG101 and VPS-4." *Journal of Virology* 77 (3): 1812–19. doi:10.1128/JVI.77.3.1812-1819.2003.

Lieleg, Oliver, Corinna Lieleg, Jesse Bloom, Christopher B. Buck, and Katharina Ribbeck. 2012. "Mucin Biopolymers As Broad-Spectrum Antiviral Agents."

Biomacromolecules 13 (6): 1724–32. doi:10.1021/bm3001292.

Li, Erguang, Dwayne Stupack, Gary M. Bokoch, and Glen R. Nemerow. 1998. “Adenovirus Endocytosis Requires Actin Cytoskeleton Reorganization Mediated by Rho Family GTPases.” *Journal of Virology* 72 (11): 8806–12.

Lindert, S., M. Silvestry, T.-M. Mullen, G. R. Nemerow, and P. L. Stewart. 2009. “Cryo-Electron Microscopy Structure of an Adenovirus-Integrin Complex Indicates Conformational Changes in Both Penton Base and Integrin.” *Journal of Virology* 83 (22): 11491–501. doi:10.1128/JVI.01214-09.

Lin, Shanshan, Peter E Nadeau, and Ayalew Mergia. 2015. “HIV Inhibits Endothelial Reverse Cholesterol Transport through Impacting Subcellular Caveolin-1 Trafficking.” *Retrovirology* 12 (1). doi:10.1186/s12977-015-0188-y.

Lin, Yu-Shiuan, Yin-Ju Chen, Stanley N. Cohen, and Tzu-Hao Cheng. 2013. “Identification of TSG101 Functional Domains and p21 Loci Required for TSG101-Mediated p21 Gene Regulation.” Edited by Irina U. Agoulnik. *PLoS ONE* 8 (11): e79674. doi:10.1371/journal.pone.0079674.

Lion, T. 2014. “Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients.” *Clinical Microbiology Reviews* 27 (3): 441–62. doi:10.1128/CMR.00116-13.

Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method.” *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Li, Yi, Bo Li, Chun-Jie Li, and Long-Jiang Li. 2015. “Key Points of Basic Theories and Clinical Practice in rAd-p53 (GendicineTM) Gene Therapy for Solid Malignant Tumors.” *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (3): 437–54. doi:10.1517/14712598.2015.990882.

Lou, Zhiyong, Yuna Sun, and Zihe Rao. 2014. “Current Progress in Antiviral Strategies.” *Trends in Pharmacological Sciences* 35 (2): 86–102. doi:10.1016/j.tips.2013.11.006.

Lu, X., Y. Xiong, and J. Silver. 2002. “Asymmetric Requirement for Cholesterol in Receptor-Bearing but Not Envelope-Bearing Membranes for Fusion Mediated by Ecotropic Murine Leukemia Virus.” *Journal of Virology* 76 (13): 6701–9. doi:10.1128/JVI.76.13.6701-6709.2002.

Macias, Maria J., Silke Wiesner, and Marius Sudol. 2002. “WW and SH3 Domains, Two Different Scaffolds to Recognize Proline-Rich Ligands.” *FEBS Letters* 513 (1): 30–37.

Maier, Oana, Debra L. Galan, Harald Wodrich, and Christopher M. Wiethoff. 2010. “An N-Terminal Domain of Adenovirus Protein VI Fragments Membranes by Inducing Positive Membrane Curvature.” *Virology* 402 (1): 11–19. doi:10.1016/j.virol.2010.03.043.

Maier, O., S. A. Marvin, H. Wodrich, E. M. Campbell, and C. M. Wiethoff. 2012. “Spatiotemporal Dynamics of Adenovirus Membrane Rupture and Endosomal Escape.” *Journal of Virology* 86 (19): 10821–28. doi:10.1128/JVI.01428-12.

Malecka, Kimberly A., Daniela Fera, David C. Schultz, Santosh Hodawadekar, Melvin Reichman, Preston S. Donover, Maureen E. Murphy, and Ronen Marmorstein. 2014. “Identification and Characterization of Small Molecule Human Papillomavirus E6 Inhibitors.” *ACS Chemical Biology* 9 (7): 1603–12. doi:10.1021/cb500229d.

Marschall, Manfred, Ina Niemann, Karin Kosulin, Anna Bootz, Sabrina Wagner, Thomas Dobner, Thomas Herz, et al. 2013. “Assessment of Drug Candidates for Broad-Spectrum Antiviral Therapy Targeting Cellular Pyrimidine Biosynthesis.” *Antiviral Research* 100 (3): 640–48. doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.003.

Martinez, Ruben, Andrew M. Burrage, Christopher M. Wiethoff, and Harald Wodrich. 2013. “High Temporal Resolution Imaging Reveals Endosomal Membrane Penetration and Escape of Adenoviruses in Real Time.” In *Virus-Host Interactions*, edited by Susanne M. Bailer and Diana Lieber, 1064:211–26. Totowa, NJ: Humana Press. http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-601-6_15.

Martinez, Ruben, Pascale Schellenberger, Daven Vasishtan, Cindy Akin, Sisley Austin, Denis Dacheux, Fabienne Rayne, et al. 2015. “The Amphipathic Helix of Adenovirus Capsid Protein VI Contributes to Penton Release and Postentry Sorting.” Edited by M. J. Imperiale. *Journal of Virology* 89 (4): 2121–35. doi:10.1128/JVI.02257-14.

Martin-Serrano, J. 2004. “HECT Ubiquitin Ligases Link Viral and Cellular PPXY Motifs to the Vacuolar Protein-Sorting Pathway.” *The Journal of Cell Biology* 168 (1): 89–101. doi:10.1083/jcb.200408155.

McInnes, Campbell. 2007. “Virtual Screening Strategies in Drug Discovery.” *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (5): 494–502. doi:10.1016/j.cbpa.2007.08.033.

Meier, O. 2002. “Adenovirus Triggers Macropinocytosis and Endosomal Leakage Together with Its Clathrin-Mediated Uptake.” *The Journal of Cell Biology* 158 (6): 1119–31. doi:10.1083/jcb.200112067.

Meier, Oliver, and Urs F. Greber. 2004. “Adenovirus Endocytosis.” *The Journal of Gene Medicine* 6 (S1): S152–63. doi:10.1002/jgm.553.

Merabova, Nana, Ilker Kudret Sariyer, A. Sami Saribas, Tijana Knezevic, Jennifer Gordon, M. Caterina Turco, Alessandra Rosati, Michael Weaver, Jacques Landry, and Kamel Khalili. 2015. “WW Domain of BAG3 Is Required for the Induction of Autophagy in Glioma Cells: BAG3 WW DOMAIN AND AUTOPHAGY.” *Journal of Cellular Physiology* 230 (4):

831–41. doi:10.1002/jcp.24811.

Meyniel-Schicklin, L., B. de Chasse, P. Andre, and V. Lotteau. 2012. “Viruses and Interactomes in Translation.” *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (7): M111.014738–M111.014738. doi:10.1074/mcp.M111.014738.

Moore, Mary, Nobuo Horikoshi, and Thomas Shenk. 1996. “Oncogenic Potential of the Adenovirus E4orf6 Protein.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (21): 11295–301.

Morris, L. L., I. Z. Hartman, D.-J. Jun, J. Seemann, and R. A. DeBose-Boyd. 2014. “Sequential Actions of the AAA-ATPase Valosin-Containing Protein (VCP)/p97 and the Proteasome 19 S Regulatory Particle in Sterol-Accelerated, Endoplasmic Reticulum (ER)-Associated Degradation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (27): 19053–66. doi:10.1074/jbc.M114.576652.

Moyer, C. L., C. M. Wiethoff, O. Maier, J. G. Smith, and G. R. Nemerow. 2011. “Functional Genetic and Biophysical Analyses of Membrane Disruption by Human Adenovirus.” *Journal of Virology* 85 (6): 2631–41. doi:10.1128/JVI.02321-10.

Mukherjee, S., A. M. Hanson, W. R. Shadrick, J. Ndjomou, N. L. Sweeney, J. J. Hernandez, D. Bartczak, et al. 2012. “Identification and Analysis of Hepatitis C Virus NS3 Helicase Inhibitors Using Nucleic Acid Binding Assays.” *Nucleic Acids Research* 40 (17): 8607–21. doi:10.1093/nar/gks623.

Muthumani, K., D. Falzarano, E. L. Reuschel, C. Tingey, S. Flingai, D. O. Villarreal, M. Wise, et al. 2015. “A Synthetic Consensus Anti-Spike Protein DNA Vaccine Induces Protective Immunity against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Nonhuman Primates.” *Science Translational Medicine* 7 (301): 301ra132–301ra132. doi:10.1126/scitranslmed.aac7462.

Naesens, L., L. Lenaerts, G. Andrei, R. Snoeck, D. Van Beers, A. Holy, J. Balzarini, and E. De Clercq. 2005. “Antiadenovirus Activities of Several Classes of Nucleoside and Nucleotide Analogues.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (3): 1010–16. doi:10.1128/AAC.49.3.1010-1016.2005.

Narahara, Chisato, and Jiro Yasuda. 2015. “Roles of the Three L-Domains in β -Retrovirus Budding: M-PMV Budding.” *Microbiology and Immunology* 59 (9): 545–54. doi:10.1111/1348-0421.12285.

Nilsson, Emma C, Rickard J Storm, Johannes Bauer, Susanne M C Johansson, Aivar Lookene, Jonas Ångström, Mattias Hedenström, et al. 2011. “The GD1a Glycan Is a Cellular Receptor for Adenoviruses Causing Epidemic Keratoconjunctivitis.” *Nature Medicine* 17 (1):

105–9. doi:10.1038/nm.2267.

Nwanegbo, Edward C., Eric G. Romanowski, Y. Jerold Gordon, and Andrea Gambotto. 2007. “Efficacy of Topical Immunoglobulins against Experimental Adenoviral Ocular Infection.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (9): 4171.

Ott, David E., Lori V. Coren, Elena N. Chertova, Tracy D. Gagliardi, and Ulrich Schubert. 2000. “Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag.” *Virology* 278 (1): 111–21. doi:10.1006/viro.2000.0648.

Ott, David E., Lori V. Coren, Terry D. Copeland, Bradley P. Kane, Donald G. Johnson, Raymond C. Sowder, Yoshiyuki Yoshinaka, Stephen Oroszlan, Larry O. Arthur, and Louis E. Henderson. 1998. “Ubiquitin Is Covalently Attached to the p6GagProteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus and to the p12Gag Protein of Moloney Murine Leukemia Virus.” *Journal of Virology* 72 (4): 2962–68.

Panchal, Rekha G., Gordon Ruthel, Tara A. Kenny, George H. Kallstrom, Douglas Lane, Shirin S. Badie, Limin Li, Sina Bavari, and M. Javad Aman. 2003. “In Vivo Oligomerization and Raft Localization of Ebola Virus Protein VP40 during Vesicular Budding.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 15936–41.

Parent, Leslie J., Robert P. Bennett, Rebecca C. Craven, Timothy D. Nelle, Neel K. Krishna, J. Bradford Bowzard, Carol B. Wilson, BRIDGET A. Puffer, Ronald C. Montelaro, and John W. Wills. 1995. “Positionally Independent and Exchangeable Late Budding Functions of the Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Gag Proteins.” *Journal of Virology* 69 (9): 5455–60.

Patel, Dhara A., Anand C. Patel, William C. Nolan, Yong Zhang, and Michael J. Holtzman. 2012. “High Throughput Screening for Small Molecule Enhancers of the Interferon Signaling Pathway to Drive Next-Generation Antiviral Drug Discovery.” Edited by Chen Liang. *PLoS ONE* 7 (5): e36594. doi:10.1371/journal.pone.0036594.

Patnaik, A., V. Chau, F. Li, R. C. Montelaro, and J. W. Wills. 2002. “Budding of Equine Infectious Anemia Virus Is Insensitive to Proteasome Inhibitors.” *Journal of Virology* 76 (6): 2641–47. doi:10.1128/JVI.76.6.2641-2647.2002.

Patnaik, Akash, Vincent Chau, and John W. Wills. 2000. “Ubiquitin Is Part of the Retrovirus Budding Machinery.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 13069–74.

Patton, G. S., S. A. Morris, W. Chung, P. D. Bieniasz, and M. O. McClure. 2005. “Identification of Domains in Gag Important for Prototypic Foamy Virus Egress.” *Journal of Virology* 79 (10): 6392–99. doi:10.1128/JVI.79.10.6392-6399.2005.

Pautus, Stéphane, Peter Sehr, Joe Lewis, Antoine Fortuné, Andrea Wolkerstorfer, Oliver Szolar, Delphine Guilligay, Thomas Lunardi, Jean-Luc Décout, and Stephen Cusack. 2013. “New 7-Methylguanine Derivatives Targeting the Influenza Polymerase PB2 Cap-Binding Domain.” *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (21): 8915–30. doi:10.1021/jm401369y.

Perez, Mar, Rebecca C. Craven, and C. Juan. 2003. “The Small RING Finger Protein Z Drives Arenavirus Budding: Implications for Antiviral Strategies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (22): 12978–83.

Persaud, Avinash, and Daniela Rotin. 2011. “Use of Proteome Arrays to Globally Identify Substrates for E3 Ubiquitin Ligases.” In *Yeast Systems Biology*, edited by Juan I. Castrillo and Stephen G. Oliver, 759:215–24. Totowa, NJ: Humana Press. http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-173-4_13.

Pery, Erez, Ann Sheehy, N. Miranda Nebane, Vikas Misra, Marie K. Mankowski, Lynn Rasmussen, E. Lucile White, Roger G. Ptak, and Dana Gabuzda. 2015. “Redoxal, an Inhibitor of de Novo Pyrimidine Biosynthesis, Augments APOBEC3G Antiviral Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1.” *Virology* 484 (October): 276–87. doi:10.1016/j.virol.2015.06.014.

Pfleger, Kevin D G, Ruth M Seeber, and Karin A Eidne. 2006. “Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) for the Real-Time Detection of Protein-Protein Interactions.” *Nature Protocols* 1 (1): 337–45. doi:10.1038/nprot.2006.52.

Platta, Harald W., Hilde Abrahamsen, Sigrid B. Thoresen, and Harald Stenmark. 2012. “Nedd4-Dependent Lysine-11-Linked Polyubiquitination of the Tumour Suppressor Beclin 1.” *Biochemical Journal* 441 (1): 399–406. doi:10.1042/BJ20111424.

Ponterio, Eleonora, and Lucio Gnessi. 2015. “Adenovirus 36 and Obesity: An Overview.” *Viruses* 7 (7): 3719–40. doi:10.3390/v7072787.

Prigozhin, Daniil M., and Yorgo Modis. 2015. “Flunarizine Arrests Hepatitis C Virus Membrane Fusion.” *Hepatology*, September, n/a – n/a. doi:10.1002/hep.28224.

Puffer, Bridget A., Leslie J. Parent, John W. Wills, and Ronald C. Montelaro. 1997. “Equine Infectious Anemia Virus Utilizes a YXXL Motif within the Late Assembly Domain of the Gag p9 Protein.” *Journal of Virology* 71 (9): 6541–46.

Rauch, S., and J. Martin-Serrano. 2011. “Multiple Interactions between the ESCRT Machinery and Arrestin-Related Proteins: Implications for PPXY-Dependent Budding.” *Journal of Virology* 85 (7): 3546–56. doi:10.1128/JVI.02045-10.

Reddy, V. S., and G. R. Nemerow. 2014. “Structures and Organization of Adenovirus Cement Proteins Provide Insights into the Role of Capsid Maturation in Virus Entry and

Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (32): 11715–20. doi:10.1073/pnas.1408462111.

Rider, Todd H., Christina E. Zook, Tara L. Boettcher, Scott T. Wick, Jennifer S. Pancoast, and Benjamin D. Zusman. 2011. “Broad-Spectrum Antiviral Therapeutics.” *PLoS One* 6 (7): e22572.

Roberts, Michael M., Janice L. White, Markus G. Grutter, and Roger M. Burnett. 1986. “Three-Dimensional Structure of the Adenovirus Major Coat Protein Hexon.” *Science* 232 (4754): 1148–51.

Robinson, P. A. 2004. “Ubiquitin-Protein Ligases.” *Journal of Cell Science* 117 (22): 5191–94. doi:10.1242/jcs.01539.

Rodriguez, Eduardo, and Einar Everitt. 1996. “Adenovirus Uncoating and Nuclear Establishment Are Not Affected by Weak Base Amines.” *Journal of Virology* 70 (6): 3470–77.

Roelvink, Peter W., Alena Lizonova, Jennifer GM Lee, Yuan Li, Jeffrey M. Bergelson, Robert W. Finberg, Douglas E. Brough, Imre Kovesdi, and Thomas J. Wickham. 1998. “The Cocksackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F.” *Journal of Virology* 72 (10): 7909–15.

Ronzaud, Caroline, Dominique Loffing-Cueni, Pierrette Hausel, Anne Debonneville, Sumedha Ram Malsure, Nicole Fowler-Jaeger, Natasha A. Boase, et al. 2013. “Renal Tubular NEDD4-2 Deficiency Causes NCC-Mediated Salt-Dependent Hypertension.” *Journal of Clinical Investigation*, January. doi:10.1172/JCI61110.

Rosati, A, V Graziano, V De Laurenzi, M Pascale, and M C Turco. 2011. “BAG3: A Multifaceted Protein That Regulates Major Cell Pathways.” *Cell Death and Disease* 2 (4): e141. doi:10.1038/cddis.2011.24.

Rosati, Alessandra, Kamel Khalili, Satish L. Deshmane, Sujatha Radhakrishnan, Maria Pascale, M. Caterina Turco, and Liberato Marzullo. 2009. “BAG3 Protein Regulates Caspase-3 Activation in HIV-1-Infected Human Primary Microglial Cells.” *Journal of Cellular Physiology* 218 (2): 264–67. doi:10.1002/jcp.21604.

Rossignol, Jean-François. 2014. “Nitazoxanide: A First-in-Class Broad-Spectrum Antiviral Agent.” *Antiviral Research* 110 (October): 94–103. doi:10.1016/j.antiviral.2014.07.014.

Rost, M., S. Mann, C. Lambert, T. Doring, N. Thome, and R. Prange. 2006. “2-Adaptin, a Novel Ubiquitin-Interacting Adaptor, and Nedd4 Ubiquitin Ligase Control Hepatitis B Virus

Maturation.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (39): 29297–308. doi:10.1074/jbc.M603517200.

Roth, Charles M., and Sumati Sundaram. 2004. “Engineering Synthetic Vectors for Improved DNA Delivery: Insights from Intracellular Pathways.” *Annual Review of Biomedical Engineering* 6 (1): 397–426. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140203.

Saban, S. D., M. Silvestry, G. R. Nemerow, and P. L. Stewart. 2006. “Visualization of Helices in a 6-Angstrom Resolution Cryoelectron Microscopy Structure of Adenovirus Allows Refinement of Capsid Protein Assignments.” *Journal of Virology* 80 (24): 12049–59. doi:10.1128/JVI.01652-06.

Sabin, Albert B. 1955. “Behavior of Chimpanzee-Avirulent Poliomyelitis Viruses in Experimentally Infected Human Volunteers.” *The American Journal of the Medical Sciences* 230 (1): 1–8.

Saeed, Mohammad F., Andrey A. Kolokoltsov, Thomas Albrecht, and Robert A. Davey. 2010. “Cellular Entry of Ebola Virus Involves Uptake by a Macropinocytosis-Like Mechanism and Subsequent Trafficking through Early and Late Endosomes.” Edited by Christopher F. Basler. *PLoS Pathogens* 6 (9): e1001110. doi:10.1371/journal.ppat.1001110.

Sakurai, Akira, Jiro Yasuda, Hiroko Takano, Yuetsu Tanaka, Masanori Hatakeyama, and Hisatoshi Shida. 2004. “Regulation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Budding by Ubiquitin Ligase Nedd4.” *Microbes and Infection* 6 (2): 150–56. doi:10.1016/j.micinf.2003.10.011.

Sakurai, Yasuteru, Andrey A. Kolokoltsov, Cheng-Chang Chen, Michael W. Tidwell, William E. Bauta, Norbert Klugbauer, Christian Grimm, Christian Wahl-Schott, Martin Biel, and Robert A. Davey. 2015. “Two-Pore Channels Control Ebola Virus Host Cell Entry and Are Drug Targets for Disease Treatment.” *Science* 347 (6225): 995–98.

Samuel, C. E. 2001. “Antiviral Actions of Interferons.” *Clinical Microbiology Reviews* 14 (4): 778–809. doi:10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.

Sarwar, Uzma N., Laura Novik, Mary E. Enama, Sarah A. Plummer, Richard A. Koup, Martha C. Nason, Robert T. Bailer, et al. 2014. “Homologous Boosting with Adenoviral Serotype 5 HIV Vaccine (rAd5) Vector Can Boost Antibody Responses despite Preexisting Vector-Specific Immunity in a Randomized Phase I Clinical Trial.” <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0106240>.

Sautto, G. A., K. Wisskirchen, N. Clementi, M. Castelli, R. A. Diotti, J. Graf, M. Clementi, R. Burioni, U. Protzer, and N. Mancini. 2015. “Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Engineered T Cells Redirected against Hepatitis C Virus (HCV) E2 Glycoprotein.” *Gut*,

February. doi:10.1136/gutjnl-2014-308316.

Scheffner, Martin, and Sharad Kumar. 2014. "Mammalian HECT Ubiquitin-Protein Ligases: Biological and Pathophysiological Aspects." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (1): 61–74. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.024.

Scherer, Julian, and Richard B Vallee. 2011. "Adenovirus Recruits Dynein by an Evolutionary Novel Mechanism Involving Direct Binding to pH-Primed Hexon." *Viruses* 3 (12): 1417–31. doi:10.3390/v3081417.

Scherer, Julian, and Richard B. Vallee. 2015. "Conformational Changes in the Adenovirus Hexon Subunit Responsible for Regulating Cytoplasmic Dynein Recruitment." Edited by G. McFadden. *Journal of Virology* 89 (2): 1013–23. doi:10.1128/JVI.02889-14.

Schmitt, A. P., G. P. Leser, E. Morita, W. I. Sundquist, and R. A. Lamb. 2005. "Evidence for a New Viral Late-Domain Core Sequence, FPIV, Necessary for Budding of a Paramyxovirus." *Journal of Virology* 79 (5): 2988–97. doi:10.1128/JVI.79.5.2988-2997.2005.

Schormann, N., C. I. Sommers, M. N. Prichard, K. A. Keith, J. W. Noah, M. Nuth, R. P. Ricciardi, and D. Chattopadhyay. 2011. "Identification of Protein-Protein Interaction Inhibitors Targeting Vaccinia Virus Processivity Factor for Development of Antiviral Agents." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 5054–62. doi:10.1128/AAC.00278-11.

Schreiner, Sabrina, Ruben Martinez, Peter Groitl, Fabienne Rayne, Remi Vaillant, Peter Wimmer, Guillaume Bossis, et al. 2012. "Transcriptional Activation of the Adenoviral Genome Is Mediated by Capsid Protein VI." Edited by Michael Imperiale. *PLoS Pathogens* 8 (2): e1002549. doi:10.1371/journal.ppat.1002549.

Schreiner, S., P. Wimmer, H. Sirma, R. D. Everett, P. Blanchette, P. Groitl, and T. Dobner. 2010. "Proteasome-Dependent Degradation of Daxx by the Viral E1B-55K Protein in Human Adenovirus-Infected Cells." *Journal of Virology* 84 (14): 7029–38. doi:10.1128/JVI.00074-10.

Schubert, Ulrich, David E. Ott, Elena N. Chertova, Reinhold Welker, Uwe Tessmer, Michael F. Princiotta, Jack R. Bennink, Hans-Georg Kräusslich, and Jonathan W. Yewdell. 2000. "Proteasome Inhibition Interferes with Gag Polyprotein Processing, Release, and Maturation of HIV-1 and HIV-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 13057–62.

Schudt, Gordian, Olga Dolnik, Larissa Kolesnikova, Nadine Biedenkopf, Astrid Herwig, and Stephan Becker. 2015. "Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells." *Journal of*

Infectious Diseases 212 (suppl 2): S160–66. doi:10.1093/infdis/jiv083.

Sehr, P., M. Pawlita, and J. Lewis. 2007. “Evaluation of Different Glutathione S-Transferase-Tagged Protein Captures for Screening E6/E6AP Interaction Inhibitors Using AlphaScreen(R).” *Journal of Biomolecular Screening* 12 (4): 560–67. doi:10.1177/1087057107301246.

Sendrowski, Krzysztof. 2013. “Study of the Protective Effect of Calcium Channel Blockers against Neuronal Damage Induced by Glutamate in Cultured Hippocampal Neurons.” *Pharmacological Reports*.

Serrao, Erik, Zhong-Liang Xu, Bikash Debnath, Frauke Christ, Zeger Debyser, Ya-Qiu Long, and Nouri Neamati. 2013. “Discovery of a Novel 5-Carbonyl-1H-Imidazole-4-Carboxamide Class of Inhibitors of the HIV-1 integrase–LEDGF/p75 Interaction.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (19): 5963–72. doi:10.1016/j.bmc.2013.07.047.

Sette, Paola, Kunio Nagashima, Robert C. Piper, and Fadila Bouamr. 2013. “Ubiquitin Conjugation to Gag Is Essential for ESCRT-Mediated HIV-1 Budding.” *Retrovirology* 10 (1): 79.

Sharma, Deepika, Balasubramanian Narasimhan, Pradeep Kumar, Vikramjeet Judge, Rakesh Narang, Erik De Clercq, and Jan Balzarini. 2009. “Synthesis, Antimicrobial and Antiviral Evaluation of Substituted Imidazole Derivatives.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (6): 2347–53. doi:10.1016/j.ejmech.2008.08.010.

Shehu-Xhilaga, M., S. Ablan, D. G. Demirov, C. Chen, R. C. Montelaro, and E. O. Freed. 2004. “Late Domain-Dependent Inhibition of Equine Infectious Anemia Virus Budding.” *Journal of Virology* 78 (2): 724–32. doi:10.1128/JVI.78.2.724-732.2004.

Shingalapur, Ramya V., Kallappa M. Hosamani, and Rangappa S. Keri. 2009. “Synthesis and Evaluation of in Vitro Anti-Microbial and Anti-Tubercular Activity of 2-Styryl Benzimidazoles.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (10): 4244–48. doi:10.1016/j.ejmech.2009.05.021.

Silva-Ayala, D., T. Lopez, M. Gutierrez, N. Perrimon, S. Lopez, and C. F. Arias. 2013. “Genome-Wide RNAi Screen Reveals a Role for the ESCRT Complex in Rotavirus Cell Entry.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (25): 10270–75. doi:10.1073/pnas.1304932110.

Silvius, John R. 2003. “Role of Cholesterol in Lipid Raft Formation: Lessons from Lipid Model Systems.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610 (2): 174–83. doi:10.1016/S0005-2736(03)00016-6.

Snijder, Joost, Marco Benevento, Crystal L. Moyer, Vijay Reddy, Glen R. Nemerow, and

Albert J.R. Heck. 2014. "The Cleaved N-Terminus of pVI Binds Peripentonal Hexons in Mature Adenovirus." *Journal of Molecular Biology* 426 (9): 1971–79. doi:10.1016/j.jmb.2014.02.022.

Sorkina, T., M. Miranda, K. R. Dionne, B. R. Hoover, N. R. Zahniser, and A. Sorkin. 2006. "RNA Interference Screen Reveals an Essential Role of Nedd4-2 in Dopamine Transporter Ubiquitination and Endocytosis." *Journal of Neuroscience* 26 (31): 8195–8205. doi:10.1523/JNEUROSCI.1301-06.2006.

Staub, O. 2006. "Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport." *Physiological Reviews* 86 (2): 669–707. doi:10.1152/physrev.00020.2005.

Staub, Olivier, Sascha Dho, P. Henry, Judy Correa, Toru Ishikawa, Jane McGlade, and D. Rotin. 1996. "WW Domains of Nedd4 Bind to the Proline-Rich PY Motifs in the Epithelial Na⁺ Channel Deleted in Liddle's Syndrome." *The EMBO Journal* 15 (10): 2371.

Stewart, Phoebe L., Stephen D. Fuller, and R. M. Burnett. 1993. "Difference Imaging of Adenovirus: Bridging the Resolution Gap between X-Ray Crystallography and Electron Microscopy." *The EMBO Journal* 12 (7): 2589.

Strack, Bettina, Arianna Calistri, Stewart Craig, Elena Popova, and Heinrich G. Göttinger. 2003. "AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding." *Cell* 114 (6): 689–99.

Stringer, Daniel K., and Robert C. Piper. 2011. "Terminating Protein Ubiquitination: Hasta La Vista, Ubiquitin." *Cell Cycle* 10 (18): 3067–71. doi:10.4161/cc.10.18.17191.

Strunze, Sten, Martin F. Engelke, I-Hsuan Wang, Daniel Puntener, Karin Boucke, Sibylle Schleich, Michael Way, Philipp Schoenenberger, Christoph J. Burckhardt, and Urs F. Greber. 2011. "Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection." *Cell Host & Microbe* 10 (3): 210–23. doi:10.1016/j.chom.2011.08.010.

Strunze, Sten, Lloyd C. Trotman, Karin Boucke, and Urs F. Greber. 2005. "Nuclear Targeting of Adenovirus Type 2 Requires CRM1-Mediated Nuclear Export." *Molecular Biology of the Cell* 16 (6): 2999–3009.

Tapia, V. E., E. Nicolaescu, C. B. McDonald, V. Musi, T. Oka, Y. Inayoshi, A. C. Satteson, et al. 2010. "Y65C Missense Mutation in the WW Domain of the Golabi-Ito-Hall Syndrome Protein PQBP1 Affects Its Binding Activity and Deregulates Pre-mRNA Splicing." *Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 19391–401. doi:10.1074/jbc.M109.084525.

Timmins, Joanna, Guy Schoehn, Sylvie Ricard-Blum, Sandra Scianimanico, Thierry Vernet, Rob W.H. Ruigrok, and Winfried Weissenhorn. 2003. "Ebola Virus Matrix Protein

VP40 Interaction with Human Cellular Factors Tsg101 and Nedd4.” *Journal of Molecular Biology* 326 (2): 493–502. doi:10.1016/S0022-2836(02)01406-7.

Tintori, Cristina, Jonas Demeulemeester, Luigi Franchi, Silvio Massa, Zeger Debyser, Frauke Christ, and Maurizio Botta. 2012. “Discovery of Small Molecule HIV-1 Integrase Dimerization Inhibitors.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (9): 3109–14. doi:10.1016/j.bmcl.2012.03.064.

Tollefson, Ann E., Jan S. Ryerse, Abraham Scaria, Terry W. Hermiston, And William Sm Wold. 1996. “The E3-11.6-kDa Adenovirus Death Protein (ADP) Is Required for Efficient Cell Death: Characterization of Cells Infected withadpMutants.” *Virology* 220 (1): 152–62.

Trinh, H. V., G. Lesage, V. Chennampampil, B. Vollenweider, C. J. Burckhardt, S. Schauer, M. Havenga, U. F. Greber, and S. Hemmi. 2012. “Avidity Binding of Human Adenovirus Serotypes 3 and 7 to the Membrane Cofactor CD46 Triggers Infection.” *Journal of Virology* 86 (3): 1623–37. doi:10.1128/JVI.06181-11.

Trotman, Lloyd C., Nicole Mosberger, Maarten Fornerod, Robert P. Stidwill, and Urs F. Greber. 2001. “Import of Adenovirus DNA Involves the Nuclear Pore Complex Receptor CAN/Nup214 and Histone H1.” *Nature Cell Biology* 3 (12): 1092–1100.

Trovato, Maria. 2015. “Novel Antigen Delivery Systems.” *World Journal of Virology* 4 (3): 156. doi:10.5501/wjv.v4.i3.156.

Ullman, Edwin F., Hrair Kirakossian, Sharat Singh, Z. Ping Wu, Benjamin R. Irvin, John S. Pease, Arthur C. Switchenko, Jennifer D. Irvine, Alan Dafforn, and Carl N. Skold. 1994. “Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay: Measurement of Particle Binding Kinetics by Chemiluminescence.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (12): 5426–30.

Urata, S., and J. Yasuda. 2010. “Regulation of Marburg Virus (MARV) Budding by Nedd4.1: A Different WW Domain of Nedd4.1 Is Critical for Binding to MARV and Ebola Virus VP40.” *Journal of General Virology* 91 (1): 228–34. doi:10.1099/vir.0.015495-0.

Urbanowski, Jennifer L., and Robert C. Piper. 2001. “Ubiquitin Sorts Proteins into the Intralumenal Degradative Compartment of the Late-Endosome/vacuole.” *Traffic* 2 (9): 622–30.

Usami, Yoshiko, Sergei Popov, Elena Popova, Michio Inoue, Winfried Weissenhorn, and Heinrich G. Göttlinger. 2009. “The ESCRT Pathway and HIV-1 Budding: Figure 1.” *Biochemical Society Transactions* 37 (1): 181–84. doi:10.1042/BST0370181.

Ushijima, Yoko, Chenhong Luo, Maki Kamakura, Fumi Goshima, Hiroshi Kimura, and Yukihiro Nishiyama. 2010. “Herpes Simplex Virus UL56 Interacts with and Regulates the Nedd4-Family Ubiquitin Ligase Itch.” *Virol J* 7: 179.

Van Campenhout, Claude A., Andrea Eitelhuber, Christian J. Gloeckner, Patrizia Giallonardo, Moritz Gegg, Heide Oller, Seth G.N. Grant, Daniel Krappmann, Marius Ueffing, and Heiko Lickert. 2011. "Dlg3 Trafficking and Apical Tight Junction Formation Is Regulated by Nedd4 and Nedd4-2 E3 Ubiquitin Ligases." *Developmental Cell* 21 (3): 479–91. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.003.

VerPlank, Lynn, Fadila Bouamr, Tracy J. LaGrassa, Beth Agresta, Alexandra Kikonyogo, Jonathan Leis, and Carol A. Carter. 2001. "Tsg101, a Homologue of Ubiquitin-Conjugating (E2) Enzymes, Binds the L Domain in HIV Type 1 Pr55Gag." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (14): 7724–29.

Vogt, Volker M. 2000. "Ubiquitin in Retrovirus Assembly: Actor or Bystander?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 12945–47.

Votteler, Jörg, and Wesley I. Sundquist. 2013. "Virus Budding and the ESCRT Pathway." *Cell Host & Microbe* 14 (3): 232–41. doi:10.1016/j.chom.2013.08.012.

Wagstaff, K. M., S. M. Rawlinson, A. C. Hearps, and D. A. Jans. 2011. "An AlphaScreen(R)-Based Assay for High-Throughput Screening for Specific Inhibitors of Nuclear Import." *Journal of Biomolecular Screening* 16 (2): 192–200. doi:10.1177/1087057110390360.

Walters, Robert W., Paul Freimuth, Thomas O. Moninger, Ingrid Ganske, Joseph Zabner, and Michael J. Welsh. 2002. "Adenovirus Fiber Disrupts CAR-Mediated Intercellular Adhesion Allowing Virus Escape." *Cell* 110 (6): 789–99.

Walters, W. Patrick, and Mark Namchuk. 2003. "A Guide to Drug Discovery: Designing Screens: How to Make Your Hits a Hit." *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (4): 259–66. doi:10.1038/nrd1063.

Wang, H., N. J. Machesky, and L. M. Mansky. 2004. "Both the PPPY and PTAP Motifs Are Involved in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Release." *Journal of Virology* 78 (3): 1503–12. doi:10.1128/JVI.78.3.1503-1512.2004.

Wang, Hongjie, Zong-Yi Li, Ying Liu, Jonas Persson, Ines Beyer, Thomas Möller, Dilara Koyuncu, et al. 2011. "Desmoglein 2 Is a Receptor for Adenovirus Serotypes 3, 7, 11 and 14." *Nature Medicine* 17 (1): 96–104. doi:10.1038/nm.2270.

Wang, J., Q. Peng, Q. Lin, C. Childress, D. Carey, and W. Yang. 2010. "Calcium Activates Nedd4 E3 Ubiquitin Ligases by Releasing the C2 Domain-Mediated Auto-Inhibition." *Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 12279–88. doi:10.1074/jbc.M109.086405.

Webster, Ailsa, Ian R. Leith, and Ronald T. Hay. 1994. "Activation of Adenovirus-Coded

Protease and Processing of Preterminal Protein.” *Journal of Virology* 68 (11): 7292–7300.

Weiss, Eric R., Elena Popova, Hikaru Yamanaka, Hyung Cheol Kim, Jon M. Huibregtse, and Heinrich Göttlinger. 2010. “Rescue of HIV-1 Release by Targeting Widely Divergent NEDD4-Type Ubiquitin Ligases and Isolated Catalytic HECT Domains to Gag.” Edited by Thomas J. Hope. *PLoS Pathogens* 6 (9): e1001107. doi:10.1371/journal.ppat.1001107.

Welchman, Rebecca L., Colin Gordon, and R. John Mayer. 2005. “Ubiquitin and Ubiquitin-like Proteins as Multifunctional Signals.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (8): 599–609. doi:10.1038/nrm1700.

Wickham, Thomas J. 1993. “Integrins avb3 and avb5 Promote Adenovirus Internalization but Not Virus Attachment.” *Cell*.

Wierzbicki, Anthony S. 2003. “Imidazole Derivatives as Cholesterol-Lowering Agents.” *International Journal of Cardiology* 90 (2): 145–46.

Wiethoff, Christopher M., and Glen R. Nemerow. 2015. “Adenovirus Membrane Penetration: Tickling the Tail of a Sleeping Dragon.” *Virology* 479-480 (May): 591–99. doi:10.1016/j.virol.2015.03.006.

Wiethoff, C. M., H. Wodrich, L. Gerace, and G. R. Nemerow. 2005. “Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption Following Capsid Disassembly.” *Journal of Virology* 79 (4): 1992–2000. doi:10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005.

Wilkinson, Keith D. 1997. “Regulation of Ubiquitin-Dependent Processes by Deubiquitinating Enzymes.” *The FASEB Journal* 11 (14): 1245–56.

Wirblich, C., B. Bhattacharya, and P. Roy. 2006. “Nonstructural Protein 3 of Bluetongue Virus Assists Virus Release by Recruiting ESCRT-I Protein Tsg101.” *Journal of Virology* 80 (1): 460–73. doi:10.1128/JVI.80.1.460-473.2006.

Wodrich, Harald, Tinglu Guan, Gino Cingolani, Dan Von Seggern, Glen Nemerow, and Larry Gerace. 2003. “Switch from Capsid Protein Import to Adenovirus Assembly by Cleavage of Nuclear Transport Signals.” *The EMBO Journal* 22 (23): 6245–55.

Wodrich, Harald, Daniel Henaff, Baptist Jammart, Carolina Segura-Morales, Sigrid Seelmeir, Olivier Coux, Zsolt Ruzsics, Christopher M. Wiethoff, and Eric J. Kremer. 2010. “A Capsid-Encoded PPxY-Motif Facilitates Adenovirus Entry.” Edited by Ronald N. Harty. *PLoS Pathogens* 6 (3): e1000808. doi:10.1371/journal.ppat.1000808.

Wodrich, H., A. Cassany, M. A. D’Angelo, T. Guan, G. Nemerow, and L. Gerace. 2006. “Adenovirus Core Protein pVII Is Translocated into the Nucleus by Multiple Import Receptor Pathways.” *Journal of Virology* 80 (19): 9608–18. doi:10.1128/JVI.00850-06.

Wold, William SM, and Karoly Toth. 2015. “New Drug on the Horizon for Treating

Adenovirus.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, no. ahead-of-print: 1–5.

Wu, Wenxin, J. Leland Booth, K. Mark Coggeshall, and Jordan P. Metcalf. 2006. “Calcium-Dependent Viral Internalization Is Required for Adenovirus Type 7 Induction of IL-8 Protein.” *Virology* 355 (1): 18–29. doi:10.1016/j.virol.2006.07.001.

Xu, Xiao-Hong Nancy, Zhaoyang Wen, and William J. Brownlow. 2013. “Ultrasensitive Analysis of Binding Affinity of HIV Receptor and Neutralizing Antibodies Using Solution-Phase Electrochemiluminescence Assay.” *Journal of Electroanalytical Chemistry* 688 (January): 53–60. doi:10.1016/j.jelechem.2012.08.004.

Yuan, Bing. 1999. “Mutations Altering the Moloney Murine Leukemia Virus p12 Gag Protein Affect Virion Production and Early Events of the Virus Cycle.” *The EMBO Journal*.

Yang, Baoli, Denise L Gay, Megan K L MacLeod, Xiao Cao, Tamara Hala, Eileen M Sweezer, John Kappler, Philippa Marrack, and Paula M Oliver. 2008. “Nedd4 Augments the Adaptive Immune Response by Promoting Ubiquitin-Mediated Degradation of Cbl-B in Activated T Cells.” *Nature Immunology* 9 (12): 1356–63. doi:10.1038/ni.1670.

Yang, B, and S Kumar. 2010. “Nedd4 and Nedd4-2: Closely Related Ubiquitin-Protein Ligases with Distinct Physiological Functions.” *Cell Death and Differentiation* 17 (1): 68–77. doi:10.1038/cdd.2009.84.

Yang, Penghui, Tieling Li, Na Liu, Hongjing Gu, Lina Han, Peirui Zhang, Zhiwei Li, Zhaohai Wang, Shaogeng Zhang, and Xiliang Wang. 2015. “Recombinant Influenza Virus Carrying Human Adenovirus Epitopes Elicits Protective Immunity in Mice.” *Antiviral Research* 121 (September): 145–51. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.015.

Yasuda, Jiro. 2002. “Functional Involvement of a Novel Nedd4-like Ubiquitin Ligase on Retrovirus Budding.” *EMBO reports*.

Yasuda, Jiro, and Eric Hunter. 1998. “A Proline-Rich Motif (PPPY) in the Gag Polyprotein of Mason-Pfizer Monkey Virus Plays a Maturation-Independent Role in Virion Release.” *Journal of Virology* 72 (5): 4095–4103.

Yasuda, J., M. Nakao, Y. Kawaoka, and H. Shida. 2003. “Nedd4 Regulates Egress of Ebola Virus-Like Particles from Host Cells.” *Journal of Virology* 77 (18): 9987–92. doi:10.1128/JVI.77.18.9987-9992.2003.

Ye, Qing, Lan-Yun Yan, Liu-Jun Xue, Qiang Wang, Zhi-Kui Zhou, Hiang Xiao, and Qi Wan. 2011. “Flunarizine Blocks Voltage-Gated Na⁺ and Ca²⁺ Currents in Cultured Rat Cortical Neurons: A Possible Locus of Action in the Prevention of Migraine.” *Neuroscience Letters* 487 (3): 394–99. doi:10.1016/j.neulet.2010.10.064.

Ye, Wen, Ranyi Liu, Changchuan Pan, Wenqi Jiang, Li Zhang, Zhongzhen Guan,

Jiangxue Wu, et al. 2014. “Multicenter Randomized Phase II Clinical Trial of a Recombinant Human Endostatin Adenovirus in Patients with Advanced Head and Neck Carcinoma.” *Molecular Therapy*, March. doi:10.1038/mt.2014.53.

Young, P., E. Anderton, K. Paschos, R. White, and M. J. Allday. 2008. “Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA) 3A Induces the Expression of and Interacts with a Subset of Chaperones and Co-Chaperones.” *Journal of General Virology* 89 (4): 866–77. doi:10.1099/vir.0.83414-0.

Yuan, Bing, Stephen Campbell, Eran Bacharach, Alan Rein, and Stephen P. Goff. 2000. “Infectivity of Moloney Murine Leukemia Virus Defective in Late Assembly Events Is Restored by Late Assembly Domains of Other Retroviruses.” *Journal of Virology* 74 (16): 7250–60.

Zhadina, Maria, and Paul D. Bieniasz. 2010. “Functional Interchangeability of Late Domains, Late Domain Cofactors and Ubiquitin in Viral Budding.” Edited by Michael Emerman. *PLoS Pathogens* 6 (10): e1001153. doi:10.1371/journal.ppat.1001153.

Zhadina, Maria, Myra O. McClure, Marc C. Johnson, and Paul D. Bieniasz. 2007. “Ubiquitin-Dependent Virus Particle Budding without Viral Protein Ubiquitination.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (50): 20031–36.

Zhai, Q., M. B. Landesman, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 2011. “Identification and Structural Characterization of the ALIX-Binding Late Domains of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 and SIVagmTan-1.” *Journal of Virology* 85 (1): 632–37. doi:10.1128/JVI.01683-10.

Zhang, J.-H. 1999. “A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.” *Journal of Biomolecular Screening* 4 (2): 67–73. doi:10.1177/108705719900400206.

Zhang, L., Z. P. Zhang, X. E. Zhang, F. S. Lin, and F. Ge. 2010. “Quantitative Proteomics Analysis Reveals BAG3 as a Potential Target To Suppress Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication.” *Journal of Virology* 84 (12): 6050–59. doi:10.1128/JVI.00213-10.

Zhang, W., T. Na, G. Wu, H. Jing, and J.-B. Peng. 2010. “Down-Regulation of Intestinal Apical Calcium Entry Channel TRPV6 by Ubiquitin E3 Ligase Nedd4-2.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (47): 36586–96. doi:10.1074/jbc.M110.175968.

Zhou, Yan, and Nancy J Sullivan. 2015. “Immunology and Evolvement of the Adenovirus Prime, MVA Boost Ebola Virus Vaccine.” *Current Opinion in Immunology* 35 (August): 131–36. doi:10.1016/j.coi.2015.06.006.

Zhou, Yubin, Teryl K. Frey, and Jenny J. Yang. 2009. "Viral Calciomics: Interplays between Ca²⁺ and Virus." *Cell Calcium* 46 (1): 1–17. doi:10.1016/j.ceca.2009.05.005.

Zhu, Jun-Da, Wen Meng, Xiao-Jia Wang, and Hwa-Chain R. Wang. 2015. "Broad-Spectrum Antiviral Agents." *Frontiers in Microbiology* 6 (May). doi:10.3389/fmicb.2015.00517.

ANNEXES

ANNEXE 1: Liste des virus, abréviations et pathologies associées.

ANNEXE 2: Protocole détaillé de la mise en place du criblage à haut débit d'inhibiteurs de l'IPP virus/hôte: His-VI-wt/GST-Nedd4-2 avec la technique d'AlphaScreen[®].

ANNEXE 3: IC50 des 11 composés candidats inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen.

ANNEXE 4: Structure chimiques des antifongiques de la banque « Prestwick Chemical ».

ANNEXE 5: Les différentes sortes de dérivés imidazolés.

ANNEXE 6 : Manuscrit de l'article soumis dans PNAS en Mai 2015

ANNEXE 1: Liste des virus, abréviations et pathologies associées.

| Famille | Acide nucléique * | Genre | Espèce | Abrév. | Maladie provoquée | Hôte |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Adenoviridae</i> | ADN db | Mastadénovirus | Adénovirus | HAdV | Respiratoire, gastro-intestinale, conjonctivite | Homme |
| <i>Arenaviridae</i> | ARN (-) sb | Arenavirus | Virus de la chorioméninhte lymphocytaire | LCV | Encéphalite | Homme, rongeurs |
| <i>Arenaviridae</i> | ARN (-) sb | Arenavirus | Virus de la fièvre de Lassa | | Fièvre hémorragique | Homme, rongeurs |
| <i>Arteriviridae</i> | ARN (+) sb | Arterivirus | Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin | PRRSV | Respiratoire | Porcs |
| <i>Coronaviridae</i> | ARN (+) sb | Coronavirus | Virus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient | MERS | Respiratoire | Homme, chauve-souris |
| <i>Coronaviridae</i> | ARN (+) sb | Betacoronavirus | Virus du syndrome respiratoire aigu sévère | SARS | Respiratoire | Homme, civette |
| <i>Filoviridae</i> | ARN (-) sb | Ebolavirus | Virus Ebola | EBoV | Fièvre hémorragique | Homme, singes, chauve-souris |
| <i>Filoviridae</i> | ARN (-) sb | Marburgvirus | Virus de Marburg | MARV | Fièvre hémorragique | Homme, singes, chauve-souris |
| <i>Flaviviridae</i> | ARN (+) sb | Hepacivirus | Virus de l'hépatite C | HCV | Hépatite | Homme |
| <i>Flaviviridae</i> | ARN (+) sb | Flavivirus | Virus du Nil occidental | | Fièvre hémorragique | Homme, oiseaux, tics, moustiques |
| <i>Flaviviridae</i> | ARN (+) sb | Flavivirus | Virus de la Dengue | | Fièvre hémorragique | Homme, moustiques |
| <i>Flaviviridae</i> | ARN (+) sb | Flavivirus | Virus de la fièvre jaune | | Fièvre hémorragique | Homme, singes, moustiques |
| <i>Flaviviridae</i> | ARN (+) sb | Flavivirus | Virus de l'encéphalite japonaise | | Encéphalite | Homme, cheval, oiseaux, moustiques |
| <i>Hepadnaviridae</i> | ADN (TI) db | Orthohepadnavirus | Virus de l'hépatite B | HBC | Hépatite | Homme, chimpanzés |
| <i>Herpesviridae</i> | ADN db | Lymphocryptovirus | Virus Epstein-Barr ou Herpes virus de type 4 | EBV ou HHV4 | Mononucléose | Homme |
| <i>Herpesviridae</i> | ADN db | Cytomégalovirus | Cytomégalovirus humain | CMV | Mononucléose, pneumonie | Homme |
| <i>Herpesviridae</i> | ADN db | Roseolovirus | Herpes virus de type 6 | HHV6 | Lésion de la peau | Homme |
| <i>Orthomyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Influenzavirus A | Influenzavirus A | | Grippe | Homme, oiseaux, porcs |
| <i>Papillomaviridae</i> | ADN db | | Papillomavirus humain | HPV | Cancer | Homme |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Morbillivirus | Virus de la rougeole | | Rougeole, fièvre, RACH | Homme |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Rubulavirus | Virus des oreillons | | Oreillons | Homme |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Respirovirus | Parainfluenza virus de type 5 | SV5 | Respiratoire | Singes |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Rubulavirus | Virus de Newcastle | | Pneumo-encéphalite | Oiseaux |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Henipavirus | Virus de l'Hendra | | Encéphalite | Homme, cheval, chauve-souris |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Henipavirus | Virus de Nipah | | Encéphalite | Homme, chauve-souris |
| <i>Paramyxoviridae</i> | ARN (-) sb | Pneumovirus | Virus respiratoire syncytial | | Respiratoire | Homme |
| <i>Picornaviridae</i> | ARN (+) sb | Enterovirus | Poliovirus | | Poliomyélite | Homme |
| <i>Picornaviridae</i> | ARN (+) sb | Enterovirus | Virus Cocksackie | | Méningite, Myocardite, paralysie | Homme |
| <i>Picornaviridae</i> | ARN (+) sb | Hepatovirus | Virus de l'hépatite A | HBA | Ictère, Hépatite | Homme |
| <i>Polyomaviridae</i> | ADN db | Polyomavirus | Polyomavirus de Merkel | MCV | Carcinome des cellules de Merkel | Homme |
| <i>Poxviridae</i> | ADN db | Orthopoxvirus | Virus de la vaccine | | Variole | Homme, Mammifères |

| <i>Famille</i> | Acide nucléique * | Genre | Espèce | Abrév. | Maladie provoquée | Hôte |
|----------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------------------|---------------|--------------------------|---------------------------------------|
| <i>Reoviridae</i> | ARN db | Orbivirus | Bluetongue virus | BTV | Fièvre catarrhale | Ruminants |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Lentivirus | Virus de l'immunodéficience humaine | VIH | SIDA | Homme |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Lentivirus | Virus de l'immunodéficience simien | SIV | SIDA | Singes |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Lentivirus | Virus de l'anémie infectieuse des équidés | EIAV | Anémie | Equidés |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Alpharetrovirus | Virus de la leucose Aviaire | ALV | Lymphome | Oiseaux, Mammifères |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Alpharetrovirus | Virus du sarcome de Rous | RSV | Sarcome | Oiseaux |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Betaretrovirus | Virus Mason-Pfizer du singe | M-PMV | | Singes |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Betaretrovirus | Virus de la tumeur mammaire de souris | MMTV | Cancer | Rongeurs |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Deltaretrovirus | Virus T-lymphotropique humain | HTLV | Leucémie | Homme |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Gammaretrovirus | Virus de la leucémie murine | MLV | Leucémie | Souris |
| <i>Retroviridae</i> | ARN (TI) sb | Spumavirus | Virus de Foamy | | | Homme, singes |
| <i>Rhabdoviridae</i> | ARN (-) sb | Lyssavirus | Virus de la rage | | Rage | Homme, Mammifères |
| <i>Rhabdoviridae</i> | ARN (-) sb | Vesiculovirus | Virus de la stomatite vésiculaire | VSV | Encéphalite | Homme, bétail, cheval, porcs, mouches |
| <i>Togaviridae</i> | ARN (+) sb | Rubivirus | Virus de la rubéole | | Rubéole | Homme |
| <i>Togaviridae</i> | ARN (+) sb | Alphavirus | Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne | VEE | Encéphalite | Equidé, moustiques |
| <i>Togaviridae</i> | ADN db | Alphavirus | Virus de Sindbis | | Fièvre hémorragique | Homme, oiseaux, moustiques |

* sb: simple brin, db: double brins, TI: transcriptase-inverse

ANNEXE 2: Protocole détaillé de la mise en place du criblage à haut débit d'inhibiteurs de l'IPP virus/hôte: His-VI-wt/GST-Nedd4-2 avec la technique d'AlphaScreen®.

Chapitre du livre « Methods in molecular biology.
SPRINGER Protocols. 'PROTEOSTASIS' »
à paraître durant l'été 2016.

Using AlphaScreen[®] to identify small molecule inhibitors targeting a conserved host-pathogen interaction

Sisley Austin, Saïd Taouji, Eric Chevet, Harald Wodrich and Fabienne Rayne

Abstract

AlphaScreen[®] is a technology particularly suitable for bi-molecular inhibitor screening assays e.g. using protein-protein-interactions with purified recombinant proteins. Each binding partner of the bi-molecular interaction is coupled either to donor or to acceptor beads. The technology is based on the quantifiable transfer of oxygen singlet from donor to acceptor microbeads brought together by a specific interaction between the partners. We identified the conserved interaction between WW-domains of cellular ubiquitin ligases of the Nedd4 family and a short peptide motif (PPxY) present in several structural and non-structural viral proteins as a potential drug target. Using an AlphaScreen assay recapitulating the interaction between Nedd4.2 and the PPxY motif of the adenoviral capsid protein VI, we screened a library of small molecules and identified specific inhibitors of this interaction.

Key words AlphaScreen[®], high-throughput, small molecule inhibitors, [LP]PxY motif, adenovirus, ubiquitin ligase Nedd4, antiviral, 384-well plate.

1. Introduction

Viruses infect host cells by several mechanisms but as obligate parasites in order to promote viral replication they must recruit and/or avoid certain cell signaling pathways (e.g. cell death or cell survival pathways). For this reason one can assume that some host-pathogen interactions are not restricted to a single virus family but could be rather common to several virus families. One such interaction, which we recently described, occurs between cellular ubiquitin ligases of the Nedd4 family and virus encoded short peptide motifs of the [LP]PxY type (where x can be any amino acid). [LP]PxY motifs bind to WW-domains, which are part of the N-terminal substrate recognition region used by Nedd4 ligases. [LP]PxY motifs are found in several structural and non-structural viral proteins [1, 2]. Most described functions for host-pathogen Nedd4 ⇔ [LP]PxY interactions contribute to egress of enveloped viruses by redirecting parts of the vesicular sorting machinery to viral exit sites [3, 4]. More recently a role for the Nedd4 ⇔ [LP]PxY interactions was also shown during entry of the non-enveloped adenovirus suggesting a broad range of functions for this interaction in the life cycle of many viruses [5]. Thus targeting this common viral-host interaction using small inhibitory compounds could potentially contribute to the development of antivirals with broad applicability.

Here we describe the detailed protocol for a miniaturized screening assay to identify small compound inhibitors able to block Nedd4 ⇔ [LP]PxY interactions. The

prototypic system is based on the interaction between the adenoviral capsid protein VI, which encodes for a conserved PPSY motif and the cellular ubiquitin ligase Nedd4. The adenoviral capsid protein VI is involved in membrane lysis and escape of the entering particle from the endosomal compartment to access microtubule-dependent trafficking toward the nucleus and activation of viral transcription. Adenoviruses encoding a protein VI mutant (termed mutant M1) with the PPSY motif mutated into PGAA fail to bind Nedd4 resulting in strongly reduced infectivity, an altered intracellular targeting and lack efficient gene-delivery [5, 6]. For the miniaturized screening system we chose to use the AlphaScreen® technology. Amplified luminescence proximity homogeneous assay (AlphaScreen®) is a bead-based non-radioactive and homogeneous detection technology, which allows assessing the interaction between biological partners. For the assay, the cellular GST-tagged protein Nedd4 and the viral poly-histidine-tagged protein VI (His-VI) were purified and coupled to glutathione donor beads and nickel acceptor beads, respectively (*see Note 1*). After excitation at 680 nm, the donor beads which contain a photo-sensitizer, phtalocyanine, emit an excited form of O₂ (singlet oxygen), which has a lifetime compatible with an approximate diffusion range of 200 nm in solution. In case of a protein-protein-interaction between the two partners, donor and acceptor beads are brought into <200 nm proximity and the transfer of energy from the donor to the acceptor beads containing thioxene derivatives leads to a cascade of chemiluminescence, resulting in the emission of light at 520-620 nm (Fig. 1). This energy transfer is proportional to the binding strength and can be quantified. As negative control of this interaction assay, we used the viral poly-histidine-tagged protein VI-M1 mutant, which does not bind to the Nedd4 protein.

The ideal inhibitory compound for host-pathogen interactions (e.g. to block the Nedd4 ⇌ [LP]PxY interaction) must exhibit high bioavailability and a low toxic profile. To increase the number of potential inhibitory compounds that adhere to these criteria we decided to screen the Prestwick chemical library composed of 1280 small compounds. They are 100% approved drugs (FDA, EMA and other agencies), which potentially could facilitate their use for antiviral applications.

In this chapter we describe a detailed hands-on protocol to perform an AlphaScreen®-based high-throughput inhibitor screening using a chemical library to identify inhibitors of a conserved viral-host interaction. Although this assay is specific for Nedd4 ⇌ [LP]PxY interaction, the step-by-step description with interaction assay, stoichiometry of the proteins, sensitivity and the calculation of assay performance, can be easily adapted to other kinds of bi-molecular interaction screens and should be considered as general guidelines.

2. Materials

2.1 Platform

The platform (www.bmyscreen.com) comprises:

1. An integrated and automated pipeline: JANUS® Mini liquid handler with a MDT dispensing head placed in line with a plate stacker.
2. A JANUS® robot containing an 8 pins head and a gripper.

3. An Envision® Multidetector Plate Reader.

2.2 Environment

1. For optimal performance, the manufacturer (PerkinElmer) recommends to avoid temperature variations in the room containing the microplate reader machine.

2. Because the beads are sensitive to light it is better to handle all reagents under low-light conditions.

2.3 Tools & reagents

1. Prestwick Chemical Library® (www.prestwickchemical.com) contains 1280 small molecules, 100% approved drugs (FDA, EMA and other agencies), in DMSO solution supplied at 10 mM in 96-well plate (15 plates in total).

2. Interaction buffer (I-Buffer): Phosphate Buffer Saline 1X pH 7.4, 0.1 % Bovine Serum Albumin, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM Dithiothreitol, 0.05 % Tween20.

3. DMSO solution as control (because it is the carrier for compounds).

4. Epitope tagged proteins of interest: His-VI-wt, His-VI-M1 mutant as negative control of interaction (*see Note 2*) and GST-Nedd4 (*see Note 3*).

5. A robotic liquid handler, such as JANUS® Mini liquid handler for the transfer of compounds between 96- and 384-well plates.

6. Pipette tips 200 µL Robot rack compatible and pipette tips 20 µL Robot rack compatible.

7. 96-well plates.

8. 384-well white opaque plates (*see Note 4*).

9. Plastic 384-well plate covers.

10. Adhesive plate seals.

11. Nickel Chelate AlphaLISA® Acceptor 45 Beads (PerkinElmer) (*see Note 5*).

12. AlphaScreen® Glutathione Donor beads (PerkinElmer) (*see Note 5*).

13. Vortex.

14. Low speed centrifuge.

15. Automatic monochannel pipette (*see Note 6*).

16. Incubator at 25°C.

17. Plate reader, such as Envision® Multidetector Plate Reader (*see Note 7*).

2.4 Storage

1. Purified tagged-proteins should be aliquoted, snap-frozen and stored at - 80°C for long-term storage in glycerol supplemented transport buffer (*see Note 3*). To avoid freeze-thaw cycles, aliquoted proteins were thawed the day of use and discarded (*see Note 8 and 9*).
2. Prestwick Chemical Library® supplied in DMSO at 10 mM concentration and stored at -20°C.
3. Beads should be stored at 4°C protected from light.

3. Methods

3.1 Characterization of the AlphaScreen® assay as model for a conserved host-pathogen interaction

For practical reasons the method section starts with a detailed description of the interaction assay (3.1.1). Prior to performing the screen one should determine the optimal stoichiometry (described in 3.1.2) of the binding partner, the assay sensitivity (described in 3.1.3) and the assay robustness (described in 3.1.4).

For each well of the 384-well opaque plate, the final volume for the reaction is 25 µL.

3.1.1 Interaction Assay

For this assay, each condition is performed in duplicate.

1. Using the automatic monochannel pipette or the robotic liquid handler distribute 10 µL of I-Buffer in 8 empty control wells and 5 µL of I-Buffer in 4 wells of a 384-well opaque plate.
2. Distribute 5 µL/well of purified histidine-tagged protein VI-wt protein (His-VI-wt) at 6.25 ng/µL (resulting in 31.25 ng/well, optimal quantity determined, *see section 3.1.2*) in 2 wells containing 10 µL of I-Buffer prepared at step 1 (to determine the background signal, Fig.2 Control 2) (*see Note 10*).
3. Distribute 5 µL/well of purified His-VI-wt protein at 6.25 ng/µL in 2 wells containing 5 µL of I-Buffer prepared at step 1 (*see Note 11*).
4. Distribute 5 µL/well of purified histidine-tagged protein VI-M1 mutant protein (His-VI-M1) at 6.25 ng/µL in 2 wells containing 10 µL of I-Buffer prepared at step 1 (to determine the background signal, Fig.2 Control 3).
5. Distribute 5 µL/well of purified His-VI-M1 protein at 6.25 ng/µL in 2 wells containing 5 µL of I-Buffer prepared at step 1.
6. Distribute 5 µL/well of purified GST-tagged Nedd4 protein (GST-Nedd4) at 20 ng/µL (resulting 125 ng/well, optimal quantity determined, *see section 3.1.2*) in 2 wells containing 10 µL of I-Buffer prepared at step 1 (to determine the background signal, Fig.2 Control 4).

7. Distribute 5 μL /well of purified GST-Nedd4 protein at 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in 2 wells prepared at step 3 (constitutes the duplicate positive control of the interaction, Fig.2 Control 5).
8. Distribute 5 μL /well of purified GST-Nedd4 protein at 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in 2 wells prepared at step 5 (constitutes the duplicate negative control of the interaction, Fig.2 Control 6) (*see Note 12*).
9. Cover the plate with a plastic 384-well plate cover.
11. Incubate the plate in the dark in the incubator at 25°C (*see Note 13*) during 30 min.
10. Add 5 μL /well of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of nickel chelate AlphaLISA® acceptor beads solution in all wells prepared at step 7 and 8 and in 2 wells containing 10 μL of I-Buffer prepared at step 1 (to determine the background signal, Fig.2 Control 1).
11. Add 5 μL /well of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of AlphaScreen® glutathione donor beads solution in all wells prepared at step 7, 8 and 10.
12. Cover the plate with adhesive seals.
13. Transfer all drops to the bottom of the wells by gently tapping the edges of the plate with your hand (*see Note 14*).
14. Incubate the plate in the dark in the incubator at 25°C during 1 h.
15. Read the luminescence of the plate at the EnVision® Multilabel Reader after 1 h, 4 h and 24 h (*see Note 15*) of incubation to determinate the absolute signal intensity and the stability of the signal over time (*see Note 16 and 17*) (Fig. 2).

3.1.2 Stoichiometry

For this assay, each condition is performed in duplicate.

We estimated the stoichiometry between both partners: His-VI-wt and GST-Nedd4 to find the optimal ratio between proteins to obtain an optimal interaction resulting in the best AlphaScreen® signal over noise ratio. This was achieved by defining the amount of one partner (GST-tagged Nedd4 protein) and increasing the amount of the second partner (His-protein VI-wt) at a fixed bead ratio (*see Note 18*).

1. Distribute 5 μL of I-Buffer in 10 wells of a 384-well opaque plate.
2. Add 5 μL /well of purified GST-Nedd4 protein at 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (10 pmol) in 10 wells of the 384-well containing 5 μL of I-Buffer.
3. Add 5 μL /well of a variable amount of purified His-VI-wt protein from 57 pmol to 3.5 pmol with a 1:2 serial dilution in I-Buffer; 2 wells with 57 pmol, 2 wells with 28.5 pmol, 2 wells with 14.25 pmol, 2 wells with 7.12 pmol and 2 wells with 3.5 pmol in the 10 wells prepared at step 2.
4. Follow the protocol for the *Interaction assay* (3.1.1) from step 9.

3.1.3 Sensitivity

For this assay, each condition is performed in duplicate.

After estimating the optimal stoichiometry we next estimate the sensitivity of interaction detection between His-VI-wt and GST-Nedd4 to determine the minimal quantity of protein that is necessary to obtain a robust AlphaScreen® signal.

1. Distribute 5 µL of I-Buffer in 14 wells of a 384-well opaque plate.
2. Add 5 µL/well of a variable amount of purified GST- Nedd4 protein from 10 pmol to 78 fmol with a 1:2 serial dilution; 2 wells with 10 pmol, 2 wells with 2.5 pmol, 2 wells with 1.25 pmol, 2 wells with 0.62 pmol, 2 wells with 0.31 pmol, 2 wells with 0.15 pmol and 2 wells with 78 fmol in the 14 wells of the 384-well containing I-Buffer.
3. Add 5 µL/well of a variable amount of purified His-VI-wt protein from 10 pmol to 78 fmol with a 1:2 serial dilution (maintaining the optimal stoichiometry between His-VI-wt and GST-Nedd4) in the 14 wells prepared at step 2.
4. Follow the protocol for the *Interaction assay (3.1.1)* from step 9.

3.1.4 Assay Robustness (Z prime value)

Assay robustness was confirmed through calculation of the Z' factor using 30 replicates. As described by Zhang et al [7], the Z' factor is a simple statistical parameter to evaluate the quality of the assay using data points obtained with the controls (*see Note 19*).

1. Distribute 5 µL of I-Buffer in a 60 wells of a 384-well opaque plate.
2. Distribute 5 µL/well of purified His-VI-wt protein at 6.25 ng/µL (resulting in 31.25 ng/well) in 30 wells of the 384-well opaque plate.
3. Distribute 5 µL/well of purified His-VI-M1 mutant protein at 6.25 ng/µL (in 31.25 ng /well) in 30 different wells of the 384-well opaque plate.
4. Distribute 5 µL/well of purified GST-Nedd4 protein at 20 ng/µL (resulting in 125 ng/well) in the 60 wells prepared at steps 2 and 3.
5. Follow the protocol of *Interaction assay (3.1.1)* from step 9.
6. Calculate the Z' factor (fig. 3) to determine the robustness of the assay.

$$Z' \text{ factor} = 1 - \frac{(3SD \text{ of positive control} + 3SD \text{ of negative control})}{|\text{mean of positive control} - \text{mean of negative control}|}$$

Fig. 3 Formula of the Z' factor; a statistical parameter for evaluation of AlphaScreen® assay.

3.2 Preparation of intermediate 96-well and final 384-well Prestwick library plates

1. Prestwick library compounds are supplied at 10 mM in 96-well plate (15 plates in total). Each plate contains 80 compounds, column 1 and 12 are empty.
2. The robot of the platform was programmed to first perform a dilution 1:100 (100 μ M) of each of the compounds into a new 96-well plate, called intermediate diluted Prestwick Library 96-well plates 1 to 15.
3. Then the robot dispenses 2.5 μ L of I-Buffer in each well of a 384-well opaque plate.
4. The robot adds 2.5 μ L of each compound from the intermediate diluted Prestwick Library 96-well plates 1 in corresponding wells containing I-Buffer of the 384-well plate (resulting compounds concentration 50 μ M) (Fig. 4).
5. The robot repeats the transfer with the intermediate diluted Prestwick Library 96-well plates 2, 3 and 4 to constitute the final Prestwick library 384-well plate A (intermediate diluted Prestwick Library 96-well plates 5 to 8 correspond to Prestwick library 384-well plate B etc). Finally, each well contains 5 μ L of one Prestwick library compound at 50 μ M (see **Note 20**) (Fig. 5).

3.3 Screening of the Prestwick library using AlphaScreen[®] assay

1. Using automatic monochannel pipette or the robotic liquid handler prepare control wells (see protocol for the *Interaction assay* (3.1.1) from step 1 to 8) in the 4 empty column on either side of the wells containing 50 μ M compounds.
2. Add 2.5 μ L of DMSO + 2.5 μ L of I-Buffer in 2 empty control wells of the final Prestwick library 384-well plate A.
3. Add 5 μ L/well of purified His-VI-wt protein at 6.25 ng/ μ L (resulting in 31.25 ng/well) in each well containing 50 μ M compounds or DMSO of the final Prestwick library 384-well plate A.
4. Add 5 μ L/well of purified GST-Nedd4 protein at 20 ng/ μ L (resulting in 125 ng/well) in each well containing 50 μ M compounds and DMSO of the final Prestwick library 384-well plate A.
5. Cover the plate with a plastic 384-well plate cover.
6. Incubate the plate on the dark in the incubator at 25°C during 30 min.
7. Add 5 μ L/well of 0.1 μ g/ μ L of nickel chelate AlphaLISA[®] acceptor beads solution in all wells (control and containing compound wells).
8. Add 5 μ L/well of 0.1 μ g/ μ L of AlphaScreen[®] glutathione donor beads solution in all wells (control and containing compound wells). Finally, each well contains 25 μ L of a mix containing one Prestwick library compound at 10 μ M, the partner proteins and beads (see **Note 20**).
9. Cover the plate with adhesive seals.
10. Transfer all drops to the bottom of the wells by gently tapping the edges of the plate with your hand.

11. Incubate the plate in the dark in the incubator at 25°C during 1 h.
12. Read the luminescence of the plate at the EnVision® Multilabel Reader after 1 h, 4 h and 24 h (*see Note 15*) of incubation to determinate the absolute signal intensity and the stability of the signal over time (*see Note 16 and 17*) (Fig. 6).
13. Restart the protocol at step 1 with the final Prestwick library 384-well plates B, C and D to screen all compounds from the Prestwick Chemical library.

3.4 Data analysis and identification of inhibitors targeting a conserved host-pathogen interaction

1. For each plate, determine the background value (Fig. 2, Controls 1, 2, 3 and 4).
2. For each well with individual compound, subtract the mean background value from the luminescence value obtained with optimal conditions.
3. Determine the suitable cut off for a significant inhibition of the AlphaScreen® signal. Here we choose [mean - (3 x Standard Deviation)] to select all compounds which inhibit 80% of the interaction.
4. Because of the properties of AlphaScreen®, compounds that stimulate or stabilize the interaction can also be identified.
5. Remove all false positive inhibitors using the AlphaScreen® TruHits kit (PerkinElmer) assay (*see section 3.5* for the protocol).
6. Determine the IC₅₀ (inhibitory concentration of inhibitors necessary to inhibit 50% of the interaction) in AlphaScreen® using a variable concentration range of identified compound.

3.5 AlphaScreen® TruHits assays

To exclude false positive compounds, a counter screen was carried out using the AlphaScreen® TruHits kit (PerkinElmer). This kit assay permits to identify false positive compounds of the screen. These compounds could be color quenchers, singlet oxygen quenchers or light scatterers while blue compounds could act as inner filters. This assay is based on streptavidin donor beads and biotinylated acceptor beads resulting in a robust interaction between beads and the emission of strong constitutive AlphaScreen® signal. All compounds, which interfere with this signal, are considered as false positives.

1. According to the manufacturer indications (PerkinElmer), add 20 µL of the TruHits kit bead premix (pre-incubated 30 min at room temperature) into wells of a 384-well opaque plate.
2. Add 5 µL of the 50 µM selected compound solution take from each intermediate diluted Prestwick Library 96-well plates 1 to 15
3. Add 5 µL of DMSO or interaction buffer as control in different wells.
4. Cover the plate with adhesive seals.

5. Incubate the plate 10 min at room temperature.
 6. Read the luminescence of the plate at the EnVision® Multilabel Reader.
-

4. Notes

1. PerkinElmer offers different types of beads including streptavidin-coated beads, protein A-conjugated beads or antibody-conjugated beads which permit the analysis of a large range of interactors.
2. The protein VI M1 mutant is not able to interact with the Nedd4 [5] protein and is used here as our negative control for the interaction. An alternative for histidine-tagged proteins and nickel acceptor beads would be to use imidazole as negative control to elute protein VI from the acceptor bead and inhibit the interaction. The amount of imidazole necessary to inhibit the interaction in our AlphaScreen® conditions was > 10 mM.
3. AlphaScreen® assays are performed in white opaque plates to maximize signal intensity.
4. After purification, we dialyzed the proteins into glycerol supplemented buffer (110 mM potassium acetate, mM magnesium acetate, 2 mM DTT, 20 mM Hepes pH 7.3, 10 % glycerol) for storage and subsequent use. This buffer does not interfere with the assay signal. Alternative buffers should be tested for their compatibility with the AlphaScreen® assay.
5. It is recommended to resuspend beads by vortexing or pipetting before usage and briefly centrifuge them to avoid loss of reagent.
6. If no robot can be used, it is recommended to use an automatic monochannel pipette for sampling to minimize pipetting errors. This permits a quick, consistent, accurate and homogeneous manual distribution of proteins and beads.
7. The manufacturer (PerkinElmer) recommends the use of the EnVision™ Multilabel Plate Reader of to measure the AlphaScreen® signal. However, other readers can be used as well (e.g. EnSpire™ Alpha, AlphaPLUS).
8. Aliquots containing too small volume of protein solution (e.g. < 10 µL) tend to deteriorate due to rapid changes of concentration associated with evaporation.
9. We noticed that repeated freeze-thaw cycles for purified protein aliquots result in signal decrease (e.g. 3 cycles reduce the AlphaScreen® signal >10-fold compared to freshly thawed aliquots).
10. As recommended by PerkinElmer in “A Practical Guide to working with AlphaScreen®”, the amount of blocking agent (BSA) or detergent (Tween20) in I-buffer can be optimized to avoid high background signals.
11. The ideal signal is in the range of 10⁵ luminescence units to prevent masking weak compound effects on the interaction.

12. A signal for a true negative control of the interaction (here the GST-Nedd4 and the His-protein VI-M1 mutant) should be similar to the background signal obtained with each partner or beads alone.
13. The chemistry of AlphaScreen® reaction was designed to give best results at room temperature (ex.: 20–25°C).
14. Brief plate centrifugation is an alternative to collect all solution drops at the bottom of the well.
15. As described by PerkinElmer in “A Practical Guide to working with AlphaScreen®”, the beads should not be excited more than 2-3 times allowing to read the plate (e.g. at 1 h and 24 h after the incubation) without changes in the signal intensity if the interaction is stable over time.
16. It is important to determinate the optimal incubation time to obtain a suitable signal. In our experiment the bead association reaction equilibrated at about 1 h of incubation. However, some compounds could be eliminated due to value fluctuations when read at 4 h post-incubation.
17. We could observe a signal decrease of the entire plate after 24 h incubation compared to 1 h or 4 h post-incubation suggesting that the best time point for readout has to be individually estimated.
18. As reported by the manufacturer, most AlphaScreen® assays will utilize partner concentration at 0.1 nM–300 nM. We fixed the amount of one partner (the GST-Nedd4 purified protein) to 10 pmol and varied the amount of the second partner (His-protein VI-wt purified protein) starting with a 6:1 ratio and performing serial dilutions to reach a 0.5:1 ratio. This range should be individually adapted when using different proteins.
19. The Z' factor is a statistical parameter for evaluation of high-throughput assay [7]. Z' values are calculated from the measurement of > 30 replicates of each positive and negative controls of interaction. A value equal to 1 is considered an ideal screening assay, when $1 > Z' > 0.5$ the assay is considered of excellent screening quality while $Z' < 0.5$ indicates strong sample and control signal variations not compatible with reliable screening conditions.
20. Prestwick library compounds are supplied at 10 mM in 14 x 96-well plates. It is recommended to test the compounds at 10 μ M final concentration. Thus, we performed a first intermediate library plate at 100 μ M and distribute 2.5 μ L of this compound solution in the corresponding well of the 384-well plate. In each well, the final volume is 25 μ L, resulting in compound concentration of 10 μ M.

Acknowledgments

The work described in this protocol was supported by a PEPS IDEX grant of the Excellent initiative between the CNRS and Bordeaux University. S.A received a

fellowship from the Direction Générale de l'Armement (DGA). We acknowledge the support from the SFR TransBIOmed in buying the compound library.

References

1. Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W et al (2005) HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* 168(1):89-101.
2. Harty RN, Paragas J, Sudol M et al (1999) A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol* 73(4):2921-9.
3. Bieniasz PD (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344(1):55-63.
4. Zhadina M, Bieniasz PD (2010) Functional interchangeability of late domains, late domain cofactors and ubiquitin in viral budding. *PLoS Pathog* 6(10):e1001153.
5. Wodrich H, Henaff D, Jammart B et al (2010) A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS Pathog* 6(3):e1000808.
6. Schreiner S, Martinez R, Groitl P et al (2012) Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI. *PLoS Pathog* 8(2):e1002549.
7. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4(2):67-73.

FIGURES & LEGENDS

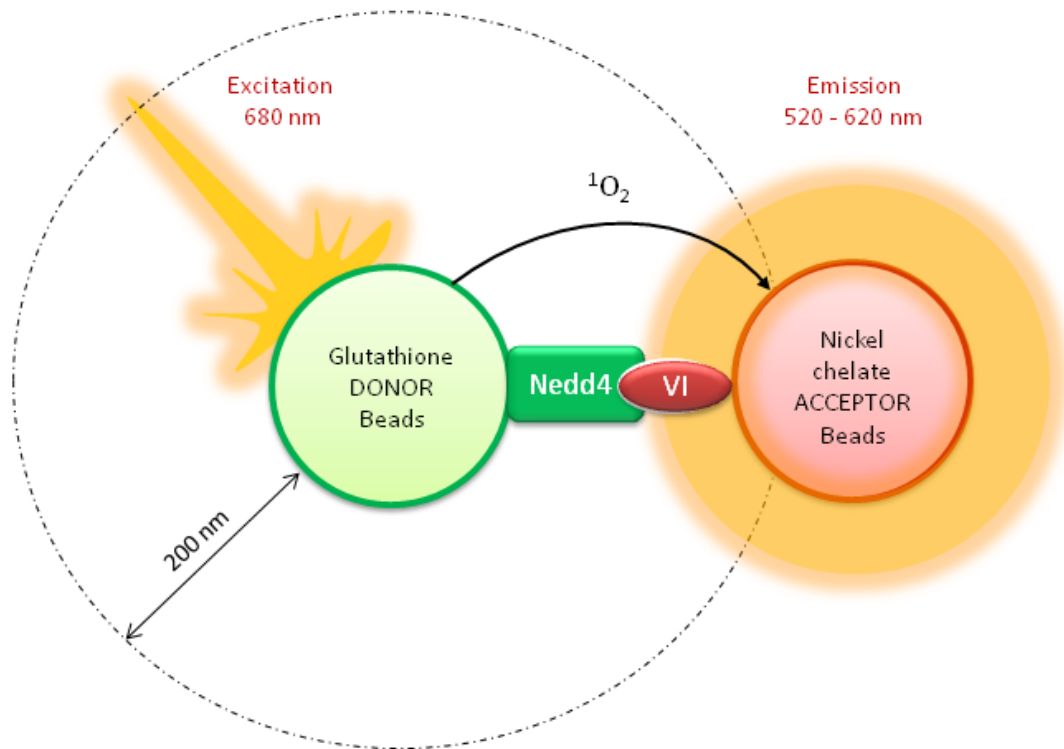


Fig. 1 Principle of AlphaScreen®-based interaction assay. Glutathione donor beads are coated with recombinant bacterially purified GST-tagged Nedd4 protein and nickel chelate acceptor beads are coated with recombinant, bacterially purified viral poly-histidine-tagged protein VI. Following interaction between the 2 proteins through the Nedd4 \leftrightarrow PPxY interaction and excitation at 680 nm, the proximity of the 2 beads permits the transfer of singlet oxygen from the donor to the acceptor beads resulting in quantifiable light emission.

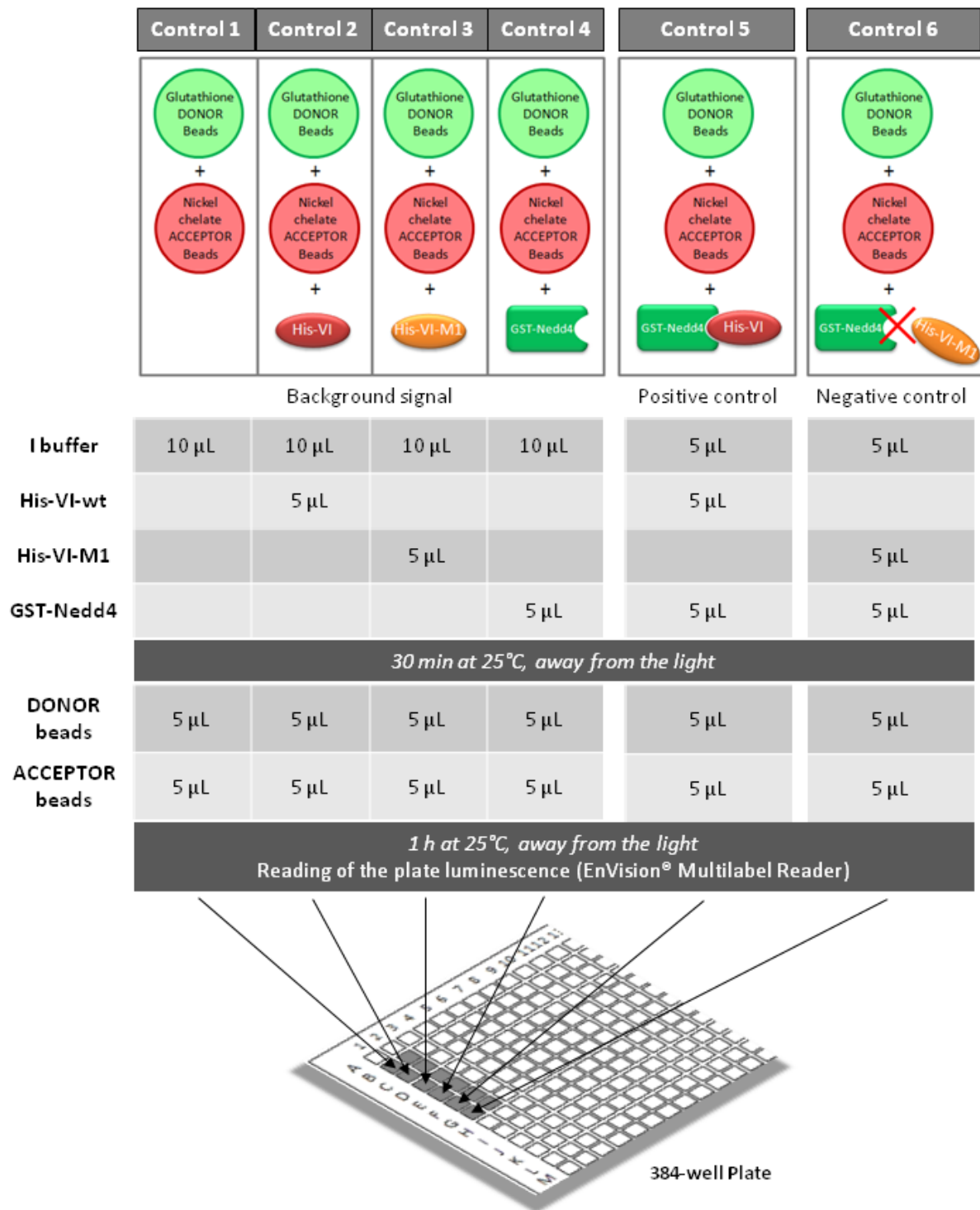


Fig. 2 Interaction assays. Schematic distribution of reagents added into different 384-wells of the plate to determine the assay controls.

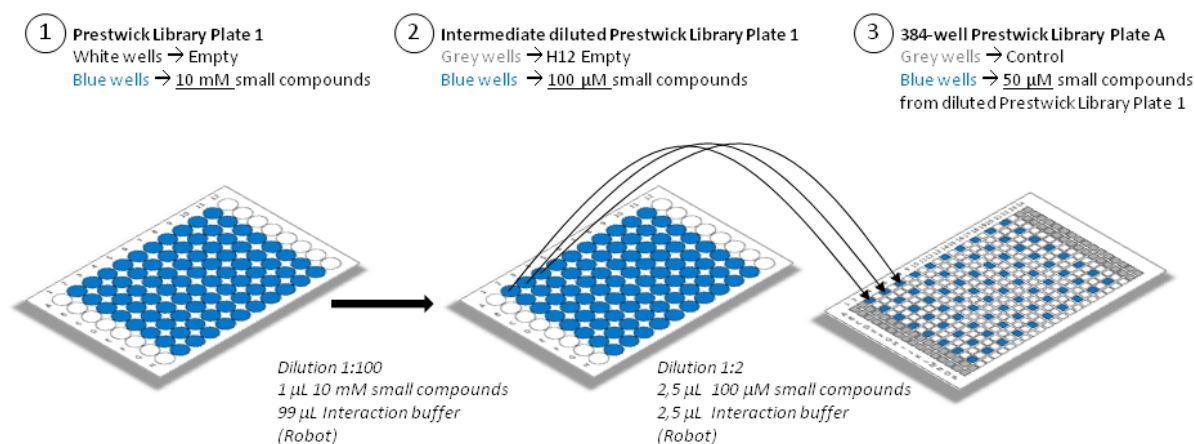


Fig. 4 Schematic representation of the preparation of the intermediate diluted Prestwick library plate 1 issue from a 1:100 dilution of the initial Prestwick library plate 1 at 10 mM. The 96-well intermediate diluted Prestwick chemical library plate 1 is transferred into one 384-well plate, called plate A, following a specific order. The 2 columns on both sides of the bank are the control wells.

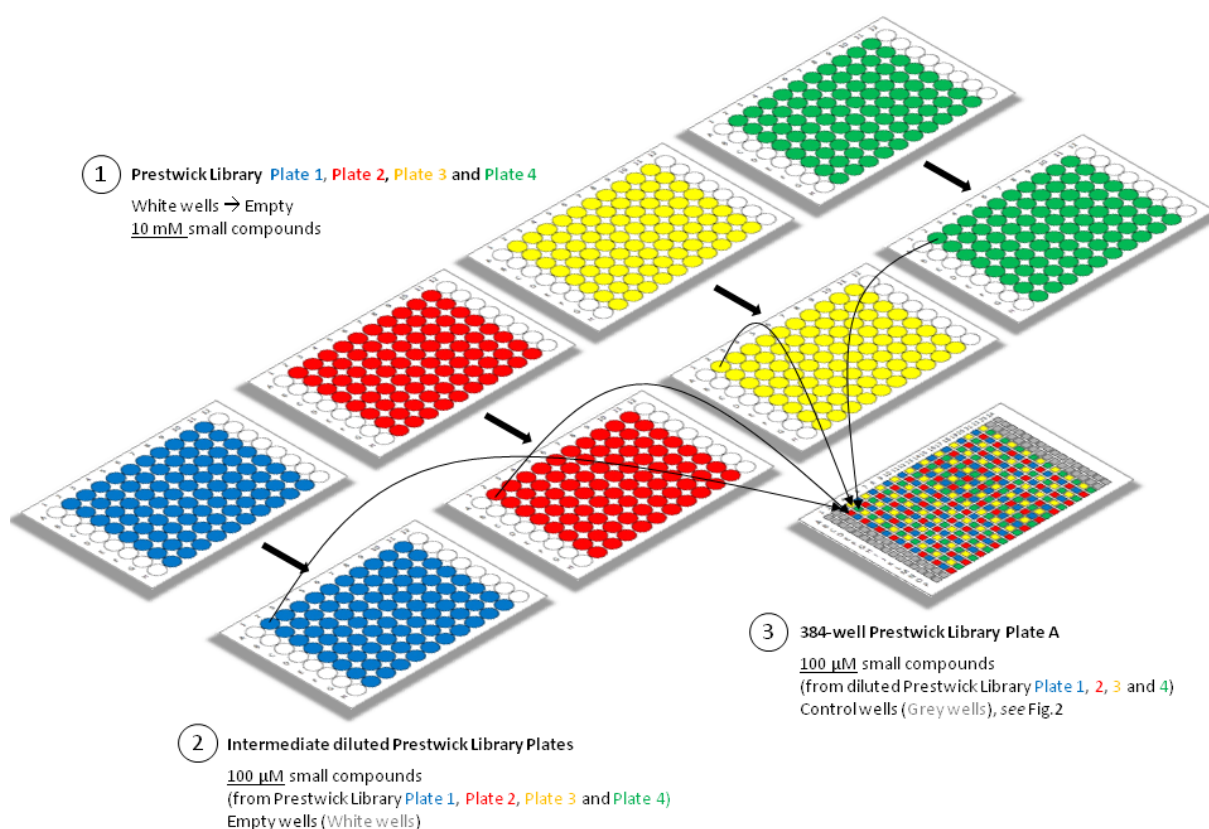


Fig. 5 Preparation of final Prestwick library 384-well plate. In total four 96-well intermediate diluted Prestwick library plates (plates 1, 2, 3 and 4) are distributed in the final Prestwick library 384-well plate A following a specific order. The 2 columns on both sides of the bank remain the control wells. Finally, each well contains 5 μL of one Prestwick library compound at 50 μM.

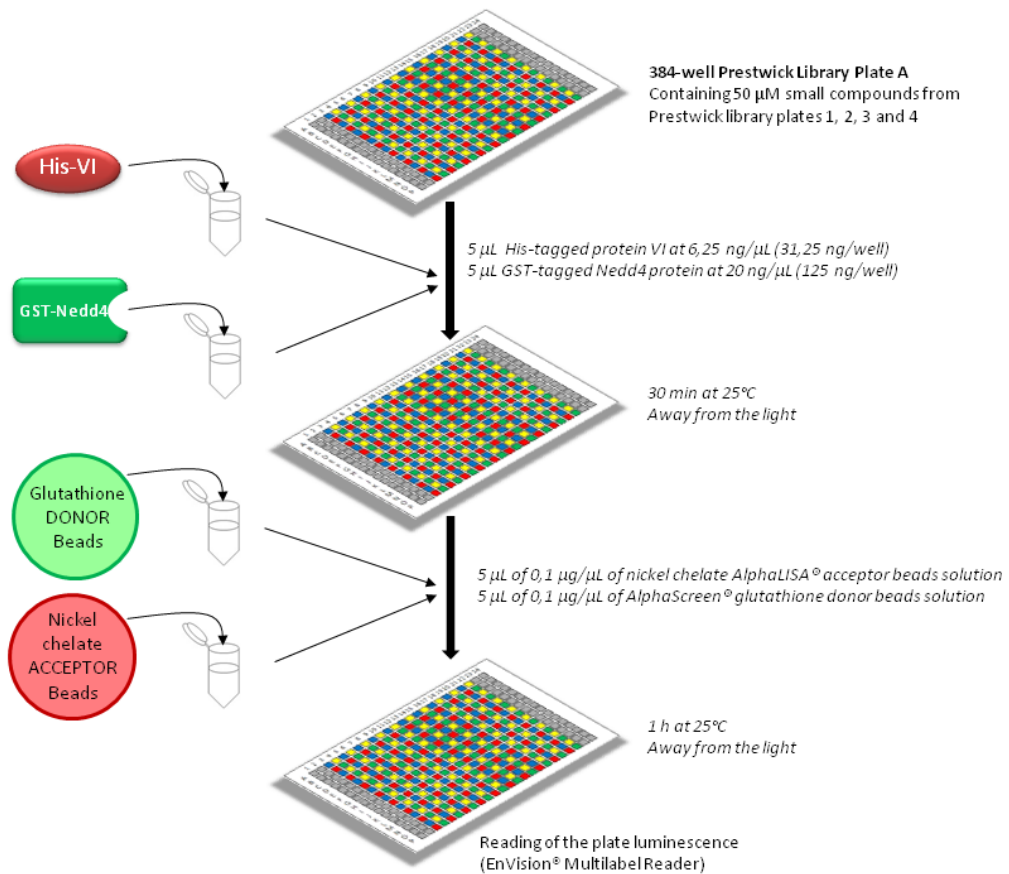
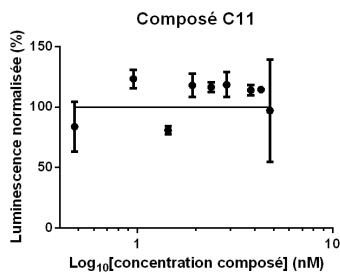
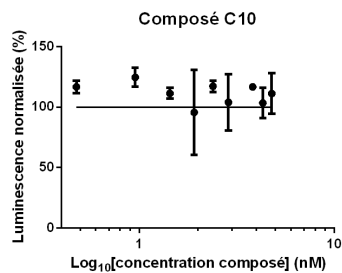
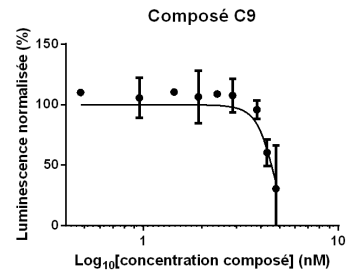
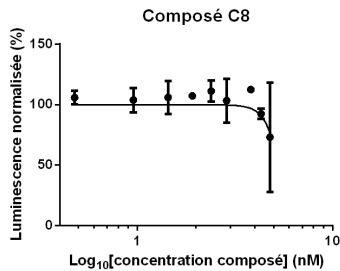
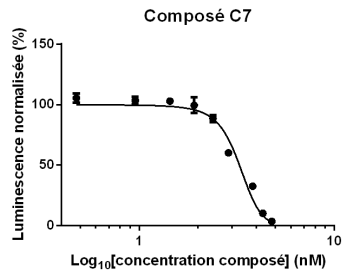
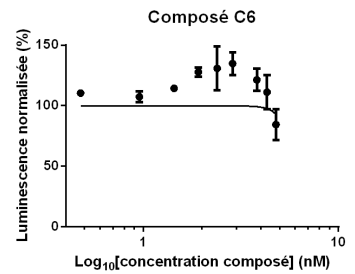
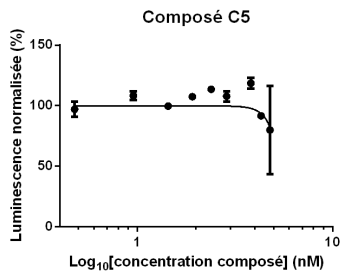
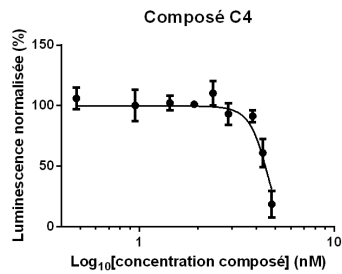
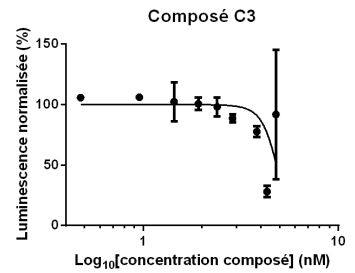
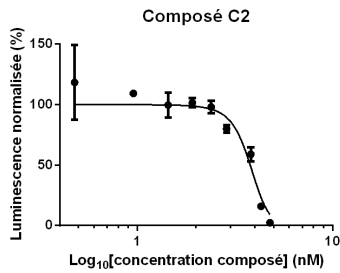
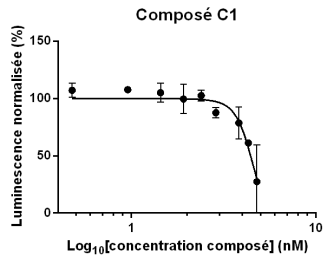
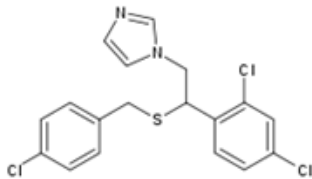
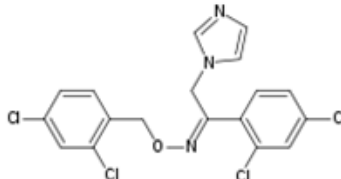
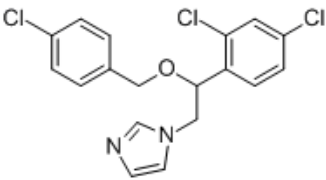
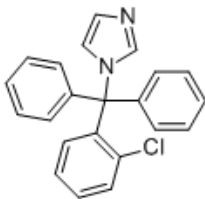
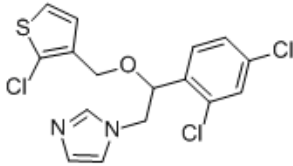
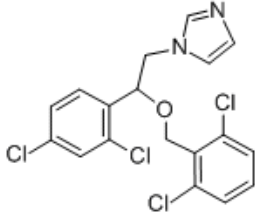
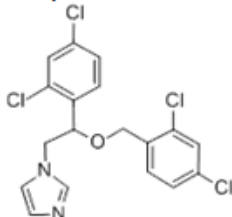
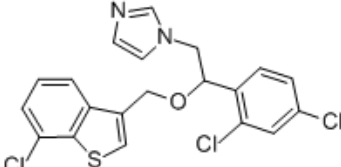
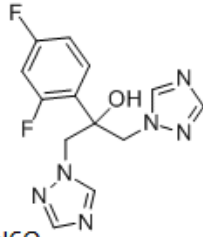


Fig. 6 Schematic distribution of reagents and protocol of AlphaScreen[®] assay using a part of the Prestwick chemical library (plate A, containing 4 of the 14 plates constituting the library) to find small molecule inhibitors targeting VI \leftrightarrow Nedd4 interaction.

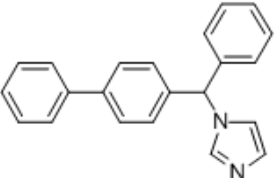
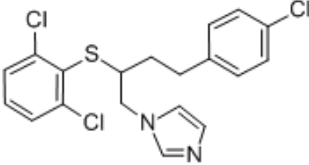
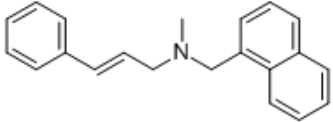
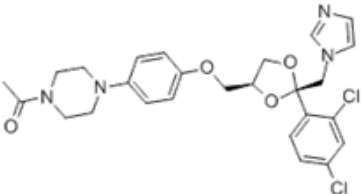
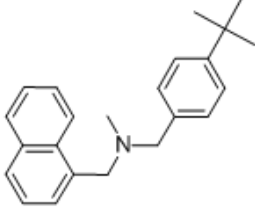
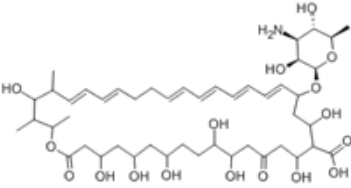
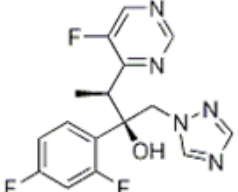
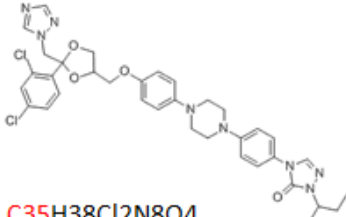
ANNEXE 3: IC50 des 11 composés candidats inhibiteurs de l'interaction protéine VI/Nedd4-2 en AlphaScreen®.



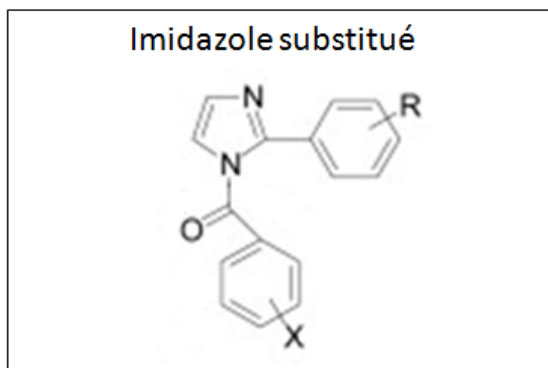
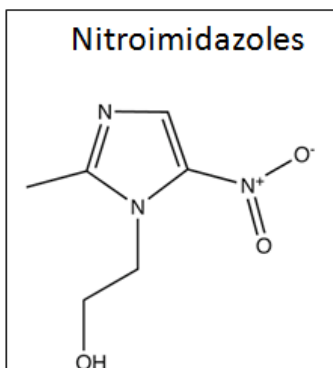
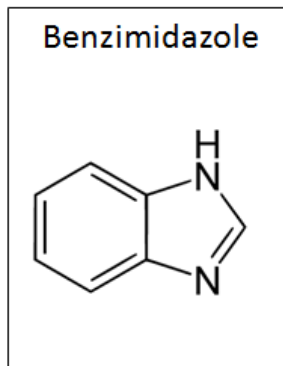
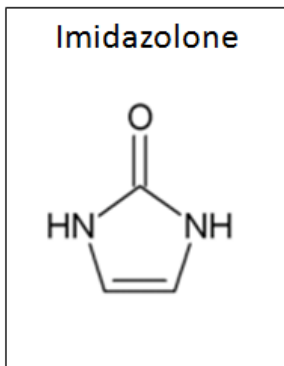
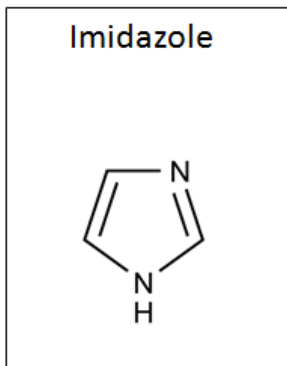
ANNEXE 4: Structure des antifongiques de la banque « Prestwick Chemical ».

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Sulconazole (-86% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₈H₁₅Cl₃N₂S PM 397.75</p> | <p>Oxiconazole (-80% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₈H₁₃Cl₄N₃O PM 429.13</p> | <p>Econazole (-67% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₈H₁₅Cl₃N₂O PM 381.68</p> |
| <p>Clotrimazole (-62% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₂₂H₁₇ClN₂ 344.84</p> | <p>Tioconazole (-58% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₆H₁₃Cl₃N₂OS PM 387.71</p> | <p>Isoconazole (-56% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₈H₁₄Cl₄N₂O PM 416.134</p> |
| <p>Miconazole (-43% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₈H₁₄Cl₄N₂O PM 416.13</p> | <p>Sertaconazole (-40% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₂₀H₁₅Cl₃N₂OS PM 437.77</p> | <p>Fluconazole (-36% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C₁₃H₁₂F₂N₆O PM 306.27</p> |

ANNEXE 4 suite : Structure des antifongiques de la banque « Prestwick Chemical ».

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Bifonazole (-36% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C22H18N2 PM 310.39</p> | <p>Butoconazole (-23% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C19H17Cl3N2S PM 411.78</p> | <p>Naftifine (-15% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p> <p>HCl</p>  <p>C21H21N.ClH PM 323.8</p> |
| <p>Ketoconazole (-11% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C26H28Cl2N4O4 PM 531.43</p> | <p>Buténafine (-4% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C23H27N PM 317.47</p> | <p>Nystatine (+6% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C47H75NO17 PM 926.09</p> |
| <p>Voriconazole (+16% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C16H14F3N5O PM 349.31</p> | <p>Itraconazole (+18% VI/Nedd4-2 <i>in vitro</i>)</p>  <p>C35H38Cl2N8O4 PM 705.63</p> | |

ANNEXE 5: Les différents types de dérivés imidazolés.



ANNEXE 6 : Manuscrit de l'article soumis dans PNAS en Mai 2015, révisé et rejeté en juillet 2015.

Cet article modifié et complété avec les expériences réalisées avec les dérivés du Sulconazole sera soumis dans le journal mBio.

Perturbing Nedd4/[LP]PxY interactions as an antiviral strategy

Sisley Austin¹, Said Taouij^{2,3}, Tetsuro Komatsu¹, Ruben Martinez¹, Cindy Aknin¹, Olga Dolnik⁴, Stefan Becker⁴, Fabienne Rayne¹, Eric Chevet^{2,3,5,6} and Harald Wodrich^{1*}

¹CNRS UMR 5234, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France ; ²INSERM U1053, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France ; ³BMYScreen, Bordeaux, France ; ⁴Institut für Virologie, Philipps Universität Marburg, 35037 Marburg, Germany ; ⁵« Oncogenesis, stress and signaling » ER440 Université Rennes 1, 54203 Rennes, France ; ⁶Centre de Lutte Contre le Cancer Eugène Marquis, 54203 Rennes, France.

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Abstract Rapid responses to emerging viruses require the availability of effective clinically validated antiviral drugs ideally applicable to a broad spectrum of pathogens. Here we show that the interaction between virally encoded L/PPxY motifs and cellular ubiquitin ligases of the Nedd4 family is a high-potential antiviral drug target and validate the relevance of the pharmacological perturbation of this interaction in adenoviruses and filoviruses. Using a miniaturized assay recapitulating the interaction between the adenoviral capsid protein VI PPSY motif and Nedd4.2, we screened a library of FDA-approved compounds and identified molecules that efficiently inhibited the PPSY/Nedd4.2 interaction and blocked adenovirus spread. Interestingly, the presence of L/PPxY motifs in > 80 viral proteins from 22 different human virus families suggested that our compounds may exert broad antiviral activities. As a proof-of-concept, we tested the best hits from our screen in a filovirus model. The molecules inhibited egress of virus like particles mediated by a PPxY motif in the VP40 matrix protein derived from Marburg and Ebola viruses and blocked filovirus replication. The compounds identified herein thus target a conserved host-pathogen protein-protein interaction essential in several viral systems. In contrast to previous attempts in targeting this essential interaction, our compounds are clinically approved, bioavailable, not toxic and may allow for rapid clinical applications. Furthermore we show that relevant host-pathogen protein-protein interactions can be efficiently exploited as screening system.

test | test | test

Introduction

To engage in productive replication viral pathogens utilize cellular functions as transport means as replication support or to abrogate antiviral mechanisms. This is achieved in part by providing high affinity binding sites for cellular factors that hijack their physiological interactions to relay their functionality for viral support. One such motif found in several virus families is the L/PPxY peptide motif (where x can be any amino acid). L/PPxY motifs interact with WW-domains (1). A cellular protein family exhibiting WW-domain able to recognize L/PPxY motifs comprises the Nedd4 ubiquitin ligases of the HECT-E3 ubiquitin ligase family (here after referred to as Nedd4/[LP]PxY interaction if not specified, (1-3)). Viral PPxY motifs belong to a group of short viral peptide motifs termed *late domains* due to their prominent role late in the lifecycle of several enveloped viruses (4-10). During egress of enveloped viruses (budding), *late domains* redirect components of the cellular vesicular sorting machinery to the viral exit site (11, 12).

We were the first to demonstrate that the Nedd4/[LP]PxY interaction also contributes to efficient entry of the non-enveloped adenovirus (13). Upon endocytic uptake adenoviruses partially disassemble, culminating in the release of the membrane lytic protein VI from the capsid interior (13-15). Protein VI comprises an N-terminal amphipathic helix that mediates rupture of the endosomal compartment (15, 16). In addition protein VI encodes

a PPSY motif. Mutational inactivation of the motif abolished binding to members of the Nedd4-family and resulted in ~20-fold reduced infectivity (13). This highlights the important role of the PPxY motif in various aspects of the viral lifecycle. Interestingly, as in most screening approaches for antivirals, the compounds found to disrupt the Nedd4/[LP]PxY motifs were identified either through the use of functional readout such as infection assays of e.g. reporter virus systems or structural data, thereby limiting the range of molecules to be screened or the information about the compound's mode of action (17, 18). In addition interactions between Nedd4 family ubiquitin ligases and numerous cellular proteins containing [LP]PxY motifs also regulate physiological processes such as i) ion and nutrient homeostasis (19-21) ii) receptor signalling and cargo trafficking to the lysosomal compartment (22, 23), iii) removal of misfolded proteins (24) and iv) cell growth and cell cycle regulation (25, 26). This prominent multifunctional role for Nedd4/[LP]PxY interactions in cellular homeostasis provides an additional challenge when considering virally encoded PPxY motifs as drug targets.

Herein we use our initial discovery that inhibition of Nedd4/[LP]PxY reduces adenovirus infectivity as rationale to develop a protein-protein interaction (PPI)-based *in vitro* drug screening approach. We identify clinically approved small molecules that perturb the Nedd4/[LP]PxY interaction and showed anti-adenoviral activity and inhibited filovirus budding and replication. Hence, our approach demonstrates that PPI inhibition-based screens are promising tools to develop new antiviral drugs and confirms the important role for the

Significance

Rapid responses to emerging viruses require the availability of effective clinically validated antiviral drugs ideally applicable to a broad spectrum of pathogens. Here we show that the interaction between virally encoded L/PPxY motifs and cellular ubiquitin ligases of the Nedd4 family is a high-potential antiviral drug target and validate the relevance of the pharmacological perturbation of this interaction in adenoviruses and filoviruses. Using a miniaturized assay recapitulating the interaction between the adenoviral capsid protein VI PPSY motif and Nedd4.2, we screened a library of FDA-approved compounds and identified molecules that efficiently inhibited the PPSY/Nedd4.2 interaction and blocked adenovirus spread. Interestingly,

Reserved for Publication Footnotes

137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204

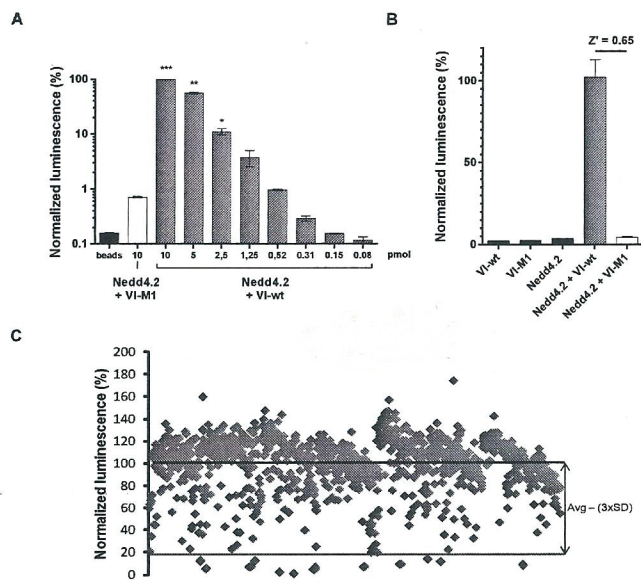


Fig. 1. AlphaScreen® assay optimization and Prestwick Chemical Library screening. (A) Determination of the sensitivity of the AlphaScreen® assay. Protein VI-wt mixed with Nedd4.2 at equimolar ratio was tested in AlphaScreen®. Total concentrations of protein are given in pmol below each column. The beads alone and the protein VI-M1 mutant mixed with Nedd4.2 were used as negative controls. Luminescence values were normalized to the maximum signal obtained with protein VI-wt and Nedd4.2. Error bars represent the variation of duplicate values. (B) Z' value determination for assay robustness. At optimized assay conditions luminescence values for positive (protein VI-wt + Nedd4.2) and background signals (protein VI-M1 + Nedd4.2) controls were determined and Z' value of 0.65 was calculated based on assay variation for 30 replicates. (C) Prestwick Chemical Library screening. 1280 clinically approved small molecules of the Prestwick chemical library were tested for their potential to interfere with the Nedd4/[LP]PxY AlphaScreen® signal. The luminescence value for each compound was normalized to the mean of the no-compound control and is depicted as grey rhombus. Positive inhibitor candidates (red) were identified by arbitrarily setting the bar for hits to compounds reducing the signal below three times the SD of the signal average in absence of drugs (red line).

Nedd4/[LP]PxY interaction during both adenovirus entry and filovirus egress.
Manuscript Text

Results

Nedd4/[LP]PxY protein-protein-interaction (PPI) assay development and drug screening

We previously showed that mutational conversion of the conserved PPSY motif to PGAA in the adenoviral capsid protein VI blocked its interaction with members of the Nedd4 family of ubiquitin ligases and strongly reduced viral infectivity (13). Because this identified the Nedd4/[LP]PxY interaction as a potential anti-adenoviral drug target, we developed an AlphaScreen®-based assay to recapitulate the Nedd4/PPSY interaction *in vitro* in a screening-compliant format (Fig. 1A) (27-29). Bacterial recombinant GST-tagged Nedd4.2 (30), His-tagged protein VI-wt and its PPSY binding defective mutant VI-M1(13) were purified and coupled respectively to Glutathione-donor beads or to Ni-acceptor beads. The ideal stoichiometry was achieved at a ratio of 1:1 (data not shown) with the strongest signal over noise ratio (~40 fold over background) by lowering the protein concentrations to 2.5 pM (Fig. 1B). The Z'-factor was of 0.65 thus indicating an assay compatible with high-throughput screening (Fig. 1C).

We next used the Prestwick FDA-approved Chemical Library® in our screening assay to identify those compounds able to disrupt the protein VI/Nedd4.2 interaction. AlphaScreen®

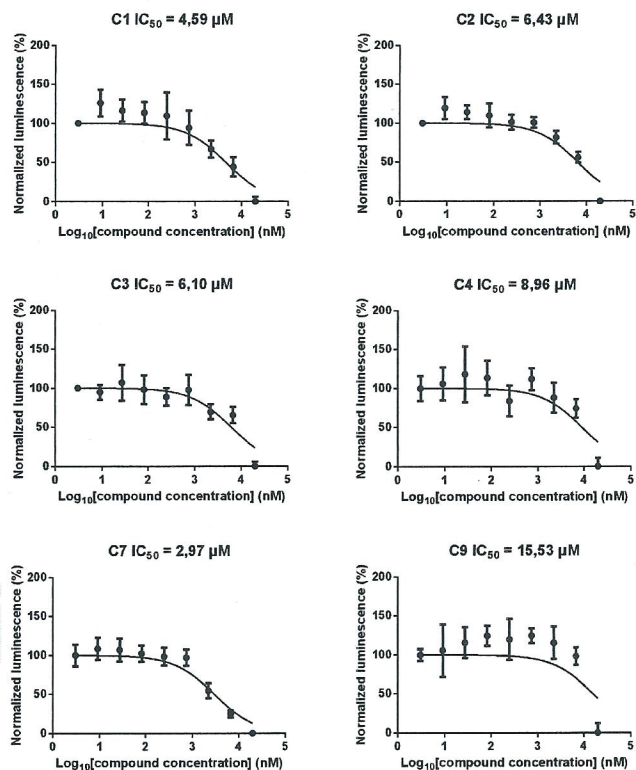


Fig. 2. IC50 determination of compounds. C1, C2, C3, C4, C7 and C9 compound as listed in table S1 (SI, table S1) were titrated into protein VI/Nedd4.2 AlphaScreen® signal reactions at concentrations ranging from 1 nM to 20 μM. Their IC50 values were determined using a non linear regression curve. Luminescence values were normalized to the mean of signal obtained with protein VI-wt and Nedd4.2 with 1 nM of compound. IC50 are indicated on top of each graph. Error bars represent the variation of triplicate values

signals were reported to those obtained with vehicle alone. Signal intensities were plotted and selected when reducing the signal more than three times the standard deviation of the signal average (Fig. 1D). We identified 13 compounds that decreased the AlphaScreen® signal suggesting inhibition of the Nedd4/[LP]PxY interaction *in vitro*. False positives were excluded using TruHits® test (Fig. S1A). Six of the remaining 11 compounds (C1, C2, C3, C4, C7, C9) displayed IC50 ranging from 2.97 to 15.53 μM (Fig. 2A). The cytotoxicity of these 6 compounds was then tested in U2OS cells or HEK293 cells treated with DMSO as control or with increasing concentrations of the compounds (250 nM to 60 μM) for 36 h or 24 h respectively (Fig. 2B). Results showed the absence of cytotoxicity at concentrations lower than 10 μM in U2OS cells and 5 μM in HEK293 cells. The identified compounds included the broad antimicrobial "Chloroxine (C1)", two smooth muscle vasodilator "Hydralazine Hydrochlorid (C2)", and "Flunarizine (C4)", the abortifacient "Mifepristone (C3)", "folic acid (C7)" and the antifungal "Sulconazole nitrate (C9)" (Table S1). Because Sulconazole is an imidazole derivative, imidazole up to 1 mM was tested in the AlphaScreen® assay and revealed an IC50 of 2.79 mM confirming that the C9 effect targets the Nedd4/[LP]PxY interaction and not the His-tag (Fig. S1B). None of the identified compounds shared apparent structural or chemical similarity suggesting multiple modes of action on the Nedd4/[LP]PxY target (Table S1).

C9 inhibits adenovirus entry

To test if the identified compounds exert antiviral activities, we used the cell-based adenovirus infection system. First, single round infection assays were performed. Cells were pre-

205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272

273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340

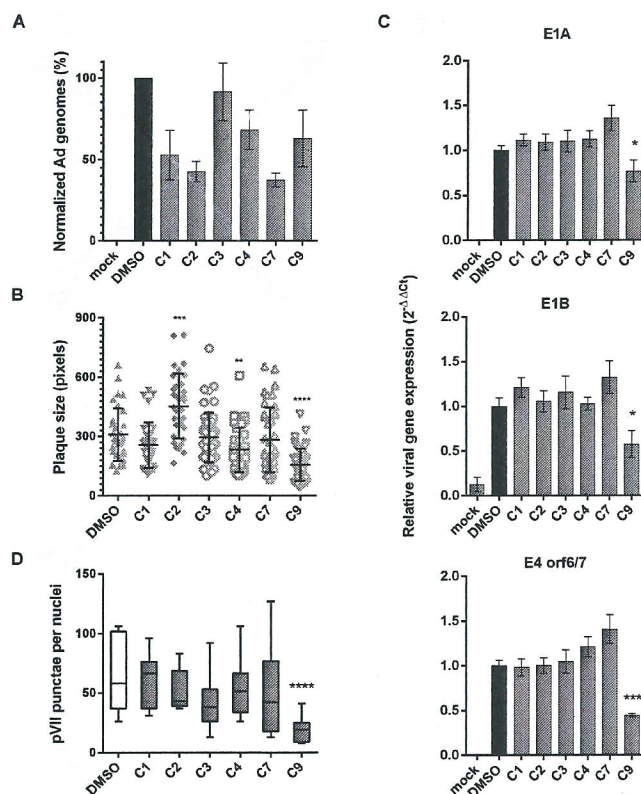


Fig. 3. Adenovirus inhibition. (A) **Compound effect on adenovirus replication.** U2OS cells were infected for 24 h with replicative HAd-C5 in presence of 5 μ M compound or DMSO as control. At 24 hpi, viral DNA from the supernatant was quantified using qPCR specific for the *hexon* gene and normalized to the DMSO control. The average Ct-value was determined from triplicate reactions of two experiments. (B) **Compound effect on adenovirus spreading.** HEK293 cells were infected with recombinant E1-deficient GFP expressing HAd-C5-GFP at 0.1 physical particle per cell during 24 h followed by inoculums removal and overlay with agarose supplemented with 5 μ M of compounds C1, C2, C3, C7, C9 or 1 μ M of compounds C4 or DMSO as control. At day 6 post infection, fluorescent plaque sizes were determined. The mean size was determined from \sim 30 plaques derived from three independent experiments. (C) **Compound effect on adenovirus early gene expression.** U2OS cells were infected for 4 h with replicative HAd-C5 in presence of 5 μ M of compound or DMSO control. Adenoviral early gene expression was quantified by real time PCR using primers for (top) E1A, (middle) E1B or (bottom) E4 orf6/7 cDNA and normalized by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Error bars represent the variation of the values from triplicate reactions of two experiments. (D) **Compound effect on adenovirus genome nuclear import.** U2OS cells were infected as in (C) for 2 h, fixed and stained with antibodies against protein VII in presence of 5 μ M compound or DMSO control. Nuclear protein VII dots were quantified using ImageJ and given as box-plots in absolute numbers per nucleus ($n > 10$ cells).

treated with 5 μ M of each compound, followed by infection with a replication competent adenovirus HAd-C5. Twenty-four hours later, viral genomes were extracted from the supernatant and quantified by qPCR. Compounds C1, C2 and C7 decreased the production of progeny virion by $>50\%$ suggesting antiviral activity (Fig. 3A). We next quantified adenoviral propagation by fluorescent plaque forming assay with GFP expressing HAd-C5 vector in the presence of the compounds as a measure of virus spread through multiple rounds of infection (Fig. 3B). Assays were performed in the presence of 5 μ M C1, C2, C3, C7, C9 and 1 μ M C4. The analysis showed significant reduced plaque size when the assay was carried out in the presence of compounds C4 and C9 (Fig. 3B, left; exemplified for C9, right). No significant difference was observed for absolute plaque numbers (not shown). The

results suggested that compound C9 had the strongest impact on virus propagation. Because our previous mutational inactivation of the PPSY motif in protein VI affected virus entry (13), we then determined the effect of our compounds on the onset of adenoviral gene expression by quantifying the intracellular expression levels of the immediate early gene E1A and two early genes, E1B and E4 orf6/7. This revealed a significant reduction of early viral gene expression at 4 h post-infection (hpi) when cells were treated with compound C9, suggesting that C9 specifically inhibited adenovirus infection at an early step (Fig. 3C). Since we showed that the PPSY motif of capsid protein VI is involved helping Adenovirus reach the nucleus and promote adenovirus-mediated transcriptional activation, we next quantified the efficiency of viral genome nuclear import upon treatment with our compounds. Quantification of protein VII dots depicting viral genomes (31, 32) at 2 hpi, when genome nuclear import reaches a plateau revealed that only compound C9 significantly reduced the nuclear accumulation of viral genomes (Fig. 3D) suggesting that its antiviral activity is linked to adenovirus entry steps upstream of genome import and viral gene expression (Fig. 3E). The results showed that pharmacological targeting of the Nedd4/[LP]PxY interaction in the adenoviral infection model is possible and supports our previous data on the mutational inactivation of the interaction.

C9 and C4 inhibit filovirus infection

As PPxY motifs might represent an important feature in virus biology, we performed an extensive database search for virally encoded PPxY including also LPxY motifs, which were shown to be functionally equivalent in the cellular context (3)(Fig. 4A; Table S2). Most of the motifs were found in structural proteins or in viral proteins involved in replication. Although we were unable to find conserved residues adjacent to viral L/PPxY motifs, we noted that in a given viral protein additional conserved residues occur (Fig. 4B). This observation suggested that the use of Nedd4/[LP]PxY inhibitors might apply to a broad spectrum of viral pathogens irrespective of the virus family. To test this, we evaluated whether our identified and clinically approved compounds could also be used to block filoviruses, which have a very different biology than adenoviruses and where novel therapeutic concepts are urgently needed. We first tested our most efficient compounds for their ability to inhibit VP40-mediated filovirus egress, which requires a conserved *late domain* with PPxY motif (8, 10, 33). HEK293 cells were transfected with expression vectors for MARV VP40 wild type (wt) encoding a PPxY motif (VP40_{WT}), MARV VP40 with the *late domain* of EBOV (PTAPPEY, VP40_{ELD}) and a MARV VP40 with the PPxY motif mutated to PPPA (VP40_{PPXA}) (34). Cells were incubated with compounds C4, C9 or DMSO. As positive control we used the *in silico* derived compound N4, previously reported to disrupt Nedd4/[LP]PxY interaction and to reduce the egress of VP40 VLPs (18), which was also active in our Alphascreen assay but with elevated IC50 of 44 μ M (Fig. S1C). The analysis of VLP VP40 content by Western blot revealed that only compounds C9 and N4 inhibited both MARV VP40 (Fig. 5A) and VP40_{ELD} (Fig. 5B) derived VLP release, with C9 presenting the highest efficiency in each case. Our data therefore confirm the importance of the Nedd4/[LP]PxY interaction in filovirus egress and validate it as high potential drug target in the fight against EBOV. Next we wanted to see if the compounds would also block replication of infectious filovirus. We infected HUH-7 cells at an MOI of 0.1 with MARV in presence of different concentrations of compounds C4, C9 or the vehicle control or added the compounds following entry at 5 hpi to the cells. Twenty-four and forty-eight hours post infection viral supernatants were collected and titers were determined by TCID50 endpoint titration. At 24 hpi C4 and C9 strongly reduced MARV titers by $>1-2\log$ (Fig. 5C). Inhibition via C9 occurred irrespective of the time the drug was added. In contrast inhibition by C4 was markedly decreased when added 5

341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408

409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476

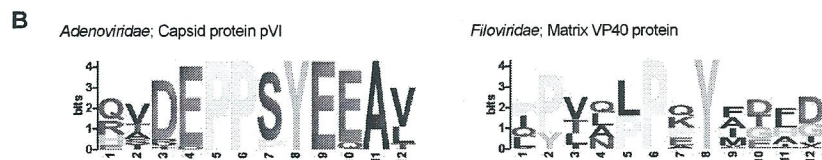
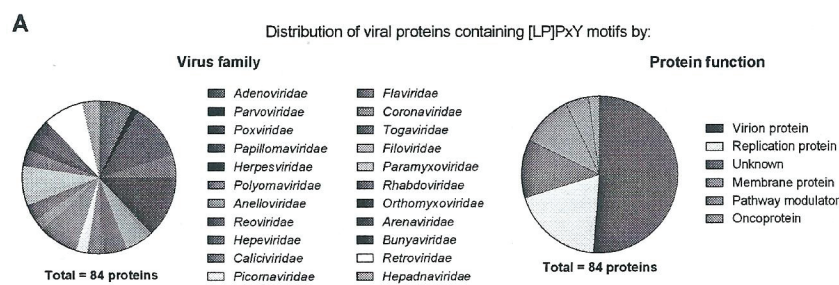


Fig. 4. Systematic analysis of viral [LP]PxY motifs.(A) Distribution of viral [LP]PxY motif containing proteins. The 84 proteins listed in supplemental table S2 (SI, table S2) were plotted according to virus families (left) or functionality (right). "Virion proteins" are all capsid, tegument, matrix and/or envelop proteins of the virion. "Replication proteins" include polymerases, helicase, chromatin remodelers, transcriptional activators, proteins for RNA metabolism and proteinases. "Membrane proteins" are those not present in the viral envelope. "Pathway regulators" affect cellular signaling pathway. (B) Analysis of sequences flanking [LP]PxY motif. All available protein sequences from adenovirus capsid protein VI (left) and filovirus matrix protein VP40 (right) were analysed with the software MEME. The frequency of each amino acid surrounding the [LP]PxY motif is given as a proportional height.

477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544

hpi suggesting a major antiviral effect upon entry. At 48 hpi both drugs diminished significantly in their antiviral activity suggesting reduced long-term stability (data not shown).

Discussion

Recurrent viral infections pose a permanent threat to the population and livestock. The resulting economic burden has the potential to disrupt societies as it can be currently observed in Western Africa due to the outbreak of the Ebola virus (35). These threats make the development of novel antiviral strategies a priority task. To date, >80% of antivirals have been designed to target virus-encoded entities including for instance enzymatic activities, envelop proteins or viral DNA/RNA (36). Only recently, novel strategies to widen the therapeutic arsenal have included the targeting of either cellular pathways essential for the virus or the direct perturbation of host-virus interactions (37). As part of the latter, the alteration of host-virus protein-protein interaction (PPI) networks represents a very appealing strategy to prevent infection at multiple steps (entry, replication, exit, propagation). This has been acknowledged by the completion of numerous human-virus PPI maps which collectively report >7000 high quality PPIs (36-38). One of the main problems associated with using PPI screens for antiviral drug discovery is to identify a relevant PPI that will not only affect virus infection but also be harmless for the host cell if perturbed. We recently identified the interaction between viral PpX motifs and cellular Nedd4 ligases as a high potential drug target (13). Our extensive database search has revealed that virally encoded L/PPxY motifs are far more common than those being investigated and extend past human and livestock pathogens suggesting some sort of evolutionary pressure to maintain such a motif (>80 different viral proteins distributed over the 22 human virus families summarized in Fig. 4 and Table S2). This is further supported by our observation that [LP]PxY motif are present in up to 8% of all viral proteins surpassing the frequency of ~3% in cellular proteins (39) (data not shown). Moreover, data mining of host-virus interactomes revealed up to 25 confirmed interactions between viral proteins and Nedd4 ubiquitin ligases (e.g. <http://pbildb1.univ-lyon1.fr/virhostnet>). Furthermore our own research suggests that PpX motifs are important for virus entry and the onset of replication extending the functional repertoire beyond viral egress (13, 40).

The recent development of repurposing screens based on PPIs is now widely accepted for the development of new anti-cancer drugs. For instance AlphaScreen®-based PPI assays have previously been employed to find inhibitors for different ubiquitin ligases and their substrates (41, 42). Employing the same method

we identify the antifungal imidazole derivate Sulconazole (C9) as a compound perturbing the Nedd4/[LP]PxY PPI. Furthermore we identify Sulconazole as potent antiviral compound achieving robust inhibition in both adenovirus and filovirus models. In the adenovirus model, Sulconazole showed a clear inhibitory effect upstream of adenovirus genome nuclear import. This correlates with nuclear transport defects observed in the genetically altered Nedd4/[LP]PxY adenovirus mutant (13) suggesting specific perturbation of the viral [LP]PxY motif. Moreover, 6 additional Imidazole derivatives (Oxiconazole, Econazole, Clotriconazole, Tioconazole, Isoconazole and Naftifine) in our compound library showed >50% inhibition of the Nedd4/[LP]PxY PPI, Sulconazole (C9) being the best inhibitor (Fig. S3). Although Sulconazole was conceptualized as an ectopic antifungal drug preventing it from rapid use in systemic applications, other Imidazole derivatives have been selected as lead compounds for the development of novel antiviral agents (43). The second most promising inhibitory compound Flunarizine (C4), a Ca²⁺ channel blocker, showed no specific early inhibition of adenovirus. In contrast it efficiently blocked filovirus replication at an early step suggesting some virus selectivity of the two compounds. C4 was also shown to attenuate hepatitis C virus (HCV) (44) suggesting that, like C9, it has broad antiviral activity.

Compounds C4, C9 as well as the Nedd4/[LP]PxY specific control compound N4 all affected to some degree VLP release of the [LP]PxY mutant MARV VP40 (data not shown). This suggests that cellular Nedd4/[LP]PxY PPI's contribute to filovirus budding while the VP40 [LP]PxY motif may augment egress efficiency through increasing the local concentration of Nedd4. This suggests that some antiviral activity may result as "side effect" of the compounds pharmacological properties. For instance, C9 affects the cholesterol metabolism shown to be essential for several viruses (45-47), which in some instances is linked to Nedd4 activity (48, 49). C4 (and C2) is a Ca²⁺ channel blocker acting as vasodilator (50). Indeed, Targeting the cellular Ca²⁺ homeostasis was suggested as efficient antiviral strategy (51), which may be essential for filovirus entry (52) and is controlled by Nedd4/[LP]PxY PPI's, (53-55). No direct link to Nedd4/[LP]PxY PPI's can be found for the other two hits in our screen Mifepristone (C3) and Folic Acid (C7) and their antiviral effects have remained limited in our assays.

In summary, our work characterizes Nedd4/[LP]PxY interactions as potential achilles heels of viral pathogens and as such using an AlphaScreen®-based PPI screening approach, we identify clinically approved compounds that target this interaction and

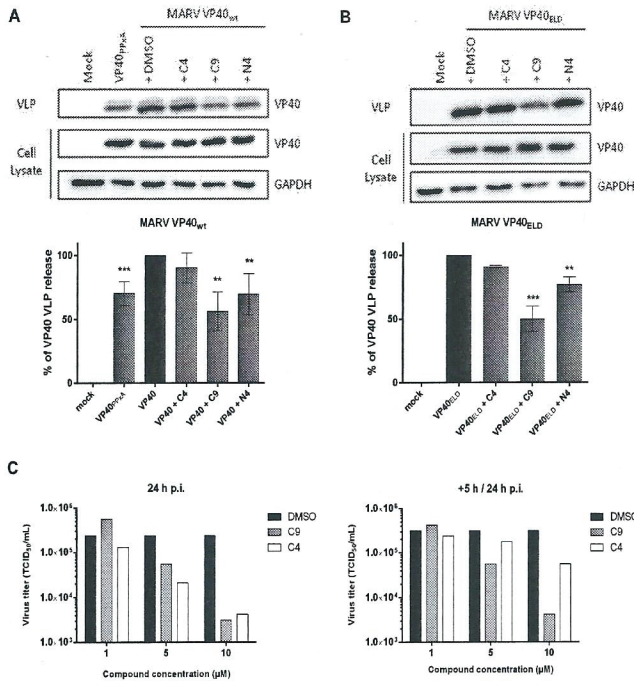


Fig. 5. Compound C9 and C4 reduce VLP egress and replication of Marburg virus. (A) Compound effect on wt Marburg VP40 VLP egress. HEK293T cells were transfected with wt MARV VP40 (VP40_{WT}) or MARV VP40 with PPxY mutated to PPxA (VP40_{PPxA}) expressing vector, or empty plasmid. Transfected cells received 5 μM of compound C9, 1 μM of compounds C4 or N4 or DMSO as control as indicated for 24 h. VLPs (top) and cell lysates (bottom) were analysed by western blot as indicated and VLP release was quantified (graph below western blot images). Error bars represent the SD from three independent experiments. (B) Compound effect on Marburg VP40 VLP egress with Ebola late domain. HEK293T cells were transfected and analysed as in (A) using MARV VP40 with the late domain motif of Ebola virus (PTAPPEY) VP40 (VP40_{ELD}), or empty plasmid as negative control. (C) Effect of compound on infectious Marburg virus replication. Cells were infected with infectious MARV in presence of 1, 5 or 10 μM compounds C4, C9 or the vehicle control. At 24 hpi, viral titers (TCID₅₀) were determined by endpoint titration. Viral titers are shown in presence of C4 (white bar), C9 (grey bar) or the DMSO control (black bar) either when infections were carried out in presence of the compounds (left panel) or when compounds were added at 5 hpi (right panel). **Supplemental Figure 1. AlphaScreen® Controls(A) TruHits® test counter screen.** To exclude assay interference, candidate inhibitors were counter screened with the TruHits® test. The TruHits® test is based on constitutive bead complex formation resulting in constitutive AlphaScreen® signal upon irradiation at 680 nm. Luminescence values were normalized to the signal obtained with bead complex without drugs and depicted as grey rhombus. Two of the compounds identified in our screen were colored and quench the obtained signal (shown as red rhombus) identifying them as false hits. (B) Determination of the IC₅₀ of Imidazole at concentrations ranging from 50 μM to 10 mM (represented in Log₁₀ of compound concentration in nM on the graph). The IC₅₀ values were determined using a non linear regression curve. Luminescence values were normalized to the mean of signal obtained with protein VI-wt and Nedd4.2 without compound. Error bars represent the variation of the values from triplicate reactions of two independent experiments. **Determination of the IC₅₀ Compound N4** (C). Compound N4 was titrated into protein VI/Nedd4.2 AlphaScreen® signal reactions at concentrations ranging from 250 nM to 60 μM respectively (represented in Log₁₀ of compound concentration in nM on the graph). The IC₅₀ values were determined essentially as described in (B).

can be used to attenuate two very different viral systems (AdV and MARV). Clinically approved regimens exist for neither of the two viruses and the data suggest that perturbing Nedd4/[LP]PxY as anti-Ebola virus disease treatment with clinically approved compounds is feasible and should be considered to combat the

current Ebola virus outbreak in Western Africa. Given the prevalence of potential Nedd4/[LP]PxY PPI's in viral pathogens documented in this report we think that the application potential of Nedd4/[LP]PxY perturbing drugs might be much broader. Future work will need to address if Nedd4/[LP]PxY inhibitors can perform as broad-spectrum antivirals while rational compound engineering may increase the specificity towards a given virus family.

Methods

Recombinant proteins - His-VI-wt of M1 bacterial expression vectors pET-15b-His-VI-wt or M1 (mutation 148-PPSY-151>148-PGAA-151) plasmids and protein purification were performed as previously described in (13, 15). Bacterial expression vectors for catalytically active murine GST-Nedd4-2 (ΔC2, ΔWWW1, ΔWW2) was kindly provided by S. Kumar (30) and purified using Glutathione Sepharose beads according to the manufacturer's instructions. Integrity of purified proteins was verified following PAGE by using Coomassie Blue staining and Western blot.

Protein VI/Nedd4-2 interaction assay development and chemical library screening - Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assays (AlphaScreen®) were performed in 384-well white opaque plates (PerkinElmer). For proof-of-concept tests, 2.5 pmol of His-VI-wt or M1 mutant and 2.5 pmol of GST-Nedd4-2 diluted in interaction buffer (PBS 1X pH 7.4, 0.1% BSA, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 0.005% Tween 20) were added into each well and incubated at 25°C for 45 min. Then 0.5 μg of glutathione-coated donor and nickel chelate acceptor beads (PerkinElmer) were added simultaneously and incubated for 1 h at 25°C. Luminescence was read using the EnVision® Multilabel plate reader. Assay robustness was determined through calculation of the Z' factor on 30 replicates (56). For screening of the FDA-approved compounds Prestwick Chemical Library (<http://www.prestwickchemical.com>), 10 μM of each of the 1280 small molecules or a vehicle control (interaction buffer) were distributed in each well before adding of recombinant proteins and beads mixture. Luminescent values were normalized and an inhibition cut-off was set for three fold the standard deviation (SD) of the signal average. For each identified compound the inhibitor concentration necessary to inhibit 50% of the AlphaScreen® signal (IC₅₀) of protein VI/Nedd4-2 interaction was determined by titrating a concentration range from 1 nM to 20 μM. Triplicate mean values and titration curves (log(inhibitor) vs. normalized response) were determined using the GraphPad Prism 6 software.

Fluorescent plaque forming assay - HEK293 cells were infected with 0.1 physical particles per cell (pp/cell) of E1-deficient GFP expressing HAd-C5-GFP vector during 24 h followed by removal of the inoculum and overlay with 1% agarose supplemented with vehicle only (DMSO) or 5 μM of compounds C1, C2, C3, C7, C9 or 1 μM of compounds C4, N4. Six days after infection, plaque sizes were measured by epifluorescence microscopy using ImageJ.

Quantification of viral genome release - U2OS cells were pre-treated with 5 μM of each compound or the vehicle control for 1 h followed by infection with 50 pp/cell of HAd-C5 virus in presence of compounds. Three hpi, inoculum was removed and fresh drug containing medium was added. Forty-eight hpi, viral genomes were extracted from the supernatant with the high pure viral nucleic acid extraction kit (Roche) followed by *hexon* targeted real time PCR to determine viral copy numbers (57). Genomes were calculated from the C_t-values against a standard curve.

Quantification of viral gene expression - U2OS cells were infected for 4 h at 37°C with replication competent HAd-C5-wt virus in medium containing 5 μM of each compound or vehicle control. At 4 hpi total RNA was extracted, revers transcribed and early viral genes E1A, E1B and E4orf6/7 gene expression was determined by real-time PCR as detailed in the table legend to table S3 (SI, table S3).

Quantification of viral genome nuclear import - U2OS cells grown on coverslips were pre-treated for 1 h with 5 μM of each compound or vehicle alone. Infections were done for 30 min at 37°C with 2500 pp/cell HAd-C5 in medium containing 5 μM of compounds or DMSO followed by inoculum removal and addition of fresh drug containing media. At 2 hpi coverslips were fixed and nuclear protein VII was detected using specific antibodies {Haruki, 2003 #1178} and Alexa546 conjugated secondary antibodies. Cells were analyzed by confocal microscopy and the protein VII signal was quantified using ImageJ.

Filovirus VLP egress. HEK293 cells were transfected with 1 μg pC-VP40 constructs: MARV VP40 containing the wt VP40 of Marburg virus (VP40_{WT}), MARV VP40 with PPxY mutated to PPxA (VP40_{PPxA}) or MARV VP40 with the late domain motif of Ebola virus (PTAPPEY) VP40 (VP40_{ELD}), or empty plasmid as negative control, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Twenty-four hours later, VLP and cell lysates were prepared as described in (18) and analyzed by western blotting using goat anti-VP40 antibody and mouse anti-GAPDH (Hitest). Signal intensities were collected using a LAS (GE healthcare) and quantified using Image J. The cellular VP40 signal (VP40_{cell}) was normalised using the GAPDH signal intensity = Normalised VP40_{cell} = VP40_{cell}/GAPDH_{mean}. Then, VLP release efficiency was calculated as VLP release efficiency = [(VP40_{supernatant} - VP40_{supernatant mock}) + [Normalised VP40_{cell} - Normalised VP40_{cell mock}]].

681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

Quantification of filovirus replication by TCID50. Vero E6 cells were cultured in 96-well plates to 50% confluence and infected with 10-fold serial dilutions (eight replicates) of supernatants from infected cells. At 12 days p.i., when the CPE had stabilized, cells were analysed by light microscopy. The TCID₅₀/ml titers were calculated using the Spearman-Kärber method.

Statistical analysis - Statistical analysis was done using unpaired Student t-test. Data are presented as means and error bars as 5D if not indicated otherwise (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.005).

- Ingham RJ, et al. (2005) WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Molecular and cellular biology* 25(16):7092-7106.
- Kanelis V, Farrow NA, Kay LE, Rotin D, & Forman-Kay JD (1998) NMR studies of tandem WW domains of Nedd4 in complex with a PY motif-containing region of the epithelial sodium channel. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 76(2-3):341-350.
- Persaud A, et al. (2009) Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays. *Molecular systems biology* 5:333.
- Harty RN, Paragas J, Sudol M, & Palese P (1999) A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *Journal of virology* 73(4):2921-2929.
- Freed EO (2002) Viral late domains. *Journal of virology* 76(10):4679-4687.
- Blot V, et al. (2004) Nedd4-1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *Journal of cell science* 117(Pt 11):2357-2367.
- Kikonyogo A, et al. (2001) Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20):11199-11204.
- Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, & Hayes FP (2000) A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13871-13876.
- Yasuda J, Hunter E, Nakao M, & Shida H (2002) Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO reports* 3(7):636-640.
- Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, & Shida H (2003) Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *Journal of virology* 77(18):9987-9992.
- Bieniasz PD (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344(1):55-63.
- Zhadina M & Bieniasz PD (2010) Functional interchangeability of late domains, late domain cofactors and ubiquitin in viral budding. *PLoS pathogens* 6(10):e1001153.
- Wodrich H, et al. (2010) A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS pathogens* 6(3):e1000808.
- Greber UF, Willetts M, Webster P, & Helenius A (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75(3):477-486.
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, & Nemerow GR (2005) Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of virology* 79(4):1992-2000.
- Maier O, Galan DL, Wodrich H, & Wiethoff CM (2010) An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature. *Virology* 402(1):11-19.
- Okumura A, Pitha PM, & Harty RN (2008) ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(10):3974-3979.
- Han Z, et al. (2014) Small-molecule probes targeting the viral PPxY-host Nedd4 interface block egress of a broad range of RNA viruses. *Journal of virology* 88(13):7294-7306.
- Fotia AB, et al. (2003) The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(1):70-72.
- Gautam V, et al. (2013) Nedd4 is a specific E3 ubiquitin ligase for the NMDA receptor subunit GluN2D. *Neuropharmacology* 74:96-107.
- Dieter M, et al. (2004) Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obesity research* 12(5):862-870.
- Pak Y, Glowacka WK, Bruce MC, Pham N, & Rotin D (2006) Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination. *The Journal of cell biology* 175(4):631-645.
- Georgieva MV, de Pablo Y, Sanchis D, Comella JX, & Llovera M (2011) Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *Journal of neurochemistry* 117(3):479-493.
- Sommer T, Weber A, & Jarosch E (2014) Rsp5/Nedd4 clears cells of heat-damaged proteins. *Nature cell biology* 16(12):1130-1132.
- Shearwin-Whyatt LM, Brown DL, Wylie FG, Stow JL, & Kumar S (2004) N4WBP5A (Ndfip2), a Nedd4-interacting protein, localizes to multivesicular bodies and the Golgi, and has a potential role in protein trafficking. *Journal of cell science* 117(Pt 16):3679-3689.
- Boase NA & Kumar S (2015) NEDD4: The founding member of a family of ubiquitin-protein ligases. *Gene* 557(2):113-122.
- Taouji S, Dahan S, Bosse R, & Chevret E (2009) Current Screens Based on the AlphaScreen Technology for Deciphering Cell Signalling Pathways. *Current genomics* 10(2):93-101.
- Bouchechareilh M, et al. (2010) AlphaScreen-based characterization of the bifunctional kinase/RNase IRE1alpha: a novel and atypical drug target. *Journal of biomolecular screening* 15(4):406-417.
- Negróni L, et al. (2014) Integrative quantitative proteomics unveils proteostasis imbalance in human hepatocellular carcinoma developed on nonfibrotic livers. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13(12):3473-3483.
- Fotia AB, et al. (2004) Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry*

Acknowledgements.

This work was supported by a PEPS Idex grant from the CNRS and the University of Bordeaux to H.W. & E.C. S.A. was supported by a fellowship of the Direction Générale de l'Armement (DGA). We acknowledge the SFRTransbiomed for support in buying the Prestwick chemical compound library. We acknowledge the support of the Bordeaux Imaging Center for image acquisition. H.W. and E.C. are INSERM fellows.

- 279(28):28930-28935.
- Wang IH, et al. (2013) Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution. *Cell host & microbe* 14(4):468-480.
- Cassany A, et al. (2015) Nuclear import of adenovirus DNA involves direct interaction of hexon with an N-terminal domain of the nucleoporin Nup214. *Journal of virology* 89(3):1719-1730.
- Hartlieb B & Weissenhorn W (2006) Filovirus assembly and budding. *Virology* 344(1):64-70.
- Kolesnikova L, et al. (2009) Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *Journal of virology* 83(5):2327-2337.
- Nunes-Alves C (2014) Ebola update. *Nature reviews. Microbiology* 12(10):656.
- de Chassey B, Meyniel-Schicklin L, Aublin-Gex A, Andre P, & Lotteau V (2012) New horizons for antiviral drug discovery from virus-host protein interaction networks. *Current opinion in virology* 2(5):606-613.
- de Chassey B, Meyniel-Schicklin L, Vonderscher J, Andre P, & Lotteau V (2014) Virus-host interactions: new insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome medicine* 6(11):115.
- de Chassey B, Meyniel-Schicklin L, Aublin-Gex A, Andre P, & Lotteau V (2012) Genetic screens for the control of influenza virus replication: from meta-analysis to drug discovery. *Molecular bioSystems* 8(4):1297-1303.
- Tapia VE, et al. (2010) Y65C missense mutation in the WW domain of the Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1 affects its binding activity and deregulates pre-mRNA splicing. *The Journal of biological chemistry* 285(25):19391-19401.
- Schreiner S, et al. (2012) Transcriptional activation of the adenoviral genome is mediated by capsid protein VI. *PLoS pathogens* 8(2):e1002549.
- Sehr P, Pawlita M, & Lewis J (2007) Evaluation of different glutathione S-transferase-tagged protein captures for screening E6/E6AP interaction inhibitors using AlphaScreen. *Journal of biomolecular screening* 12(4):560-567.
- Ungermannova D, et al. (2013) High-throughput screening AlphaScreen assay for identification of small-molecule inhibitors of ubiquitin E3 ligase SCF5K2-Cks1. *Journal of biomolecular screening* 18(8):910-920.
- Sharma D, et al. (2009) Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 44(6):2347-2353.
- Chockalingam K, Simeon RL, Rice CM, & Chen Z (2010) A cell protection screen reveals potent inhibitors of multiple stages of the hepatitis C virus life cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8):3764-3769.
- Lu X, Xiong Y, & Silver J (2002) Asymmetric requirement for cholesterol in receptor-bearing but not envelope-bearing membranes for fusion mediated by ecotropic murine leukemia virus. *Journal of virology* 76(13):6701-6709.
- Danthi P & Chow M (2004) Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *Journal of virology* 78(1):33-41.
- Cui J, et al. (2014) Critical role of cellular cholesterol in bovine rotavirus infection. *Virology journal* 11:98.
- Ikedo M & Longnecker R (2007) Cholesterol is critical for Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A trafficking and protein stability. *Virology* 360(2):461-468.
- Lee IH, et al. (2009) The activity of the epithelial sodium channels is regulated by caveolin-1 via a Nedd4-2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 284(19):12663-12669.
- Ye Q, et al. (2011) Flunarizine inhibits sensory neuron excitability by blocking voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ currents in trigeminal ganglion neurons. *Chinese medical journal* 124(17):2649-2655.
- Clark KB & Eisenstein EM (2013) Targeting host store-operated Ca²⁺ release to attenuate viral infections. *Current topics in medicinal chemistry* 13(16):1916-1932.
- Gehring G, et al. (2014) The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69(8):2123-2131.
- Debonneville C, et al. (2001) Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *The EMBO journal* 20(24):7052-7059.
- Zhang W, Na T, Wu G, Jing H, & Peng JB (2010) Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* 285(47):36586-36596.
- Rougier JS, Albesa M, Abriel H, & Viard P (2011) Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1 (NEDD4-1) controls the sorting of newly synthesized Ca^v1.2 calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 286(11):8829-8838.
- Zhang JH, Chung TD, & Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* 4(2):67-73.
- Heim A, Ebnet C, Harste G, & Pring-Akerblom P (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of medical virology* 70(2):228-239.
- Gyuresik B, Haruki H, Takahashi T, Mihara H, & Nagata K (2006) Binding modes of the precursor of adenovirus major core protein VII to DNA and template activating factor I: implication for the mechanism of remodeling of the adenovirus chromatin. *Biochemistry* 45(1):303-313.

749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

« The amphipathic helix of adenovirus capsid protein VI contributes to penton release and postentry sorting. » **Martinez R, Schellenberger P, Vasishtan D, Aknin C, Austin S, Dacheux D, Rayne F, Siebert A, Ruzsics Z, Gruenewald K, Wodrich H.** J Virol. 2015 Feb;89(4):2121-35. doi: 10.1128/JVI.02257-14. Epub 2014 Dec 3.

Chapitre du livre : Methods in molecular biology. SPRINGER Protocols. 'PROTEOSTASIS' « Using AlphaScreen[®] to identify small molecule inhibitors targeting a conserved host-pathogen interaction. » **Sisley Austin, Saïd Taouji, Eric Chevet, Harald Wodrich and Fabienne Rayne.**
à paraître durant l'été 2016.

« A novel class of small molecule inhibitors perturbs Nedd4/[LP]PxY interactions and blocks entry of a non-enveloped DNA virus. » **Austin S, Taouij S, Komatsu T, Martinez R, Aknin C, Dolnik O, Becker S, van de Weghe P, Rayne F, Chevet E, Wodrich H.**
Prochainement soumis dans JBC

Posters

Présentation d'un poster lors de l'EMBO workshop Dr Jekyll and Mr Hyde: The Macrophage in Inflammation and Immunity ayant eu lieu à Marseille du 17 – 19 Janvier 2013.

Présentation d'un poster lors du congrès Tsukuba Global Science Week 2013 ayant eu lieu à Tsukuba (JAPON) du 2 – 4 Octobre 2013. Prix de la deuxième meilleure communication orale.

Présentation d'un poster lors du forum de l'innovation de la DGA à l'école polytechnique à Palaiseau le 26 novembre 2015.

Communications

Communication orale lors du congrès Tsukuba Global Science Week 2013 ayant eu lieu à Tsukuba (JAPON) du 2 – 4 Octobre 2013. Prix de la deuxième meilleure communication orale.

Communication orale lors du Workshop «Cell Biology of Viral Infections», (Schöntal, Allemagne), Novembre 2014.

Communication orale à la journée des jeunes chercheurs de la SFR Transbiomed du 18 juin 2015. Prix de la meilleure communication orale.

RESUME

Criblage d'inhibiteurs de l'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4 : une cible antivirale à large spectre

L'identification d'antiviraux à large spectre est un des défis majeurs de la recherche actuelle en virologie. Une des stratégies les plus prometteuses consiste à cibler une interaction virus/hôte conservée. Ainsi, avec la technique d'AlphaScreen[®] et le modèle d'interaction protéine VI de l'Adénovirus (AdV)/Nedd4-2, nous avons réalisé un criblage biochimique à haut débit contre l'interaction virus/hôte [LP]PxY/Nedd4, commune à différentes familles de virus. Nous avons trouvé des candidats inhibiteurs issus d'une banque de composés approuvés par les agences de santé. Nous les avons testés, caractérisés et validé leur effet antiviral sur deux familles de virus totalement différentes. Ainsi, les composés C9 (Sulconazole) et C4 (Flunarizine) que nous avons identifiés diminuent la réplication de l'AdV, un virus à ADN enveloppé et du virus de Marburg, un virus à ARN, non enveloppé de la famille des *Filoviridae*. Ces résultats ont permis de valider l'interaction [LP]PxY/Nedd4 comme une cible idéale d'un antiviral à large spectre et de proposer un repositionnement de ces molécules C9 et C4 comme antiviraux potentiels. Nous avons également synthétisé de nouvelles molécules analogues du composé C9 et démontré qu'elles étaient tout aussi efficaces que le composé lui-même sur la réplication de l'AdV. Ces résultats nous ont permis de présenter la classe des dérivés imidazolés comme structure de base pour l'élaboration de nouveaux antiviraux, potentiellement à large spectre.

SUMMARY

Development of a small compound inhibitor screening against Virus/Host [LP]PxY/Nedd4 interaction as broad spectrum antiviral drug target

Broad-spectrum antiviral identification is considered as one of the major aims of the actual virology research and one strategy consists in targeting virus/host interaction. Using the AlphaScreen[®] technology and the adenoviral model protein VI/Nedd4-2, we performed high-throughput biochemical screening targeting the [LP]PxY/Nedd4 interaction, a common interaction of different virus families. We identified candidate inhibitors from a library compound approved by health agencies. We tested, characterized and validated the antiviral effect of those compounds on two very different virus families. Indeed, compounds C9 (Sulconazole) and C4 (Flunarizine) decrease replication of the adenovirus, a DNA non-enveloped virus and the replication of the Marburg virus, an RNA enveloped virus from the Filovirus family. Taken together, those results permit us to validate the [LP]PxY/Nedd4 interaction as good target for a broad spectrum antiviral and to propose the "repositioning" of compounds C4 and C9 as antivirals. Moreover, we have synthesized new analogues from C9 showing similar effect on AdV replication compared to the original molecule (C9). In conclusion, our work on developing new broad-spectrum antivirals highlights the possibility to use imidazole derivatives as a new class of antiviral compounds.

Keywords: Nedd4, late domain, PPxY, Adenovirus, Filovirus, drug screen, drug repositioning, AlphaScreen[®], Prestwick chemical library