



Développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines à large spectre antiviral et étude de leurs mécanismes d'action dans les infections par le Virus de l'Hépatite C et les Coronavirus.

Quentin Nevers

► To cite this version:

Quentin Nevers. Développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines à large spectre antiviral et étude de leurs mécanismes d'action dans les infections par le Virus de l'Hépatite C et les Coronavirus.. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC0013 . tel-01945254

HAL Id: tel-01945254

<https://theses.hal.science/tel-01945254>

Submitted on 5 Dec 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.

UNIVERSITE PARIS-EST

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, CRETEIL (ED 402)

INSERM U955-IMRB, Equipe 18 « Virus, Hépatologie, Cancer »



Développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines à large spectre antiviral et étude de leurs mécanismes d'action dans les infections par le virus de l'hépatite C et les *Coronavirus*

Par Quentin NEVERS

Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris-Est

Présentée et soutenue publiquement le 31/01/2018

Devant un jury constitué de :

Pr Johan NEYTS : Rapporteur

Pr Sylvie VAN DER WERF : Rapportrice

Dr Sophie LE PODER : Examinatrice

Dr Nolwenn JOUVENET : Examinatrice

Pr Jean-Michel PAWLOTSKY : Directeur de thèse

Dr Abdelhakim AHMED-BELKACEM : Co-directeur de thèse

Résumé de la thèse en français

Les dernières décennies ont été marquées par l'émergence ou la réémergence d'un nombre croissant de virus pathogènes. Malheureusement, les antiviraux actuellement approuvés ciblent un nombre trop restreint de virus ; il y a donc un besoin urgent de développer des antiviraux à large spectre.

Les cyclophilines sont des protéines cellulaires impliquées dans un grand nombre de processus biologiques, qui possèdent une activité enzymatique peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). Elles sont également impliquées dans la réplication de virus appartenant à des familles éloignées, et constituent donc une cible de choix dans le développement d'antiviraux à large spectre. Toutefois, les inhibiteurs de cyclophilines disponibles possèdent de nombreux inconvénients qui rendent leur utilisation clinique difficile.

Par une stratégie de "fragment-based drug design", nous avons généré une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines, les SMCypI ("Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors") sans lien avec ceux existant. La cristallographie de ces composés révèle qu'ils se fixent dans les deux poches du site actif des cyclophilines et qu'ils inhibent leur activité PPIase. Ces composés ne sont pas immunosuppresseurs et bloquent *in vitro* l'infection par le VIH, le VHC et les *Coronavirus*.

L'activité anti-VHC du C31, composé le plus actif sur l'activité PPIase des cyclophilines, a été caractérisée. Le C31 est un inhibiteur pan-génotypique du VHC, qui possède une haute barrière génétique au développement de la résistance, et présente une activité additive avec les inhibiteurs du VHC approuvés. Le C31 bloque l'infection par le VHC en rompant l'interaction entre la protéine virale NS5A et la cyclophiline A de façon PPIase-dépendante. Enfin, le C31 est actif sur la réplication des virus Zika, de la Dengue et de la Fièvre Jaune.

L'activité des SMCypI a été caractérisée sur l'infection par le coronavirus 229E (HCoV-229E). Contrairement au VHC, l'inhibition de l'infection ne corrèle pas avec l'inhibition de l'activité PPIase des cyclophilines. Une étude de la relation de structure/activité des composés révèle qu'un groupement chimique situé à l'interface entre les deux poches du site actif des cyclophilines est un déterminant clé de l'effet anti-coronavirus. Le F836 a été identifié comme le

composé le plus actif, et bloque l'effet cytopathique et la quantité d'ARN du HCoV-229E avec la même efficacité que l'alisporivir, sans toxicité associée. Ce composé bloque l'entrée du HCoV-229E après l'attachement du virus à la surface cellulaire, et est actif sur l'entrée des HCoV-OC43 et du MERS-CoV. Par l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9, des cellules invalidées pour les principales cyclophilines ont été générées. La cyclophiline A semble nécessaire à l'infection par HCoV-229E et est en partie responsable de l'effet antiviral du F836. Enfin, le niveau d'expression de la cyclophiline A est régulé négativement à la suite de l'infection.

Les SMCypI sont des candidats crédibles pour le développement futur d'antiviraux à large spectre, et constituent un outil dans la compréhension des mécanismes par lesquels les cyclophilines modulent les infections virales.

Mots-clés : cyclophilines, inhibiteurs, large spectre, virus de l'hépatite C, coronavirus, résistance, mécanismes d'action

Résumé de la thèse en anglais

Over the past decades, an increasing number of viruses have emerged or re-emerged in humans. Unfortunately, currently approved antivirals target a small set of viruses. Thus, there is an urgent need for the development of broad-spectrum antivirals.

Cyclophilins are cellular proteins involved in a large number of biological processes, and in different viral lifecycles from unrelated families. They possessed a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) enzymatic activity. They appear as a potential target in the development of broad-spectrum antivirals. However, already developed cyclophilin inhibitors have drawbacks, which limit their clinical use.

By means of "fragment-based drug design", we generated a new class of small-molecule cyclophilin inhibitors (SMCypI), unrelated with those already developed. Cristallographic studies revealed that they bind in the active site of cyclophilins and inhibit their PPIase activity. Those compounds are not immunosuppressive and inhibit the replication of HIV, HCV and coronaviruses *in vitro*.

The anti-HCV activity of C31, the most potent inhibitor of cyclophilins PPIase activity, has been characterized. C31 was a pan-genotypic inhibitor of HCV, possessed a high genetic barrier to the development of resistance and had additive effect with currently approved anti-HCV agents. C31 blocked HCV replication by disrupting the interaction between viral protein NS5A and host cyclophilin A in a PPIase-dependent manner. Finally, C31 was active on Zika, Yellow Fever and Dengue viruses' infections.

The antiviral activity of SMCypI has then been characterized on human coronavirus 229E (HCoV-229E) infection. Contrary to HCV, there was no correlation between anti-PPIase and antiviral activities of compounds. A structure/activity relationship study identified a key moiety in SMCypI at the interface between the two pockets of cyclophilins active site. F836 has been identified as the most potent compound which inhibited both cytopathic effect and intracellular RNA of HCoV-229E without associated cytotoxicity. This compound targeted HCoV-229E entry in a post-attachment way and was also active on HCoV-OC43 and MERS-CoV strains. By means of CRISPR-Cas9, cell lines depleted for relevant cyclophilins were generated. Cyclophilin A was

identified as a proviral factor for HCoV-229E and was partially involved in F836 antiviral effect. Finally, cyclophilin A expression level was drastically decreased following infection.

SMCypI are drugable compounds for the development of broad-spectrum antivirals, and a unique tool to decipher the cellular and molecular mechanisms by which cyclophilins interfere with viral lifecycles.

Key words: cyclophilins, inhibitors, broad spectrum, hepatitis C virus, coronavirus, resistance, mechanisms of action

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres de l'équipe 18 qui m'ont accompagné durant mes cinq ans au laboratoire. L'ambiance et l'atmosphère uniques dans lesquelles j'ai eu la chance d'évoluer ont grandement contribué à mon bien-être.

Je remercie Jean-Michel Pawlotsky, pour m'avoir accordé sa confiance à de très nombreuses reprises, depuis le stage de troisième année de licence jusqu'à la fin du doctorat. Je le remercie pour l'apport critique mais toujours bienveillant qu'il a eu sur mes travaux de thèse, et pour son implication personnelle dans mes choix de l'après-doctorat.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier, et en particulier Jean-François Guichou, pour leur travail qui fut si important pour nous. Je remercie Jean-François pour ses conseils toujours avisés.

Je remercie Patrice Bruscella, que j'estime énormément professionnellement et humainement, qui m'a accordé beaucoup de confiance et m'a donné un modèle à suivre, tant sa passion pour son métier fut communicative.

Je remercie Alexandre Soulier, avec qui je n'ai pas travaillé directement. La vie du laboratoire est faite de beaucoup d'autres choses que les expériences et les réunions, et Alex y est pour beaucoup. Je garderai un souvenir toujours très agréable d'un grand nombre de nos discussions sur le sport, la politique et tellement d'autres sujets.

Je remercie Laurent Softic, l'une des personnes les plus droites et sincères que j'ai rencontré. Par son arrivée au laboratoire, il a apporté une fraîcheur et un enthousiasme qui m'ont beaucoup aidé.

Je remercie Isaac, Flora et Camille, les personnes dont je me suis senti le plus proche au laboratoire, chacun à sa manière. Ce fut une réelle chance de pouvoir les compter à mes côtés dans un certain nombre de situations, heureuses ou pas.

Je remercie Nazim Ahnou. Sa discrétion, son professionnalisme et sa bonne humeur toujours égale ont pour moi été une véritable leçon d'humilité.

Je remercie, du fond du cœur, Rozenn Brillet. Ma thèse n'aurait pas été la même sans elle. A chaque moment difficile de la thèse, à chaque remise en question, Rozenn n'a eu de cesse de m'encourager. Nous avons, je crois, formé un tandem incroyable et elle m'a presque tout appris. Peu de doctorants ont le privilège d'évoluer aux côtés d'une professionnelle passionnée, patiente et compréhensive comme Rozenn. Cette relation fut d'autant plus importante pour moi qu'elle ne

s'est pas limitée au monde professionnel. Nous avons pu échanger et confronter nos points de vue avec toujours beaucoup de respect et de bienveillance.

Je remercie Hakim Ahmed-Belkacem. Si mes cinq ans de thèse ont été et resteront une merveilleuse période de ma vie, Hakim y est pour beaucoup. J'ai tellement appris et progressé à ses côtés. Je vais garder un souvenir ému, et nostalgique, de toutes ses pauses café à discuter de science, de la famille, de Michel Onfray et de tant d'autres choses ... Hakim m'a donné une grande part de ma confiance en moi. Il m'a parfois recadré mais je ne me suis jamais senti jugé. Je me suis senti libre d'évoquer toutes mes idées, les bonnes comme les mauvaises. Sur un grand nombre de choses, il est pour moi un modèle. Je remercie son côté humain, sincère et touchant, qui m'a parfois déstabilisé mais qui m'a permis de m'épanouir d'une manière incroyable.

Je remercie tous mes amis. Une thèse c'est long et difficile, et je n'aurais peut-être pas autant tenu sans toutes ses soirées, notamment à l'Alouette, à rigoler et à profiter les uns des autres. Un immense merci donc à Gautier, Carine, Tony, Antonin, Elodie, Valentine, Simon, Lucie, Nico et les autres ...

Je remercie ma famille. J'ai une pensée émue pour Sylvie, Jean-François, Patrick, Renée et tous ceux qui me soutiennent depuis déjà tant d'années. Je dois beaucoup à Lauren, Guillaume, Melvyn, Shanelle et Naomy.

Je veux dire un immense merci à ma sœur et mes parents, qui m'ont toujours laissé poursuivre la voie dans laquelle je me sentais le plus heureux. La fierté que je leur inspire est sans doute l'une de mes plus grandes motivations, et l'un des sentiments les plus agréables que je connaisse.

Je remercie ma femme, Alicia, mais je n'en écrirai pas plus ici car il me faudrait encore cent-quarante pages. Merci, merci, merci.

Enfin, je remercie mon fils, Hugo, qui me donne tant de bonheur.

Abréviations, sigles et acronymes utilisés

ALV : Alisporvir

BSAA : « Broad-Spectrum Antiviral Agent », antiviral à large spectre

CoV : Coronavirus

CRISPR : « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats »

CsA : Cyclosporine A

Cyp : Cyclophiline

CypI : « Cyclophilin inhibitor », inhibiteur de cyclophiline

DAA : « Direct-Acting Antiviral », antiviral à action directe

DENV : « Dengue Virus »

EC₅₀ : « Effective Concentration ₅₀ », concentration efficace à 50 %

ECP : Effet cytopathique

EMMPRIN : « Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer »

FDA : « Food and Drug Administration »

HBV : « Hepatitis B Virus », virus de l'hépatite B

HCV : « Hepatitis C Virus », virus de l'hépatite C

HIV : « Human Immunodeficiency Virus », virus de l'immunodéficience humaine

HTA : « Host-Targeting Agent », antiviral ciblant l'hôte

IC₅₀ : « Inhibitory Concentration ₅₀ », concentration inhibitrice à 50 %

IFN : Interféron

KO : « Knock-Out »

MERS : « Middle-East Respiratory Syndrome »

NFAT : « Nuclear Factor of Activated T-cells »

NS5A : « Non-structural 5A »

nsp : « non-structural protein », protéine non structurale

PPIase : Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase

RAS : « Resistance-Associated Substitutions », substitutions amino-acidiques associées à la résistance

SGR : « Subgenomic replicon », réplicon sous-génomique

SARS : « Severe Acute Respiratory Syndrome »

siRNA : « small-interfering Ribonucleic Acid »

SMCypI : « Small-Molecule Cyclophilin Inhibitor », petite molécule inhibitrice des cyclophilines

WNV : « West-Nile Virus », virus du Nil Occidental

WT : « Wild-Type », sauvage

YFV : « Yellow Fever Virus », virus de la fièvre jaune

ZIKV : « Zika Virus »

Table des Matières

I.	INTRODUCTION.....	14
A.	Emergence et réémergence des maladies virales	14
B.	Les antiviraux	17
1)	Antiviraux ayant reçu une autorisation de mise sur le marché de la « Food and Drug Administration » américaine	17
2)	Antiviraux à large spectre	18
C.	Les cyclophilines	20
1)	Structure et fonction des cyclophilines	20
2)	Rôle des cyclophilines dans la cellule et conséquences physiopathologiques	23
D.	Les inhibiteurs de cyclophilines.....	24
1)	Cyclosporines et analogues non immunosuppresseurs	24
2)	Sanglifehrines et analogues non immunosuppresseurs	27
3)	Inconvénients et limites des analogues non-immunosuppresseurs de la cyclosporine A et de la sanglifehrine A.....	28
E.	Rôle des cyclophilines dans le cycle réplcatif de nombreux virus.....	28
1)	Cyclophilines et <i>Flaviviridae</i>	28
2)	Cyclophilines et <i>Coronavirus</i>	38
3)	Cyclophilines et autres virus	48
4)	Cyclophilines et virus : synthèse.....	52
F.	Objectifs et déroulement de la thèse	56
1)	Développement d'une nouvelle famille de petites molécules inhibitrices des cyclophilines, non peptidiques, non immunosuppressives et au large spectre antiviral	56
2)	Caractérisation de l'activité anti- <i>Flaviviridae</i> du composé 31	56

3) Caractérisation de l'activité anti- <i>Coronavirus</i> des petites molécules inhibitrices des cyclophilines et étude de leur mécanisme d'action antiviral.....	57
II. MATERIELS ET METHODES	59
A. Modèles infectieux des <i>Coronavirus</i>	59
1) HCoV-229E	59
2) MERS-CoV	59
B. Mesure de l'activité anti- <i>Coronavirus</i> des inhibiteurs de cyclophilines.....	59
1) Développement d'un test de mesure de l'effet cytopathique viro-induit.....	59
2) RT-qPCR HCoV-229E	60
3) Immunofluorescence	61
C. Criblage anti-HCoV-229E d'une librairie de petites molécules inhibitrices des cyclophilines.....	62
D. Gammes de concentrations	62
E. Etude de l'étape du cycle viral du HCoV-229E ciblée par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines	62
1) « Time-of-addition-assay »	62
2) « Time-of-removing » assay	63
3) Test d'attachement	63
4) Test d'internalisation	63
F. Développement de cellules « Knock-Out » (KO) pour la cyclophiline A (CypA -/-) par la technologie CRISPR/Cas9	64
1) Présentation de la technologie CRISPR/Cas9.....	64
2) « Design » des sites de clivage	65
3) Plasmides	65
4) Clonage des sites de clivage	65

5)	Transfections.....	67
6)	Isolements clonaux.....	67
7)	Validation par géotypage	68
8)	Validation par séquençage	68
9)	Validation par Western-Blot.....	68
G.	Infection des lignées Huh7 WT et CypA KO	69
H.	Hydrolyse par la protéinase K.....	69
I.	Purification des particules virales.....	70
J.	Expériences de « cross-linking »	70
III.	RESULTATS	71
A.	Développement d'une nouvelle famille de petites molécules inhibitrices des cyclophilines, non peptidiques, non immunosuppressives et au large spectre antiviral....	71
B.	Caractérisation de l'activité anti-VHC du composé 31 et évaluation de son potentiel antiviral à large spectre chez les virus de la famille <i>Flaviviridae</i>	73
C.	<i>Coronavirus</i> et cyclophilines	130
1)	Caractérisation de l'effet des SMCypI lors de l'infection par HCoV-229E	130
2)	Recherche de l'étape du cycle viral ciblée par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines.....	139
3)	Identification de la cyclophiline impliquée dans l'infection par HCoV-229E	143
IV.	DISCUSSION	150
V.	CONCLUSION GENERALE	161
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162

Table des Figures

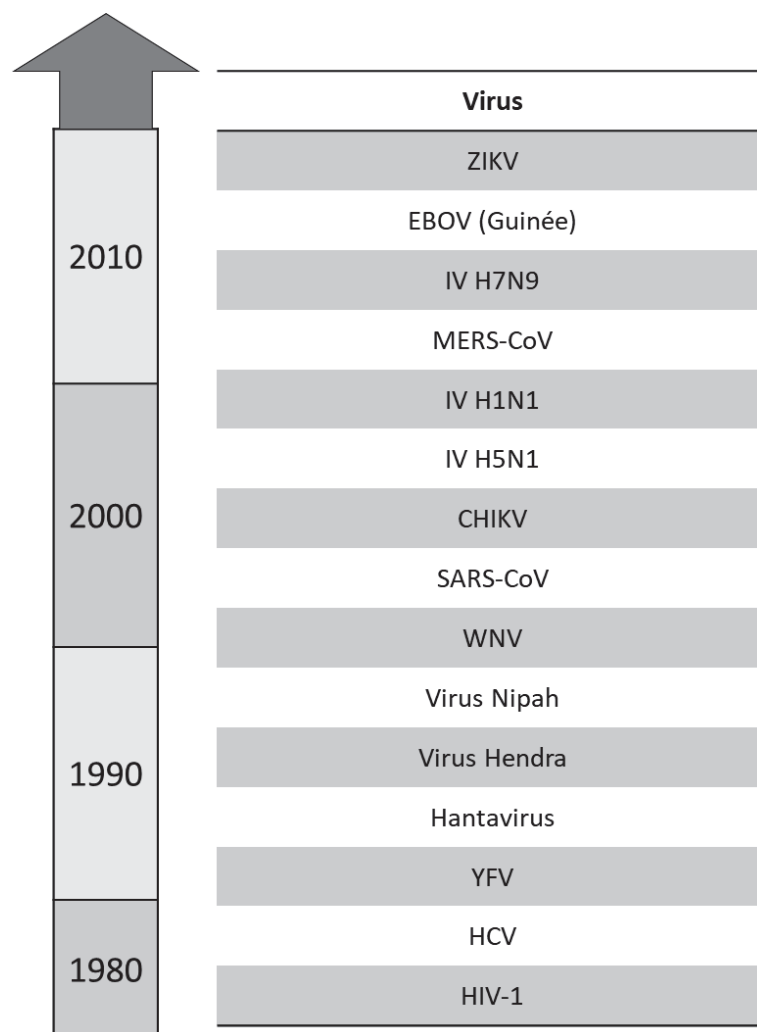
<u>Figure 1</u> : Antiviraux mis sur le marché par la « Food and Drug Administration » américaine	17
<u>Figure 2</u> : Infections virales dont les cycles de vie semblent requérir la participation des cyclophilines	20
<u>Figure 3</u> : Activité peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomérase des cyclophilines	21
<u>Figure 4</u> : Structure cristallographique de la cyclophiline A	22
<u>Figure 5</u> : Structures de la cyclosporine A, de l'alisporivir, de la sanglifehrine A et du BC544	25
<u>Figure 6</u> : Mécanisme d'action immunosuppressive de la cyclosporine A	26
<u>Figure 7</u> : Structure cristallographique du complexe ternaire cyclosporine A/cyclophiline A/calcineurine	27
<u>Figure 8</u> : Représentation schématique du HCV	29
<u>Figure 9</u> : Organisation génomique du virus de l'hépatite C	30
<u>Figure 10</u> : Cycle de réplication du virus de l'hépatite C	31
<u>Figure 11</u> : Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C	32
<u>Figure 12</u> : Modèle simplifié du mécanisme d'action des inhibiteurs de cyclophilines dans l'infection par le virus de l'hépatite C	34
<u>Figure 13</u> : Différents mécanismes d'inhibition du virus de l'hépatite C par les inhibiteurs de cyclophilines	36
<u>Figure 14</u> : Arbre phylogénique de la sous-famille <i>Coronavirinae</i>	38
<u>Figure 15</u> : Représentation schématique de la particule virale des <i>Coronavirus</i>	39
<u>Figure 16</u> : Organisation génomique du SARS-CoV	40
<u>Figure 17</u> : Cycle réplcatif des <i>Coronavirus</i>	41
<u>Figure 18</u> : Représentation de la réplication des <i>Coronavirus</i>	42
<u>Figure 19</u> : Ecologie de l'émergence des <i>Coronavirus</i>	45
<u>Figure 20</u> : Modèle de l'interaction entre la nucléocapside du SARS-CoV et la cyclophiline A	46
<u>Figure 21</u> : Modèle des interactions cyclophilines / <i>Coronavirus</i>	48
<u>Figure 22</u> : Modèle du mécanisme d'action des inhibiteurs de cyclophilines dans l'entrée du virus de l'hépatite B	51
<u>Figure 23</u> : Représentation schématique du test de quantification de l'effet cytopathique viro-induit	60
<u>Figure 24</u> : Représentation schématique du principe de la technologie CRISPR/Cas9	64
<u>Figure 25</u> : Représentation schématique du plasmide "sgRNA"	65

I. Introduction

A. Emergence et réémergence des maladies virales

Les dernières décennies ont été marquées par l'émergence ou la réémergence dans les populations humaines de virus pathogènes, aux impacts économiques et sanitaires majeurs (Marston, Folkers et al. 2014) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Chronologie de l'émergence virale depuis le début des années 1980 – Adapté de « *The Center for Food Security and Public Health* », Université d'Etat de l'Iowa



ZIKV : virus Zika ; **EBOV** : virus Ebola ; **IV** : Virus Influenza ; **MERS-CoV** : *Coronavirus* associé au MERS (« Middle-East Respiratory Syndrome ») ; **CHIKV** : Virus Chikungunya ; **SARS-CoV** : *Coronavirus* associé au SARS (« Severe Acute Respiratory Syndrome ») ; **WNV** : virus du « West-Nile » ; **YFV** : Virus de la fièvre jaune ; **HCV** : virus de l'hépatite C ; **HIV-1** : virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1, « Human Immunodeficiency Virus type 1 »), ainsi que les virus des hépatites B (HBV, « Hepatitis B Virus ») et C (HCV, « Hepatitis C Virus »), causent chaque année plusieurs centaines de milliers de décès (Dube, Sylla et al. 2017; Heffernan, Barber et al. 2018). Des virus respiratoires hautement pathogènes au risque pandémique élevé ont émergé lors des quinze dernières années. Les *Coronavirus* humains (HCoV) associés au Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère (SARS-CoV, « Severe Acute Respiratory Syndrome ») et au Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV, « Middle-East Respiratory Syndrome ») présentent des taux de létalité élevés (Leung, Hedley et al. 2004; Beigel, Voell et al. 2018), tout comme certains virus grippaux (IV, « Influenza Virus ») de souches H5N1 et H7N9 (Hui, Lee et al. 2018). Les épidémies de virus Ebola sont généralement limitées au niveau local ; pourtant, l'épidémie en Afrique de l'Ouest au début des années 2010 (Gautier, Hounghbedji et al. 2017), qui a causé la mort de 10000 personnes, a montré que ces virus pouvaient adopter de nouveaux modes de transmission sans pour autant perdre de leur pathogénicité. Enfin, un grand nombre de virus connus sous le nom d'arbovirus (pour « arthropode-borne virus »), constituent un problème de santé publique majeur (Ruckert and Ebel 2018) : citons, entre autres, les virus de la Dengue (« Dengue Virus », DENV), du Chikungunya (« Chikungunya Virus », CHIKV), de la fièvre jaune (YFV, « Yellow Fever Virus »), du Nil Occidental (« West-Nile Virus », WNV) ou plus récemment le virus Zika (« Zika Virus », ZIKV), responsable de milliers de cas de microcéphalies chez les enfants nés de mères infectées (Jaenisch, Rosenberger et al. 2017) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Impact des maladies causées par des virus à ARN – Données les plus récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et du Centre Européen de Prévention et de contrôle des maladies (ECDC)

Famille virale	Virus	Pathologies	Incidence	Morbidité	Mortalité	Antiviral ou vaccin	Populations à risque
<i>Flaviviridae</i>	DENV	Syndrome pseudo-grippal à fièvre hémorragique	390 M/an	96 M/an	15000/an	Pas d'antiviral Vaccin en développement avancé	Enfants ++ Adultes +
	YFV	Fièvre hémorragique	200000/an	84000-170000/an	29000-60000/an	Pas d'antiviral Vaccin disponible	Enfants, adultes, personnes âgées

	JEV	Encéphalite	68000/an	68000/an	13600-20400/an	Pas d'antiviral Vaccin disponible	Enfants
	WNV	Encéphalite, fièvre du « West-Nile »	Epidémies sporadiques	43000 (Etats-Unis, 1999-2015)	1000 depuis 1999	Ni antiviral ni vaccin	Enfants, adultes, personnes âgées
	ZIKV	Microcéphalie, syndrome de Guillain-Barré	Epidémies sporadiques	Inconnue	Rare	Ni antiviral ni vaccin	Femmes enceintes
<i>Togaviridae</i>	CHIKV	Douleurs articulaires sévères	Epidémies sporadiques	Plus de 200000/an	Rare	Ni antiviral ni vaccin	Nouveau-nés Personnes âgées
<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	Détresse respiratoire	Epidémies sporadiques	8096 (2002-2004)	774 (2002-2004)	Ni antiviral ni vaccin	Personnes âgées, immunodéprimées
	MERS-CoV	Détresse respiratoire, défaillance rénale	Epidémies sporadiques	2029 depuis 2012	704 depuis 2012	Ni antiviral ni vaccin	Personnes âgées, immunodéprimées, diabétiques
<i>Paramyxoviridae</i>	hRSV	Bronchiolite	Epidémies saisonnières	30 M/an	66000-200000/an	Ribavirine ? Palivizumab (prophylaxie) ?	Enfants
		Pneumopahie					Adultes
	hMPV	Pneumopathie	Epidémie saisonnières	Plusieurs M/an	Même ratio que hRSV	Ni antiviral ni vaccin	Enfants
	PIV3	Infections respiratoires hautes et basses	Epidémie saisonnières	52000/an (Etats-Unis)	Même ratio que hRSV	Ni antiviral ni vaccin	Enfants < 2 ans
<i>Picornaviridae</i>	EV71	Syndrome neurologique sévère, maladie pied-main-bouche	Epidémies sporadiques	Inconnue	Inconnue	Pas d'antiviral Vaccin en développement	Enfants
	CVB	Péricardite, myocardite	Epidémies sporadiques	Inconnue	Inconnue	Ni antiviral ni vaccin	Enfants ++ Adultes +

DENV : virus de la Dengue ; **YFV** : virus de la fièvre jaune ; **JEV** : virus de l'encéphalite japonaise ; **WNV** : virus du « West-Nile » ; **ZIKV** : virus Zika ; **CHIKV** : virus chikungunya ; **SARS-CoV** : *Coronavirus* associé au SARS (« Severe Acute Respiratory Syndrome ») ; **MERS-CoV** : *Coronavirus* associé au MERS (« Middle-East Respiratory Syndrome ») ; **hRSV** : virus respiratoire syncytial humain ; **hMPV** : métapneumovirus humain ; **PIV3** : virus parainfluenza de type 3 humain ; **EV71** : entérovirus 71 ; **CVB** : coxsackievirus ; **M** : millions

La lutte contre ces pathogènes rend nécessaire la recherche d'antiviraux efficaces. Dans la partie suivante, nous décrirons quels antiviraux sont actuellement sur le marché, leurs avantages et leurs inconvénients, puis évoquerons la nécessité du développement d'antiviraux à large spectre.

B. Les antiviraux

1) Antiviraux ayant reçu une autorisation de mise sur le marché de la « Food and Drug Administration » américaine

En 1963, l'idoxuridine devient la première molécule mise sur le marché par la « Food and Drug Administration » (FDA) américaine pour le traitement de la kératite herpétique. Entre juin 1963 et avril 2016, des milliers de molécules antivirales ont été décrites dans la littérature (De Clercq and Li 2016). Malgré cela, seuls 90 antiviraux ont été approuvés au cours de cette période. De plus, un très faible nombre de virus sont concernés par ces molécules : HIV, HBV, HCV, HCMV (« Human Cytomegalovirus »), VZV (« Varicella Zoster Virus »), HSV (« Herpes Simplex Virus »), IV, RSV (« Respiratory Syncytial Virus ») et HPV (« Human Papillomavirus »). A eux seuls, le HIV et le HCV sont la cible de deux-tiers des antiviraux sur le marché (**Figure 1**).

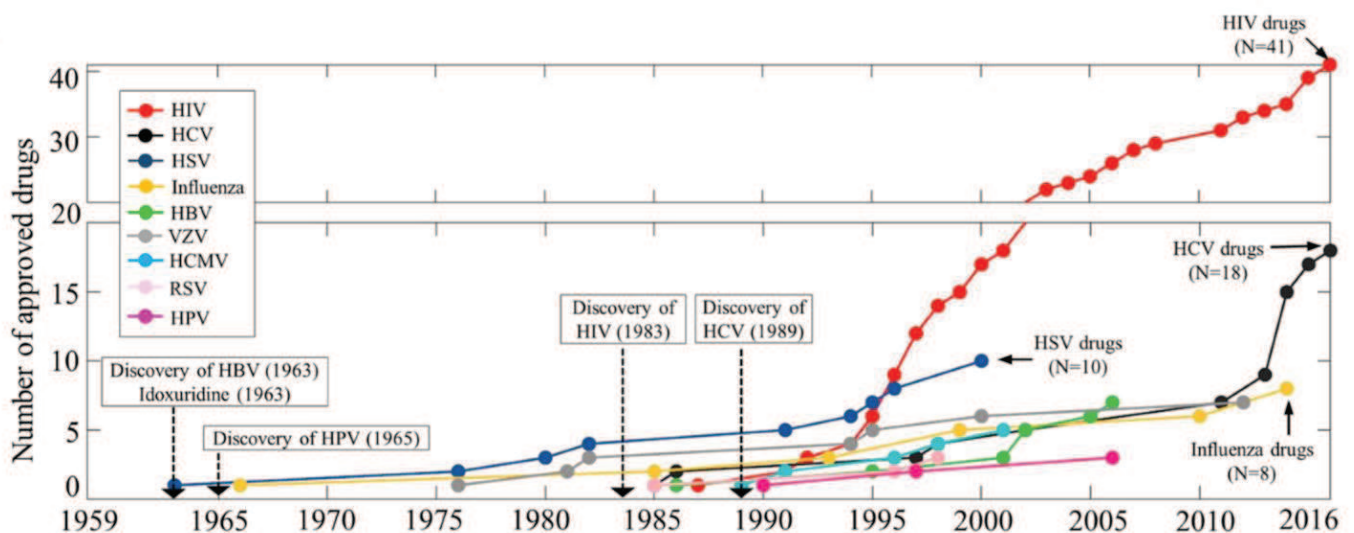


Figure 1 : Antiviraux mis sur le marché par la « Food and Drug Administration » américaine - (De Clercq and Li 2016) - Les antiviraux actuellement sur le marché concernent seulement 9 virus : HIV, HCV, HSV, IV, HBV, VZV, HCMV, RSV et HPV. La figure représente le nombre de mises sur le marché de 1963 à 2016. Quarante et une molécules ont été approuvées dans la lutte anti-HIV, 18 pour le HCV, 10 pour le HSV et 8 pour l'IV.

Certaines de ces molécules ont été de véritables succès thérapeutiques, c'est par exemple le cas des nouveaux traitements de l'infection par le HCV. En revanche, certains virus, parfois hautement pathogènes, comme l'EBOV (« Ebola Virus ») ou le MERS-CoV ne bénéficient ni d'un vaccin ni d'un traitement antiviral efficace.

Par ailleurs, la découverte et le développement d'un médicament constituent un processus extrêmement long. Ainsi, dans le cas du HCV, presque 30 ans se sont écoulés entre la découverte du virus et la mise sur le marché des nouveaux traitements. Cette recherche est évidemment très coûteuse, or il existe aujourd'hui plus de 200 infections virales orphelines de traitement (De Clercq and Li 2016). Dans ce contexte, la stratégie visant à cibler chaque virus de manière spécifique peut apparaître vaine, d'autant plus dans le contexte d'émergence et de réémergence que nous venons de rappeler. Il y a donc un besoin urgent de développer des antiviraux pouvant agir sur différents virus.

C'est l'objectif du développement d'antiviraux à large spectre, ou « Broad-Spectrum Antiviral Agents » (BSAA), qui a pour finalité la mise sur le marché de composés actifs sur l'infection par des virus appartenant au même genre, ou à des genres différents au sein d'une même famille virale, ou encore à des familles virales différentes. Le but ultime de ce développement d'antiviraux à large spectre serait d'obtenir des molécules pan-virales (Debing, Neyts et al. 2015).

2) Antiviraux à large spectre

a) Antiviraux à action directe

Les antiviraux à action directe (DAA, pour « Direct-Acting Antivirals ») sont des molécules qui ciblent des protéines virales. De par leur spécificité d'action, la plupart des DAA sont des composés actifs sur le cycle d'un virus donné, comme c'est le cas des inhibiteurs de la protéine virale NS5A (« Non-Structural 5A ») dans le traitement du HCV par exemple. Pourtant, certains DAA possèdent une activité antivirale à large spectre, notamment les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques.

L'exemple type de ce genre de composés est le favipiravir, ou T705. Ce composé a été mis sur le marché au Japon pour le traitement des virus grippaux A, B et C, mais il est actif sur la réplication de nombreux virus à ARN de polarités positive et négative (*Arenavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Flavivirus*, *Enterovirus* et *Alphavirus*) (Furuta, Takahashi et al. 2009). Récemment, des études menées chez la souris ont montré une activité du favipiravir sur la réplication de l'EBOV, et un essai clinique sur ce pathogène a même été mené chez l'Homme (essai « JIKI »). On peut également citer le BCX4430 ou la 2'-C-méthylcytidine, qui ont montré un spectre antiviral élargi *in vitro* (*Flavivirus*, *Norovirus*, *Picornavirus*, *Filovirus*). Certaines de ces molécules ont toutefois été associées à des toxicités importantes, et leur mécanisme d'action est parfois mal compris. De plus, leur spectre d'action *in vitro* est trop étroit pour pouvoir les considérer comme de véritables BSAA.

b) Antiviraux ciblant l'hôte

Les antiviraux ciblant l'hôte, ou HTA (« Host-Targeting Agents ») sont des composés qui bloquent des facteurs cellulaires et/ou des voies de signalisation nécessaires à l'infection. Certains ont un spectre d'action trop étroit pour être considérés comme des BSAA, c'est notamment le cas du miravirsén, molécule qui antagonise le rôle proviral de miR-122 dans l'infection par le HCV (Pawlotsky 2012). L'une des cibles principales du développement d'HTA à large spectre est la modulation du métabolisme lipidique, dont un grand nombre de virus sont dépendants. Citons, entre autres, les statines (del Real, Jimenez-Baranda et al. 2004; Potena, Frascaroli et al. 2004; Delang, Paeshuyse et al. 2009), l'arbidol (Blaising, Levy et al. 2013) ou les dérivés du LJ001, qui possèdent des mécanismes d'action différents (Wolf, Freiberg et al. 2010; Vigant, Hollmann et al. 2014).

Malheureusement, les données sur l'utilisation de ces molécules *in vivo* sont à la fois peu nombreuses et peu encourageantes. De la même manière, les modulateurs de la réponse immunitaire comme les interférons (IFN) apparaissent comme des pistes très intéressantes, mais susceptibles d'avoir des effets secondaires importants et peu contrôlables chez les patients, comme le développement de maladies auto-immunes.

Les cyclophilines (Cyps), dont les structures et fonctions sont détaillées dans ce manuscrit, sont des protéines cellulaires intervenant dans le cycle de vie de virus appartenant à des familles virales très éloignées, de toutes organisations génomiques, enveloppés ou non (**Figure 2**). Les Cyps apparaissent en ce sens comme une cible de choix dans le développement de molécules au potentiel pan-viral.

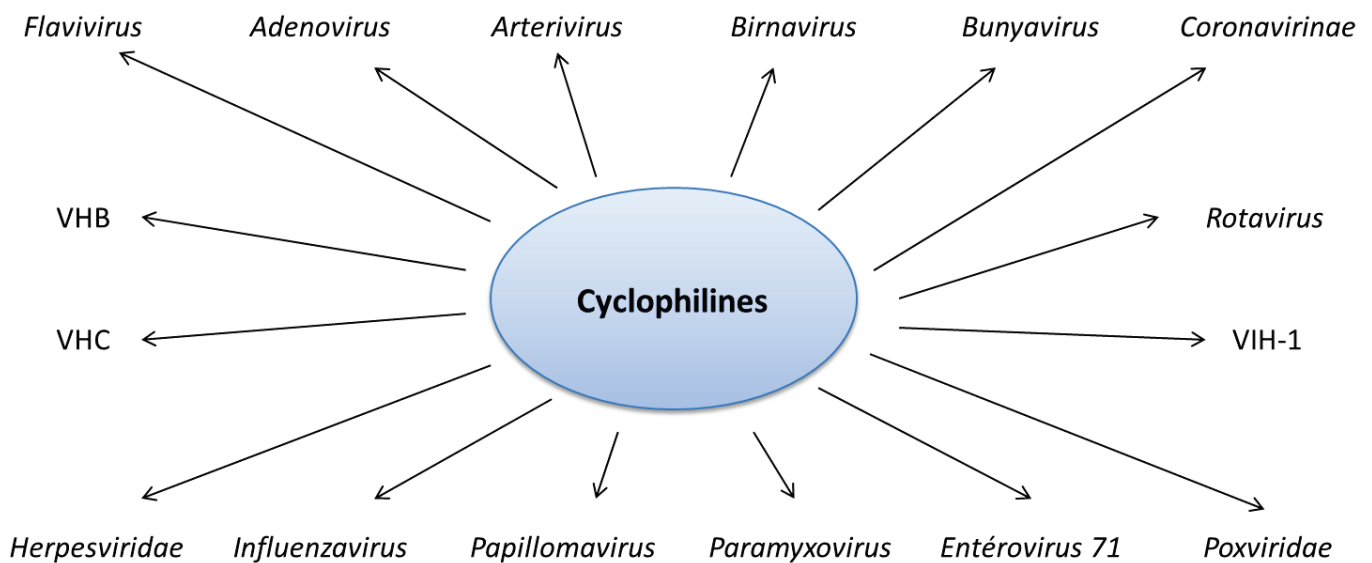


Figure 2 : Infections virales dont les cycles de vie semblent requérir la participation des cyclophilines – Ce schéma est fondé sur une analyse de la littérature. Les critères choisis pour considérer une implication des Cyps dans l'infection par un virus sont : 1) la susceptibilité de ce virus aux inhibiteurs de cyclophilines (CypI) et 2) la modulation de l'infection par la surexpression, le « silencing » ou le KO (« Knock-Out ») d'une ou plusieurs cyclophilines (Cyps), *in vitro* ou *in vivo*.

C. Les cyclophilines

1) Structure et fonction des cyclophilines

Les Cyps sont des protéines présentes chez les mammifères, les plantes, les insectes, les bactéries et les champignons. Chez l'Homme, 17 Cyps ont été décrites. Toutes les Cyps possèdent un domaine commun d'environ 109 acides aminés, appelé CLD (pour « Cyclophilin Like Domain »). Le CLD est entouré de différents domaines spécifiques de chaque Cyp qui régulent leurs activités biologiques ainsi que leurs localisations subcellulaires. Elles possèdent une activité enzymatique peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). Cela signifie qu'elles

catalysent, en amont d'un résidu amino-acidique proline (Pro), le changement de conformation de la liaison peptidique de la forme *trans* à la forme *cis*, et *vice-versa* (**Figure 3**).

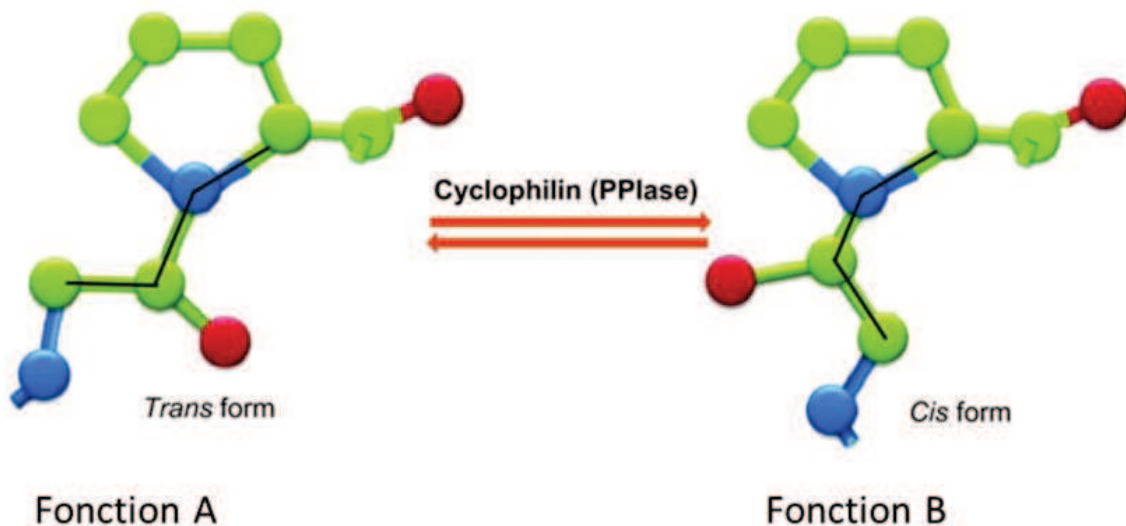


Figure 3 : Activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase des cyclophilines - (Kumari, Roy *et al.* 2013) – Les liaisons peptidiques existent généralement sous la forme *trans* (à gauche), énergétiquement favorable ; la forme *cis* (à droite) est toutefois indispensable à la réalisation de certains processus biologiques. En amont d'un résidu proline, au niveau d'une liaison dite peptidyl-prolyl, les Cyps isomérisent l'interconversion *cis-trans* de la liaison, conférant à la protéine porteuse de la liaison isomérisée une fonction biologique (A ou B) différente. Cette activité enzymatique est en conséquence nommée peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase).

En effet, les liaisons peptidiques des protéines contiennent des doubles liaisons généralement sous la forme *trans*, énergétiquement favorable. Dans cette conformation, les chaînes latérales s'opposent l'une à l'autre avec un angle de 180°. La forme *cis*, dans laquelle les chaînes latérales sont adjacentes, est indispensable à la réalisation de certains processus biologiques fondamentaux. L'isomérisation spontanée des liaisons peptidyl-prolyl est un processus lent qui constitue une étape limitante du repliement des protéines. Par leur activité PPIase, les Cyps accélèrent ce processus et sont en ce sens considérées comme des protéines chaperonnes. L'importance de leur activité explique le haut degré de conservation des Cyps dans tous les règnes du vivant.

Les structures cristallographiques de plusieurs Cyps ont été résolues. La CypA, prototype de la famille des Cyps, possède une structure en tonneau- β composée de huit feuillets- β

antiparallèles et de deux hélices- α qui « entourent » littéralement le tonneau de chaque côté (**Figure 4**).

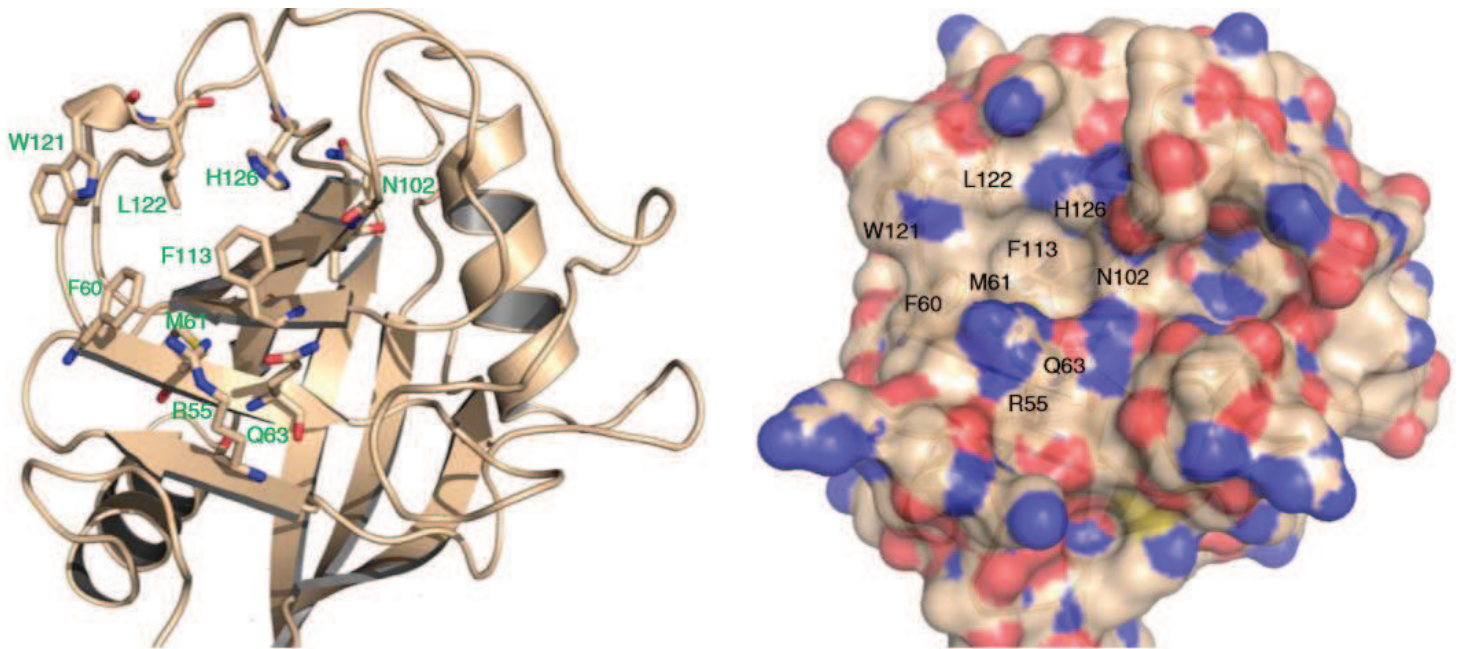


Figure 4 : Structure cristallographique de la cyclophiline A - (Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016) – A gauche, représentation « cartoon » ; à droite, représentation « surface ». Les acides aminés catalytiques représentés et numérotés entourent la poche hydrophobe. La poche gardienne est contiguë à la poche hydrophobe. L : Leucine ; H : Histidine ; F : Phénylalanine ; M : Méthionine ; Q : Glutamine ; R : Arginine ; W : Tryptophane ; N : Asparagine.

La CypA possède un site actif composé de deux poches. La première, peu profonde, est composée de neuf résidus d'acides aminés hydrophobes et aromatiques (R55, F60, M61, Q63, N102, F113, W121, L122 et H126) et porte l'activité catalytique PPIase. Elle sera nommée dans ce manuscrit « poche hydrophobe ». Elle est très conservée au sein de cette famille de protéines. Ainsi, les acides aminés Q63 et L122 sont présents chez les 17 membres des Cyps. L'autre poche, contiguë à la première et beaucoup plus profonde, pourrait permettre de porter la spécificité du substrat. Les acides aminés qui la constituent sont moins conservés que ceux de la poche hydrophobe. Elle est composée d'acides aminés qui ne permettent l'accès qu'à certains substrats et est appelée en conséquence « gatekeeper pocket », ou « poche gardienne » dans ce manuscrit (Davis, Walker et al. 2010).

2) Rôle des cyclophilines dans la cellule et conséquences physiopathologiques

La CypA est une protéine de 18 kilo Daltons (kDa), principalement cytosolique et très abondante (elle représente entre 0,1% et 0,5% de l'ensemble des protéines du cytosol). Elle participe à de nombreux processus physiologiques comme le repliement des protéines, l'activation des lymphocytes T et le transport intracellulaire des protéines.

La CypA peut être sécrétée et se fixer à son récepteur membranaire EMMPRIN (« Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer »), également appelé CD147. La sécrétion de la CypA intervient au cours de processus inflammatoires. Elle est un régulateur clé des maladies cardiovasculaires, et un niveau élevé de CypA est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de dérèglements inflammatoires. Elle est également surexprimée dans de nombreux cancers et régule les processus de transformation et de métastase (Nigro, Pompilio et al. 2013).

La CypB est également fortement exprimée et se localise au niveau du réticulum endoplasmique. Elle est principalement impliquée dans l'adhésion cellulaire et la modulation de l'inflammation. La CypB est intimement liée à la réponse immunitaire innée, processus dans lequel elle a été montrée comme étant un activateur d'IRF-3 (« Interferon Responsive Factor-3 ») (Obata, Yamamoto et al. 2005). Comme la CypA, la CypB peut être sécrétée et partage le même récepteur membranaire que la CypA, EMMPRIN/CD147.

La CypD possède une séquence d'adressage à la mitochondrie. Dans cet organite, elle semble être un élément régulateur de l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale mPTP (« mitochondrial Permeability Transition Pore ») au niveau de la membrane mitochondriale. En cas d'augmentation du contenu calcique dans la cellule, le pore mPTP s'ouvre pour incorporer le calcium et réguler l'homéostasie cellulaire. Ceci induit un gonflement de la mitochondrie, qui aboutit à son éclatement et à la mort cellulaire. L'ouverture calcium-dépendante du pore mPTP a été mise en cause dans les lésions survenant après une ischémie-reperfusion. Des expériences chez des souris « Knock-Out » (KO) ou « Knock-In » (KI) pour le gène PPIF (codant la CypD) ont montré que les souris KO étaient protégées des dommages liés à l'ischémie-reperfusion

cardiaque, tandis que les souris KI présentaient un gonflement mitochondrial et une mortalité cellulaire spontanés (Baines, Kaiser et al. 2005).

Le rôle potentiel de la CypD dans le déclenchement et la progression de la maladie d'Alzheimer a également été suggéré dans un modèle murin (Du, Guo et al. 2008). Ainsi, il apparaît que les souris PPIF KO récupéraient des fonctions cérébrales en lien avec la mémoire beaucoup plus rapidement que les souris sauvages (« Wild-Type », WT).

Les Cyps A, B et D concentrent l'essentiel des recherches concernant cette famille de protéines. Toutefois, de nouvelles Cyps sont fréquemment identifiées, comme la CypJ, récemment découverte comme étant surexprimée dans plus de 60 % des carcinomes hépatocellulaires, pathologie au cours de laquelle elle régulerait le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire *via* son activité PPIase (Chen, Chen et al. 2015).

Ces rôles divers et pléiotropes des Cyps peuvent être connectés les uns aux autres, ajoutant de la complexité à la compréhension de leur mécanisme d'action. Ainsi, il a été montré que la Cyp60 régulaient le niveau d'expression de EMMPRIN/CD147, le récepteur membranaire des Cyps A et B sécrétées (Pushkarsky, Yurchenko et al. 2005).

D. Les inhibiteurs de cyclophilines

1) Cyclosporines et analogues non immunosuppresseurs

La cyclosporine A (CsA) a été découverte lors d'un criblage de molécules immunosuppressives réalisé par la société Sandoz (Sweeney, Fu et al. 2014). Elle est issue du champignon *Tolypocladium inflatum* et consiste en un peptide cyclique de onze acides aminés (**Figure 5**).

L'utilisation clinique de la CsA a été révolutionnaire, en faisant le composé immunosuppresseur de choix pour prévenir les rejets de greffe. Elle a également été utilisée dans certaines pathologies telles que le psoriasis ou l'uvéite (Borel, Di Padova et al. 1990).

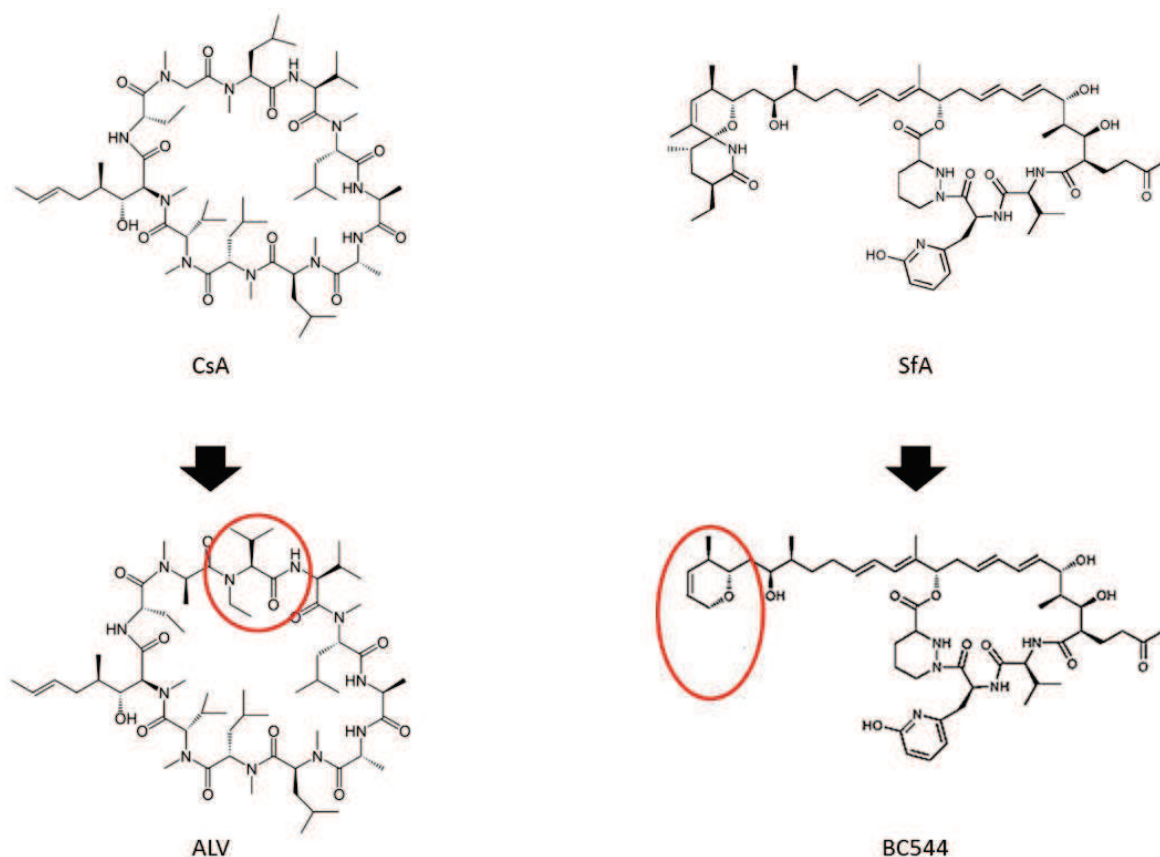


Figure 5 : Structures de la cyclosporine A, de l'alisporivir, de la sanglifehrine A et du BC544 – Adapté de (Sweeney, Fu et al. 2014) et de (Hansson, Moss et al. 2015)) – Les modifications clés à l'origine de la perte des propriétés immunosuppressives de la CsA et de la SfA sont indiquées par un cercle rouge. CsA : cyclosporine A ; SfA : sanglifehrine A ; ALV : alisporivir.

Le mécanisme d'immunosuppression de la CsA est connu (**Figure 6**). La CsA se fixe avec une grande affinité à la CypA dans le cytosol. Ce complexe binaire se lie à la calcineurine, inhibant son activité enzymatique (Colombani, Robb et al. 1985; Schreiber 1992).

Dans les conditions physiologiques, la calcineurine est une phosphatase responsable de la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (« Nuclear Factor of Activated T-cells »). La déphosphorylation de NFAT aboutit à sa translocation au noyau, où il active la transcription de plusieurs gènes, notamment immunitaires. L'expression du gène de l'interleukine-2 (IL-2) est grandement dépendante de la translocation nucléaire de NFAT (Schreiber and Crabtree 1992; Peel and Scribner 2013).

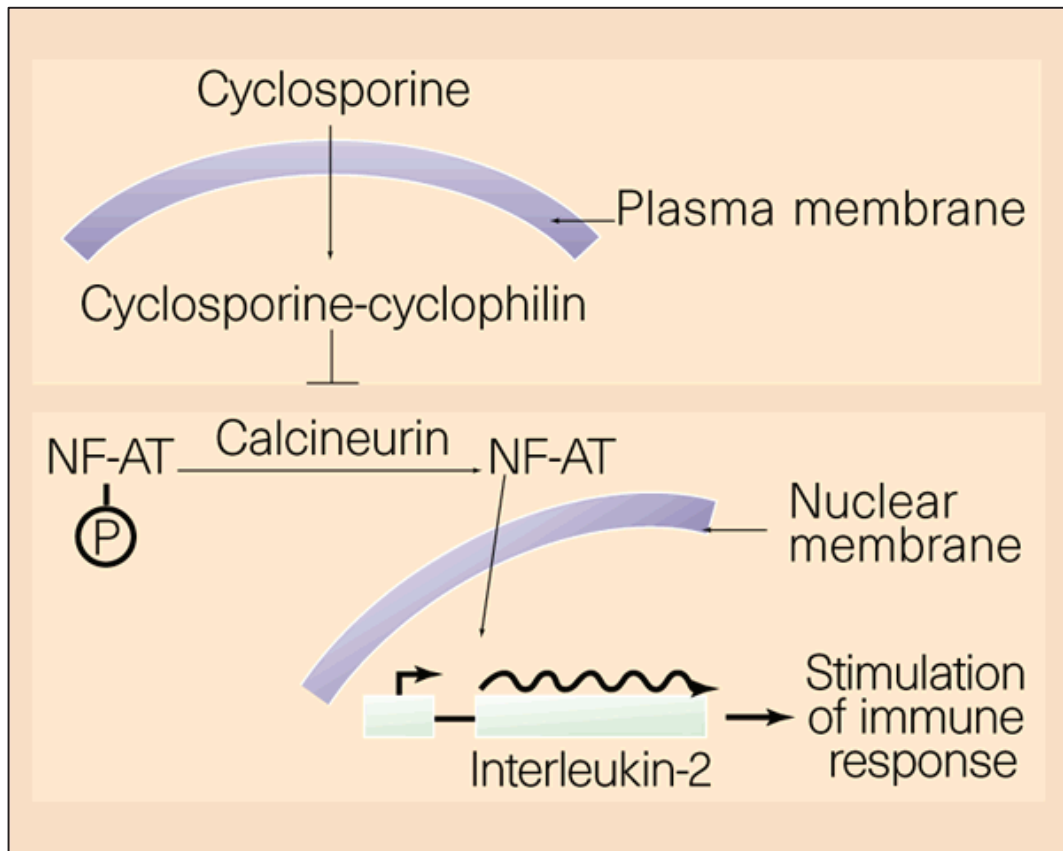


Figure 6 : Mécanisme d'action immunosuppressive de la cyclosporine A - (Nabel 1999) – La CsA se fixe à la CypA après son entrée dans le cytosol. Le complexe binaire CsA/CypA se fixe à la calcineurine et inhibe l'activité phosphatase de cette dernière. En absence de CsA, la calcineurine déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (« Nuclear Factor of Activated T-cells »). Cette déphosphorylation entraîne la translocation nucléaire de NFAT qui active la transcription de gènes, notamment immunitaires.

La CsA se fixe aux Cyps au niveau de la poche hydrophobe. Son site de fixation sur la calcineurine est distinct du premier, ce qui permet la formation du complexe ternaire CypA/CsA /calcineurine (**Figure 7**).

Des analogues non-immunosuppresseurs de la CsA ont été développés (Sweeney, Fu et al. 2014). Ces composés sont très proches en termes de structure et ne diffèrent que par quelques atomes. Ils perdent la capacité de fixation à la sous-unité catalytique de la calcineurine, mais continuent de fixer les Cyps avec une grande affinité, parfois supérieure à celle de la CsA, et d'inhiber l'activité PPIase avec des concentrations inhibitrices à 50 % (IC_{50} , « Inhibitory Concentration $_{50}$ ») *in vitro* de l'ordre du nanomolaire.

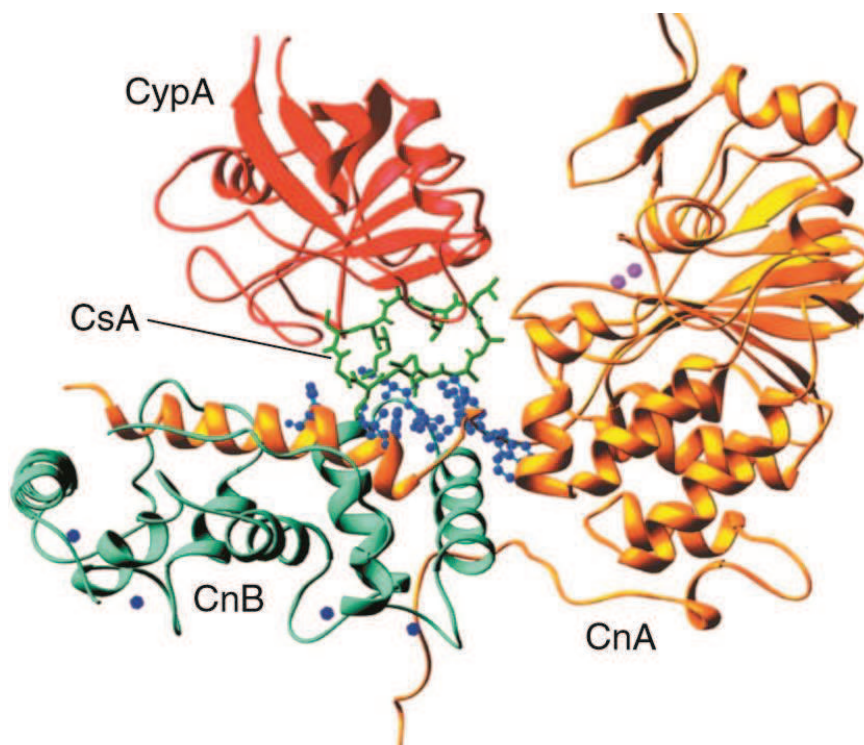


Figure 7 : Structure cristallographique du complexe ternaire cyclosporine A/cyclophiline A/calcineurine - (Huai, Kim et al. 2002) – La CsA possède un site de fixation sur la CypA et un autre sur les sous-unités A et B de la calcineurine, respectivement catalytique et régulatrice, à l’origine de la formation du complexe ternaire. En rouge, la CypA ; en vert, la CsA ; en jaune, la sous-unité catalytique de la calcineurine ; en bleu, la sous-unité régulatrice de la calcineurine.

Ces dérivés ont été développés notamment dans le cadre de la lutte contre le HCV, comme par exemple le NIM811, le SCY635 ou l’alisporivir (DEBIO-025, ou ALV dans ce manuscrit, représenté sur la **Figure 5**).

2) Sanglifehrines et analogues non immunosuppresseurs

Les sanglifehrines (**Figure 5**) sont une classe d’agents macrocycliques immunosuppresseurs naturels, découverts lors d’un criblage de molécules capables de se fixer aux Cyps (Sweeney, Fu et al. 2014). La sanglifehrine A (SfA) est le membre le plus abondant de cette famille de molécules et se fixe dans le site actif de la CypA. Contrairement à la CsA, son activité immunosuppressive n’est pas liée à l’inhibition de la calcineurine et reste à déterminer. Récemment, certains analogues non-immunosuppresseurs de la SfA, possédant la capacité de fixation à la CypA, ont été développés à l’instar de ce qui a été fait pour les dérivés de la CsA (Hansson, Moss et al. 2015; Steadman, Pettit et al. 2017) (**Figure 5**).

3) Inconvénients et limites des analogues non-immunosuppresseurs de la cyclosporine A et de la sanglifehrine A

Bien que débarrassés des propriétés immunosuppressives de la CsA et de la SfA, leurs analogues présentent un grand nombre d'inconvénients qui rendent compliquée une éventuelle utilisation clinique dans le contexte de l'émergence d'une maladie virale. Il s'agit de macromolécules, dont la synthèse nécessite un grand nombre d'étapes (12 par exemple dans le cas de l'ALV). La taille de ces molécules a en outre pour conséquence une faible perméabilité membranaire. Ces composés présentent aussi un risque élevé d'effets secondaires, non liés à l'inhibition des Cyps. Il est par exemple connu qu'ils inhibent les transporteurs de type ABC (« ATP-Binding Cassette »), notamment Pgp (« P-glycoprotein 1 »). Les dérivés non-immunosuppresseurs de la CsA moduleraient la réponse immunitaire en activant la présentation de l'antigène *via* une augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des cellules (Esser-Nobis, Schmidt et al. 2016) par des mécanismes inconnus. Enfin, l'ALV a été associé, lors du traitement de patients ayant une infection chronique par le HCV, à sept cas de pancréatites aiguës dont un décès, liées à l'hypertriglycémie qu'il provoque, en cours de phase III d'essai clinique (Zeuzem, Flisiak et al. 2015).

E. Rôle des cyclophilines dans le cycle répliatif de nombreux virus

1) Cyclophilines et *Flaviviridae*

a) Cyclophilines et HCV

- Généralités

Le HCV, découvert en 1989 (Choo, Kuo et al. 1989), appartient au genre *Hepacivirus* au sein de la famille des *Flaviviridae*. Il existe 7 génotypes et de très nombreux sous-types du virus. Le virus possède un tropisme hépatique et l'Homme est le seul hôte naturel du virus.

- Particule virale

La particule virale est enveloppée et présente un diamètre de 40 à 100 nm (Catanese, Uryu et al. 2013). Les hétérodimères de protéines d'enveloppe E1/E2 sont les constituants majeurs de la membrane virale. Elle possède une capsidie icosaédrique contenant le génome viral (**Figure 8**).

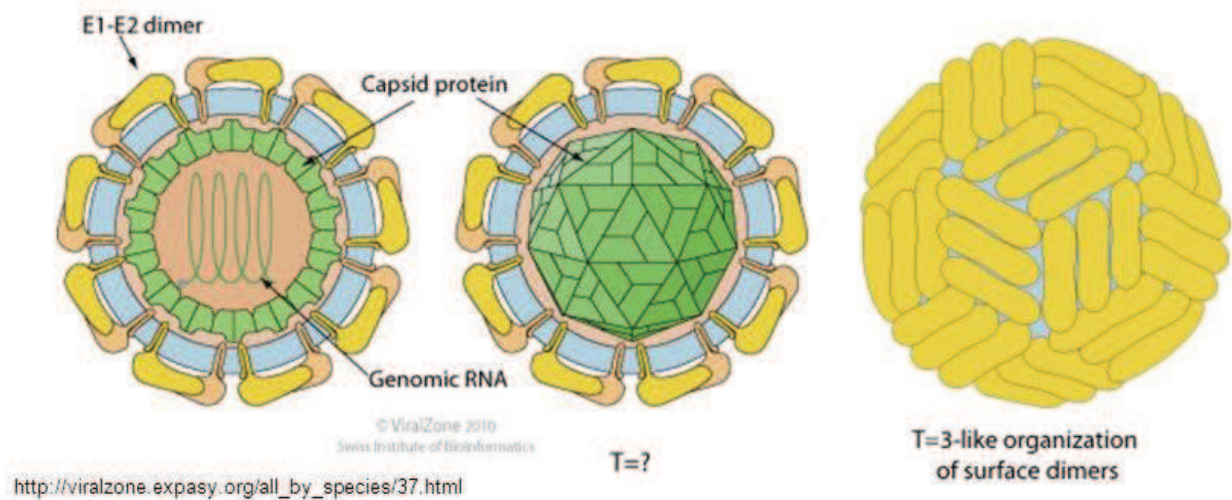


Figure 8 : Représentation schématique du HCV- (Viralzone) - La particule virale enveloppée, constituée d'hétérodimères de glycoprotéines E1 et E2, renferme une capside icosaédrique contenant l'ARN génomique.

- Organisation génomique et protéines virales

L'ARN génomique du HCV mesure 9,6 kb. Il s'agit d'un ARN simple brin et de polarité positive. Deux régions non-codantes sont situées aux extrémités 5'et 3'. La traduction IRES- (« Internal Ribosome Entry Site »)-dépendante du génome viral aboutit à la synthèse d'une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés, clivée par différentes protéases cellulaires (notamment la SPP, pour « Signal Peptide Peptidase ») et virales. Le clivage aboutit à la synthèse de 10 protéines. Les protéines structurales E1/E2 constituent l'enveloppe virale, tandis que la protéine « Core » est l'élément de base de la capside. La viroporine p7 semble posséder un rôle de canal ionique. Six nsp (« non structural proteins », protéines non structurales) sont exprimées : NS2 et NS3 sont les protéases virales responsables du clivage de la polyprotéine ; NS4A est le cofacteur de la protéase NS3 ; NS5A est une phosphoprotéine qui ne possède pas d'activité enzymatique mais possède différents rôles fondamentaux dans la réplication et est considérée comme le chef d'orchestre de l'infection par HCV ; enfin, NS5B possède une activité ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Moradpour, Penin et al. 2007) (**Figure 9**).

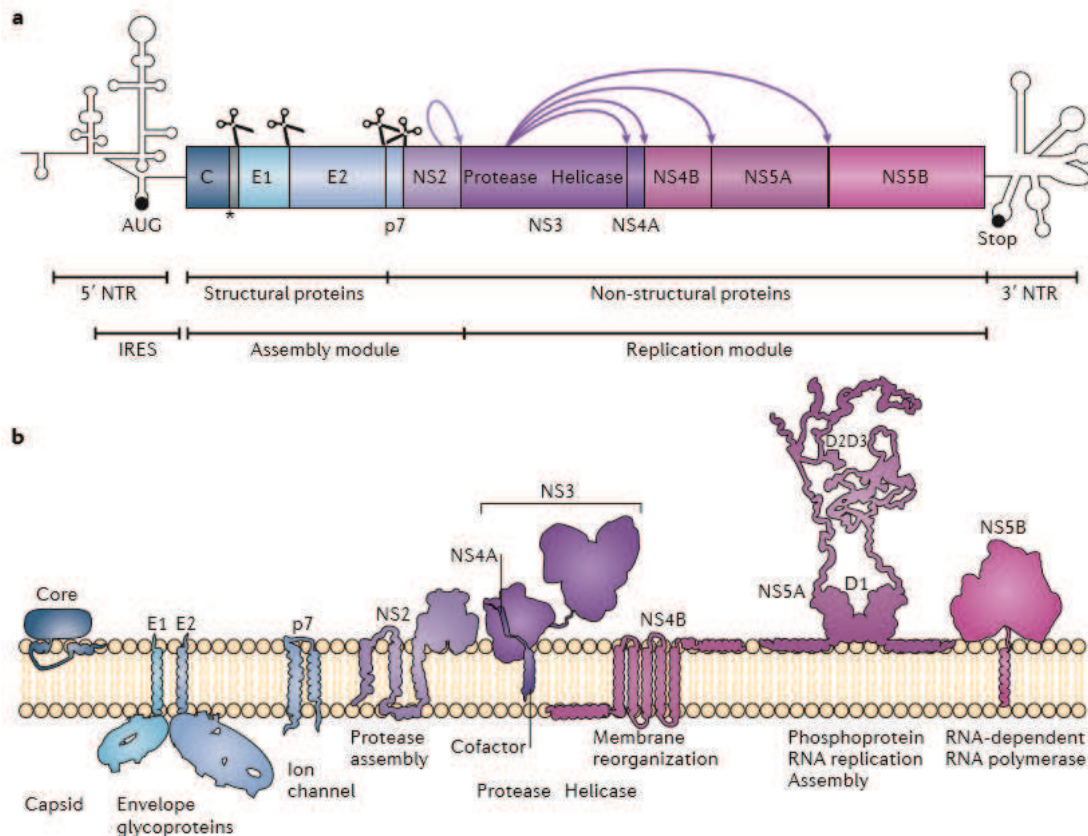


Figure 9 : Organisation génomique du virus de l'hépatite C – (Bartenschlager, Lohmann et al. 2013) – a) Représentation schématique du génome viral. La partie 5' NTR (non traduite) du génome contient l' « Internal Ribosome Entry Site » (IRES). Les protéines structurales et non structurales sont indiquées. Les paires de ciseaux représentent les sites de clivage par les protéases cellulaires. La flèche en violet clair représente le site de clivage par NS2 à la jonction NS2/NS3. Les flèches en violet foncé indiquent les sites de clivage par NS3/4A. b) Représentation schématique de la structure et de la localisation des protéines virales.

- Cycle répliatif

Le HCV présente un cycle de répliation entièrement cytoplasmique schématisé sur la **Figure 10**. Après reconnaissance et attachement de la particule virale sur ses récepteurs membranaires, le virion pénètre dans la cellule (hépatocytes majoritairement, mais aussi lymphocytes B et T, cellules dendritiques) par endocytose dépendante de la clathrine, même s'il ne s'agit pas d'un mode d'entrée exclusif (Blanchard, Belouzard et al. 2006). Les mécanismes de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome font intervenir un gradient de pH. Après libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN génomique non coiffé est traduit par la machinerie cellulaire, notamment grâce au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome sur l'IRES située dans la partie 5' non codante de l'ARN du HCV. Le précurseur polyprotéique qui en résulte est clivé par les différentes protéases cellulaires (SPP) et virales

(NS2 et NS3/4A) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique comme évoqué précédemment.

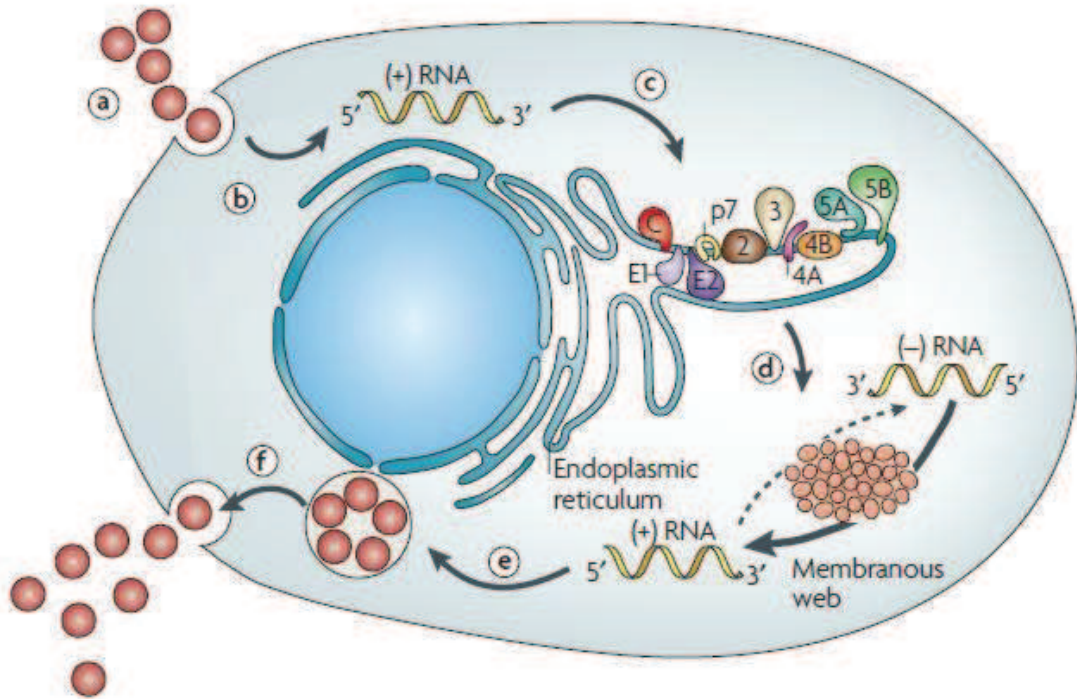


Figure 10 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite C- (Moradpour, Penin et al. 2007) - **a)** Attachement du virus et internalisation. **b)** Décapsidation et libération du génome viral dans le cytoplasme. **c)** Traduction dépendante de l'IRES et clivage de la polyprotéine au niveau de la membrane du RE. **d)** Réplication de l'ARN au sein du réseau membranaire. **e)** Assemblage des virions. **f)** Exocytose des virions.

La réplication de l'ARN viral a lieu au niveau d'usines de production qui consistent en des vésicules à double membranes, ou DMV (pour « Double Membrane Vesicles ») (Romero-Brey, Merz et al. 2012). La polymérase virale NS5B réalise la synthèse d'un ARN viral de polarité négative, qui sert de matrice à la synthèse de nombreux génomes viraux. Le génome viral est encapsidé et les nouvelles particules bourgeonnent au niveau du réticulum endoplasmique. Lors de ce processus, il apparaît que la modulation du métabolisme lipidique par le HCV soit extrêmement importante. En effet, il est clairement établi que l'infection induit la production de gouttelettes lipidiques, et que l'infektivité du virus est corrélée avec son association à des particules de faibles et de très faibles densités (Andre, Komurian-Pradel et al. 2002).

- **Epidémiologie**

Environ 70 millions de personnes dans le monde sont chroniquement infectées par le HCV, soit une séroprévalence mondiale d'environ 1 % (Global Hepatitis Report, OMS 2017). L'Afrique sub-saharienne et l'Asie du Sud-est sont des zones endémiques avec des prévalences d'infection dépassant les 10 %. On estime à 3 à 4 millions le nombre de nouvelles infections par an par le HCV, responsable chaque année de la mort d'environ 1 500 000 personnes (Stanaway, Flaxman et al. 2016).

La transmission du HCV est parentérale avec 60 % des cas d'infections concernant des usagers de drogue par injection. Les transmissions périnatales et sexuelles sont relativement rares, ainsi que la transmission du HCV par transfusion sanguine dans les pays occidentaux.

- **Histoire naturelle de l'infection**

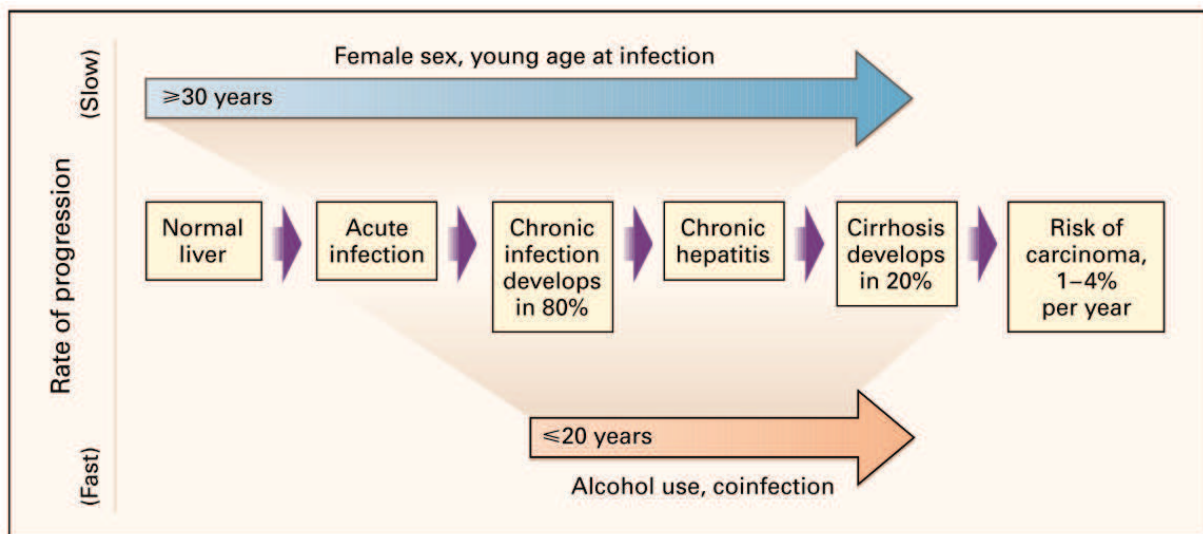


Figure 11 : Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C- (Lauer and Walker 2001) - Une infection chronique se développe dans 4 cas sur 5 à partir d'une infection aiguë. L'hépatite chronique qui en résulte est responsable dans 20 % des cas de l'apparition d'une cirrhose. Tous les ans, 1 à 4 % des patients cirrhotiques développent un carcinome hépatocellulaire de mauvais pronostic. De nombreux facteurs (coinfections, âge, sexe, alcoolisme) contribuent à l'évolution plus ou moins rapide de la maladie.

L'infection aiguë par le HCV est majoritairement asymptomatique et aboutit, dans 65 à 85 % des cas, à une infection chronique, caractérisée par la présence dans le sérum d'ARN viral plus de six mois après l'infection. L'hépatite chronique est responsable dans un cas sur cinq de l'apparition d'une cirrhose.

Chaque année, 1 à 4 % des patients cirrhotiques développent un carcinome hépatocellulaire (Lauer and Walker 2001), qui représente la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Le sexe, l'âge au moment de l'infection, l'alcoolisme et les coinfections par les virus des hépatites B et δ sont des facteurs aggravant l'évolution de la maladie (**Figure 11**).

- **Thérapeutique**

Pendant de nombreuses années, le traitement des patients chroniquement infectés par le HCV a consisté en l'administration de ribavirine et d'IFN. Cette combinaison, efficace dans à peine 50 % des cas, possédait une efficacité inégale entre les génotypes, et était associée à des effets secondaires très importants. Une première avancée majeure a eu lieu en 2011, avec l'approbation aux Etats-Unis et en Europe de deux inhibiteurs de protéase, le telaprevir et le boceprevir. Ces deux composés ont permis d'augmenter significativement les taux de SVR (pour « Sustained Virological Response », ou réponse virologique soutenue), mais n'étaient actifs que contre les virus de génotype 1, possédaient également des effets secondaires majeurs et présentaient une faible barrière génétique au développement de la résistance, compliquant la prise en charge des patients infectés par des virus arborant des RAS (pour « Resistance-Associated Substitutions », substitutions amino-acidiques associées à la résistance). Très récemment, le traitement du HCV a connu une véritable révolution. De nombreuses molécules ont été développées et ont atteint le marché. Les dernières combinaisons de DAA, ciblant les protéines virales NS3, NS5A et NS5B, parfois sans ribavirine ni IFN, permettent d'obtenir des taux de SVR de près de 95 %, pour tous les génotypes, y compris chez les patients difficiles à traiter (cirrhotiques, atteints de défaillance rénale). Enfin, ces molécules possèdent généralement de hautes barrières génétiques au développement de la résistance (Pawlotsky 2016).

- **Cyclophilines et HCV**

L'étude des relations entre Cyps et HCV a commencé en 1988 avec la démonstration que le ligand cellulaire de la CsA était impliqué dans la réplication du virus des hépatites « non A / non B », par l'amélioration des scores hépatiques de chimpanzés chroniquement infectés par le virus (Teraoka, Mishiro et al. 1988) et traités par la CsA. Bien plus tard, en 2003, Inoue et collaborateurs observent une augmentation du taux de SVR chez des patients recevant de la CsA

en plus de l'IFN (Inoue, Sekiyama et al. 2003). Ces observations ont mené à la recherche du mécanisme anti-HCV de la CsA et des CypI en général.

Pendant une décennie, de nombreux travaux ont permis de comprendre le modèle principal de l'implication des Cyps dans le cycle de vie du HCV, et le mécanisme d'action sous-jacent des CypI dans l'infection (**Figure 12**).

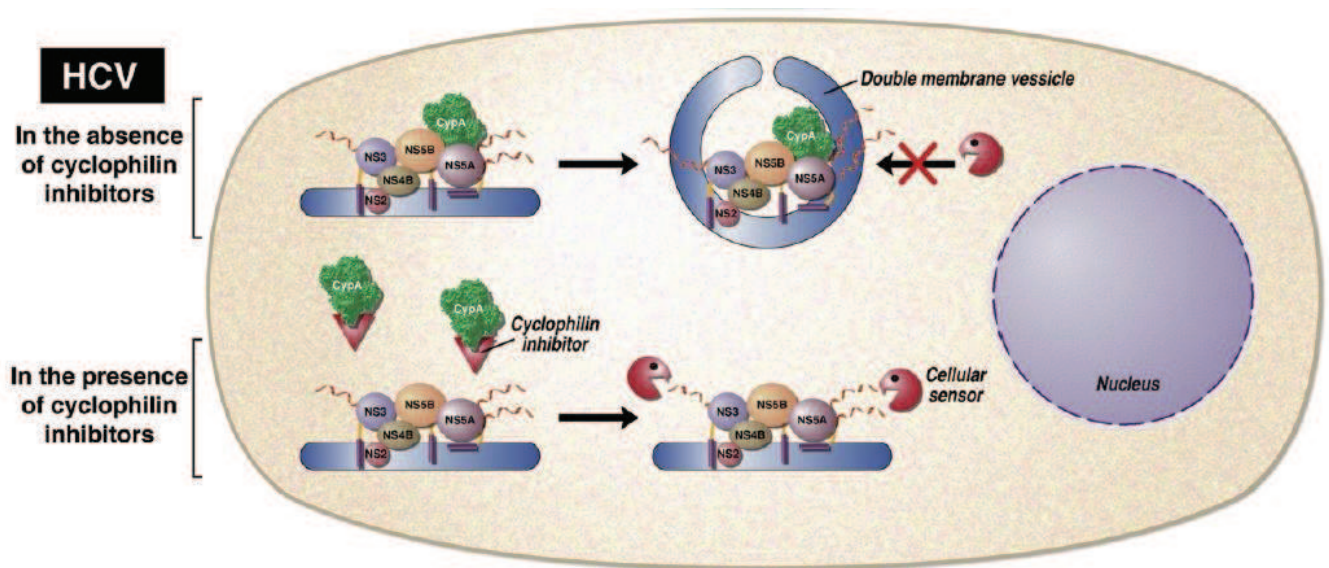


Figure 12 : Modèle simplifié du mécanisme d'action des inhibiteurs de cyclophilines dans l'infection par le virus de l'hépatite C - (Hopkins and Gallay 2015) – En absence de CypI, la CypA interagit avec la protéine virale NS5A et réalise son isomérisation *cis-trans*. NS5A isomérisée participe à la formation des DMV (« Double Membrane Vesicles ») qui protègent le virus de la dégradation par les RNases cellulaires et de la détection par les facteurs de l'immunité innée. En présence de CypI, l'interaction CypA/NS5A est bloquée, ainsi que la formation des DMV. Ceci résulte en la détection du virus par le système immunitaire innée et au blocage de l'infection.

Il est aujourd'hui clairement établi que la CypA, et plus particulièrement son activité PPIase, sont indispensables à la réplication du HCV (Nakagawa, Sakamoto et al. 2005; Chatterji, Bobardt et al. 2009; Kaul, Stauffer et al. 2009; von Hahn, Schiene-Fischer et al. 2012). La caractérisation approfondie du mécanisme d'action antiviral de la CsA et de ses analogues non-immunosuppresseurs a montré que la CypA catalyse l'isomérisation *cis-trans* de NS5A, au niveau d'une région riche en prolines située dans le domaine II, impliquant principalement les acides aminés R318, D320 et Y321 (Fernandes, Poole et al. 2007; Chatterji, Bobardt et al. 2010; Coelmont, Hanouille et al. 2010; Fernandes, Ansari et al. 2010; Puyang, Poulin et al. 2010; Yang, Robotham et al. 2010; Garcia-Rivera, Bobardt et al. 2012). L'isomérisation *cis/trans* de NS5A

par la CypA induit un changement conformationnel de NS5A, conformation dans laquelle elle participe à la formation des DMV à partir de membranes dérivées du réticulum endoplasmique (Chatterji, Bobardt et al. 2015). Ces DMV auraient différents intérêts : 1) protéger le virus des RNases cellulaires ; 2) prévenir la reconnaissance du virus par les facteurs de reconnaissance du non-soi de l'immunité innée ; 3) rassembler, dans un espace restreint, l'ensemble des protéines nécessaires à la réplication virale. Ces différents rôles expliquent l'importance des DMV dans le cycle de vie du virus et donc la grande dépendance du virus pour la CypA, et plus particulièrement pour son activité PPIase.

Cela dit, d'autres mécanismes d'action des CypI ont été proposés et méritent l'attention (**Figure 13**). Il est aujourd'hui clair que la CypA interagit avec NS5B, et qu'elle augmente significativement sa fixation sur l'ARN viral (Chatterji, Bobardt et al. 2009; Fernandes, Ansari et al. 2010), de même qu'elle augmente la fixation de NS5A sur l'ARN viral. Il a également été montré que la CypA participait, et régulait finement, la cinétique du clivage de la polyprotéine virale à la jonction NS5A/NS5B (Kaul, Stauffer et al. 2009). Le même groupe a identifié que les virus « pleine-longueur » étaient beaucoup plus susceptibles à l'action de la CsA et de ses dérivés non-immunosuppresseurs que les réplicons sous-génomiques (SGR, « Subgenomic replicon ») ne possédant que les protéines non-structurales du virus de NS3 à NS5B. Cette différence serait due à la présence de l'autre protéase virale, NS2. Là encore, la CypA modulerait la cinétique de clivage, cette fois à la jonction NS2/NS3 (Ciesek, Steinmann et al. 2009; Madan, Paul et al. 2014). Il a aussi été montré que le « silencing » des Cyps A et 40 aboutissait à une diminution du nombre de gouttelettes lipidiques, à une augmentation de leur taille et à un défaut de sécrétion du virus (Anderson, Lin et al. 2011). La CypA jouerait également un rôle dans l'immunité, en rentrant en compétition avec NS5A pour la fixation d'IRF-9 (Bobardt, Hopkins et al. 2013), et la neutralisation de la CypA augmenterait ainsi la réponse IFN.

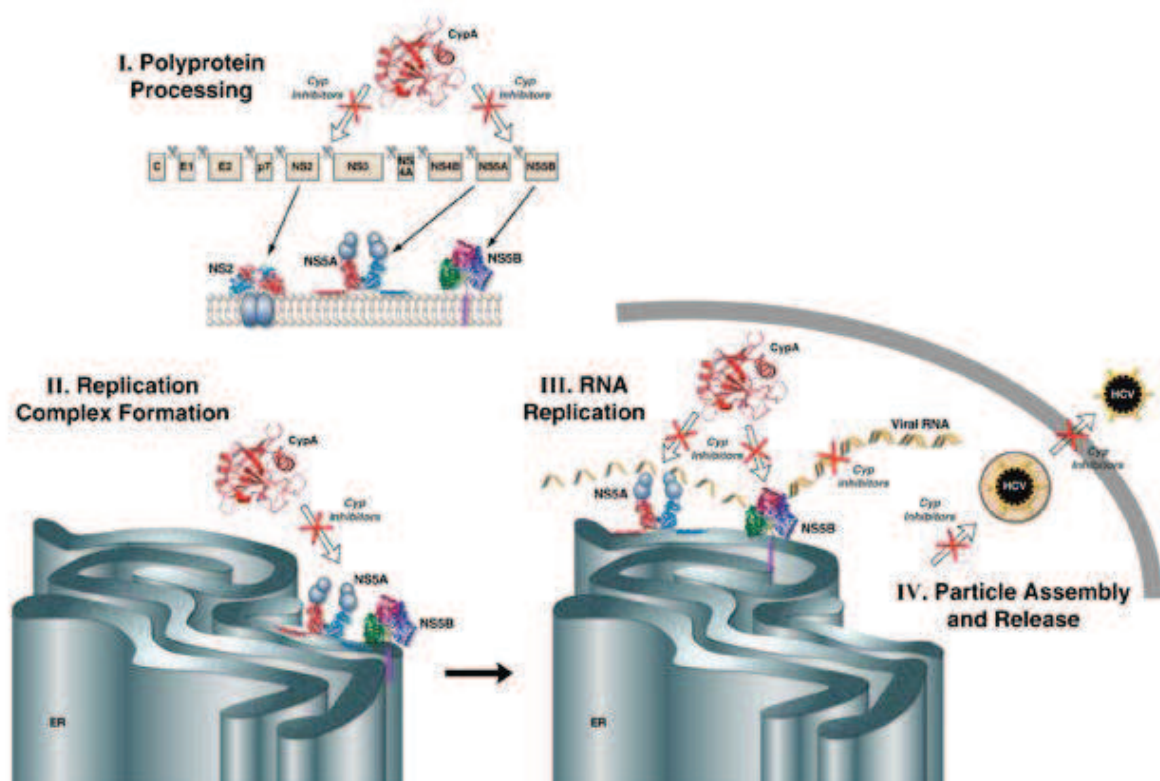


Figure 13 : Différents mécanismes d'inhibition du virus de l'hépatite C par les inhibiteurs de cyclophilines – Site Internet du laboratoire de Philippe Gailly – I. La CypA participerait à la cinétique de clivage de la polyprotéine virale au niveau des jonctions NS2/NS3 et NS5A/NS5B. L'utilisation de CypI ralentirait ce clivage et donc l'infection. II. Formation des complexes de réplication via l'isomérisation de NS5A par la CypA. Ce mécanisme est détaillé sur la Figure 12. III. La CypA pourrait augmenter l'affinité de NS5A et NS5B pour l'ARN viral. L'ajout de CypI aurait pour conséquence une diminution de la réplication de l'ARN viral *stricto sensu*. IV. Les CypI bloqueraient l'assemblage correct des lipovirions et leur excrétion via une action sur la CypA et la Cyp40.

b) Cyclophilines et Flavivirus

Le genre *Flavivirus*, au sein de la famille des *Flaviviridae*, regroupe des virus très différents. Ils possèdent des organisations génomiques et structurales distinctes de celles décrites précédemment pour le HCV, même s'il existe des similitudes entre les genres *Hepacivirus* et *Flavivirus*.

La plupart sont des arbovirus, c'est-à-dire qu'ils sont transmis *via* des vecteurs arthropodes (moustiques et tiques principalement). Ils sont à l'origine de maladies très diverses (encéphalite, dengue hémorragique, fièvre jaune, etc.) qui menacent une grande partie de la population mondiale et sont donc des pathogènes d'intérêt majeur dans la compréhension des

mécanismes par lesquels ils interagissent avec leurs hôtes, ainsi que dans le développement d'antiviraux.

Peu de publications font état de l'implication des Cyps dans le cycle viral du genre *Flavivirus*. Il a été montré que la CsA possédait une activité contre DENV, YFV et à un moindre niveau contre le virus du Nil Occidental (WNV, « West-Nile Virus »). Son activité serait liée à l'inhibition de l'interaction entre la protéine virale NS5 et la CypA. Les auteurs ont aussi montré que les Cyps A, B et C seraient importantes dans la réplication des *Flavivirus* car leur extinction conditionnelle altérerait l'infection des 3 virus précédemment cités (Qing, Yang et al. 2009), avec des effets relativement modestes et visibles uniquement à certains temps post-infection.

Ces travaux sont en contradiction avec les résultats du groupe de Philippe Gallay, qui n'ont montré aucun effet du « silencing » des Cyps A, B et C sur l'infection par DENV (Chatterji, Bobardt et al. 2009). En 2011, un rôle de la CypB a été suggéré dans l'infection par le Virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV, « Japanese Encephalitis Virus »). Cette activité serait PPIase-dépendante et jouerait un rôle au niveau de la réplication de l'ARN *stricto sensu* (Kambara, Tani et al. 2011). Une récente étude computationnelle a laissé supposer une possible interaction entre la CypA et la protéine NS4B du YFV (Vidotto, Morais et al. 2017), étude dans laquelle l'activité anti-YFV de la CsA a été montrée à forte concentration (10 μ M). Faisant écho aux résultats de Qing *et al.* montrant un effet modeste de la CsA sur la réplication du WNV, une étude a montré une absence d'effet de l'ALV sur la réplication de ce virus (Chiramel, Banadyga et al. 2016).

Enfin, un travail publié dans la revue *Cell Host & Microbe* a conclu à une activité anti-ZIKV de la CsA (Barrows, Campos et al. 2016). Pourtant, les auteurs constatent une augmentation de la réplication du ZIKV en présence de 1 μ M de CsA, et il semble que l'effet antiviral observé à la concentration de 10 μ M soit la résultante d'un effet délétère sur la viabilité cellulaire. Ces données montrent que le rôle des Cyps dans l'infection par les *Flavivirus* est obscur et un certain nombre de résultats et d'analyses sont en contradiction.

2) Cyclophilines et Coronavirus

a) Les Coronavirus

- Généralités

Les genres *Coronavirus* appartiennent à la sous-famille des *Coronavirinae* et à la famille des *Coronaviridae*, au sein de l'ordre des *Nidovirales*. Les CoVs infectent une grande variété d'espèces, y compris l'Homme, et possèdent un tropisme multi-organes, notamment respiratoire, entérique et hépatique. La sous-famille des *Coronavirinae* se compose de 4 genres, comme le montre la **Figure 14**.

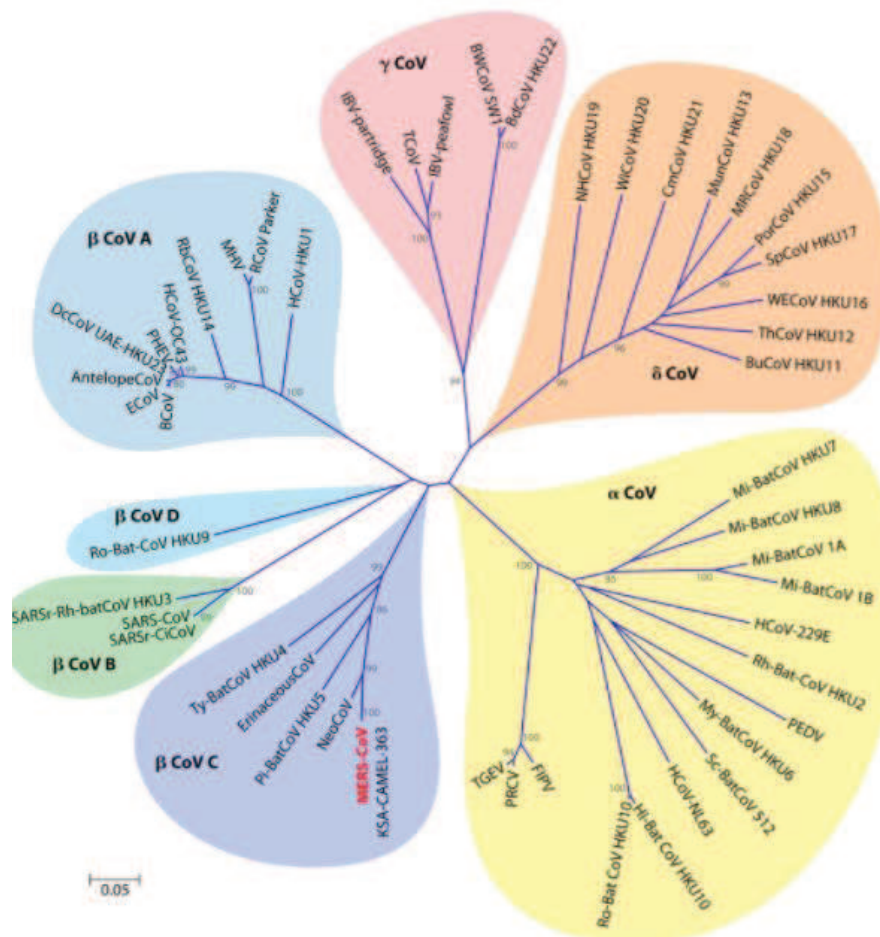


Figure 14 : Arbre phylogénique de la sous-famille *Coronavirinae* – (Chan, Chan et al. 2013)– La sous-famille des *Coronavirinae* contient 4 genres (α , β , δ et γ). Le genre β -CoV se divise en 4 sous-groupes A, B, C et D qui contiennent entre autres les SARS-CoV et MERS-CoV.

- Particule virale

Les CoVs sont des virus enveloppés. La particule virale des CoVs mesure entre 70 et 120 nm de diamètre (**Figure 15**). Elle est recouverte par les trimères de la glycoprotéine d'enveloppe « Spike » (S) en formes de spicules, donnant aux virions une forme de couronne solaire, à l'origine du nom *Coronavirus*. La membrane virale contient aussi la protéine transmembranaire M et la protéine d'enveloppe E. La nucléoprotéine N s'enroule autour de l'ARN viral, formant ainsi une nucléocapside hélicoïdale.

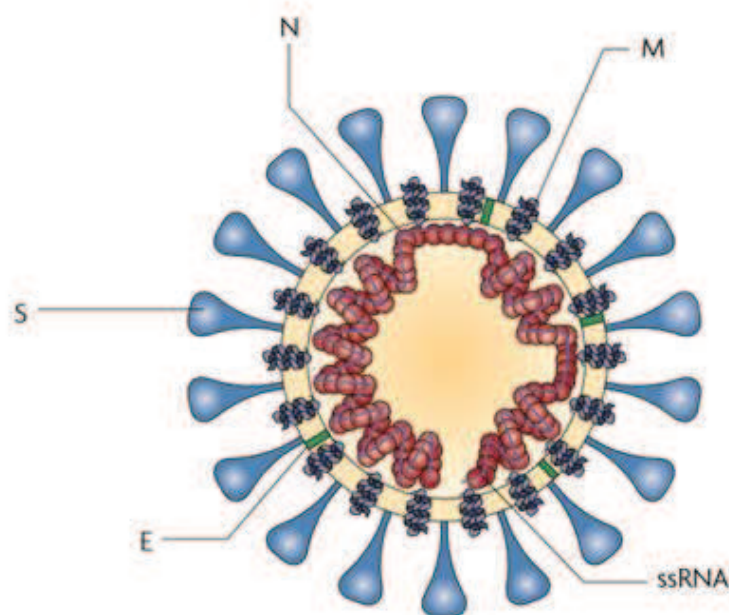


Figure 15 : Représentation schématique de la particule virale des *Coronavirus* – (Perlman and Netland 2009) – La particule virale est constituée des protéines d'enveloppe S (« Spike »), E (« Enveloppe »), M (« Membrane ») et N (« Nucléoprotéine »), celle-ci entourant l'ARN viral au sein d'une capsidie icosaédrique.

- Organisation génomique et protéines virales

L'ARN viral des CoVs possède une taille variant de 25,5 à 32 kb, ce qui en fait le plus long ARN viral connu. Il s'agit d'un ARN simple brin de polarité positive, coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Au moins 6 cadres ouverts de lecture (ORF, « Open Reading Frame ») sont contenus dans ce génome (**Figure 16**). L'ORF 1ab, codant les protéines non structurales, recouvre les deux-tiers du génome en 5'. La traduction de l'ARN génomique par le ribosome aboutit à la synthèse de la polyprotéine 1a ou 1ab en cas de décalage de cadre de lecture de type « -1 » par le ribosome. Ces

polyprotéines sont clivées par des protéases virales, principalement 3CL^{pro}, en 16 nsp. Parmi celles-ci, nsp3 contient les régions codant pour les protéases virales, qui participent avec 3CL^{pro} au clivage des polyprotéines virales ; la protéase 3CL^{pro} est codée par nsp5 ; nsp12 est une RdRp tandis que nsp13 possède une activité hélicase ; plus récemment, il a également été montré que nsp8 possède également une activité RdRp, et agirait comme primase afin d'initier la réplication ; la protéine nsp14 joue un rôle déterminant dans l'infection, car elle possède une activité 3' → 5' exonucléase et semble être indispensable à la fidélité de la réplication, relativement élevée pour des virus à ARN (McMullan, Folk et al. 2012) ; comme nsp16, elle est également impliquée dans la formation de la coiffe de l'ARN en 5' par son activité N7-méthyl-transférase.

Le dernier tiers du génome viral est constitué des ORF codant les protéines structurales, toujours dans l'ordre S, E, M, et N. Certains CoVs du groupe β codent une hémagglutinine-estérase (HE). Un certain nombre de gènes codant des nsp dites « accessoires » sont également localisés dans la partie 3' du génome viral.

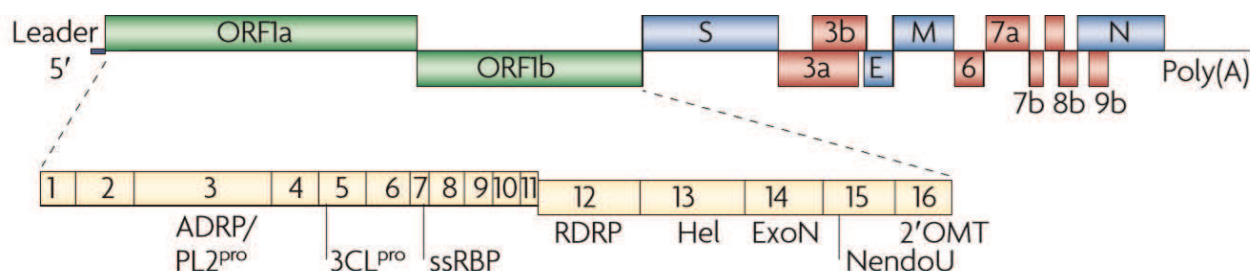


Figure 16 : Organisation génomique du SARS-CoV – (Perlman and Netland 2009) – Les ORF 1a et 1b sont traduites en polyprotéines, pp1a à partir de ORF1a et pp1ab à la faveur d'un décalage de cadre de lecture « -1 » entre ORF1a et ORF1b par le ribosome. Après clivage protéolytique, ces deux polyprotéines donnent naissance aux 16 protéines non structurales qui possèdent différents rôles dans le cycle de vie du virus. Les protéines structurales sont codées par des régions situées en 3' de l'ARN génomique, toujours dans l'ordre S, E, M et N. Un certain nombre de protéines non structurales accessoires sont également codées dans cette zone du génome.

- Cycle réplcatif

Les CoVs utilisent une grande variété de récepteurs membranaires pour leur attachement (DPP4 (« Dipeptidyl peptidase 4 ») pour le MERS-CoV, ACE2 (« Angiotensin converting enzyme 2 ») pour SARS-CoV et HCoV-NL63, CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) pour MHV (« Murine Hepatitis Virus »), CD13 pour HCoV-229E, etc.) (Perlman and Netland 2009).

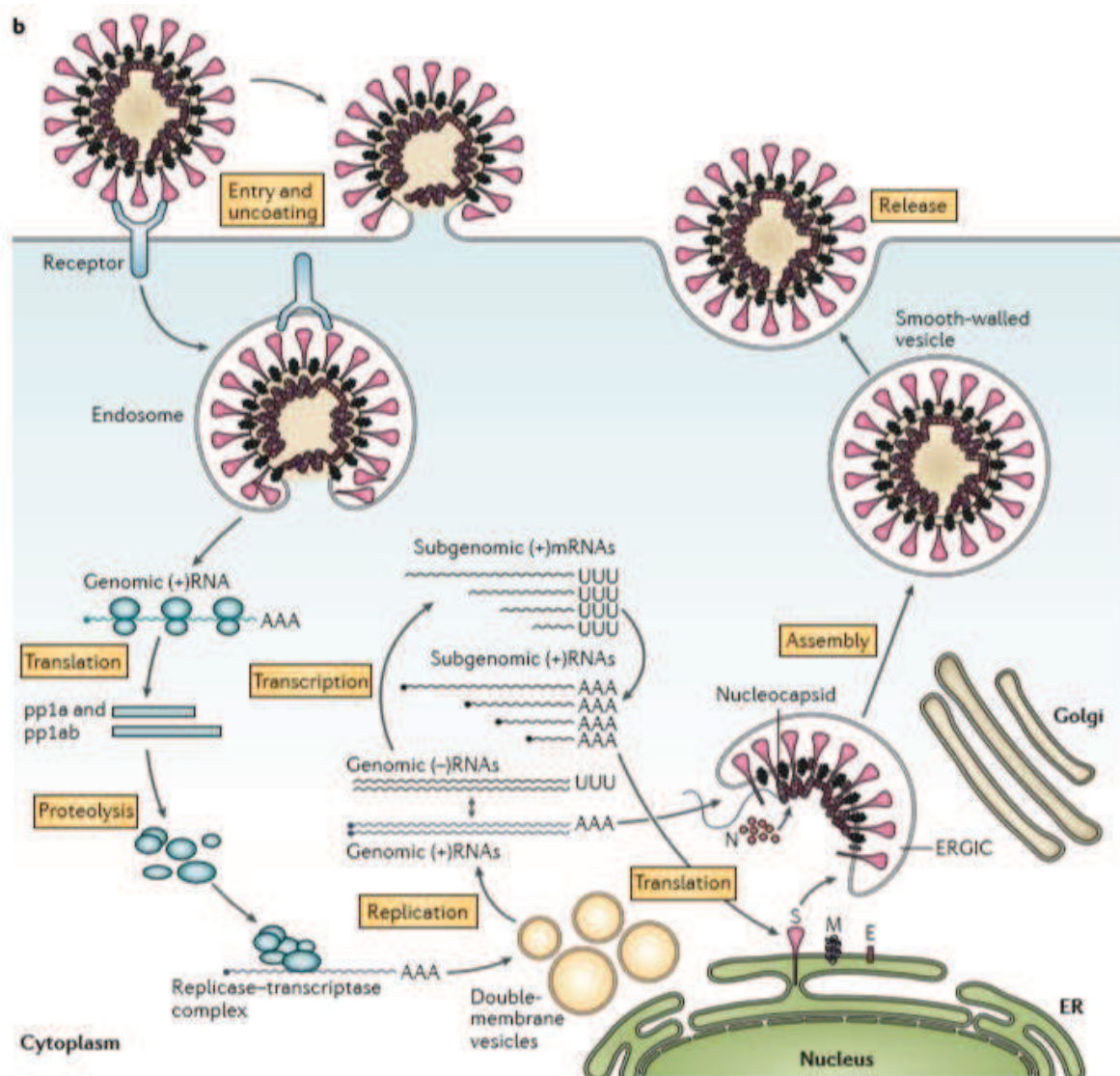


Figure 17 : Cycle répliatif des *Coronavirus* – (de Wit, van Doremalen et al. 2016) - Les CoVs s'attachent à différents récepteurs à la surface cellulaire. L'attachement est suivi de l'endocytose, puis de la fusion de la membrane virale avec l'endosome par des mécanismes obscurs. La libération du génome viral dans le cytosol aboutit à la traduction par le ribosome des polyprotéines pp1a et pp1ab, qui sont clivées par des protéases virales et cellulaires pour donner les différentes protéines non structurales. Celles-ci participent au niveau des DMV, à la réplication détaillée sur la **Figure 18**. La traduction des ARNm viraux codant les protéines structurales est suivie de la maturation de ces protéines au niveau de l'enveloppe nucléaire. L'assemblage a lieu avec la nucléoprotéine N au niveau du ERGIC (« Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment ») puis les nouveaux virions sont libérés par exocytose.

Les mécanismes d'entrée cellulaire des CoVs sont peu connus et les résultats contradictoires, même si le modèle actuel propose une entrée par endocytose à la suite de la fixation sur le récepteur, suivie par une fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome. Comme

évoqué précédemment, la traduction des polyprotéines 1a et 1ab par le ribosome de la cellule, suivie par leur clivage par les protéases virales, aboutit à la production des nsp impliquées dans la réplication de l'ARN viral (**Figure 17**).

Celle-ci se fait suivant un schéma complexe (Sawicki, Sawicki et al. 2007) et original au niveau de DMV notamment, à l'instar de ce qui est connu dans le cas du HCV (**Figure 18**).

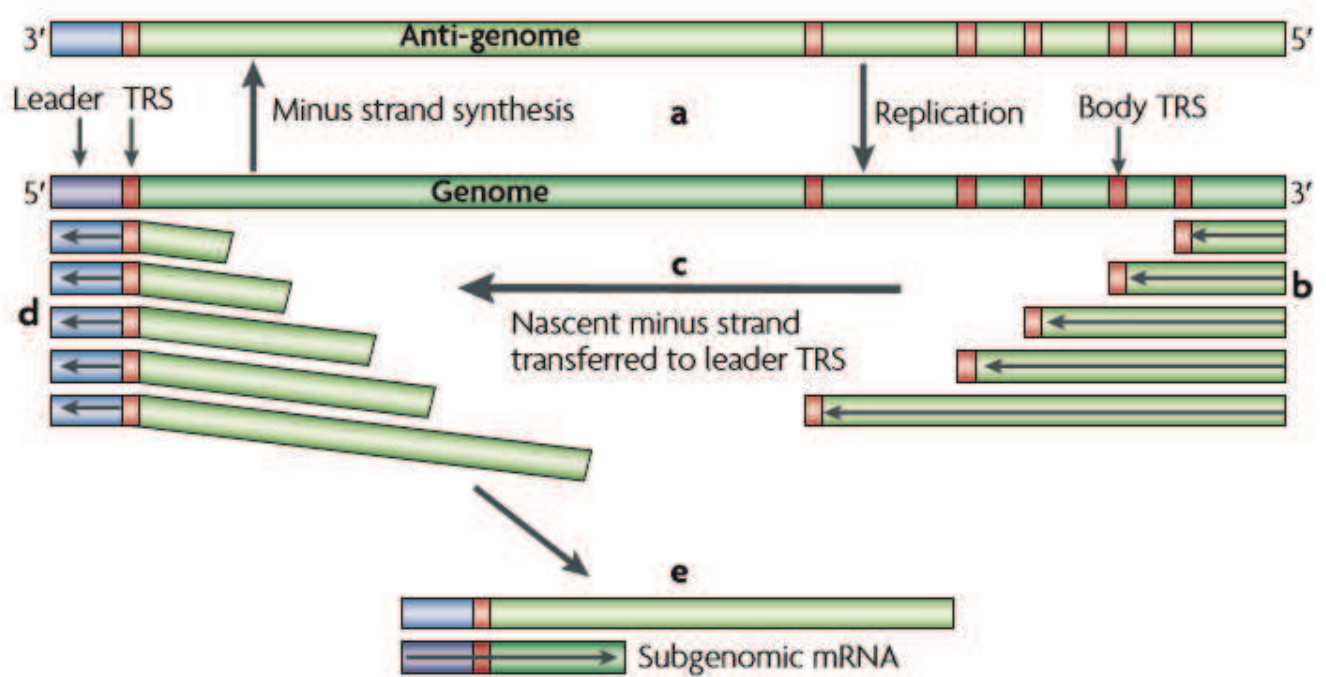


Figure 18 : Représentation de la réplication des Coronavirus – (Perlman and Netland 2009) – **a**) La synthèse par la RdRp d'un antigénome (-) à partir de l'ARN génomique permet d'utiliser cet ARN (-) comme matrice pour la synthèse de nouveaux génomes. **b**) La synthèse du brin (-) peut aussi s'arrêter au niveau d'une séquence de régulation de la transcription (TRS) en rouge. **c**) Après l'arrêt de la RdRp au niveau d'une TRS, le brin (-) en cours de synthèse est transféré jusqu'à la TRS la plus en 5' du génome, au niveau de la séquence « Leader ». **d**) La RdRp termine la synthèse des brins (-) qui possèdent tous la séquence complémentaire de la séquence « Leader ». **e**) La synthèse des brins (+) à partir de ce groupe d'ARN (-) donnent naissance aux ARNm viraux sous-génomiques.

Un « antigénome » (-) est synthétisé par la RdRp à partir du génome viral (+). Cet antigénome sert de matrice à la synthèse d'un grand nombre de génomes viraux, qui seront ensuite empaquetés dans les nouveaux virions au niveau du ERGIC (« Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment »). Lors de la synthèse d'un brin (-) à partir du génome viral, il arrive que la RdRp « saute » littéralement au niveau d'une séquence de régulation de la

transcription (TRS, « Transcription Regulating Sequence ») jusqu'à la TRS située en aval de la séquence « Leader », en 5' du génome. Ceci génère un groupe d'ARN (-) de tailles différentes, et possédant tous la même extrémité 3'. La synthèse, de nouveau, de brins (+) à partir de ces molécules donne naissance aux ARNm (+) viraux sous-génomiques (Fehr and Perlman 2015). Les virions néo-formés sont ensuite libérés par exocytose, ou par la lyse cellulaire induite par l'infection.

- **Epidémiologie**

Les HCoV 229E, NL63, HKU1 et OC43 sont endémiques dans la population générale. Le SARS-CoV est apparu en Chine à la fin de l'année 2002 (Zhong, Zheng et al. 2003), et l'infection s'est poursuivie jusqu'à la mi-2003. En tout, 8098 cas et 774 décès ont été à déplorer (OMS). Le MERS-CoV a été identifié en septembre 2012 chez un patient Saoudien décédé en juin de la même année (McMullan, Folk et al. 2012). A la date du 24 Novembre 2017, 2103 cas ont été rapportés dans 27 pays, pour 733 décès (OMS). Le MERS-CoV possède une infectivité relativement faible, contrairement au SARS-CoV qui a présenté des épisodes de « super-transmission », contenus par des efforts intenses de la communauté internationale.

- **Pathologies**

Les HCoVs endémiques sont responsables d'infections bénignes des voies respiratoires hautes et basses, comme le rhume hivernal. Toutefois, chez les personnes immunodéprimées, il semblerait que ces 4 virus puissent être à l'origine de pathologies plus sévères (Vabret, Dina et al. 2009).

Dans le cas des infections par SARS-CoV et MERS-CoV, celles-ci peuvent être asymptomatiques ou au contraire se caractériser par un syndrome de détresse respiratoire aiguë et sévère, avec parfois des manifestations extra-pulmonaires. Dans le cas du MERS, on note une évolution possible vers une défaillance rénale. Les facteurs de comorbidités (obésité, diabète, maladies chroniques rénales et cardiaques) sont plus fréquents dans le cas du MERS que du SARS (Yang, Hsu et al. 2017).

- Options thérapeutiques

Aucun traitement, antiviral ou vaccin, n'est à ce jour disponible pour traiter les infections par les HCoV. Dans le cas des SARS-CoV et MERS-CoV, différentes stratégies empiriques ont été utilisées chez les patients infectés. Les différentes études rétrospectives menées ont montré une absence d'efficacité de la ribavirine, des IFN, de la méthylprednisolone, ou encore du plasma de patients infectés. Dans le cas du MERS-CoV, même les combinaisons de ribavirine avec IFN et/ou lopinavir-ritonavir n'ont pas montré d'effet. Dans ce contexte, le traitement des patients atteints par les CoVs « sévères » se limite donc à un usage symptomatique (Al-Tawfiq and Memish 2017).

- Emergence et transmission

La transmission par les CoVs bénins se fait principalement par les gouttelettes issues de la toux d'une personne infectée. Les transmissions respiratoire et manuportées sont possibles mais semblent plus rares (Vabret, Dina et al. 2009).

Les infections par SARS-CoV et MERS-CoV sont considérées comme des zoonoses. Les vecteurs de ces deux virus ont été montrés comme étant respectivement les civettes palmistes masquées et les dromadaires. De nombreuses études suggèrent que les chauves-souris constitueraient le réservoir de ces pathogènes, bien qu'il semble que les espèces impliquées soient différentes entre les deux virus. Les HCoV possèdent donc une aptitude à franchir les barrières d'espèces relativement importante. Ceci semble s'expliquer par la très grande variabilité du RBD (« Receptor Binding Domain ») de la protéine d'enveloppe « Spike », qui explique aussi que les CoVs utilisent des récepteurs très différents, déterminant en partie leur tropisme.

La possible émergence de nouveaux CoVs dans la population humaine est augmentée par la colonisation par l'Homme de nouveaux territoires, mettant en contact les populations avec des espèces porteuses de virus (Guan, Zheng et al. 2003) pouvant éventuellement franchir les barrières d'espèces (**Figure 19**).

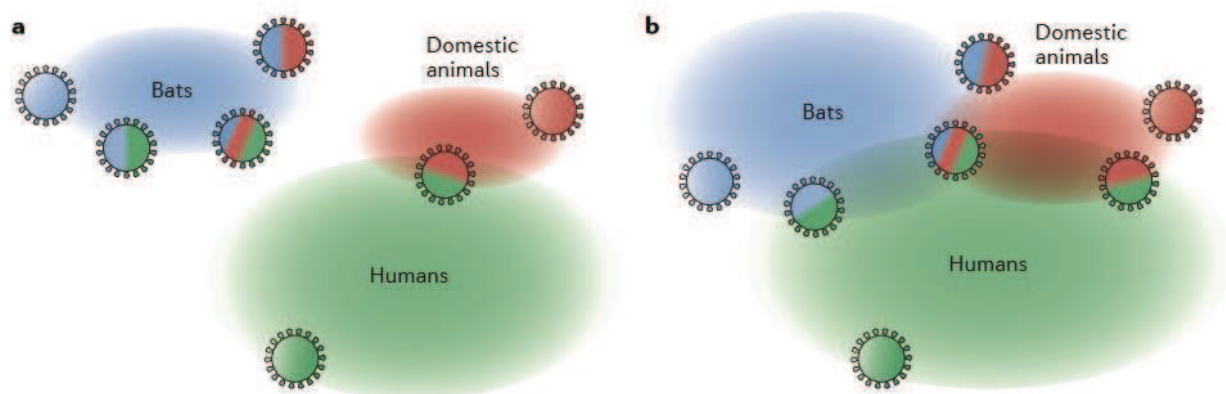


Figure 19 : Ecologie de l'émergence des *Coronavirus* – (Graham, Donaldson et al. 2013) – a) Les chauve-souris constituent un réservoir pour un grand nombre de CoVs émergents. Ces pathogènes entrent peu en contact avec l'Homme, dont les infections sont parfois des zoonoses avec certains animaux domestiques. **b)** A la faveur de la colonisation par l'Homme de nouveaux territoires, et de certaines pratiques d'élevage intensif, des CoVs de chauve-souris pouvant franchir aisément les barrières d'espèces peuvent entrer en contact avec les populations humaines.

- *Coronavirus* et cyclophilines

La première étude faisant état d'un lien entre Cyps et HCoV date de 2004. Dans la publication du groupe de Jiang, les auteurs ont démontré par une approche bio-informatique que la CypA était capable de se lier à la nucléoprotéine du SARS-CoV (**Figure 20**). Par des expériences de résonance plasmonique de surface, les auteurs ont confirmé cette interaction, qui était plus forte qu'avec la protéine de capsid du HIV. Ils montrent par ailleurs une homologie structurale de 25 % entre les protéines de capsid de ces deux virus, au niveau d'une région couvrant les acides aminés 235 à 369 de la nucléoprotéine. Enfin, les auteurs démontrent par mutagenèse dirigée que la CypA interagissait avec la protéine de capsid du SARS-CoV *via* son site actif (Luo, Luo et al. 2004).

L'année suivante, un groupe s'est intéressé aux interactions pouvant exister entre le SARS-CoV et le récepteur membranaire des Cyps A et B, EMMPRIN/CD147. Aucune protéine virale n'était capable de se fixer à ce récepteur, toutefois ils confirment l'interaction de la nucléocapside avec la CypA. De manière tout à fait intéressante, les auteurs montrent que la CypA était associée aux particules virales, à l'instar de ce que l'on connaît pour différents virus, notamment le HIV. L'utilisation d'un peptide dirigé contre EMMPRIN/CD147 permettait

d'abolir l'infection virale *in vitro* (Chen, Mi et al. 2005) mais aucun lien n'a pu être fait entre l'effet antiviral de ce peptide et la présence de la CypA dans le surnageant de culture.

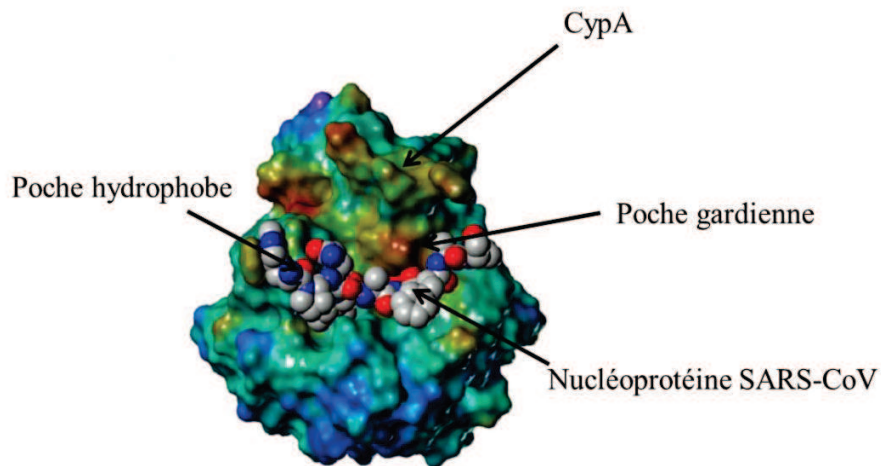


Figure 20 : Modèle de l'interaction entre la nucléocapside du SARS-CoV et la cyclophiline A – Adapté de (Luo, Luo et al. 2004) – Les acides aminés W302, P303, Q304, I305, A306, Q307 et F308 de la nucléoprotéine du SARS-CoV s'insèrent dans les deux poches du site actif de la CypA.

La véritable avancée concernant les relations entre Cyps et CoVs arrive en 2011 avec un article du groupe de von Brunn. Dans ce travail, par des techniques de criblage doubles-hybrides de levure, les auteurs ont établi l'interactome de nombreuses protéines virales avec les protéines cellulaires. De manière intéressante, ils ont montré que la protéine nsp1 du SARS-CoV interagissait avec les Cyps A, B, G et H. Par la suite, il a été montré que la protéine nsp1 activait la transcription de gènes cellulaires en induisant la translocation nucléaire de NFAT. Les auteurs ont enfin montré une inhibition de la réplication de nombreux CoVs humains (SARS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43) et animaux (FCoV ou « Feline Coronavirus », TGEV ou « Transmissible Gastroenteritis Virus » et IBV ou « Infectious Bronchitis Virus ») par la CsA. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la CsA, par son action immunosuppressive, bloquerait la réplication en annulant la transcription des gènes sous le contrôle de NFAT dont les CoVs semblent dépendants (Pfefferle, Schopf et al. 2011).

Cette étude semble confortée par le travail d'un autre groupe qui publie la même année un article montrant l'activité anti-CoVs de la CsA (SARS-CoV, HCoV-229E), et de manière très intéressante que la diminution de l'expression des Cyps A et B n'altérerait pas la réplication du SARS-CoV *in vitro*, suggérant une action antivirale de la CsA indépendante des Cyps (de Wilde, Zevenhoven-Dobbe et al. 2011).

Ces résultats peuvent mener à la confusion lorsque d'autres études montrent une importance directe des Cyps dans la réplication des CoVs. Ainsi, l'utilisation de dérivés non-immunosuppresseurs de la CsA tels que l'ALV ou le NIM811 bloquaient la réplication des CoVs *in vitro* (Carbajo-Lozoya, Ma-Lauer et al. 2014). Dans cet article, les auteurs ont également démontré par l'utilisation de shRNA que la diminution de l'expression de la CypA, mais pas de la CypB, bloquait la réplication virale lors de l'infection par HCoV-NL63 *in vitro*.

Dans ce débat actuel, l'utilisation du Tacrolimus rend plus complexe encore la compréhension de ces mécanismes. Ce composé exerce, à l'instar de la CsA, un effet anti-NFAT *via* une inhibition de la calcineurine, en se fixant non pas à la CypA mais à FKBP1, protéine cellulaire possédant également une activité PPIase. Ainsi, l'utilisation du Tacrolimus a été montrée comme bloquant la réplication des SARS-CoV, HCoV-229E et HCoV-NL63 *in vitro*. Ce résultat pourrait suggérer qu'il s'agit d'un rôle sur la voie NFAT, mais là encore il est impossible de faire la distinction entre l'action immunosuppressive du composé et son action sur les FKPB. En effet, des lignées shFKBP1A et 1B ne supportaient pas l'infection par HCoV-NL63, suggérant une implication directe de ces protéines dans le cycle de vie du virus (Carbajo-Lozoya, Muller et al. 2012). Ces contradictions semblent en partie liées aux modèles viraux et/ou cellulaires utilisés, car il apparaît par exemple que contrairement à la CsA, le Tacrolimus n'exerce aucune activité antivirale sur les CoVs animaux (Tanaka, Sato et al. 2012).

Récemment, le travail de de Wilde *et al.* a permis de montrer une activité anti-SARS-CoV et anti-MERS-CoV de l'ALV et de la CsA *in vitro*. De manière surprenante, malgré leurs efficacités très différentes sur l'activité PPIase des Cyps (10 fois environ), les deux composés bloquaient l'infection par les CoVs avec des efficacités similaires (environ 5 μ M).

The diagram illustrates the proposed mechanism of Cyclosporin A (CsA) inhibition of Coronavirus replication. It shows the cytosol and nucleus. In the cytosol, CsA inhibits Cyclophilin (CypA) and Cyclophilin G (CypG), which are involved in virus replication. CsA also blocks the Calcineurin/NF-AT pathway. In the nucleus, CsA inhibits Calcineurin A and B, which are involved in NF-AT activation. The diagram shows that CsA blocks the activation of NF-AT, leading to reduced IL-2 production.

3) Cyclophilines et autres virus

a) Cyclophilines et HIV

Le HIV est un virus enveloppé, possédant un génome diploïde à ARN de polarité positive protégé par une nucléocapside, et ayant un tropisme pour les cellules de l'immunité CD4+. C'est un *Lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae*. Le HIV est l'agent étiologique du Syndrome de l'Immunodéficience Humaine (SIDA) et a fait l'objet d'efforts intenses dans la recherche d'antiviraux, dans la compréhension des mécanismes de l'infection, et dans la recherche de facteurs de l'hôte impliqués dans son cycle de vie.

clophilines et HIV

Le HIV est un virus enveloppé, possédant un génome diploïde à ARN de polarité positive protégé par une nucléocapside, et ayant un tropisme pour les cellules de l'immunité CD4+. C'est un *Lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae*. Le HIV est l'agent étiologique du Syndrome de l'Immunodéficience Humaine (SIDA) et a fait l'objet d'efforts intenses dans la recherche d'antiviraux, dans la compréhension des mécanismes de l'infection, et dans la recherche de facteurs de l'hôte impliqués dans son cycle de vie.

Les interactions Cyps/HIV ont été étudiées de manière approfondie depuis 25 ans, et restent malgré cela énigmatiques. Le modèle actuel propose un rôle de la CypA dans l'entrée du virus, et plus particulièrement dans le transport de la nucléocapside jusqu'au noyau. Il est proposé que peu de temps après la pénétration du virus dans ses cellules cibles, la CypA se lie avec une grande affinité sur la protéine de capsid du virus. Cette fixation aurait pour but la déstabilisation des dimères de capsid, permettant une décapsidation efficace. Ceci permettrait également de protéger la capsid de facteurs de reconnaissance cellulaires, comme Nef-1 (Towers, Hatziioannou et al. 2003; Schaller, Ocwieja et al. 2011).

Toutefois, énormément de zones d'ombres demeurent. Il fait consensus que la CypA est incorporée au sein des virions (Franke, Yuan et al. 1994; Thali, Bukovsky et al. 1994). Toutefois, contrairement à ce qui a été cru pendant de nombreuses années, il semble aujourd'hui que c'est la CypA cellulaire, et non la CypA encapsidée, qui serait le facteur clé de l'infection (Ylinen, Schaller et al. 2009). De nombreux rôles de la CypA associée aux particules virales ont été proposés (attachement, internalisation, décapsidation) et restent aujourd'hui débattus. De même, bien que l'importance du site actif de la CypA fasse consensus, il existe un conflit sur l'importance de l'activité PPIase de la CypA dans l'infection (Bosco, Eisenmesser et al. 2002; Saphire, Bobardt et al. 2002). Enfin, il semble que la fixation de la CypA sur la capsid module l'utilisation par le HIV des protéines de transport au noyau, mais là encore la nature de ces nucléoporines fait débat.

b) Cyclophilines et HBV

Le HBV est un virus à ADN circulaire partiellement double brin, enveloppé, qui possède une capsid icosaédrique et appartient à la famille *Hepadnaviridae*. Le virus possède un génome de 3,2 kb, l'un des plus petits connus. Le HBV peut causer chez les patients infectés une hépatite fulminante, et l'infection chronique peut comme dans le cas du HCV aboutir au développement d'une cirrhose et d'un carcinome hépatocellulaire.

Comme pour beaucoup d'autres virus, le rôle des Cyps dans l'infection par le HBV est peu clair et soumis à controverse. En 2007, le groupe de Wen a montré que le niveau d'expression intracellulaire de CypA était diminué dans le foie de souris transgéniques exprimant

l'antigène de surface du HBV (HBsAg, « Hepatitis B surface Antigen »), ainsi que dans une lignée cellulaire surexprimant HBsAg (Zhao, Fang et al. 2007). A l'inverse, il apparaît que le niveau d'expression extracellulaire de la CypA était augmenté dans les deux modèles. Trois ans plus tard, le même groupe a proposé que HBsAg interagissait de manière directe avec la CypA et induirait sa sécrétion, phénomène qui s'accompagnait d'une augmentation du niveau des enzymes hépatiques dans le sérum des souris infectées (Tian, Zhao et al. 2010). De manière intéressante, ces augmentations étaient abolies par l'utilisation de CsA ou d'un anticorps dirigé contre le récepteur extracellulaire de la CypA, EMMPRIN/CD147. Finalement, les auteurs font le lien entre le niveau de CypA extracellulaire et la physiopathologie du HBV, en montrant que le niveau extracellulaire de CypA était augmenté chez les patients chroniquement infectés, et que ce niveau chutait de manière spectaculaire après une transplantation hépatique.

La première preuve de l'efficacité anti-HBV des CypI a été apportée par l'équipe de Takaji Wakita (Watashi, Sluder et al. 2014). Dans ce travail, les auteurs ont montré que le CsA bloquait l'entrée du HBV dans les cellules, mais de manières Cyp- et calcineurine-indépendantes. La CsA bloquerait l'interaction entre la grande protéine d'enveloppe du virus et NTCP (« Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide »), découvert comme étant le récepteur du HBV à la surface des cellules. Ces travaux ont été confirmés quelques mois plus tard par une autre équipe (Nkongolo, Ni et al. 2014) qui a montré que l'entrée du HBV était bloquée par la CsA, qui empêcherait l'interaction entre NTCP et le domaine preS1 de la grande protéine d'enveloppe du virus. Il a également été montré que l'ALV diminuait la réplication du HBV et la sécrétion d'HBsAg dans différents modèles cellulaires, et que le « silencing » des Cyps A, B et C altèrait le niveau de réplication virale, remettant en cause un effet Cyp-indépendant de la CsA et de ses analogues (Phillips, Chokshi et al. 2015). Un niveau supplémentaire de complexité a été récemment apporté, de nouveau par l'équipe de Takaji Wakita (Shimura, Watashi et al. 2017). Dans cette publication, les auteurs ont proposé que l'inhibition de l'entrée virale était réalisée par des dérivés de CsA qui n'inhibent ni l'activité de la calcineurine, ni l'activité PPIase de la CypA, ni l'activité de transporteur de l'acide biliaire du NTCP (**Figure 22**).

Le rôle précis des Cyps dans l'infection par le HBV reste donc peu clair, de même que le mécanisme d'action des CypI sur l'entrée virale.

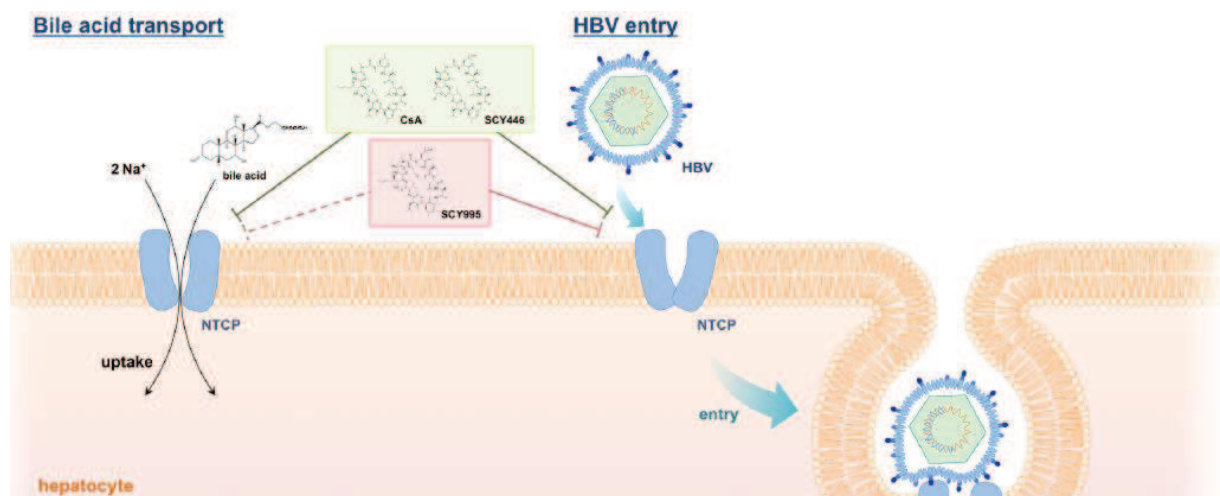


Figure 22 : Modèle du mécanisme d'action des inhibiteurs de cyclophilines dans l'entrée du virus de l'hépatite B - (Shimura, Watashi et al. 2017) – La CsA et certains de ses dérivés non-immunosuppresseurs bloquent l'interaction du virus avec son récepteur membranaire NTCP, aboutissant à une inhibition de l'entrée. Ces molécules bloquent également l'activité de transporteur d'acide biliaire de NTCP. D'autres dérivés n'ont pas d'action sur cette activité et bloquent simplement l'interaction virus/NTCP.

c) Cyclophilines et HPV

Il existe environ 200 *Papillomavirus* différents au sein de la famille *Papillomaviridae*. Il s'agit de virus nus, possédant un génome à ADN de 8 kpb. Les HPV causent des pathologies très diverses, des verrues plantaires aux condylomes acuminés. Les génotypes 16, 18, 31, 33 et 35 sont responsables de 99 % des cancers du col de l'utérus et constituent un problème de santé publique malgré le développement récent de différents vaccins.

Un article publié en 2009 dans le journal *PLoS Pathogens* a montré que la CsA inhibait la réplication des HPV de types 16 et 18. Le NIM811, analogue non-immunosuppresseur de la CsA qui possède une meilleure activité anti-PPIase que cette dernière, semblait également efficace contre ces deux virus mais avec une efficacité antivirale moindre que la CsA. Des expériences d'ARN interférence ont montré dans cette étude un rôle de la CypA dans l'infection, et un rôle encore plus important de la CypB. L'inhibition des Cyps aurait pour conséquence un blocage de l'internalisation des particules virales. Les auteurs suggèrent dans cet article que la CypB membranaire induirait un changement de conformation de la protéine de capside L2 du HPV-16, permettant une entrée efficace dans la cellule (Bienkowska-Haba, Patel et al. 2009). Trois ans plus tard, le même groupe a découvert un mutant insensible à la déplétion de la CypB mais qui

restait sensible à la CsA, ce qui suggèrait un rôle d'une autre Cyp dans l'infection (Bienkowska-Haba, Williams et al. 2012). Là encore, le mécanisme d'action se situerait dans une étape d'entrée car la Cyp impliquée faciliterait le désassemblage de l'autre protéine de capsid, L1, suite à l'acidification des endosomes. Cela suggère des rôles de différentes Cyps à différents moments d'une même phase de l'infection (l'entrée), ce qui souligne la complexité des interactions Cyps/HPV. Il est d'ailleurs important de noter qu'une étude récente a montré peu, voire pas du tout d'implication des Cyps dans le changement conformationnel de la protéine L2 (Bronnimann, Calton et al. 2016).

4) Cyclophilines et virus : synthèse

Sans en évoquer tous les aspects dans ce manuscrit, il s'avère que les Cyps réguleraient le cycle de vie d'un grand nombre de virus. Ces résultats souvent parcellaires, et parfois contradictoires, montrent que les interactions entre Cyps et virus sont difficiles à appréhender dans leur globalité, et cela pour plusieurs raisons : 1) le nombre importants d'isoformes des Cyps (17 connues) qui rend compliquée l'identification de la cible principale dans le cycle de vie d'un virus donné ; 2) la possibilité d'intervention d'une seule et même Cyp à différentes étapes de l'infection, avec des rôles parfois antagonistes ; 3) la possibilité d'intervention de différentes Cyps à une même étape ou à différentes étapes du cycle de vie d'un virus ; 4) l'utilisation d'un grand nombre de modèles cellulaires différents pour un virus donné, ou de méthodologies différentes (siRNA, shRNA, KO, CsA ou analogues non-immunosuppresseurs) ; 5) l'existence de mécanismes différents chez des virus pourtant génétiquement proches, appartenant parfois à la même famille virale ; 6) la possibilité d'action d'une Cyp indépendamment de son activité PPIase, voire indépendamment de son site actif, qui peut fournir des résultats contradictoires s'ils sont obtenus avec la CsA et ses analogues ou avec des expériences de « silencing » ou de surexpression des Cyps.

Le **Tableau 3** ci-dessous résume les éléments des interactions Cyps/virus décrits dans la littérature. Les **résultats robustes**, reproduits de nombreuses fois, dans différents modèles et par différents groupes, sont présentés **en gras**. Les données émanant d'un nombre restreint de publications, ou d'un petit nombre de groupes sont répertoriées en caractère normal. Enfin, les données contradictoires sont représentées en double soulignées.

Tableau 3 : Synthèse des interactions cyclophilines/virus

Virus	Famille	Cyp impliquée	Méthodologie	Etape du cycle / mécanisme suggéré	Partenaire viral suggéré	Fonction Cyp	Références bibliographiques
HIV-1	<i>Retroviridae</i>	A ; Nup358	CsA et ANI ; cellules PPIA +/- ; siRNA	CypA incorporée ; attachement ; transcription inverse ; décapitation ; import nucléaire ; intégration	Capside (pr55 et p24) ; Vpr ; Nef ; Vif ; p17 ; gp120	<u>PPIase</u>	(Franke, Yuan et al. 1994; Thali, Bukovsky et al. 1994; Billich, Hammerschmid et al. 1995; Ylinen, Schaller et al. 2009; Schaller, Ocwieja et al. 2011; Hilditch and Towers 2014)
HCV	<i>Flaviviridae</i>	A ; <u>B</u> ; D ; H ; 40	CsA et ANI ; siRNA	Réplication ; excrétion ; métabolisme mitochondrial ; régulation calcique	NS5A ; <u>NS5B</u> ; NS2 ; NS3/4A	PPIase	(Watashi, Ishii et al. 2005; Chatterji, Bobardt et al. 2009; Ciesek, Steinmann et al. 2009; Kaul, Stauffer et al. 2009; Coelmont, Hanouille et al. 2010; Anderson, Lin et al. 2011; Bobardt, Hopkins et al. 2013; Hopkins and Gallay 2015)
HBV	<i>Hepadnaviridae</i>	A ; B ; C	CsA et <u>ANI</u> ; siRNA	Fixation virus sur NTCP ; sécrétion CypA par HBsAg	HBsAg	?	(Tian, Zhao et al. 2010; Nkongolo, Ni et al. 2014; Watashi, Sluder et al. 2014; Phillips, Chokshi et al. 2015; Shimura, Watashi et al. 2017)
HSV-1	<i>Herpesviridae</i>	?	CsA	Régulation calcique	?	?	(Walev, Weise et al. 1991)
KSHV	<i>Herpesviridae</i>	?	Biologie cellulaire	Régulation calcique	K7	?	(Feng, Park et al. 2002)

CMV	<i>Herpesviridae</i>	A	CsA et ANI ; siRNA	Réplication ; réactivation	?	?	(Kawasaki, Mocarski et al. 2007; Keyes, Bego et al. 2012)
HPV-16 et HPV-18	<i>Papillomaviridae</i>	A ; B	CsA et ANI ; siRNA	Internalisation ; fusion avec endosome	Capside (L1 et L2)	?	(Bienkowska-Haba, Patel et al. 2009; Bienkowska-Haba, Williams et al. 2012; Bronnimann, Calton et al. 2016)
DENV	<i>Flaviviridae</i>	<u>A</u> ; <u>B</u> ; <u>C</u>	CsA ; siRNA	Réplication ; régulation calcique	NS5 ; capsid	?	(Chatterji, Bobardt et al. 2009; Qing, Yang et al. 2009; Li, Huang et al. 2012)
WNV	<i>Flaviviridae</i>	A ; B ; C	CsA ; siRNA	Réplication	NS5	?	(Qing, Yang et al. 2009; Chiramel, Banadyga et al. 2016)
YFV	<i>Flaviviridae</i>	A ; B ; C	CsA ; siRNA ; <i>in silico</i>	Réplication	NS5 ; NS4B	?	(Qing, Yang et al. 2009; Vidotto, Morais et al. 2017)
JEV	<i>Flaviviridae</i>	B	siRNA	Réplication	?	PPIase	(Kambara, Tani et al. 2011)
IV	<i>Orthomyxoviridae</i>	A ; E	CsA ; siRNA	CypA incorporée ; entrée ; sortie ; facteurs de restriction	M1	PPIase-indépendante	(Liu, Sun et al. 2009; Xu, Meng et al. 2010; Wang, Liu et al. 2011; Liu, Zhao et al. 2012; Hamamoto, Harazaki et al. 2013; Li, Chen et al. 2016)

Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	A	siRNA ; surexpression	Facteur de restriction	Capside (VP2)	PPIase	(He, Zhou et al. 2012; He, Mou et al. 2013; Shen, He et al. 2013)
CoV	<i>Coronaviridae</i>	<u>A</u> ; <u>B</u> ; D ; G ; H	CsA et ANI ; siRNA ; protéomique	CypA associée au virus ; réplication ; régulation de l'apoptose	Nucléocapside (N) ; nsp1	?	(Luo, Luo et al. 2004; Chen, Mi et al. 2005; Pushkarsky, Yurchenko et al. 2005; de Wilde, Zevenhoven-Dobbe et al. 2011; Pfefferle, Schopf et al. 2011; Carbajo- Lozoya, Muller et al. 2012; Carbajo-Lozoya, Ma-Lauer et al. 2014; von Brunn, Ciesek et al. 2015; de Wilde, Falzarano et al. 2017)
Arteri-virus	<i>Arteriviridae</i>	A	CsA ; siRNA	Réplication	?	?	(de Wilde, Li et al. 2013)
IBDV	<i>Birnaviridae</i>	A	Protéomique ; siRNA ; surexpression	Facteur de restriction	VP4	?	(Wang, Zhang et al. 2015)
RVFV	<i>Bunyaviridae</i>	Ppil2	Protéomique	?	NSm	?	(Engdahl, Naslund et al. 2012)
MeV	<i>Paramyxoviridae</i>	A; B	Protéomique	CypB incorporée ; attachement	Nucléocapside (N)	?	(Watanabe, Yoneda et al. 2010)
RSV	<i>Paramyxoviridae</i>	A	Protéomique	?	M	?	(Kipper, Avrahami et al. 2016)
CVB3	<i>Picornaviridae</i>	A	ANI de la CsA ; souris PPIA -/-	Inflammation	?	?	(Seizer, Klingel et al. 2012)

EV71	<i>Picornaviridae</i>	A	CsA ; siRNA	Décapsidation	Capside (VP1)	?	(Qing, Wang et al. 2014)
VV	<i>Poxviridae</i>	A	CsA et ANI ; protéomique	CypA incorporée	?	PPIase	(Damaso and Moussatche 1998; Castro, Carvalho et al. 2003)
Virus Orf	<i>Poxviridae</i>	B	CsA ; siRNA	?	?	?	(Zhao, Li et al. 2017)
HEV	<i>Hepeviridae</i>	A; B	CsA ; siRNA	Facteurs de restriction	?	?	(Wang, Zhou et al. 2014)

KSHV : « Kaposi's Sarcoma Herpes Virus », virus herpétique associé au sarcome de Kaposi ; **IBDV** : « Infectious Bursal Disease Virus », virus de la maladie de la bursite infectieuse ; **RVFV** : « Rift Valley Fever Virus », virus de la fièvre de la Vallée du Rift ; **MeV** : « Measles Virus », virus de la rougeole ; **CVB3** : Coxsackievirus B3 ; **EV71** : entérovirus 71 ; **VV** : « Vaccinia Virus », virus de la vaccine ; **HEV** : « Hepatitis E Virus », virus de l'hépatite E ; ? : pas de données claires

F. Objectifs et déroulement de la thèse

1) Développement d'une nouvelle famille de petites molécules inhibitrices des cyclophilines, non peptidiques, non immunosuppressives et au large spectre antiviral

Les premiers résultats de la thèse ont été générés dans le cadre de la participation à la découverte d'une toute nouvelle famille de petites molécules non peptidiques, inhibitrices des Cyps (SMCypI, « Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors »), sans lien avec la CsA ou la SfA, ayant une affinité pour les Cyps *in vitro* de l'ordre du nanomolaire. L'absence de propriétés immunosuppressives de ces composés a été vérifiée et leur aptitude à inhiber la réplication de virus de familles différentes a été testée.

2) Caractérisation de l'activité anti-*Flaviviridae* du composé 31

Nous avons caractérisé l'activité antivirale du composé 31 (C31), aussi appelé F759, SMCypI le plus puissant sur l'activité PPIase des Cyps, lors de l'infection par le HCV. L'activité du C31 a été vérifiée dans différents modèles infectieux et réplicatifs du HCV afin d'attester de

son potentiel pan-génotypique. Une étude mécanistique a également été menée afin de déterminer le mécanisme d'action antiviral du C31 dans l'infection par le HCV (modélisation moléculaire de la fixation du composé, expériences de FRET, corrélation entre l'activité anti-PPIase des SMCypI et leurs activités anti-HCV). L'étude de l'action du C31 sur l'interaction entre la CypA et NS5A a été réalisée. Une large étude de résistance a été menée (barrière génétique au développement de la résistance au C31, caractérisation des mutations de résistance au C31 et études de résistance croisée avec les inhibiteurs de NS5A). Enfin, le potentiel large spectre du C31 dans la famille des *Flaviviridae* à laquelle appartient le HCV a été confirmé dans différents modèles internes et externes au laboratoire (DENV, WNV, YFV et ZIKV).

3) Caractérisation de l'activité anti-Coronavirus des petites molécules inhibitrices des cyclophilines et étude de leur mécanisme d'action antiviral

Nous avons dans un premier temps caractérisé l'effet des SMCypI au cours de l'infection par HCoV-229E dans des cellules MRC5. Pour cela, 31 SMCypI ont été sélectionnés de manière rationnelle en fonction de leur structure et leur aptitude à bloquer la production d'ARN viral et à inhiber l'effet cytopathique (ECP) viro-induit a été mesurée. La relation structure-activité des composés a été caractérisée, afin d'identifier les groupements chimiques nécessaires à l'effet antiviral. De même, la dépendance du virus à l'activité PPIase des Cyps a été étudiée.

Dans un deuxième volet, nous nous sommes intéressés à l'étape du cycle viral bloqué par les SMCypI au cours de l'infection par HCoV-229E. Des gammes de concentrations ont été réalisées afin de sélectionner un « lead compound » pertinent pour les études mécanistiques. Des expériences de « time-of-addition assay » ont été réalisées et ont nous ont menés à nous intéresser à l'entrée virale. Des « time-of-removing assay » et des infections à basse température ont été utilisées afin de décortiquer plus précisément l'étape de l'entrée virale bloquée par le « lead compound », le F836. Des expériences sur l'entrée du virus MERS-CoV en présence de F836 ont été menées.

Compte-tenu du mécanisme d'action supposé des Cyps dans l'entrée virale, nous nous sommes intéressés au rôle extracellulaire des Cyps dans l'infection. Nous avons étudié les

conséquences de l'association de la CypA avec les particules virales sur l'infection par des techniques biochimiques et génétiques (CRISPR/Cas9).

Enfin, nous avons étudié le rôle de la CypA intracellulaire dans le cycle de vie du HCoV-229E, en infectant des cellules WT ou KO pour la CypA. Le degré d'implication de la CypA dans l'effet des SMCypI a également été recherché.

II. Matériels et Méthodes

A. Modèles infectieux des *Coronavirus*

1) HCoV-229E

Le virus HCoV-229E a été fourni par le Pr Astrid Vabret (CHU Caen, France). La production du stock de virus a été effectuée dans les cellules diploïdes MRC5 (RD-Biotech, Besançon, France) à 38 doublements. Dix millions de cellules MRC5 ensemencées la veille en flasque de 75cm² ont été infectées avec 5 ml de virus fourni dilué au ½ dans du milieu DMEM supplémenté (2 % SVF, 50 UI/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et 0,1 µg/ml amphotéricine-β, Thermo Fischer Scientific) pendant 4 heures à 35°C, 5 % CO₂, sous agitation. Cinq ml de milieu ont ensuite été ajoutés pour atteindre un volume final de 10 ml. Le virus produit a été récupéré après 72 heures, lorsqu'environ 95 % des cellules étaient lysées. Les 10 ml de virus produits ont été utilisés pour infecter, de la même manière, deux flasques de 75cm² de MRC5 à 38 doublements. Cette opération a été reproduite jusqu'à obtenir un stock de virus de 500 ml.

2) MERS-CoV

Les expériences sur le MERS-CoV ont été réalisées par Jean K. Millet, de l'équipe de Gary Whittaker (Université Cornell, New York, Etats-Unis). La souche EMC/2012 leur a été fournie par Ralph Baric (Université de Chapel Hill, Caroline du Nord, Etats-Unis). Le virus a été propagé dans des cellules Vero-81 dans un laboratoire de type L3 dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % SVF, 10 mM HEPES, 100 UI/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine.

B. Mesure de l'activité anti-*Coronavirus* des inhibiteurs de cyclophilines

1) Développement d'un test de mesure de l'effet cytopathique viro-induit

Le développement d'un test de mesure de l'ECP (**Figure 23**) a été utilisé dans les cellules MRC5 infectées par le virus HCoV-229E pendant 72 heures à la M.O.I. de 1. Le principe du test repose sur le fait que lors de la lyse cellulaire, les cellules libèrent leur contenu intra-cytosolique dans le milieu de culture, notamment des protéases. Un composé commercial (« AAF-Glo Substrate » (Promega, Madison, Etats-Unis)) est ajouté dans le surnageant de culture et clivé par

les protéases cellulaires en luciférase. En présence de luciférine, le signal obtenu au luminomètre est donc directement lié au niveau de mortalité cellulaire.

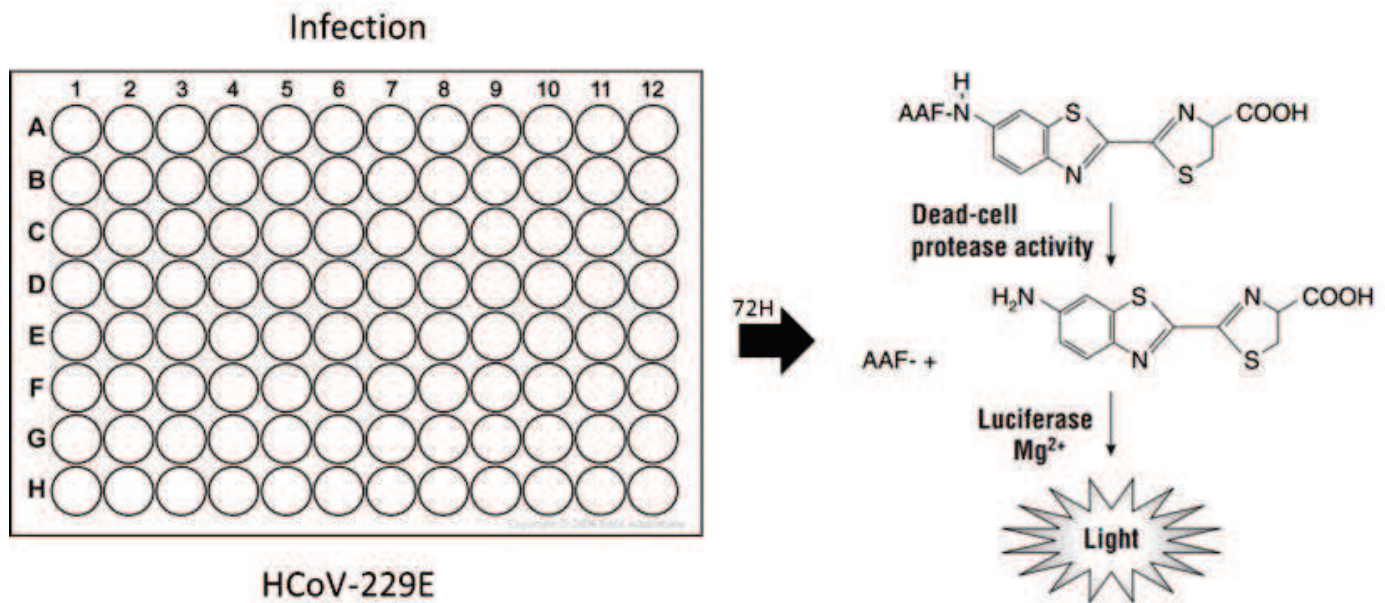


Figure 23 : Représentation schématique du test de quantification de l'effet cytopathique viro-induit - Les cellules sont infectées en plaque de 96 puits dans différentes conditions. L'ECP viro-induit se traduit par une lyse cellulaire qui aboutit à la libération du contenu intra-cytosolique des cellules dans le surnageant. Les protéases cellulaires clivent le « AAF-Glo-Substrate » en luciférase. En présence de luciférine et de Mg^{2+} , une réaction lumineuse qui est proportionnelle à la mort cellulaire se produit.

Le signal obtenu dans les puits contenant l'inoculum viral sans cellules (correspondant au bruit de fond des protéases cellulaires libérées lors de la production du stock viral) a été soustrait du signal obtenu dans les cellules infectées. Le signal obtenu dans les cellules non infectées (correspondant à la mortalité naturelle des cellules) a été soustrait du signal obtenu dans les cellules infectées.

Le signal a donc été calculé avec la formule : Signal spécifique = Signal cellules infectées – signal virus sans cellules – signal cellules non infectées.

2) RT-qPCR HCoV-229E

L'ARN total des cellules infectées a été extrait avec le kit « SV96 Total RNA Isolation System » (Promega). Les ARN ont été rétro-transcrits avec le kit « High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit » (Thermo Fischer Scientific). Les ADN complémentaires (ADNc) du HCoV-229E ont été amplifiés avec le « Taqman Gene Expression Master Mix » (Thermo Fischer Scientific) en utilisant les oligonucléotides sens 5'- CGC AAG AAT TCA GAA CCA GAG -3', antisens 5'- GGG AGT CAG GTT CTT CAA CAA -3' et la sonde 5' – FAM CCA CAC TTC AAT CAA AAG CTC CCA AAT TAMRA – 3'. La GAPDH humaine a été utilisée comme contrôle avec « GAPDH Human Endogenous Control » (ThermoFischer Scientific).

3) Immunofluorescence

a) HCoV-229E

Les immunofluorescences (IF) ont été réalisées sur des cellules Huh7 ensemencées en « Lab-Tek Permanox » de 8 puits (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) et infectées avec le virus HCoV-229E dans différentes conditions expérimentales. Les cellules infectées ont été rincées une fois dans du PBS ++ (Ca²⁺ et Mg²⁺) et fixées pendant 10 minutes dans 4 % PFA, à l'abri de la lumière et à température ambiante (TA). Les cellules fixées ont été rincées 3 fois dans du PBS ++ et perméabilisées avec 100 % de méthanol froid pendant 10 minutes à -20°C. Les cellules perméabilisées ont été rincées 3 fois au PBS ++ et incubées pendant 1 heure en présence d'un tampon de blocage (Triton X-114 0,3%, BSA fraction V 10 mg/ml dans PBS ++) à 37°C dans une chambre humide. Les cellules ont ensuite été incubées 1 heure en présence d'un anticorps primaire de souris anti-ARNdb « J2 » (Scicons, Szirak, Hongrie) dilué au 1/400^{ème} dans du « Antibody Diluent » (Agilent Technologies, Les Ulis, France), pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages ont été réalisés au PBS ++ et les cellules incubées pendant 1 heure à 37°C en présence d'un anticorps secondaire anti-souris (« Goat anti-mouse Alexa Fluor 488nm », Thermo Fischer Scientific) dilué au 1/400^{ème} dans du « Antibody Diluent », et à l'abri de la lumière. Trois lavages au PBS ++ ont ensuite été réalisés et le montage a été réalisé avec « ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI » (Thermo Fischer Scientific) et les cellules observées au microscope à fluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

b) MERS-CoV

Les IF ont été réalisées sur des cellules Huh7 ensemencées dans des chambres de microscopie (Ibidi, Munich, Allemagne) et infectées dans différentes conditions. Les cellules infectées ont été

rincées au PBS et fixées pendant 1 heure avec 4 % PFA. Les cellules ont été perméabilisées au Triton X-100, bloquées avec du sérum de chèvre, et marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine S du MERS-CoV (40069-RP02, SinoBiological) puis avec du DAPI. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Zeiss).

C. Criblage anti-HCoV-229E d'une librairie de petites molécules inhibitrices des cyclophilines

Des cellules MRC5 en plaque de 96 puits ont étéensemencées à la densité de 10000 cellules par puits et infectées à la M.O.I. de 1 par HCoV-229E pendant 72 heures, en présence de 0,1 % DMSO ou de 50 μ M de chacun des 31 SMCypI. L'inhibition de l'infection a été mesurée par ECP viro-induit et RT-qPCR comme décrit précédemment.

D. Gammes de concentrations

Des cellules MRC5 en plaque de 96 puits ont étéensemencées à la densité de 10000 cellules par puits et infectées à la M.O.I. de 1 par HCoV-229E pendant 72 heures, en présence de 0,1 % DMSO ou de concentrations croissantes en inhibiteurs. L'inhibition de l'infection a été mesurée par ECP viro-induit et RT-qPCR comme décrit précédemment. Les EC₅₀ des composés sur l'inhibition de l'ECP ont été calculées avec le logiciel SigmaPlot et des courbes à quatre paramètres.

E. Etude de l'étape du cycle viral du HCoV-229E ciblée par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines

1) « Time-of-addition-assay »

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à la densité de 10000 cellules par puits en plaque de 96 puits. Le lendemain, les cellules ont été infectées par le virus HCoV-229E à la M.O.I. de 1. Les inhibiteurs ont été ajoutés à la concentration fixe de 12,5 μ M à différents temps par rapport à l'infection (0 heure, + 3 heures, + 6 heures, + 9 heures, +12 heures, + 24 heures). La durée totale de l'infection a été de 72 heures et l'effet antiviral a été étudié par RT-qPCR.

2) « Time-of-removing » assay

a) *HCoV-229E*

Des cellules MRC5 ont été infectées par HCoV-229E à la M.O.I. de 1 pendant 3 heures, en absence ou en présence de 50 μ M de F836. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois au PBS -/- et incubées sans inhibiteur pendant 69 heures supplémentaires. La quantité d'ARN viral a été mesurée par RT-qPCR.

b) *MERS-CoV*

Des cellules Huh7 ont été infectées par MERS-CoV à la M.O.I. de 10 pendant 2 heures, en absence ou en présence de 50 μ M de F836. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois au PBS -/-, et incubées sans inhibiteur pendant 7 heures supplémentaires. L'infection a été mesurée par une IF dirigée contre la protéine d'enveloppe « Spike » (S) du virus décrite précédemment.

3) Test d'attachement

Des cellules MRC5 ont été ensemencées en plaque 48 puits et incubées toute la nuit à 37°C. Deux heures avant l'infection, les cellules ont été placées à 4°C. Les cellules ont ensuite été infectées à la M.O.I. de 1 par du virus froid, en présence ou en absence de 50 μ M de F836. L'infection à basse température permet au virus de s'attacher aux cellules, mais pas de s'internaliser. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois au PBS -/- froid et placées à 37°C. La quantité d'ARN viral a été mesurée 24 heures post-infection par RT-qPCR.

4) Test d'internalisation

Des cellules MRC5 ont été ensemencées en plaque 48 puits et incubées toute la nuit à 37°C. Deux heures avant l'infection, les cellules ont été placées à 4°C. Les cellules ont ensuite été infectées à la M.O.I. de 1 par du virus froid, en absence d'inhibiteur. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois au PBS -/- et placées à 37°C en absence ou en présence de 50 μ M de F836. Les cellules ont de nouveau été rincées deux fois au PBS -/-, et incubées en absence d'inhibiteurs jusqu'à 24 heures post-infection. L'infection a été mesurée par RT-qPCR.

F. Développement de cellules « Knock-Out » (KO) pour la cyclophiline A (CypA -/-) par la technologie CRISPR/Cas9

1) Présentation de la technologie CRISPR/Cas9

La technologie CRISPR/Cas9 (« Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats »)/Cas9 permet de réaliser des coupures double-brin de l'ADN génomique afin d'éteindre l'expression d'un gène donné à 100 %. Il s'agit initialement d'un système de défense immunitaire procaryote utilisé pour éditer le génome d'un agent pathogène ayant déjà infecté la cellule. Le système repose sur l'utilisation de la nucléase en question, la Cas9, humanisée pour les besoins des expériences dans les cellules de mammifères. Cette nucléase est « guidée » au niveau du site génomique à couper par un ARN guide (ARNg) constitué de deux éléments contigus : la partie ARN qui « tracte » la nucléase ou « ARNtracr » et la partie qui s'hybride au génome cellulaire par complémentarité de bases, « ARNhyb ». L'ARNhyb doit obligatoirement contenir le motif NGG, reconnu par la Cas9.

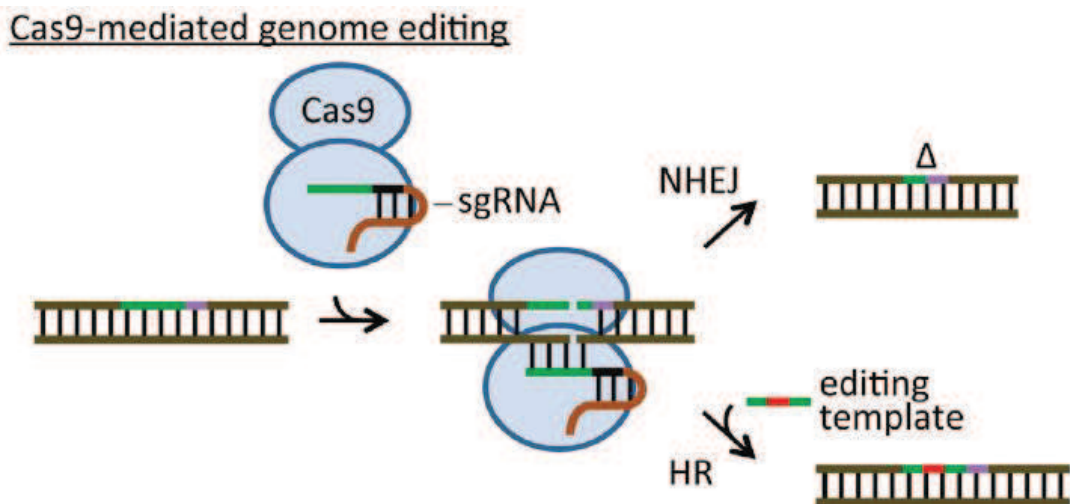


Figure 24 : Représentation schématique du principe de la technologie CRISPR/Cas9 – (Barrangou and Marraffini 2014)– En marron à gauche, la zone d'ADN db cible, avec en vert la séquence cible et en violet le « PAM » NGG. La nucléase Cas9 est guidée par l'ARNg (ou « sgRNA » sur le schéma) au niveau de la séquence cible grâce à sa séquence en orange. La séquence de l'ARNg en vert permet l'hybridation sur la séquence génomique cible. La coupure double-brin qui en résulte peut être réparée par « Non-Homologous End-Joining » (NHEJ) ou par recombinaison homologue (HR, pour « Homologous Recombination ») en présence d'un ADN exogène (« editing template »).

2) « Design » des sites de clivage

Le « design » des sites de clivage a été effectué *via* l'algorithme du site CHOPCHOP élaboré par l'Université d'Harvard. Une recherche des meilleurs sites de clivage a été effectuée pour le gène PPIA. Deux oligonucléotides ont été choisis afin d'augmenter la probabilité d'obtenir à terme un clone KO, de séquences 5'-CGT ACC TGA CAC ATA AAC CCT GG et GTA CCC TTA CCA CTC AGT CTT GG.

3) Plasmides

Depuis 2012, un grand nombre de stratégies de clonage ont été proposées. Nous avons choisi la stratégie développée par le laboratoire de George M. Church (Mali, Yang et al. 2013). Il s'agit de transfecter dans les cellules un plasmide codant la Cas9 humanisée et un autre plasmide codant l'ARNg spécifique de la cible. Le plasmide codant la Cas9 a été commandé sur le site Addgene (réf 41815) et fourni par George M. Church. Le plasmide contenant l'ARNg a également été commandé sur le site Addgene (réf 41824) et provient du même laboratoire.

Les clones bactériens contenant les plasmides ont été reçus sur gélose et mis en culture dans 150 ml de milieu BHI (« Brain-Heart Infusion », Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) contenant de l'ampicilline (plasmide 41815) ou de la kanamycine (plasmide 41824). Les plasmides ont été isolés et purifiés avec le kit « GeneJet Plasmid Maxiprep Kit » (Thermo Fischer Scientific).

4) Clonage des sites de clivage

B



U6 promoter + target RNA + guide RNA scaffold:

TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTG
CATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTT
GGGTAGTTTGCAGTTTAAATTTATGTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTGGCTTTATATATCTTGTGGAAA
GGACGAAACACC**GNNNNNNNNNNNNNNNNNNN****GTTT**TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT
CGGTGCTTTTTTCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATT

Figure 25 : Représentation schématique du plasmide "sgRNA" – (Mali, Yang et al. 2013) – En haut : la séquence cible est représentée en vert (« Target RNA »), fusionnée avec le « scaffold » de l'ARNg en bleu, nécessaire pour « guider » la nucléase efficacement au site de coupure. En rouge, un motif de sept « T » permettant d'arrêter la transcription. Cet ensemble est exprimé sous le contrôle du promoteur U6. En bas, la représentation de la séquence obtenue.

Afin d'insérer les sites de clivage spécifiques du gène PPIA dans le plasmide 41824, la stratégie de recombinaison homologue a été adoptée, selon Mali *et al.* afin d'obtenir le plasmide représenté sur la **Figure 25**.

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides "sgRNA" ciblant la cyclophiline A

Gène	Oligonucléotides 1	Oligonucléotides 2
PPIA	TTT CTT GGC TTT ATA TAT CTT GTG GAA AGG ACG AAA CAC CGGTACCTGACACATAAACCC	TTT CTT GGC TTT ATA TAT CTT GTG GAA AGG ACG AAA CAC CGTACCCTTACCACTCAGTCT
	+	+
	GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TTT CTA GCT CTA AAA CGGGTT TAT GTG TCA GGT ACC	GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TTT CTA GCT CTA AAA CAG ACT GAG TGG TAA GGG TAC

Ces oligonucléotides (**Tableau 4**) ont été reçus lyophilisés et resuspendus dans de l'eau à la concentration finale de 100 µM, puis phosphorylés en utilisant la « T4 Polynucléotide Kinase » (Promega) pendant 30 minutes à 37°C. Les oligonucléotides phosphorylés sens et antisens ont ensuite été hybridés en augmentant la température jusqu'à 95°C (phase de déshybridation) et en la diminuant jusqu'à 25°C de 5°C par minute. Une phase d'extension d'amorces a ensuite été utilisée afin d'obtenir une molécule d'ADNdb de 100 nucléotides en utilisant la « Phusion DNA » (New England Biolabs, Ipswich, Etats-Unis). Cette étape a été analysée par électrophorèse (gel d'agarose 2 %). Le plasmide 41824 a ensuite été hydrolysé par l'enzyme AflIII (New England Biolabs) afin de le linéariser, à 37°C pendant 45 minutes. L'hydrolyse des 500 ng de plasmide a été vérifiée sur gel d'agarose 1 %, 100V pendant 45 minutes. La

recombinaison homologue a été effectuée avec le kit « NEBuilder Assembly Master Mix » (New England Biolabs) en utilisant 0,1 pmol d'insert purifié avec le kit « MinElute PCR Purification Kit » (QIAgen, Hilde, Allemagne) et 0,02 pmol de vecteur hydrolysé. La réaction a été effectuée à 50°C pendant 1 heure. Des bactéries chimiocompétentes ont ensuite été incubées avec 2 µl de produit de recombinaison homologue 30 minutes dans la glace, puis un choc thermique a été réalisé (42°C pendant 45 secondes puis 2 minutes dans la glace). Deux-cents µl de milieu BHI à 37°C ont été ajoutés sur les bactéries et la réaction incubée une heure à 37°C sous agitation (250 rotations par minutes, rpm). L'ensemble de la réaction a ensuite été étalé sur une boîte BHI contenant 30 µg/mL de kanamycine. Le lendemain, les clones ont été ensemencés dans 5 ml de milieu BHI contenant de la kanamycine pendant 4 heures à 37°C, sous agitation. L'ADN plasmidique des clones a été extrait avec le kit « GeneJet Plasmid Miniprep Kit » (Thermo Fischer Scientific) et élués dans 50 µl d'eau. Dix µl de plasmides ont été hydrolysés par AflIII et les plasmides n'étant plus hydrolysés ont été analysés et vérifiés par séquençage Sanger en utilisant l'amorce sens U6 5'- GGG CAG GAA GAG GGC CTA T-3' et le kit « BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Thermo Fischer Scientific). Les plasmides validés ont ensuite été amplifiés (« Maxiprep ») et dosés au Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific).

5) Transfections

Des cellules Huh7 ont été ensemencées à la densité de 75000 cellules par puits de plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 150 ng de plasmide 41815 et 350 ng de plasmide 41824 (quantités équimolaires) contenant les sites de clivage spécifiques du gène PPIA en utilisant le kit « Lipofectamine LTX with Plus Reagent » de Thermo Fischer Scientific. Vingt-quatre heures après la transfection, le milieu a été changé et les cellules incubées pendant 24 heures supplémentaires à 37°C, 5% CO₂.

6) Isolements clonaux

Afin d'obtenir une population clonale KO ou hétérozygote, un isolement clonal a été effectué. Les cellules transfectées ont été trypsinées et comptées, puis ensemencées à la densité de 2 cellules par puits de plaque de 96 puits, dans un volume final de 200 µl par puits. Les cellules ont été laissées à 37°C jusqu'à l'observation de clones cellulaires au microscope (4-6 semaines).

7) Validation par géotypage

L'ADN génomique des populations clonales obtenues a été extrait avec le kit « Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System » (Promega). Une PCR permettant d'amplifier l'ADN génomique autour du site de clivage a ensuite été réalisée. Les produits de PCR ont ensuite été analysés avec le kit « Guide-It Genotype Confirmation » (Takara-Bio, USA).

8) Validation par séquençage

Les produits de PCR validés par géotypage ont été séquencés avec les mêmes amorces que pour les PCR par la technologie Sanger en utilisant le kit « BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing » (Thermo Fischer Scientific).

9) Validation par Western-Blot

L'expansion des clones validés en géotypage et séquençage a été réalisée jusqu'à obtenir un nombre de cellules suffisant pour le western-blot. Les cellules ont été rincées une fois au PBS +/- et lysées dans le « Cell Disruption Buffer » du kit « PARIS » (Thermo Fischer Scientific) à température ambiante pendant 10 minutes. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide « NuPage 4-12% Bis-Tris Gel » (Thermo Fischer Scientific). La migration a été effectuée dans du tampon « NuPage SDS MES Running Buffer » (Thermo Fischer Scientific) 1 heure à 120V. Le transfert a ensuite été réalisé dans du tampon de transfert 1X à 4°C, 1 heure à 100V avec une membrane de nitrocellulose « Nitrocellulose Transfert Membrane 0,45 µM » (Thermo Fischer Scientific). La membrane a ensuite été incubée 1 heure dans une solution de TBS (« Tris Buffered-Saline ») 1X – 5% lait. La membrane a ensuite été incubée avec les anticorps suivant les recommandations du **Tableau 5** ci-dessous et rincée 3 fois au TBS 1X. La membrane a ensuite été incubée 1 heure à TA avec l'anticorps secondaire adéquat dilué au 1/10 000ème dans TBS 1X-5% lait (**Tableau 6**). La membrane a ensuite été lavée 3 fois au TBS 1X et incubée 5 minutes avec de l'« Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent » (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) et la révélation effectuée avec le logiciel ImageQuant Las4000 (GE Healthcare).

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés

Protéine détectée	Fournisseur	Dilution	Espèce
CypA	Abcam (clone EPR7511)	1/2000 ^{ème}	Lapin (monoclonal)
Gamma-tubuline	Thermo Fischer	1/1000 ^{ème}	Souris (monoclonal)

Tableau 6 : Anticorps secondaires utilisés

Espèce reconnue	Fournisseur	Dilution	Espèce
Lapin	Thermo Fischer	1/10000 ^{ème}	Chèvre
Souris	Thermo Fischer	1/10000 ^{ème}	Chèvre

G. Infection des lignées Huh7 WT et CypA KO

Des cellules Huh7 WT et CypA KO ont été infectées à la M.O.I. de 1 par du virus HCoV-229E produit pendant 24 heures dans des cellules Huh7 WT ou CypA KO. Après une heure d'infection, les cellules ont été rincées une fois au PBS -/- et l'infection poursuivie pendant 23 heures supplémentaires. L'infection a été mesurée par RT-qPCR et IF de l'ARNdb.

H. Hydrolyse par la protéinase K

Cinq ml de surnageant de cellules MRC5 infectées par HCoV-229E ont été concentrés 10 fois avec des colonnes « Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 3K » (Merck-Millipore, Billerica, Etats-Unis). Vingt µl de surnageants concentrés ont été incubés pendant 1 heure à 37°C en présence de 0, 1, 2 ou 4 ng/µl de protéinase K (PK). La réaction a été arrêtée par ajout de 2

mM EGTA pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été préparé pour une analyse des Cyps A, B et D en western-blot comme décrit précédemment. Alternativement, le surnageant a été chauffé à 95°C pendant 15 minutes avant d'être ramené lentement à température ambiante pendant une heure. Puis, le surnageant a été incubé en présence de PK comme expliqué ci-dessus.

I. Purification des particules virales

Cinq ml de surnageant de cellules MRC5 infectées ou non par HCoV-229E ont été concentrés 5 fois avec des colonnes « Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 3K ». Une centrifugation de 5 minutes à 1000 g a été effectuée afin de retirer les noyaux et débris cellulaires. Le surnageant récupéré a été centrifugé 15 minutes à 15000 g afin de retirer les mitochondries. Le surnageant récupéré a été ultracentrifugé 1 heure 30 à 150000 g, puis les culots resuspendus dans le bleu de charge contenant du SDS et du DTT précédemment décrit (conditions « peu dénaturantes ») ou en présence de 10 % de β -mercaptoéthanol (conditions « dénaturantes »). L'analyse par western-blot des Cyps A et B a été réalisée comme décrit précédemment.

J. Expériences de « cross-linking »

La CypA purifiée a été incubée en présence de 0,4 % de PFA, en présence ou en absence de virus HCoV-229E soniqué et de F836 à la concentration de 50 μ M. Les complexes formés par la CypA ont été analysés par western-blot.

III. Résultats

A. Développement d'une nouvelle famille de petites molécules inhibitrices des cyclophilines, non peptidiques, non immunosuppressives et au large spectre antiviral

La première problématique fut de créer une nouvelle classe de CypI sans lien structuraux avec la CsA et la SfA. Pour cela, la stratégie de « Fragment-Based Drug Design » (FBDD) a été choisie. Cette approche permet un développement rationnel, guidé par la structure, d'inhibiteurs spécifiques d'une cible donnée.

Environ 35000 fragments ont été criblés pour leur aptitude à se fixer sur la CypD. Les composés identifiés par résonance magnétique nucléaire comme de possibles interactants de la CypD ont été caractérisés par cristallographie aux rayons X. Parmi ces molécules, deux ont été sélectionnées, l'une se fixant dans la poche hydrophobe et l'autre dans la poche gardienne de la CypD. Une stratégie dite de « linking » a ensuite été adoptée afin de lier ces deux fragments entre eux. Plusieurs groupements chimiques ont été testés, mais aucun n'a permis de faire le lien entre les deux fragments. Finalement, c'est la superposition des structures de la CsA et de la SfA en complexe avec la CypD qui a laissé apparaître un pont urée à l'interface entre les deux poches du site actif. La liaison des deux fragments sélectionnés par ce groupement urée a permis d'obtenir le composé 22 (C22), dont la structure cristallographique a révélé une fixation dans les deux poches voisines du site actif des Cyps A et D.

La poursuite de l'optimisation chimique a ensuite concerné deux motifs essentiels du composé. Le premier correspondait au groupement aniline qui se fixe dans la poche gardienne. Ce groupement pose problème car il est souvent associé à une toxicité cellulaire. Le remplacement du groupement NH_2 par d'autres groupes a été associé dans cette étude à une perte totale d'activité des composés, la liaison hydrogène entre le motif NH_2 du composé et le résidu T107 de la CypD étant visiblement une interaction clé.

L'autre modification a concerné la fonction ester, celle-ci étant associée à une très faible stabilité des composés *in cellulo*. Dans ce travail, les premières tentatives de modification de

cette fonction ont été associées à une perte d'activité. Ce phénomène s'expliquait par la perte de la liaison hydrogène entre la fonction ester du composé et le résidu catalytique R55. La difficulté principale fut donc d'identifier un groupement hydrophobe effectuant une liaison hydrogène avec R55. Le remplacement de la fonction ester par un motif phényl-pyrrolidine a permis d'obtenir le composé 24 dont l'activité anti-PPIase était 10 fois supérieure à celle du C22. Les études structurales ont révélé que le groupement phényl-pyrrolidine « poussait » littéralement R55, faisant interagir celle-ci avec le pont urée du composé *via* une liaison hydrogène.

L'activité immunosuppressive du C31 (ou F759), le composé le plus actif sur l'activité PPIase des Cyps A, B et D a été caractérisée. Contrairement à la CsA, le C31 n'inhibait ni l'activité de la calcineurine, ni la production d'IL-2 dans des cellules immunocompétentes Jurkat.

Enfin, l'activité antivirale des composés a été évaluée contre la réplication du HCV, du HIV et du HCoV-229E *in vitro*. Les EC₅₀ des composés étaient variables mais ces résultats ont apporté la preuve de concept du potentiel antiviral à large spectre de cette nouvelle famille de molécules.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans la revue à comité de lecture *Nature Communications* en septembre 2016.

ARTICLE

Received 29 Sep 2015 | Accepted 1 Aug 2016 | Published 22 Sep 2016

DOI: 10.1038/ncomms12777

OPEN

Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities

Abdelhakim Ahmed-Belkacem^{1,*}, Lionel Colliandre^{2,3,*}, Nazim Ahnou¹, Quentin Nevers¹, Muriel Gelin^{2,3}, Yannick Bessin^{2,3}, Rozenn Brillet¹, Olivier Cala⁴, Dominique Douguet^{2,3}, William Bourguet^{2,3}, Isabelle Krimm⁴, Jean-Michel Pawlotsky^{1,5,**} & Jean- François Guichou^{2,3,**}

Cyclophilins are peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPlase) that catalyse the interconversion of the peptide bond at proline residues. Several cyclophilins play a pivotal role in the life cycle of a number of viruses. The existing cyclophilin inhibitors, all derived from cyclosporine A or sanglifehrin A, have disadvantages, including their size, potential for side effects unrelated to cyclophilin inhibition and drug-drug interactions, unclear antiviral spectrum and manufacturing issues. Here we use a fragment-based drug discovery approach using nucleic magnetic resonance, X-ray crystallography and structure-based compound optimization to generate a new family of non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors with potent *in vitro* PPlase inhibitory activity and antiviral activity against hepatitis C virus, human immunodeficiency virus and coronaviruses. This family of compounds has the potential for broad-spectrum, high-barrier-to-resistance treatment of viral infections.

¹INSERM U955 'Pathophysiology and Therapy of Chronic Viral Hepatitis and Related Cancers', Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France. ²CNRS UMR5048, Centre de Biochimie Structurale, Université de Montpellier, 29 rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France. ³INSERM U1054, Centre de Biochimie Structurale, Université de Montpellier, 29 rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France. ⁴Institut des Sciences Analytiques, CNRS UMR5280, Université Lyon 1, École Nationale Supérieure de Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France. ⁵National Reference Center for Viral Hepatitis B, C and Delta, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France. * These authors contributed equally to this work. ** These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-M.P. (email: jean-michel.pawlotsky@aphp.fr) or to J.-F.G. (email: guichou@cbs.cnrs.fr).

Over the past decades, an increasing number of viruses causing unexpected illnesses and epidemics among humans, wildlife and livestock has emerged. These outbreaks have seriously stretched local and national resources in the economically developed world, whereas the capacity to control emerging diseases remains limited in poorer regions where many of them have their origin. A number of virus-specific antiviral agents have been developed and commercialized since the early 1980s. These agents, including drugs that specifically inhibit members of the *Herpesviridae* family, influenza viruses, human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV) and, more recently, hepatitis C virus (HCV), had a major medical impact¹. However, the development costs of specific antiviral agents are extremely high and there are many other medically important viral infections that require efficacious therapies. Thus, there is an urgent need for new families of broad-spectrum antiviral agents, that is, antiviral agents that are active against a number of different viral families². Such compounds should target mechanisms common to different families of viruses, such as cellular components and/or functions involved in their life cycles. The cellular proteins cyclophilins have been shown to play a key role in the life cycle of a number of different viral families. In addition, cyclophilin inhibitors were reported to inhibit the replication of different viruses, both *in vitro* and *in vivo*^{3,4}. Thus, cyclophilins represent an attractive target for broad-spectrum antiviral inhibition.

Cyclophilins are peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIase) that catalyse the interconversion of the two energetically preferred conformers (*cis* and *trans*) of the planar peptide bond preceding an internal proline residue. Seventeen human cyclophilins have been identified thus far. Among them, cyclophilin A (CypA) is present in the cytosol and involved in protein folding, trafficking, immunomodulation and cell signalling⁵. The extracellular fraction of CypB is involved in cell–cell communications and inflammatory signalling. CypD is localized in the matrix of the mitochondria and acts as a key regulator of the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which plays a major role in calcium efflux from mitochondria to the cytosol and can lead to mitochondrial swelling and cell death^{6–9}. The function of most of the remaining cyclophilins is unknown^{10,11}.

Cyclophilins share a common domain of ~109 amino acids, the cyclophilin-like domain, surrounded by domains unique to each member of the family and associated with their subcellular compartmentalization and functional specialization¹¹. Cyclophilins adopt an eight-stranded anti-parallel β -barrel structure (Fig. 1a)¹⁰. Their PPIase catalytic groove is formed by a mixture of hydrophobic, aromatic and polar residues, including Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Asn102, Phe113, Trp121, Leu122 and His126 (Fig. 1a,b). The existence of a deep pocket contiguous to the canonical catalytic site, called the ‘gatekeeper’ pocket, has been revealed (Fig. 1c,d)¹⁰. The gatekeeper pocket might contribute to substrate-binding specificity, its access being determined by gatekeeper residues at its surface.

Several cyclophilins, including principally but not exclusively CypA, have been shown to play a pivotal role in the life cycle of a number of viruses, including HIV, HCV, dengue virus, Japanese encephalitis virus, yellow fever virus, coronaviruses, HBV, cytomegalovirus, influenza A virus, enteroviruses and so on^{3,12–14}. Cyclosporine A (CsA) and non-immunosuppressive macrocyclic analogues of CsA and of sanglifehrin A (SfA) potently inhibit cyclophilin PPIase activity by binding its catalytic site (Fig. 1d). They have shown *in vitro* effectiveness against HIV, HCV and HBV replication³. A CsA analogue, alisporivir, showed potent anti-HCV activity *in vivo*^{15,16}, but its clinical development was halted during the Phase III programme due to severe adverse events unrelated to cyclophilin inhibition.

The existing cyclophilin inhibitors, all derived from CsA or SfA, have disadvantages, including their size resulting in poor cell permeability, the risk of drug–drug interactions, their unclear antiviral spectrum (only the effect on HCV has been reproducibly demonstrated), manufacturing issues they raise (synthesis of alisporivir is a complicated hemi-synthetic pathway starting with CsA that includes 12 steps, some of which use highly reactive and dangerous compounds) and their potential for side effects unrelated to cyclophilin inhibition. In addition to inhibiting cyclophilin PPIase activity, CsA was, for instance, shown to inhibit the mitogen-activated protein kinase pathway and affect transforming growth factor- β 1 levels, whereas CsA and its non-immunosuppressive derivatives were reported to inhibit ABC transporters (for example, PgP, MRP and BCRP) and stimulate antigen presentation by enhancing major histocompatibility complex-I surface expression^{17–22}. Alisporivir was associated with acute pancreatitis cases, including one fatal case, when combined with pegylated interferon- α in a Phase III trial, in patients infected with HCV, through mechanisms that are unknown. Thus, new families of cyclophilin inhibitors are urgently needed.

Fragment-based drug discovery (FBDD) is based on the identification of very small molecules (fragments) that are subsequently expanded or linked together to generate drug leads with therapeutic activity^{23,24}. Here we use an FBDD approach using nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography to generate a new family of non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors, unrelated to CsA or SfA, with potent *in vitro* PPIase inhibitory activity and antiviral activity against several families of viruses responsible for frequent human infections.

Results

Fragment screening. In total, 34,409 fragments were computationally docked into the canonical active site and the gatekeeper pocket of CypD by means of the FlexX programme. Forty-four fragments were selected based on their mode of interaction. Their ability to interact with CypD was further studied by means of NMR spectroscopy. Ten fragment hits with low-affinity dissociation constants (millimolar range) were identified (Supplementary Fig. 1). Their scaffolds and proline-mimicking motifs were used to select *in cerebro* a set of 52 derivative fragments for subsequent X-ray crystallographic experiments. Apo CypD crystals were soaked with each of the 52 fragments. X-ray structures of CypD complexed with 14 fragments were obtained.

Supplementary Fig. 2 shows the chemical structures of the 14 binding fragments. Four fragments (9, 11, 12 and 13) bound the catalytic site of CypD, whereas five fragments (6, 15, 16, 17 and 18) bound the gatekeeper pocket. Fragment 14 bound between the two sites. Finally, four fragments (5, 19, 20 and 21) were nonspecific multibinders. The density map of each fragment is shown in Supplementary Fig. 3 and at (https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocrystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493).

The ability of each fragment to inhibit cyclophilin activity *in vitro* was assessed in cell-free enzyme assays for CypA, CypB and CypD. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of the 14 fragments were >5 mM in all instances.

Fragment selection for linking. Among the 14 fragment hits, the final selection of compounds 6 and 13 for subsequent compound optimization was based on a number of criteria, including their ligand efficiency, their ability to access key regions, their synthetic tractability and the possibility to link them to generate

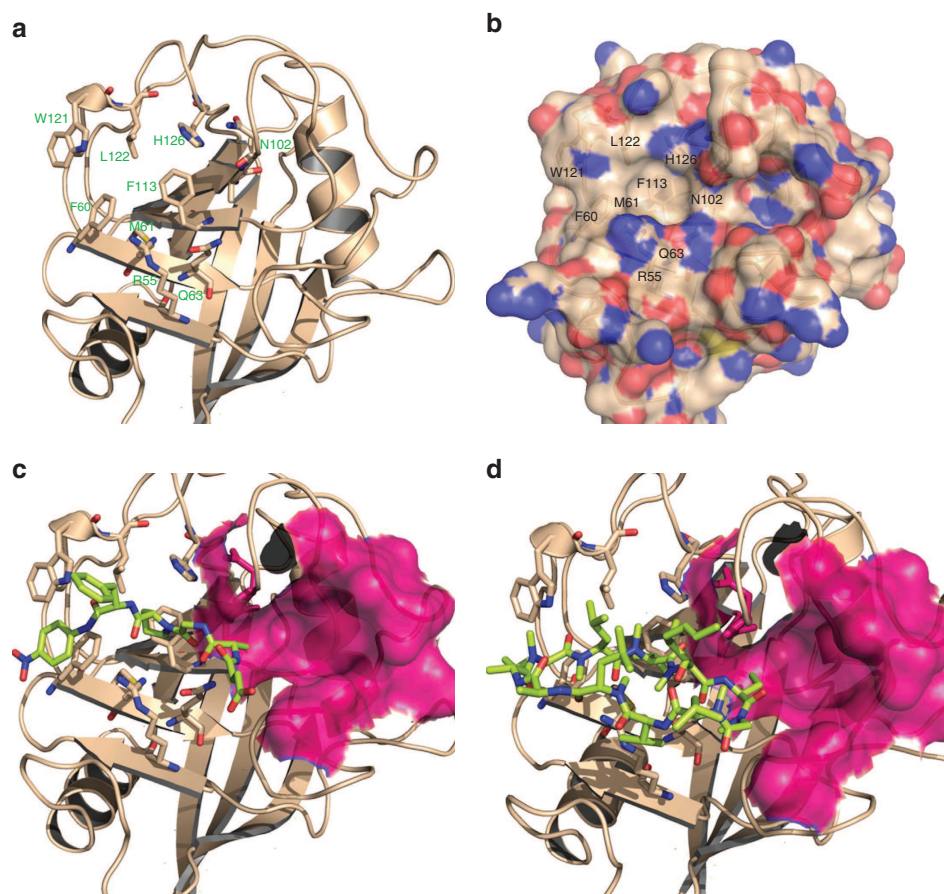


Figure 1 | Crystal structure of CypA alone or in complex. (a) Cartoon representation of CypA, with the catalytic residues in stick format. (b) Surface representation of CypA showing the catalytic pocket (left) and the gatekeeper pocket (right). (c) Cartoon representation of PDB 1ZKF showing the catalytic residues and the succinyl-AGPF-pNA substrate (green) in stick format, and the gatekeeper pocket in surface representation (pink). (d) Cartoon representation of PDB 1CWA showing the catalytic residues and the cyclophilin inhibitor CsA (green) in stick format, and the gatekeeper pocket in surface representation (pink).

compounds binding both the catalytic site and the gatekeeper pocket.

The X-ray crystallographic structure of CypD complexed with fragment **6**, solved at a resolution of 1.10 Å, showed that this fragment deeply buried into the gatekeeper pocket, a hydrophilic region (Fig. 2a), and its amino group displaced a water molecule present in this pocket in the apo form of CypD. Within the gatekeeper pocket, fragment **6** made one direct hydrogen bond with Thr107 and two hydrogen bonds with Ala101 and Gln111 through a water molecule (Fig. 2b).

The crystallographic structure of CypD in complex with fragment **13** was solved at a resolution of 1.35 Å (Fig. 2c). In addition to its hydrophobic contacts with Phe60, Met61, Phe113 and Leu122 within the catalytic site of CypD, fragment **13** directly interacted with Asn102 *via* a hydrogen bond (Fig. 2d).

Linking strategy. Superimposition of fragments **6** and **13** with the known structures of CsA and SfA, two cyclophilin inhibitors, suggested that a urea moiety could be used as a linker between the two fragments, because of one hydrogen bond with Gln63 and two with Asn102 (Fig. 2e). Compound **22**, consisting of fragments **6** and **13** connected by a urea moiety, was thus generated (Fig. 2f). This compound inhibited CypD activity, with an IC_{50} of $6.2 \pm 3.7 \mu M$ (Table 1).

The structure of CypD complexed with compound **22**, obtained at a resolution of 1.93 Å, revealed binding to both the gatekeeper pocket and the catalytic site (Fig. 3a and b). Compound **22** maintained the key interactions of fragments **6** and **13** within their respective pockets, while making one, one and two additional hydrogen bonds with Arg55, Gln63 and Asn102, respectively (Fig. 3b). The binding mode of compound **22** to CypD was confirmed by means of NMR experiments. The CypD ^{15}N -heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectrum revealed significant chemical shift perturbations on ligand binding only for residues located at or near the catalytic site and gatekeeper pocket, respectively (Supplementary Fig. 4). Cross-peaks of Gly151, Asn144 and Asn145 disappeared on ligand addition, likely to be due to intermediate chemical exchange, demonstrating that these residues are part of the binding site and the corresponding amide protons are located at proximity of the ligand.

Compound **22** also potently inhibited CypA and CypB (IC_{50} s: 13.1 ± 5.9 and $6.1 \pm 3.8 \mu M$, respectively). These findings were confirmed by isothermal titration calorimetry experiments showing reduced conformational flexibility on binding of these proteins (Supplementary Fig. 5). Finally, superimposition of the crystallographic structures of CypA and CypD complexed with compound **22** showed identical binding modes (Fig. 3c and https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocrystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493).

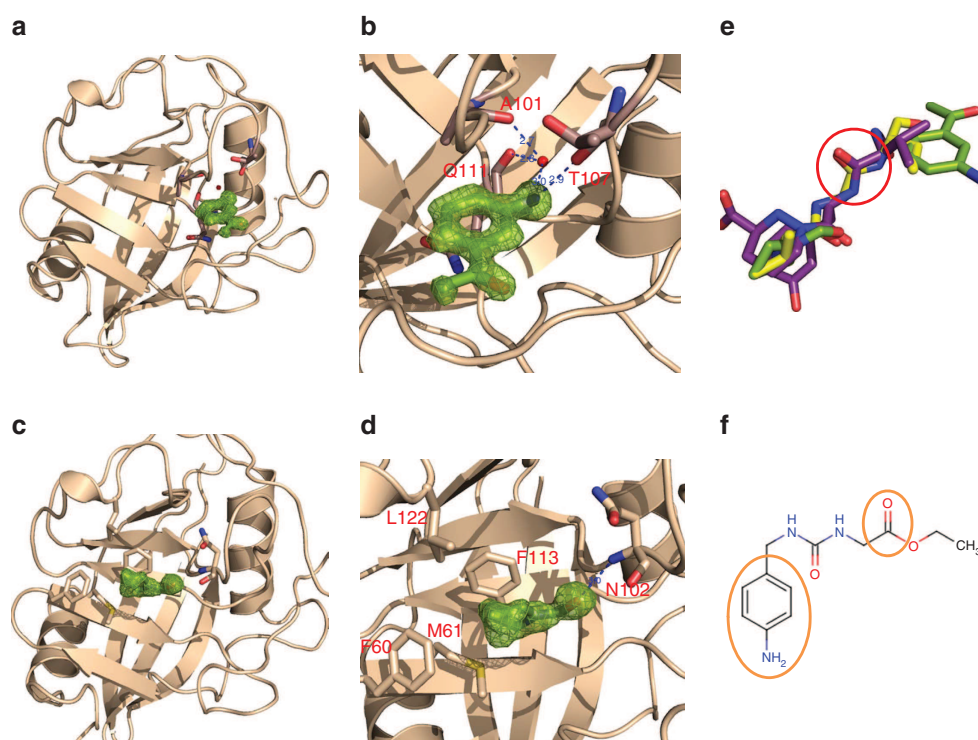


Figure 2 | Cocystal structures of fragment hits with CypD and linking strategy. (a,b) The crystal structure shows fragment **6** bound to the gatekeeper pocket, predominantly through a hydrogen bond with Thr107. The green mesh and surface represent the electron density map of fragment **6** ($2F_o - F_c$ omit map contoured at 1.0σ). The gatekeeper pocket is zoomed in **b**. (c,d) The crystal structure shows fragment **13** bound to the catalytic site, predominantly through a hydrogen bond with Asn102. The green mesh and surface represent the electron density map of fragment **13** ($2F_o - F_c$ omit map contoured at 1.0σ). The catalytic site of CypD is zoomed in **d**. (e) Superimposition of PDB 1CWA (CypA-CsA) and 1YND (CypA-SfA) with cocystals CypD-fragment **6** and CypD-fragment **13**. CsA is represented with yellow sticks. SfA is represented by purple sticks. Fragments **6** and **13** are represented by green sticks. The red circle shows the urea moiety used to link fragments **6** and **13**. (f) Chemical structure of compound **22**, generated by linking fragments **6** and **13** with a urea moiety. The orange circle shows key atoms from fragments **6** and **13**.

Table 1 | *In vitro* inhibitory activities and LE of the two selected fragments and of the compounds resulting from their linkage and subsequent chemical optimization in CypA, CypB and CypD PPIase assays.

Compound	CypA IC ₅₀ (μM)	CypB IC ₅₀ (μM)	CypD IC ₅₀ (μM)	LE (kcal per heavy atom)
CsA	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.005	0.02 ± 0.003	ND
Alisporivir	0.07 ± 0.003	0.04 ± 0.012	0.03 ± 0.005	ND
13	> 5,000	> 5,000	> 5,000	< 0.45
6	> 5,000	> 5,000	> 5,000	< 0.31
22	13.1 ± 5.9	6.1 ± 3.8	6.2 ± 3.7	0.36
23	> 500	> 500	> 500	< 0.29
24	2.8 ± 0.6	1.2 ± 0.1	11.4 ± 3.0	0.27
25	3.4 ± 0.7	3.7 ± 1.4	6.2 ± 2.3	0.28
26	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.31
27	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.31
28	1.5 ± 0.5	1.8 ± 0.9	1.4 ± 0.2	0.26
29	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.26
30	3.3 ± 1.4	1.9 ± 1.5	3.0 ± 0.7	0.23
31	0.1 ± 0.07	0.08 ± 0.04	0.2 ± 0.08	0.28
32	7.4 ± 6.8	8.7 ± 1.5	12.8 ± 2.5	0.34
33	4.2 ± 1.6	2.2 ± 1.2	7.7 ± 0.8	0.22

CsA, cyclosporine A; CypA, cyclophilin A; CypB, cyclophilin B; CypD, cyclophilin D; LE, ligand efficiency; ND, not defined; PPIase, peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase. CsA and the CsA analogue alisporivir are used as references.

Structure-based lead optimization of the compounds. Structure-guided optimization was used to improve cyclophilin affinity and stability of the compounds. As ester functions are often associated with low biological stability, the first step was to replace the ester function of compound **22**, which makes a key hydrogen bond with Arg55, without affecting the cyclophilin inhibitory potency. All designed compounds lacking the ester

function lost their interaction with Arg55, resulting in a drastic decrease of cyclophilin inhibition ($IC_{50} > 500 \mu M$). This was the case of compound **23** (Table 1), although this compound retained all of the other key interactions of compound **22** (Supplementary Fig. 6 and https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493). Based on the observation that in the CypA-SfA

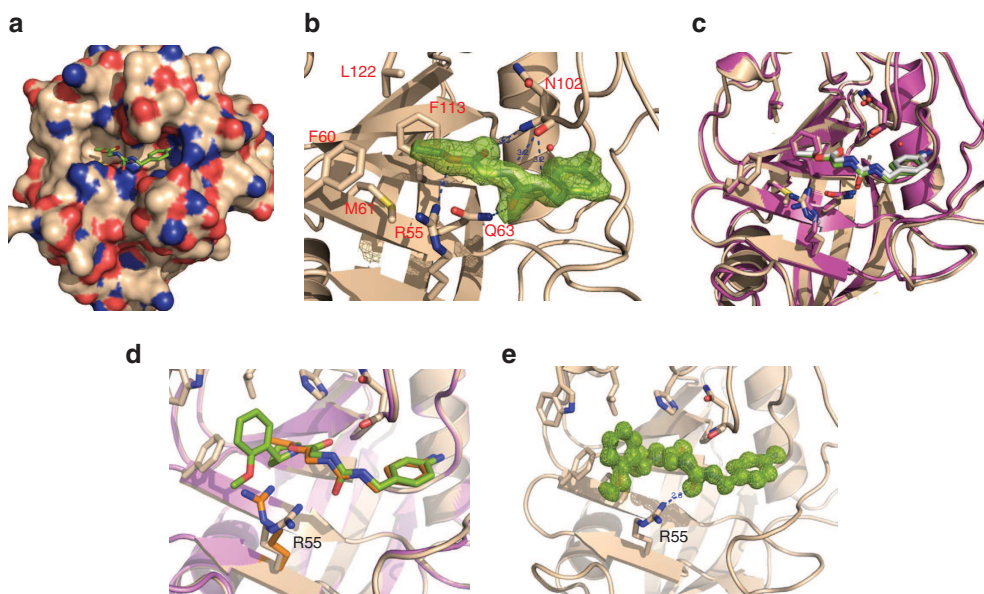


Figure 3 | Co-crystal structure of compounds 22 and 24 with CypA and CypD. (a) Surface representation of CypD in complex with compound 22, showing occupation of both the catalytic site (left) and the gatekeeper pocket (right) of CypD. (b) Zoom into the catalytic site of CypD showing the urea moiety linker of compound 22 making four hydrogen bonds with Arg55, Gln63 and Asn102. The green mesh and surface represents the electron density map of compound 22 ($2F_o - F_c$ omit map contoured at 1.0σ). (c) Superimposition of the CypD-compound 22 (pink for CypD, green sticks for compound 22) and the CypA-compound 22 (purple for CypA, white sticks for compound 22) co-crystals, showing identical binding modes. (d) Superimposition of the CypD-compound 24 cocrystal (pink for CypD, green sticks for compound 24) with the CypD-compound 22 co-crystal (purple for CypD, orange sticks for compound 22). The side chain of Arg55 is shown in stick format (pink for compound 24 and orange for compound 22). Compound 24 shares the same mode of CypD binding as compound 22 and its methoxy group pushes Arg55 to create a hydrogen bond with the urea moiety of the compound. (e) Cartoon representations of CypD in complex with compound 24, showing occupation of the gatekeeper pocket and the catalytic site of CypD. The side chain of Arg55 is represented in stick format to show the interaction with the urea moiety. The green mesh and surface represent the electron density maps ($2F_o - F_c$ omit map contoured at 1.0σ).

complex (PDB code 1YND) the side chain of Arg55 is pushed by an oxygen atom of SfA, a phenyl-pyrrolidine moiety was added to generate compound 24 (Table 1). As shown in Fig. 3d, compound 24 shared the same binding mode as compound 22. In addition, the methoxy of the phenyl-pyrrolidine moiety displaced the side chain of Arg55, making a hydrogen bond with the carbonyl moiety of the urea motif (Fig. 3e and https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocrystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493). Compound 24 proved to be a potent inhibitor of CypA, CypB and CypD PPIase activities, with IC_{50} s of 2.8 ± 0.6 , 1.2 ± 0.1 and $11.4 \pm 3.0 \mu M$, respectively.

A series of phenyl-pyrrolidine derivatives were then synthesized, including compounds 25–31 (Table 1). The crystal structures of CypD in complex with compounds 26, 27, 28 and 29 showed the same binding mode (Supplementary Fig. 7 and https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocrystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493), in keeping with NMR experiments shown in Supplementary Fig. 4B. Interestingly, the thiomethyl groups of compounds 27 and 29 were involved in a transient contact with Arg55 Nε. Table 1 shows the inhibitory effects of these compounds on CypA, CypB and CypD PPIase activities in enzyme assays.

As compounds with an aniline motif have been reported to potentially bear toxic properties^{25,26}, a very large number of chemical modifications aimed at replacing compound 22's aniline motif, while retaining its PPIase inhibitory activity, were made. These included replacement of the amino group by the following: halogens (F, Cl and Br), hydroxyl, methoxy, ester and acetamide; replacement by pyridines, aminopyridines and heterocycles that sometimes contained an amine function, and fused or non-fused

6:6 or 6:5 bicycles; and substitution with methoxy or alkyl groups. The list and structure of the compounds tested for PPIase inhibitory activity is shown in Supplementary Table 1. Among them, only compound 32, in which the aniline motif was replaced by an amino-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl, retained the PPIase inhibitory potency of its parent compound, with IC_{50} s of 7.4 ± 6.8 , 8.7 ± 1.5 and $12.8 \pm 2.5 \mu M$ for CypA, CypB and CypD, respectively (Table 1). In addition, replacement of compound 31's aniline motif by a 3-amino-pyridine led to the generation of compound 33, which, although less active than its parent compound, retained significant PPIase inhibitory activities, with IC_{50} s of 4.2 ± 1.6 , 2.2 ± 1.2 and $7.7 \pm 0.8 \mu M$ for CypA, CypB and CypD, respectively (Table 1).

On the other hand, macrocyclization was attempted to stabilize the bioactive conformation of the compounds. However, macrocyclic compound S69 (Supplementary Table 1) was inactive against cyclophilin PPIase activity. In contrast, the addition of a phenyl ring between the urea and carbonyl of compound 31 stabilized the bioactive conformation by a π - π interaction between the two phenyl moieties, leading to an at least threefold gain of anti-PPIase activity. Ultimately, compound 31 was the most potent cyclophilin inhibitor generated, with IC_{50} s of 0.1 ± 0.07 , 0.08 ± 0.04 and $0.2 \pm 0.08 \mu M$ for CypA, CypB and CypD, respectively (Table 1).

Broad-spectrum antiviral activity. Huh7 cells harbouring an HCV genotype 1b replicon were treated with increasing concentrations of compounds 26, 27, 29, 30, 31, 32 and 33. As shown in Table 2, all of them inhibited HCV replicon replication in a dose-dependent manner, with EC_{50} s ranging from 0.4 to $8.4 \mu M$.

Table 2 | *In vitro* antiviral activities of the cyclophilin inhibitors against HCV, HIV and HCoV-229E, and cellular toxicities in their respective cellular models.

Compound	Huh7 cells		MT4 cells		MRC5 cells	
	HCV genotype 1b replicon EC ₅₀ (μM)	HCV genotype 1b replicon CC ₅₀ (μM)	HIV-IIIb in MT4 cells EC ₅₀ (μM)	MT4 cells CC ₅₀ (μM)	HCoV-229E EC ₅₀ (μM)	MRC5 cells CC ₅₀ (μM)
Csa	0.3 ± 0.1	19.2 ± 4.5	> CC ₅₀	7.5 ± 1.7	> CC ₅₀	9.3 ± 1.7
Alisporivir	0.01 ± 0.0007	32.3 ± 22.0	NT	NT	2.6 ± 0.6	9.7 ± 2.2
26	6.0 ± 0.7	>100	3.6 ± 0.8	> 53	66.3 ± 24.0	>100
27	2.7 ± 2.5	>100	6.8 ± 2.3	> 53	34.6 ± 18.3	>100
29	1.7 ± 1.2	>100	13.0 ± 2.7	40 ± 5.4	27.6 ± 8.6	>100
30	1.4 ± 1.2	>100	15.0 ± 1.2	> 53	7.2 ± 1.8	>100
31	0.4 ± 0.3	>100	NT	NT	44.7 ± 2.2	>100
32	8.0 ± 1.3	>100	NT	NT	71.5 ± 4.3	>100
33	8.4 ± 1.0	>100	NT	NT	55.3 ± 12.2	>100

Csa, cyclosporine A; HCV, hepatitis C virus; HCoV-229E, human coronavirus 229E; HIV, human immunodeficiency virus; NT, not tested.
Csa and the Csa analogue alisporivir are used as references.

Table 3 | Effect of the D320E and R318H HCV NS5A protein substitutions on the antiviral effect of the cyclophilin inhibitors.

Compound	EC ₅₀ (μM) HCV (WT) subgenomic replicon	HCV (D320E) subgenomic replicon		HCV (R318H) subgenomic replicon	
		EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ fold-increase as compared with WT	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ fold-increase as compared with WT
CsA	0.1 ± 0.02	0.5 ± 0.06	3.7	0.4 ± 0.03	2.9
Alisporivir	0.04 ± 0.0005	0.1 ± 0.003	2.5	0.08 ± 0.02	2.0
27	5.6 ± 0.7	10.3 ± 2.7	1.8	4.8 ± 0.5	0.9
29	2.9 ± 0.04	3.9 ± 0.4	1.3	3.5 ± 0.6	1.2
30	2.1 ± 0.09	5.8 ± 1.1	2.8	3.2 ± 1.2	1.5
31	0.3 ± 0.16	0.3 ± 0.1	1.0	0.4 ± 0.01	1.4

CsA, cyclosporine A; HCV, hepatitis C virus; WT, wild type.
CsA and its analogue alisporivir were used as references.

Representative inhibitory curves are shown for compound **31** in Supplementary Fig. 8. The EC₅₀s of CsA and compound **31**, the most potent inhibitor, were in the same range (0.3 ± 0.1 μM versus 0.4 ± 0.3 μM, respectively) and ~40-fold higher than the EC₅₀ of the CsA derivative alisporivir (0.01 ± 0.0007 μM; Table 2). The compounds were not cytotoxic at their effective concentrations.

The antiviral activities of compounds **26**, **27**, **29** and **30** were also assessed against HIV-IIIb replication in MT4 cells. All tested compounds inhibited HIV replication better than CsA, with EC₅₀s ranging from 3.6 to 15 μM. The compounds were not cytotoxic at their effective concentrations (Table 2).

Finally, the antiviral activities of compounds **26**, **27**, **29**, **30**, **31**, **32** and **33** were assessed against human coronavirus 229E (HCoV-229E) in MRC-5 cells. The seven tested compounds inhibited HCoV-229E replication with EC₅₀s ranging from 7.2 to 71.5 μM, without associated cytotoxicity (Table 2).

Effect of NS5A protein substitutions on anti-HCV activity. The D320E and R318H substitutions in domain II of the NS5A protein have been reported to be associated with slightly reduced HCV susceptibility to the antiviral action of CsA and its nonimmunosuppressive derivatives²⁷. The corresponding nucleotide substitutions were introduced in a genotype 1b subgenomic replicon by means of site-directed mutagenesis and the antiviral activity of compounds **27**, **29**, **30** and **31** was measured in the mutated replicons in comparison with a wild-type replicon. The results shown in Table 3 indicate that substitutions D320E and R318H very slightly reduced susceptibility to these compounds

(1.0- to 2.8-fold change in EC₅₀), in the same order as the change in CsA and alisporivir susceptibility they induce.

Lack of calcineurin inhibition properties. In addition to its anti-cyclophilin activity, CsA displays potent immunosuppressive properties through the formation of a stable ternary complex in a 1:1:1 stoichiometry with calcineurin, CypA and CsA, resulting in the inhibition of calcineurin phosphatase activity²⁸. Although the new family of inhibitors is unrelated to CsA, preincubation studies were performed with the binary complex formed of CypA and compound **31**, to determine whether this complex inhibits calcineurin phosphatase activity. As shown in Supplementary Fig. 9, a dose-dependent decrease of calcineurin activity was observed in the presence of increasing concentrations of the CypA–CsA complex, used as a positive control of inhibition. In contrast, no inhibition was observed in the presence of the binary complex of CypA and compound **31**. In addition, CsA potently inhibited interleukin (IL)-2 production in stimulated immortalized T lymphocytes (Jurkat cells) with an EC₅₀ of 0.005 μM, whereas compound **31** had no effect on IL-2 production (EC₅₀ > 20 μM).

***In vitro* metabolism.** Compounds **29** and **30** were assessed for their *in vitro* metabolism before compound **31** was synthesized. The results are summarized in Supplementary Table 2. The measured octanol/water partitioning (LogD) values for compounds **29** and **30** were 2.5 and 2.6, respectively. Both compounds were very soluble at pH 7.4 and at pH 1.0. They were not degraded after incubation in PBS for 24 h at 37 °C and slightly

degraded after incubation in HCl 0.1 N at pH 1.0 for 24 h at 37 °C (98% of compound **29** and 92% of compound **30** remaining at 24 h). Permeability was high for both compounds, whereas the efflux was negligible for compound **30** and low for compound **29** in monolayers of Caco-2 cells, suggesting a high absorption potential for the family.

Binding to human plasma proteins was 85.0 and 85.1% for compounds **29** and **30**, respectively. The high recovery indicated satisfactory plasma stability. Therefore, both compounds were predicted to display low shifts in biological potency in the presence of human plasma compared with cell culture medium. The metabolic stabilities were studied using human hepatic microsomal fractions in the presence of NADPH, to support oxidative metabolism. Compounds **29** and **30** were metabolized in microsomal fractions with *in vitro* half-lives of 21.6 and 35.5 min, respectively, yielding moderate predicted clearances.

Neither compound **29** nor compound **30** was metabolized by CYP1A2 or CYP2B6. Both compounds were metabolized at the highest rate by CYP2C19. Compound **30**, but not compound **29**, was metabolized by CYP3A4. The relative contributions of the individual enzymes to the metabolism of the compounds could not be determined from these experiments, but the data suggested that compounds **29** and **30** were predominantly metabolized by CYP2C19 enzymes.

Neither compound **29** nor compound **30** significantly inhibited CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 or CYP2D6. Both compounds were moderate inhibitors of CYP2C8 and potent inhibitors of CYP3A, suggesting possible drug–drug interactions through the inhibition of CYP3A enzymes.

Discussion

In this study, we used FBDD to create a new family of non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors, unrelated to CsA or SfA, with potent PPIase inhibitory activity and with potent antiviral effectiveness against HCV, HIV and coronaviruses *in vitro*.

FBDD has emerged as an effective approach for drug discovery nearly 20 years ago²⁹. FBDD indeed generated a number of new drug classes, including some that reached the medical market³⁰. FBDD is based on screening of low-molecular-weight molecules with minimal chemical complexity that bind subpockets within a target site. These fragments typically bind with low affinity, in the μM to mM range. They represent suitable starting points for structurally guided ‘hit-to-lead optimization’. The fragment-based approach offers better coverage of the chemical diversity space than high-throughput screening, while offering the advantage of structure-based chemical optimization³¹.

The cyclophilin PPIase catalytic groove is formed by a mixture of hydrophobic, aromatic and polar residues that are highly conserved across different cyclophilins. Notably, the side-chain guanidine group of the essential Arg55 is hydrogen bonded to the prolyl nitrogen of the substrate. It promotes isomerization by weakening the double-bond properties of the peptide bond³². Targeting this residue is thus crucial to achieve potent inhibition of PPIase activity. CsA, its non-immunosuppressive cyclic analogues and SfA are large macrocycle compounds (molecular weight $> 1,000 \text{ g mol}^{-1}$). They bind the cyclophilin catalytic site and potently inhibit PPIase activity³³. However, the shortcomings of these families of compounds in clinical practice emphasize the need for the development of small-molecule cyclophilin inhibitors. As the cyclophilin catalytic site is not a buried pocket, the design of small ligands with a molecular weight $< 500 \text{ g mol}^{-1}$ is nevertheless challenging³³. A deeper pocket, the ‘gatekeeper pocket’, has been identified in close vicinity to the PPIase catalytic site¹⁰. This pocket could contribute to substrate

binding specificity through gatekeeper residues located at its surface that restrict substrate accessibility. Thus, the gatekeeper pocket appears as an interesting target close to the catalytic site, suitable for a fragment-based approach targeting both sites combined with a linking strategy.

The most common approach for chemical optimization is the ‘fragment growing strategy’, which permits a multistep optimization of ligand efficiency and size within the binding site³⁰. Alternatively, the ‘linking strategy’ is constrained by the size of the original fragments and that of the linker, therefore resulting in a rapid buildup of atoms in a single step. Furthermore, conformational strain and flexibility mean that an energy price often needs to be paid to achieve optimal linking of the fragments³⁴. In spite of these challenges, and because we were targeting two different subpockets, we decided to use this approach to link two fragments binding the catalytic and gatekeeper pockets, respectively, to substantially improve the stability and binding affinity of the resulting molecule. By means of structure-based drug design, we selected a linker consisting of a urea moiety that mimicked key interactions of both CsA and SfA with cyclophilins without altering the binding mode of the two fragments alone. Our results thus show that linking fragments that bind adjacent sites is a powerful approach for complex targets when an optimal linker can be found.

Compound **31** displayed potent *in vitro* activity against CypA, CypB and CypD PPIase activities. Unlike CsA, the new family of cyclophilin inhibitors had no effect of calcineurin phosphatase activity, which is responsible for CsA immunosuppressive properties. In addition, early pharmacological studies and *in vitro* cellular toxicity experiments suggest that the compound family is druggable. As the presence of an aniline motif may be associated with toxicity in animal models or man^{25,26}, several rounds of chemical optimization were performed to remove the aniline motif. This led to the generation of compounds **32** and **33** that do not have an aniline motif but retain both anti-PPIase and anti-viral activity. The risk related to the aniline motif must be balanced with the severity of the target disease (cost/benefit ratio) and the required duration of administration. For instance, what would be considered a major safety issue when treating a benign disease requiring long-term administration would be unimportant in case of short-term treatment of a severe, eventually life-threatening acute infection. Thus, lead compounds both with and without the aniline motif will be moved forward throughout preclinical development.

The compounds described here represent the first non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitor family with broad-spectrum antiviral properties described thus far. Based on a previous work from our group³⁵, Chinese authors reported a series of thiourea-based inhibitors targeting both the HIV-1 capsid and human CypA, which inhibited assembly and uncoating of the viral capsid³⁶. However, the low CypA-binding affinity of the compounds strongly contradicted the claimed PPIase inhibitory activity and the reported effect on HIV could be exclusively related to the capsid ligand properties of the compounds in this work.

Another series of small-molecule CypA inhibitors was reported in 2009 as a result of *de novo* drug design³⁷. We synthesized their two ‘best’ compounds and purchased one of them (TMN-355) from Tocris Bioscience, to test their ability to inhibit PPIase activity, and HCV and coronavirus replication *in vitro*. As shown in Supplementary Table 3, none of these compounds exhibited any biological activity in the models. Furthermore, we could not obtain any crystallographic structure of the compounds complexed with cyclophilins. In another article in which a closely related compound was tested against enterovirus 71 (ref. 4), *in vitro* resistance selection experiments identified one amino acid

substitution selected after several passages with increasing concentrations of the compound. The substitution conferred a modest fivefold reduction in EV71 susceptibility, but no resistance to CsA, further challenging the hypothesis of a common mechanism of inhibition for the two molecules. Altogether, these results cast doubt as to the reality of the anti-cyclophilin properties of this class of molecules. Other families of compounds have been reported to inhibit cyclophilin activity *in vitro*, but they need to be externally validated and their potential as broad-spectrum antiviral compounds has not been evaluated^{38–40}. These results emphasize the difficulty of developing efficacious small-molecule cyclophilin inhibitors unrelated to CsA or SfA and underline the originality and importance of our work.

Cyclophilins represent interesting targets for broad-spectrum antiviral drugs. Indeed, several cyclophilins, principally but not only CypA, have been convincingly shown to play a pivotal role in the life cycle of a number of viral families³. Our results showing inhibition of HCV, HIV and HCoV-229E coronavirus by compound **31** and related compounds, together with preliminary data suggesting hepatitis B virus replication inhibition, support the future development of our new family of cyclophilin inhibitors as broad-spectrum antiviral compounds with a high barrier to resistance. The high barrier to resistance, demonstrated with CsA derivatives in HCV infection¹⁶, results of the fact that cyclophilin inhibitors do not directly target a viral function but instead target a host protein involved at a key step of the viral life cycle. Thus, the likelihood to select viruses that are resistant to the action of the drug is low and, if such viruses were selected, they would be unlikely to yield high levels of resistance, as already shown²⁷. This was confirmed here by the demonstration that amino acid substitutions in the HCV NS5A protein known to modestly reduce CsA- and CsA-derived inhibitor susceptibility of HCV also very modestly affected HCV susceptibility to the new compounds.

Other experiments showed that compound **31** inhibits mPTP opening as a result of CypD inhibition (Panel M, Ahmed-Belkacem A, *et al.*, manuscript in preparation). This suggests that the new family of cyclophilin inhibitors also has the potential for medical utility in a number of pathological conditions in which mPTP opening has been shown to be involved, such as protection against cardiac ischaemia-reperfusion injury, protection against hepatic ischaemia-reperfusion injury in the context of liver transplantation or neurocellular protection in the context of Alzheimer's disease.

In conclusion, we used FBDD combined with a linking strategy and structure-based compound optimization, to generate a new family of non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors, unrelated to CsA or SfA, with potent PPIase inhibitory activity, antiviral effectiveness against HCV, HIV and coronaviruses *in vitro*, and druggable properties. This family of compounds has the potential to be useful in the high-barrier-to-resistance treatment of viral infections that use cyclophilins in their life cycle, as well as in various medical applications of CypD/mPTP opening-related cellular protection.

Methods

Expression and purification of CypD K133I. Mutant K133I of human CypD was expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Bacteria were grown in Luria Broth medium at 37 °C up to an optical density (OD) of 0.6 at 600 nm and induced for 2 h with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. Cells were lysed by sonication in buffer A, composed of 50 mM Tris at pH 7.5, 2 mM EDTA and 2 mM β -mercaptoethanol. Then, the cell lysate was clarified by centrifugation at 40,000 g for 30 min and the supernatant was loaded on Q-Sepharose and S-Sepharose columns in series equilibrated with buffer A. The S-Sepharose column was washed with equilibrium buffer and bound proteins were eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl. The combined peak fractions were loaded on an S75 column

equilibrated with 20 mM Tris at pH 7.5, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (DTT). This two-step purification protocol was sufficient to yield a pure protein.

¹⁵N labelling for the NMR experiments was obtained by growing the bacteria in M9 medium with ¹⁵N-labelled ammonium chloride as sole nitrogen source. The labelled CypD was then purified as described above.

Expression and purification of CypA and CypB. CypA and CypB proteins carrying a hexahistidine tag (His-Tag) at their carboxy terminus were expressed in *E. coli* and purified. Briefly, cultures of C41(DE3) cells were grown at 37 °C for 1 h until the culture reached an OD of 0.6 at 600 nm and then induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C (CypA) or overnight at 22 °C (CypB). Cell pellets were resuspended in a lysis buffer 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300 mM NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mg ml⁻¹ lysozyme, 0.1 U μ l⁻¹ desoxyribonuclease and complete protease inhibitor tablets (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana). The sonicated cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 45 min at 4 °C, chromatographed on a Ni-NTA column and washed with a buffer containing 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, 7 mM β -mercaptoethanol and 10% glycerol. The bound protein was eluted in 1 ml fractions with a buffer composed of 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 7 mM β -mercaptoethanol and 10% glycerol, monitored by the Bradford colorimetric assay. The purity of each cyclophilin was determined by Coomassie-stained SDS-PAGE analysis. Fractions enriched in cyclophilin (> 95% purity) were pooled and dialysed against a buffer containing 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 10% glycerol.

PPIase enzyme assay. Cyclophilin PPIase activity was measured at 20 °C by using the standard chymotrypsin-coupled assay. The assay buffer (25 mM Hepes and 100 mM NaCl pH 7.8) and the cyclophilin (1,900 nM stock solution) were pre-cooled to 4 °C. Then, 5 μ l of 50 mg ml⁻¹ chymotrypsin in 1 mM HCl was added. The reaction was initiated by adding 20 μ l of 3.2 mM peptide substrate (Suc-Ala-Ala-Cis-Pro-Phe-pNA) in LiCl/TFE solution with rapid inversion. After a delay from the onset of mixing, the absorbance of p-nitroaniline was followed at 390 nm until the reaction was complete (1 min). The final concentration of LiCl in the assay was 20 mM and TFE was present at a concentration of 4% (v/v). Absorbance readings were collected every 1 s by a spectrophotometer. For inhibition assessment, 5 μ l of the tested compound in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cyclophilin solution in the assay buffer. CsA was used as a positive control in all measurements. The percentage inhibition of cyclophilin PPIase activity was calculated from the slopes and the values obtained represent the mean $\pm$ s.d. of at least two independent measurements.

Fragment library design and docking. Fragments purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri), Maybridge (Tintagel, UK) and Chembridge (San Diego, California) were filtered applying a one-dimensional filter (molecular weight < 300 g mol⁻¹) based on the 'rule of three'⁴¹. This virtual library was docked using programme interface LEA3D based on docking programme FlexX^{42,43}. The X-ray coordinates of CypD (PDB-ID 2BIT) were used to dock the fragments. The site for docking was defined to cover the entire active site including the catalytic site and the gatekeeper pocket. No water molecule was included in the binding site. After docking, the top 10% poses of the docking were manually inspected.

Compound synthesis. Chemical reagents were obtained from Aldrich Chemical (Saint Louis, Missouri), Acros Organics, abcr GmBh (Karlsruhe, Germany), ACB Blocks (Toronto, Canada) and Chembridge, and were used without further purification. Compound synthesis is described in the Supplementary Methods and their associated comments.

NMR experiments. NMR samples used for screening contained 100 μ M ¹⁵N-labelled protein, in a buffer consisting of 50 mM KH₂PO₄ at pH 7.3. ¹⁵N-HSQC experiments were recorded at 298 K in the presence of 5% D₂O on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. Typical acquisition time was 75 min per experiment. Mixtures of ten fragments (cocktails) at an individual concentration of 10 mM were screened. For cocktails soluble in water no DMSO-*d*₆ was used, whereas 20% DMSO-*d*₆ was used to solubilize cocktails insoluble in water. The attribution of the ¹⁵N-HSQC spectrum for CypD K133I deposited in the Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB entry 7310) was used to re-attribute the ¹⁵N-HSQC spectrum of the protein in the presence of 20% DMSO-*d*₆. Fragment binding was detected by comparing the ¹⁵N-HSQC spectra in the presence and in the absence of the fragment mixtures. As the fragment cocktails caused significant perturbations in the ¹⁵N-HSQC spectrum for some residues of the active site, one ¹⁵N-HSQC spectrum of ¹⁵N-CypD K133I was recorded in the presence of each individual fragment. All NMR data were processed using Bruker software XwinNMR Version 3.0, and the analyses and comparisons were made with in-house software Cindy for fragment screening.

NMR experiments with compounds **22** and **27** were recorded at 25 °C on an Inova Agilent 600 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance ^1H , ^{13}C and ^{15}N probe. ^1H - ^{15}N -HSQC spectra were recorded with 50 μM protein, 200 μM compound **27** and 500 μM compound **22**. Resonance assignment on ligand binding was checked using three-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy- ^{15}N -HSQC spectra with 150 ms mixing time.

^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **22** and **25–31** are shown in Supplementary Figs 10–25.

Crystallization and structure determination of ligand-CypD. Crystals of apo CypD K133I suitable for ligand soaking were obtained by a procedure described by Schlatter *et al.*⁴⁴. Briefly, CypD K133I was buffer exchanged into 50 mM KH_2PO_4 at pH 7.3, 100 mM NaCl, 1 mM DTT and 2 mM EDTA, and concentrated to 30 mg ml⁻¹. Apo CypD K133I crystals were grown using the hanging drop vapour diffusion method at 20 °C. Drops were formed by mixing 1 μl of protein with an equal volume of mother liquor containing 25–30% (w/v) PEG 4000 and equilibrated over 500 μl of the same solution. Crystals formed in about one night. The X-ray screening process requires a large amount of reproducible crystals available for soaking. Thus, the crystallization procedure was optimized with the seeding method using the ‘Seed Bead’ protocol (Hampton Research, Aliso Viejo, California).

For fragment soaking, saturated solutions of immersion oil of 1.250 centistokes (Sigma-Aldrich) or 0.1 M DMSO stock solutions were made. Crystals were added to the saturated immersion oil for 10 min to 1 day or 0.1 μl DMSO stock solution was added to the growing drop for 10 min to 1 h before flash freezing and data collection. Crystals soaked with a DMSO stock solution were cryoprotected for data collection by brief immersion in oil.

X-ray diffraction data were collected in-house with an X-Ray generator (RU-200, Rigaku, Tokyo, Japan) and the Image Plate Detector mar300 (MarResearch, Norderstedt, Germany) or at the European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, France, on beamlines BM30, ID14-1, ID14-2, ID14-3, ID14-4 and ID29. Data were integrated and processed using MOSFLM and SCALA of the CCP4 suite. The crystals belong to the space group $P4_12_12$ ($a = b = 57 \text{ \AA}$ and $c = 87 \text{ \AA}$) with one monomer in the asymmetric unit. The structures were solved by molecular replacement using PDB entry 2BIT as the search model. Bound ligands were manually identified and fitted into $F_o - F_c$ electron density using Coot. The structures were refined by rounds of rebuilding in Coot and refinement using Refmac of the CCP4 suite. Data collection and refinement statistics for crystal structures are presented in Supplementary Tables 4 to 11.

Crystallization and structure determination of ligand-CypA. Crystals of apo CypA suitable for ligand soaking were obtained by means of hanging drop vapour diffusion by mixing 1 μl of CypA 20 mg ml⁻¹ in 50 mM Tris pH 7.8, 100 mM NaCl and 1 μl of Hepes 100 mM pH 7.5, 20% PEG 10k (w/v), 5% ethanol at 20 °C, equilibrated over 500 μl of the same solution. Crystals formed in about one night. A 0.1 μl DMSO stock solution of compound **22** was added to the growing drop for 10 min before flash freezing and data collection. X-ray diffraction data were collected in-house with the X-Ray generator RU-200 and the Image Plate Detector mar300. Data were integrated and processed using MOSFLM and SCALA of the CCP4 suite. The crystals belong to the space group $P2_12_12$ ($a = 40.7 \text{ \AA}$, $b = 52.3 \text{ \AA}$ and $c = 86.9 \text{ \AA}$) with one monomer in the asymmetric unit. The structures were solved by molecular replacement using PDB entry 1CWA as the search model. Bound ligand was manually identified and fitted into $F_o - F_c$ electron density using Coot. The structures were refined by rounds of rebuilding in Coot and refinement using Refmac of the CCP4 suite. Data collection and refinement statistics for crystal structure are presented in Supplementary Table 8.

Isothermal titration calorimetry. The proteins were dialysed against buffer A containing 10 mM Hepes pH 7.4 and 150 mM NaCl. Twenty to 50 μM of protein was loaded into the MicroCal VP-ITC (Malvern, Orsay, France) isothermal titration calorimeter cell (~2 ml, cell volume ~1.4 ml). The titration syringe (250 μl volume) was filled with 1 mM ligand solution in buffer A. Titrations were carried out using 40 injections of 4 μl each, injected at 5 min intervals. Stirring speed was 400 r.p.m. Titrations were carried out at a constant temperature of 25 °C. Data were fit to a single site binding model using Origin 5.0 software.

Assessment of anti-HCV activity. An HCV genotype 1b bicistronic replicon was transfected in Huh7 cells⁴⁵ grown in DMEM medium Glutamax II (Invitrogen, Carlsbad, California) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 IU ml⁻¹ penicillin, 100 μg ml⁻¹ streptomycin, 0.1 μg ml⁻¹ fungizone and 600 μg ml⁻¹ geneticin (G418). HCV replicon-harboring cells were seeded at a low density of 5,000 cells per well in 96-well plates. The cells were treated with increasing concentrations of the tested compounds in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 1% DMSO without G418 and cultured for 3 days. Total RNA was extracted using the RNeasy 96 kit (Qiagen, Hilden, Germany). HCV RNA levels were measured by means of a quantitative real-time PCR assay using the Taqman technology with HCV-specific primers (sense 5'-CGCCCAAACCAAGATACG A-3' and antisense 5'-AGATAGTACACCCCTTTTGCCAGATG-3') and probe (5'-6-FAM-CAATGTGTCTAGTCGCG-TAMRA-3') on an ABI 7003 device

(Applied Biosystems, Foster City, California). HCV RNA levels were measured by means of a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware). The results were normalized to the *GAPDH* gene. Each data point represents the average of at least three replicates in cell culture. HCV RNA level reductions after treatment were assessed by comparing the level of HCV RNA in compound-treated cells with that of control cells treated with 1% DMSO.

Assessment of anti-HIV activity. Compounds diluted in DMSO (0.4 μl) was added to 40 μl of cell growth medium (RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine and 1% Hepes) in each well of 384-well assay plates (10 concentrations) in quadruplicate. One-millilitre aliquots of 2×10^6 MT-4 cells were pre-infected for 1 and 3 h, respectively, at 37 °C with 25 μl of either cell growth medium or a fresh 1:250 dilution of an HIV-IIIB concentrated ABI stock (0.004 multiplicity of infection). Infected and uninfected cells were diluted in cell growth medium and 35 μl of a suspension of 2,000 cells was added to each well of the assay plates, respectively. The assay plates were then incubated in a 37 °C incubator. After 5 days of incubation, 25 μl of twofold concentrated CellTiter-Glo Reagent (Promega Biosciences, Madison, Wisconsin) was added to each well of the assay plates. Cell lysis was carried out by incubating at room temperature for 2–3 min and then chemiluminescence was read using an Envision multimode plate reader (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts). Data were converted into percentages of the untreated control and non-linear regression was performed to calculate EC_{50} values. For compound cytotoxicity assessment, the protocol was identical except that uninfected cells were used.

Assessment of anti-human coronavirus 229E activity. MRC-5 cells (RD-Biotech, Besançon, France) were cultured in DMEM containing 10% FCS, 50 U ml⁻¹ penicillin, 50 μg ml⁻¹ streptomycin and 0.1 μg ml⁻¹ amphotericin B (Fungizone, Life Technologies, Carlsbad, California). Twelve hours before infection, MRC-5 cells were seeded at the density of 2×10^4 cells per well in a 96-well plate. Cells were infected with human coronavirus 229E at the multiplicity of infection of 1 in DMEM containing 2% FCS, 50 U ml⁻¹ penicillin, 50 μg ml⁻¹ streptomycin and 0.1 μg ml⁻¹ amphotericin B for 72 h in the presence of increasing concentrations of inhibitors. The viral cytopathic effect was quantified with ‘Cytotox-Glo Cytotoxicity Assay’ (Promega, Madison, Wisconsin). Virus-induced cytotoxicity was calculated as relative light unit signal in infected treated cells minus relative light unit signal in non-infected treated cells.

Calcineurin phosphatase assay. The inhibition of calcineurin phosphatase activity was measured by measuring the dephosphorylation of *p*-nitrophenyl phosphate (R&D Systems, Minneapolis, USA), according to the manufacturer’s instructions. Briefly, Csa or compound **31** were incubated in a 1:1 molar ratio with recombinant CypA at room temperature for 30 min, in the presence of 1.32 nM of calcineurin and 50 nM of calmodulin. After *p*-nitrophenyl phosphate addition, the reaction was run for 35 min at 37 °C. The reaction was terminated by addition of BIOMOL green reagent and OD was measured at 630 nm. The results are the means of three independent experiments performed in duplicate. They are presented as the percentage of calcineurin activity relative to that in the inhibitor-free control.

Inhibition of IL-2 production in Jurkat cells. Jurkat cells (2×10^5 cells per well) were pretreated for 1 h at 37 °C with either compound **31** at concentrations ranging from 0.1 to 20 μM or CsA at concentrations ranging from 0.01 to 2 μM . Duplicate evaluations were included for each test concentration. At the end of the pretreatment period, cells were induced with a mixture of phorbol myristate acetate and ionomycin at 50 ng ml⁻¹ and 1.34 μM , respectively. After a 6 h incubation, sample supernatants were collected for measurement of IL-2 production using a commercial kit (Quantikine ELISA, R&D Systems).

LogD determination. The octanol/water partitioning (LogD) values of compounds were determined from their retention times during reverse-phase HPLC at pH 7.4 with diode array ultraviolet/visible detection. The LogD values were obtained by interpolation within a standard curve (range LogD: 0.3–5.7) generated with seven standards, with LogD values previously determined using the shake-flask method.

Solubility and chemical stability. Kinetic solubility was determined by diluting a DMSO stock of the compound into the test media solutions (PBS pH 7.4 and 0.1 N HCl pH 1.0) to a final concentration of 100 μM with a total DMSO concentration of 1% (v/v) at 37 °C. The solutions were incubated at room temperature with shaking for 24 h and were then centrifuged, and the recovered supernatants assayed by HPLC with diode array ultraviolet/visible detection. Solubility values were calculated by comparing the amount (by chromatographic peak area) of compound detected in the defined test solution with an unextracted standard. Relative chemical stabilities of compounds after 24 h incubation in PBS at 37 °C were also determined. The solubility and chemical stability of a quality-control compound (amprenavir) were determined in parallel.

Caco-2 cell permeability. Permeability and efflux potential were determined using confluent (≥ 21 day) monolayers of Caco-2 cells grown on transwell filters. Compounds were added to donor wells at a target concentration of $10\ \mu\text{M}$ and rates of appearance in receiver wells (containing 1% BSA to maintain sink conditions) were determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Quality controls included transepithelial electrical resistance, lucifer yellow exclusion, low (atenolol) and high (propranolol) permeability controls and the ability to demonstrate polarized efflux of digoxin.

Protein binding. The extent of binding to pooled human plasma and to cell culture medium containing 10% fetal bovine serum was determined by equilibrium dialysis against isotonic phosphate buffer. Equilibrium dialysis was conducted at 37°C with initial concentrations of compounds of $2\ \mu\text{M}$ in the non-buffer matrix. A 3 h dialysis time was used for equilibration. Following dialysis, plasma samples were drained into pre-weighed polypropylene tubes containing buffer and buffer samples were drained into pre-weighed tubes containing blank plasma. Post-dialysis plasma and buffer weights were measured and recorded for concentration and recovery calculations. After precipitation and centrifugation, LC-MS/MS assays were used for the analysis of each of the protein/phosphate buffer-mixed matrices. Relative binding to human plasma and cell culture medium was determined in a similar manner, except that the two matrices were dialysed against each other directly and the compound was spiked into both matrices. After equilibration, the plasma sample was diluted with blank cell culture medium and the cell culture medium diluted with blank plasma.

Stability with hepatic microsomal fractions. The compounds ($3\ \mu\text{M}$) were incubated in duplicate for up to 1 h in the presence of human hepatic microsomal fractions ($0.5\ \text{mg protein ml}^{-1}$ final) at 37°C . The addition of cofactor solution (NADPH generating system) initiated the reaction and aliquots were removed at 0, 5, 15, 30, 45 and 60 min after the start. The concentrations of the compounds in each sample were determined using specific LC-MS/MS assays. The half-life for the disappearance of each was determined by fitting the concentration-time data with a monophasic exponential model. A control compound (verapamil) was run in parallel to test the enzymatic integrity of the microsomal fractions.

Metabolism by recombinant human cytochrome P450. Five micromoles of compound was incubated with individual bacterially expressed recombinant human cytochromes P450 co-expressed with human NADPH cytochrome P450 reductase. The reduction in substrate concentration was monitored over 45 min using specific LC-MS/MS assays and the *in vitro* half-life calculated in the same manner as that described for hepatic microsomal stability. Enzyme-selective positive control substrates were tested in parallel.

Cytochrome P450 enzyme inhibition assays. Up to $25\ \mu\text{M}$ of compounds **29** and **30** was incubated with human hepatic microsomal fractions and NADPH in the presence of individual probe substrates. All assays were designed so that conditions were linear with respect to time and protein concentration. Substrates were present at concentrations equal to or lower than their respective K_m values. Enzyme selective products were determined by fluorometry (ethoxymresorufin *O*-deethylase) or by specific LC-MS/MS assays. Relative enzyme activities were determined by comparison with those assayed with DMSO vehicle instead of inhibitor. IC_{50} values were calculated by nonlinear curve fitting using a sigmoidal model. Positive control inhibitors for each enzyme were tested in parallel.

Data availability. Data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files and from the corresponding authors upon reasonable request. PDB: the complex structures for compounds **5**, **6**, **9**, **11** to **24**, **26** to **29** with CypD K133I mutant enzyme are deposited under accession codes 3RCI, 3R59, 3RCF, 3RCG, 3R4G, 3R54, 3RD9, 3R49, 3R56, 3RCL, 3RDB, 3RCK, 3RDA, 3R57, 3RDC, 4J58, 4J5E, 4J5D, 4J5B, 4J59 and 4J5C, respectively. The complex structure for compound **22** with CypA is deposited under accession code 3RDD. Stereo views of cocrystal structures of the compounds with cyclophilin D are available at https://figshare.com/articles/Stereo_views_of_cocrystal_structures_of_cyclophilin_inhibitors_with_cyclophilin_D/3490493.

References

- De Clercq, E. Antivirals: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 727–744 (2013).
- Zhu, J. D., Meng, W., Wang, X. J. & Wang, H. C. Broad-spectrum antiviral agents. *Front. Microbiol.* **6**, 517 (2015).
- Hopkins, S. & Gallay, P. A. The role of immunophilins in viral infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 2103–2110 (2014).
- Qing, J. *et al.* Cyclophilin A associates with enterovirus-71 virus capsid and plays an essential role in viral infection as an uncoating regulator. *PLoS Pathog.* **10**, e1004422 (2014).
- Nigro, P., Pompilio, G. & Capogrossi, M. C. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* **4**, e888 (2013).
- Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658–662 (2005).
- Elrod, J. W. & Molkenin, J. D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ. J.* **77**, 1111–1122 (2013).
- Javadov, S. & Kuznetsov, A. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin D. *Front. Physiol.* **4**, 76 (2013).
- Rasola, A. & Bernardi, P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**, 222–233 (2011).
- Davis, T. L. *et al.* Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol.* **8**, e1000439 (2010).
- Wang, P. & Heitman, J. The cyclophilins. *Genome Biol.* **6**, 226 (2005).
- Carbajo-Lozoya, J. *et al.* Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including alisporivir. *Virus Res.* **184**, 44–53 (2014).
- Madan, V., Paul, D., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology* **146**, 1361–1372 (2014).
- Pfefferle, S. *et al.* The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* **7**, e1002331 (2011).
- Flisiak, R. *et al.* The cyclophilin inhibitor Debio-025 combined with PEG-IFN α -2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology* **49**, 1460–1468 (2009).
- Pawlotsky, J. M. *et al.* Alisporivir plus ribavirin, interferon-free or in combination with peg-interferon, for HCV genotype 2 or 3 infection. *Hepatology* **62**, 1013–1023 (2015).
- Akool, S. *et al.* Molecular mechanisms of TGF β receptor-triggered signaling cascades rapidly induced by the calcineurin inhibitors cyclosporin A and FK506. *J. Immunol.* **181**, 2831–2845 (2008).
- Esser-Nobis, K. *et al.* The cyclophilin-inhibitor alisporivir stimulates antigen presentation thereby promoting antigen-specific CD8-T-cell activation. *J. Hepatol.* **64**, 1305–1314 (2016).
- Matsuda, S. *et al.* Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.* **1**, 428–434 (2000).
- Morjani, H. & Madoulet, C. Immunosuppressors as multidrug resistance reversal agents. *Methods Mol. Biol.* **596**, 433–446 (2010).
- Bing, P., Maode, L., Li, F. & Sheng, H. Comparison of expression of TGF- β 1, its receptors TGF- β 1R-I and TGF- β 1R-II in rat kidneys during chronic nephropathy induced by cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc.* **38**, 2180–2182 (2006).
- Chi, J. *et al.* Cyclosporin A induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through calcium-sensing receptor-mediated activation of the ERK MAPK and p38 MAPK pathways. *Mol. Cell Biochem.* **367**, 227–236 (2012).
- Erlanson, D. A. Introduction to fragment-based drug discovery. *Top. Curr. Chem.* **317**, 1–32 (2012).
- Hajduk, P. J. & Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 211–219 (2007).
- Wolkenstein, P. *et al.* A slow acetylator genotype is a risk factor for sulphonamide-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Pharmacogenetics* **5**, 255–258 (1995).
- Woosley, R. L. *et al.* Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. *N. Engl. J. Med.* **298**, 1157–1159 (1978).
- Coelmont, L. *et al.* Debio-025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 967–976 (2009).
- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E. & Burakoff, S. J. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK-506 and cyclosporin A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 3686–3690 (1992).
- Murray, C. W. & Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* **1**, 187–192 (2009).
- Baker, M. Fragment-based lead discovery grows up. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 5–7 (2013).
- Eitner, K. & Koch, U. From fragment screening to potent binders: strategies for fragment-to-lead evolution. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 956–961 (2009).
- Howard, B. R., Vajdos, F. F., Li, S., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 475–481 (2003).
- Sweeney, Z. K., Fu, J. & Wiedmann, B. From chemical tools to clinical medicines: nonimmunosuppressive cyclophilin inhibitors derived from the cyclosporin and sanglifehrin scaffolds. *J. Med. Chem.* **57**, 7145–7159 (2014).
- Chung, S., Parker, J. B., Bianchet, M., Amzel, L. M. & Stivers, J. T. Impact of linker strain and flexibility in the design of a fragment-based inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 407–413 (2009).

35. Guichou, J. F. *et al.* Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of novel inhibitors of human cyclophilin. *J. Med. Chem.* **49**, 900–910 (2006).
36. Li, J. *et al.* Discovery of dual inhibitors targeting both HIV-1 capsid and human cyclophilin A to inhibit the assembly and uncoating of the viral capsid. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3177–3188 (2009).
37. Ni, S. *et al.* Discovering potent small molecule inhibitors of cyclophilin A using *de novo* drug design approach. *J. Med. Chem.* **52**, 5295–5298 (2009).
38. Daum, S. *et al.* Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry* **48**, 6268–6277 (2009).
39. Dunsmore, C. J. *et al.* Design and synthesis of conformationally constrained cyclophilin inhibitors showing a cyclosporin-A phenotype in *C. elegans*. *Chembiochem* **12**, 802–810 (2011).
40. Yang, S. *et al.* Structure-based discovery of novel cyclophilin A inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infections. *J. Med. Chem.* **58**, 9546–9561 (2015).
41. Jhoti, H., Williams, G., Rees, D. C. & Murray, C. W. The ‘rule of three’ for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 644–645 (2013).
42. Douguet, D., Munier-Lehmann, H., Labesse, G. & Pochet, S. LEA3D: a computer-aided ligand design for structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **48**, 2457–2468 (2005).
43. Kramer, B., Rarey, M. & Lengauer, T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins* **37**, 228–241 (1999).
44. Schlatter, D. *et al.* Crystal engineering yields crystals of cyclophilin D diffracting to 1.7 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 513–519 (2005).
45. Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* **75**, 4614–4624 (2001).

Acknowledgements

This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01, the Fonds Européen de Développement Économique et

Régional (FEDER) Number 48748, the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Author contributions

A.A.-B., L.C., J.-M.P. and J.-F.G. designed the study and the experiments, analysed and discussed the results, and wrote the article. N.A., Q.N., M.G., Y.B., R.B., O.C., D.D., W.B. and I.K. performed the experiments and analyses and approved the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: Inserm Transfert is the owner of patent EP 09306294.1 covering the family of cyclophilin inhibitors described, for which A.A.-B., L.C., J.-M.P. and J.-F.G. are inventors. All other authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Ahmed-Belkacem, A. *et al.* Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat. Commun.* 7:12777 doi: 10.1038/ncomms12777 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

B. Caractérisation de l'activité anti-VHC du composé 31 et évaluation de son potentiel antiviral à large spectre chez les virus de la famille *Flaviviridae*

Nous avons mené une étude de l'effet des CypI sur l'infection par le HCV. En effet, dans le contexte clinique du début de la thèse, les CypI apparaissaient comme une voie crédible dans la lutte contre l'infection par le HCV, du fait des inconvénients connus des CypI en développement clinique à l'époque.

Différents modèles *in vitro* d'infection et de réplication du HCV ont été implémentés et développés au laboratoire. Le C31 possédait une activité inhibitrice de l'ordre du micromolaire sur l'infection et la réplication du HCV de génotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 4a et 5a, ce qui en fait un inhibiteur pan-génotypique du HCV à l'instar de la CsA et de l'ALV.

Le mode d'action antivirale du C31 a été caractérisé. Par modélisation computationnelle, nous avons montré que les sites de fixation du C31 et de la CsA dans le site actif de la CypA se chevauchaient partiellement, bien que ces deux molécules possèdent des structures et des modes de fixation différents. Ce résultat trouvait écho dans les expériences de FRET qui ont montré que le C31 déplaçait la CsA du site actif de la CypA de manière dose-dépendante avec un K_d de 0,105 μ M. Par ailleurs, nous avons calculé les IC_{50} de 6 de nos composés sur l'activité PPIase de la CypA et leurs EC_{50} respectives sur la réplication du HCV. Ces deux activités étaient corrélées avec un coefficient de Pearson $R = 0,96$ et un $p < 0.0001$. Ces données indiquaient que le C31 inhibe la réplication du HCV de manière PPIase-dépendante.

Par la suite, nous avons confirmé l'interaction entre la CypA et la protéine NS5A du HCV, déjà rapportée. Le C31 rompait de manière dose-dépendante cette interaction. Ce mécanisme est, selon toute vraisemblance, responsable de son activité anti-HCV. De manière intéressante, le C31 rompait aussi efficacement l'interaction entre la CypA et NS5A-D320E, c'est-à-dire une protéine NS5A portant une substitution amino-acidique associée à une modeste perte de sensibilité du virus à l'inhibiteur.

Nous avons aussi montré une action au moins additive du C31 avec l'inhibiteur du domaine I de NS5A ledipasvir (LDV), démontrant le potentiel combinatoire des SMCypI avec les nouveaux DAA. De la même manière, les virus résistants au LDV, porteurs des substitutions NS5A-L31V/Y93H, se sont montrés sensibles à l'action du C31.

La suite de ce travail a consisté en une étude approfondie de la résistance potentielle du HCV au C31. Des cellules stabilisées contenant un réplicon sous-génomique du HCV ont été cultivées en présence de concentrations progressives de C31 sous pression de sélection. Cent jours ont été nécessaires pour l'obtention de clones cellulaires résistants, ce qui indique une barrière génétique à l'apparition de la résistance élevée, comme c'est le cas pour la CsA et ses analogues non-immunosuppresseurs. La région codant la protéine virale NS5A des clones résistants a été séquencée et 8 substitutions ont été identifiées, dont 5 dans la région codant le domaine II de la protéine. Toutes ces mutations ont été réintroduites dans un réplicon sous-génomique sauvage afin d'étudier leurs rôles respectifs dans le développement de la résistance au C31. Seules les mutations D320E et Y321H, précédemment décrites pour conférer la résistance à la CsA et ses dérivés non-immunosuppresseurs, étaient associées à de faibles niveaux de résistance au C31 (entre 2 et 5 fois d'augmentation de l' EC_{50}) dans nos conditions expérimentales.

Enfin, nous avons confirmé le potentiel antiviral à large spectre du C31 sur la réplication de virus appartenant à la même famille que le HCV, la famille des *Flaviviridae*. Dans nos modèles expérimentaux, le C31 bloquait la réplication du WNV sans qu'une EC_{50} puisse être calculée, et inhibait de manière dose-dépendante la réplication du virus zika. Le C31 bloquait également l'infection par des souches cliniques des virus YFV et DENV.

L'ensemble de ces résultats a montré que le C31 est doté d'un mécanisme d'action anti-HCV semblable à celui de la CsA et de l'ALV, et valide de fait les SMCypI comme un outil de choix dans la compréhension des mécanismes par lesquels les Cyps interviennent dans le cycle de vie d'un virus donné.

TITLE PAGE

Title

Characterization of the anti-*Flaviviridae* activity of new non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with broad-spectrum antiviral potency

Authors

Quentin Nevers,^{a*} Isaac Ruiz,^{a,b*} Nazim Ahnou,^{a,c} Flora Donati,^{a,c} Rozenn Brillet,^a Laurent Softic,^a Maxime Chazal,^d Nolwenn Jouvenet,^d Slim Fourati,^{a,c} Camille Baudesson,^a Patrice Bruscella,^a Muriel Gelin,^e Jean-François Guichou,^{e,f} Jean-Michel Pawlotsky^{a,c#} and Abdelhakim Ahmed-Belkacem^{a#}

Affiliation

^aInstitut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), INSERM U955 Team 18 “Pathophysiology and Therapy of Chronic Viral Hepatitis and Related Cancers”, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France; ^bDepartment of Hepatology, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Université Paris-Est, Créteil, France; ^cNational Reference Center for Viral Hepatitis B, C and D, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France; ^dInstitut Pasteur, Paris, France; ^eCentre de Biochimie Structurale (CBS), INSERM, CNRS, Université de Montpellier, France; ^fINSERM 13 U1054, Centre de Biochimie Structurale, Université de Montpellier, Montpellier, France.

*Q.N. and I.R. contributed equally to this work; AA.B. and JM.P. contributed equally to this work[#]

Keywords

Cyclophilin inhibitors, small-molecule, hepatitis C virus, *Flaviviridae*, resistance, broad-spectrum antiviral activity

Address for correspondence

Abdelhakim Ahmed-Belkacem, hakim.ahmed-belkacem@inserm.fr.

Present address

Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.

Authors email addresses

Quentin Nevers (quentin.nevers@inserm.fr), Isaac Ruiz (isaac.ruiz@inserm.fr), Nazim Ahnou (nazim.ahnou@inserm.fr), Flora Donati (flora.donati@aphp.fr), Rozenn Brillet (rozenn.brillet@inserm.fr), Laurent Softic (laurent.softic@inserm.fr), Maxime Chazal (maxime.chazal@pasteur.fr), Nolwenn Jouvenet (nolwenn.jouvenet@pasteur.fr), Slim Fourati (slim.fourati@aphp.fr), Muriel Gelin (gelin@cbs.cnrs.fr), Camille Baudesson camille-f.baudesson@inserm.fr), Patrice Bruscella (Patrice.bruscella@inserm.fr), Jean-François Guichou (guichou@cbs.cnrs.fr), Jean-Michel Pawlotsky (jean-michel.pawlotsky@aphp.fr), Abdelhakim Ahmed-Belkacem (hakim.ahmed-belkacem@inserm.fr).

Financial Support

National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS); Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT); National Agency for Research (ANR).

Prior Presentation

Oral communication: Nevers Q, Ruiz I, Ahnou N, Brillet R, Guichou JF, Ahmed-Belkacem A, Pawlotsky JM. Characterization of anti-HCV activities of a new family of small molecule cyclophilin inhibitors with a high barrier of resistance. HCV2016 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 11-15, 2016. Kyoto, Japan.

Author contributions

Q.N., I.R.: participated in the design of the study, performed part of the experiments, wrote the article; N.A., F.D., R.B., L.S., M.C., N.J., M.G., C.B., P.B., J.-F.G., S.F.: performed part of the experiments; A.A.-B., J.-M.P.: designed the study, wrote the article, led the project. All authors approved the manuscript.

Competing financial interest statements

INSERM Transfert is the owner of patent EP 09306294.1 covering the family of cyclophilin inhibitors described, for which J.-F.G., A.A.-B., and J.-M.P. are inventors. All other authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

Q.N. received a pre-doctoral fellowship grant from the French Ministry for Research. I.R. received pre-doctoral fellowship grants from the National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) and the Mexican National Council on Science and Technology (CONACYT). The authors are grateful to Nathalie Pardigon (Institut Pasteur, France), Cécile Khou (Institut Pasteur, France) and Justine Basset (Institut Pasteur, France) for their help

with WNV and JEV experiments. The authors are grateful to Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, New York, USA), Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany), Jens Bukh (University of Copenhagen, Denmark) and Takaji Wakita (National Institute for Infectious Diseases, Tokyo, Japan) for kindly providing the plasmids used for the constructs.

Abbreviations

HCV: hepatitis C virus

SGR: subgenomic replicon

GT: genotype

EC₅₀: effective concentration 50%

C31: compound 31

ALV: alisporivir

CsA: cyclosporine A

CypA: cyclophilin A

DAA: direct-acting antiviral

RAS: resistance-associated substitution

SMCypI: small-molecule cyclophilin inhibitor

NS5A: nonstructural 5A

TR-FRET: time-resolved fluorescence resonance energy transfer

PPIase: peptidyl prolyl cis-trans isomerase

SUMMARY

Despite *Flaviviridae* viruses display high incidence, morbidity and mortality rates, the development of specific antiviral drugs for each virus is unlikely. Cyclophilins, a family of host peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase), play a pivotal role in the lifecycle of many viruses and therefore represent an attractive target for broad-spectrum antiviral development. We report here the broad-spectrum anti-*Flaviviridae* properties of a new family of small-molecule cyclophilin inhibitors (SMCyPI). Their mechanism of antiviral action against HCV, is related to Cyp binding, inhibition of the PPIase catalytic activity and disruption of the CypA/NS5A interaction. They also bear pan-genotypic anti-HCV activity, additive effect with Direct Antiviral Agent and a high barrier of resistance. Thus, because of its chemical plasticity and simplicity of synthesis, our new family of SMCyPIs represents a promising new class of drugs with broad-spectrum anti-*Flaviviridae* properties, as well as an invaluable tool to explore the role of cyclophilins in viral lifecycles.

INTRODUCTION

Urbanization, human migrations and climate changes facilitate emergence or re-emergence of a large number of viruses causing unexpected illnesses and epidemics, while the capacity to identify and control emerging diseases is limited in poorer regions where many of them have their origin (De Clercq and Li 2016). Among emerging and re-emerging viruses, members of the Flaviviridae family represent a global public health issue. The Flaviviridae family consists of four genera (Flavivirus, Hepacivirus, Pegivirus and Pestivirus) which include viruses responsible for important animal and human diseases, such as yellow fever virus (YFV), zika virus (ZIKV), Japanese encephalitis virus (JEV), West-Nile virus (WNV), hepatitis C virus (HCV) or dengue virus (DENV). YFV, ZIKV, JEV, WNV and DENV are leading causes of arthropod-borne human diseases worldwide. According to the World Health Organization (WHO), they globally infect 400 million individuals each year, causing approximately 80,000 deaths each year. HCV is a blood-borne Hepacivirus responsible for chronic liver diseases causing approximately 700,000 deaths annually (Stanaway, Flaxman et al. 2016). Approximately 71 million individuals are infected worldwide, representing 1% of the global population (Global Hepatitis Report from WHO, 2017). The recent approval of a large number of direct-acting antiviral agents (DAAs) active against HCV, including generic compounds, has revolutionized the treatment of this infection with more than 95% rates of infection cure (Pawlotsky 2016). In contrast, no antiviral drugs are available so far to cure infections caused by arthropod-borne members of the Flaviviridae family, despite their global public health importance.

During the past 10 years, two different types of antiviral agents, including DAAs and host-targeting antiviral (HTA) agents, have been developed for the treatment of HCV infection. Among the HTAs, non-immunosuppressive derivatives of cyclosporin A (CsA) that target host cyclophilins yielded the most promising results. Alisporivir (ALV) was the first HTA to enter HCV clinical development and reach Phase III clinical trials (Flisiak, Horban et al. 2008; Pawlotsky 2015). Its development was halted after seven cases of acute pancreatitis were reported, including one lethal one (Zeuzem, Flisiak et al. 2015). These events were independent from cyclophilin inhibition, most likely due to ALV-induced hypertriglyceridemia that potentiated the pancreatic toxicity of interferon alpha that was part of the combination regimens. Although cyclophilin inhibitor (CypI) failed to reach the market in the indication of hepatitis C treatment, they remain attractive to combat other viral infections (de Wilde, Li et al. 2013; Chiramel, Banadyga et al. 2016; Burse, Shi et al. 2017; de Wilde, Falzarano et al. 2017). Indeed, CypIs have been reported to be involved in the lifecycle of other viruses than HCV, while having a high barrier to resistance, broad antiviral activity and possibly additive or synergistic effects with other antiviral compounds in various models.

Cyps are peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases) that catalyze the interconversion of the two energetically preferred conformers (*cis* and *trans*) of the planar peptide bond preceding an internal proline residue. Seventeen human Cyps have been identified but more may exist. Cyps have been convincingly shown to play a pivotal role in the lifecycle of a large number of viruses from different families (Hopkins and Gallay 2015). However, there are few data available regarding the anti-*Flaviviridae* activity of CypIs, all of which were obtained with CsA and ALV (Qing, Yang et al. 2009; Kambara, Tani et al. 2011;

Chiramel, Banadyga et al. 2016; Vidotto, Morais et al. 2017). The molecular mechanisms of CypI anti-HCV activity are not yet fully understood. It is believed that they exert their antiviral effect by disrupting the CypA-NS5A interaction that regulates multiple phases of HCV replication (Lin and Gallay 2013) (Chatterji, Bobardt et al. 2015).

We previously reported our rational design of a new family of potent small-molecule, non-peptidic CypI (SMCypI) unrelated to CsA by means of a complex fragment-based drug discovery approach (Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016). Our SMCypIs displayed antiviral effectiveness against not only HCV, but also HIV and coronaviruses, suggesting, together with data reported in the literature, that they could act as broad-spectrum antiviral agents, effective against a number of different viruses from different viral families. The present study aims at characterizing the anti-HCV activity of the new family of SMCypIs, unraveling their molecular antiviral mechanism and evaluating their spectrum of anti-Flaviviridae activity.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

Alisporivir (ALV) and ledipasvir (LDV) were purchased from AGV Discovery (Clapiers, France), while cyclosporine A (CsA) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA).

Compound synthesis

SMCypI compound synthesis is described in the Supplementary Materials and Methods. Chemical reagents were obtained from Aldrich Chemical (Saint-Louis, Missouri, USA), Acros Organics (Geel, Belgium), abcr GmbH (Karlsruhe, Germany), acbblocks (Toronto, Canada) and Chembridge (San Diego, California) and used without further purification.

HCV-SGR plasmids

Plasmids *H77/SG-Feo*, *S52/SG-Feo* and *SA1/SG-Feo*, that contain a Firefly luciferase reporter gene and a genotype 1a, 3a or 5a HCV subgenome, respectively, were kindly

provided by Dr Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, New York) (Saeed, Scheel et al. 2012; Wose Kinge, Espiritu et al. 2014). Plasmid *p1071-NS5A(Ni)-S2204I* contains a Firefly luciferase reporter gene and a genotype 1b HCV subgenome (Con1 strain) with an NS5A cassette from the genotype 1b HCV-N strain (Maqbool, Imache et al. 2013). Plasmids *APP76-Con1-SG-Neo-(I)-hRluc2aUb* and *APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo* that contain a Renilla luciferase reporter gene and genotype 1b and 2a HCV subgenomes, respectively, were purchased from Apath LLC (New York, New York, USA) (http://www.apath.com/Hepatitis_C_Virus_Technology.htm#3). Plasmid *I389-Neo/NS3-3'/5.1* that contains the Neomycin resistance gene and an HCV genotype 1b subgenome was used for resistance selection experiments and was kindly provided by Dr Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) (Lohmann, Korner et al. 1999). Plasmid *DBN3acc* that contains a full-length HCV genotype 3a genome was kindly provided by Dr Jens Bukh (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark) (Ramirez, Mikkelsen et al. 2016). Finally, chimeric plasmid *fdRocco-chimeric2a/4aNS5A* consisting of a genotype 4a NS5A sequence inserted into a genotype 2a HCV subgenome from *APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo* has been developed in our laboratory.

Cell cultures

Human hepatoma Huh7 cells (kindly provided by Dr Eliane Meurs) and Huh7.5 cells (Apath LLC) were cultured in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with 10% fetal bovine

serum, 50 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.1 µg/ml amphotericine-β (ThermoFisher Scientific).

Assessment of antiviral activity in HCV-SGR models

For transient HCV-SGR models, plasmids *p1071-NS5A(Ni)-S2204I*, *APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo* and *fdRocco-chimeric2a/4aNS5A* were linearized with XhoI, XbaI and XbaI, respectively (FastDigest, ThermoFisher Scientific) and *in vitro* transcribed using MEGAscript T7 Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). Then, approximately 1.5×10^4 Huh7.5 cells were transfected with 250 ng of HCV-SGR RNA using trans-IT mRNA transfection kit (Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin, USA). Four hours after transfection, the compounds were added to the culture medium. Luciferase activity was monitored 96, 48 and 72 hours post-transfection for genotype 1b, 2a and chimeric 2a/4a HCV-SGR, respectively, by means of Luciferase Assay System (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

For stable HCV-SGR models, Huh7.5 cells stably harboring genotype 1a, 3a and 5a HCV-SGR were cultured in the presence of the compounds for 48 hours before luciferase activity measurement. Plots were fitted with a four-parameter logistic curve with SigmaPlot® v11 software (Systat Software, Inc) and the EC_{50s} were determined from the curves.

Assessment of antiviral activity in the infectious HCV model

Huh7.5 cells were seeded at the density of 1.5×10^4 cells and incubated overnight in complete DMEM. They were infected 24 hours later with 250 μ l of HCVcc (J6/JFH1 strain, GT2a/2a) in the presence of increasing concentrations of the compounds. Eight hours after infection, the cells were washed with PBS and incubated with fresh medium containing the inhibitors for 72 hours. Then, luciferase activity was measured and plotted against compound concentrations. The EC_{50} s were determined from curves fitted with a four-parameter logistic equation.

Assessment of the combination of compound 31 and ledipasvir

Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1a HCV-SGR were cultured in the presence of 10 pM LDV, 2.5 μ M C31 or both drugs at the same concentrations, in the absence or presence of 500 μ g/ml of G418. After 5 passages, the remaining living cells were stained with crystal violet.

Selection of clones resistant to compound 31

Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR replicon that confers cell resistance to G418 were used for selection experiments. The cells were cultured in the

presence of escalating doses of C31 (1 to 50 μ M) and of 1.5 mg/ml of G418 until colonies growing in the presence of C31 appeared. Two resistant colonies were isolated after several passages and total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed with the High Capacity cDNA reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific). The NS5A-coding region was amplified at baseline and in the resistant colonies by PCR using forward oligonucleotides 5'-GTG CAG TGG ATG AAY CGG CTG ATA GC-3', 5'-TTC CAR GAC TCT ARC ART G-3', 5'-ACT ATG TGC CTG AGA GCG ACG-3', 5'-GGR TTG TAR TCC GGS CGY GCC CAT A-3' and reverse oligonucleotides 5'-TCC CRT GYG AGC CYG AAC CG-3', 5'-GTG GTG ACG CAG CAA AGA GT-3', 5'-CCC ACA TTA CAG CAG AGA CGG C-3', and 5'-TTG ATG GGC AGC TTG GT-3'.

Phenotypic characterization of amino acid substitutions selected by compound 31

Candidate resistance-associated substitutions (RASs) were introduced into a wild-type genotype 1b HCV-SGR containing the luciferase reporter gene by means of site-directed mutagenesis (Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Ninety-six hours post-RNA transfection, the susceptibility to compound 31 of RAS-containing HCV-SGR was determined by measuring luciferase activity using wild-type HCV-SGR susceptibility as a comparator. The replication capacity of RAS-containing HCV-SGR was assessed by comparing luciferase activity 4 hours and 96 hours post-transfection and expressed as a percentage of wild-type replication capacity.

Phenotypic characterization of amino acid substitutions selected by ledipasvir

The L31V and Y93H RASs, which confer high-level resistance to LDV (Kwon, Xing et al. 2015), were introduced in the NS5A-coding region of the *APP76-Con1-SG-Neo-(I)-hRluc2aUb* plasmid by means of site-directed mutagenesis. After linearization with *ScaI* and *in vitro* transcription, the genotype 1b HCV-SGR was transfected into Huh7.5 cells. The cells were cultured in the presence of the compounds for 84 hours and luciferase activity was measured. Then, susceptibility of HCV-SGR(L31V/Y93H) to C31, ALV and LDV was compared to that of wild-type HCV-SGR.

Competitive binding assay

A 96-well plate-based TR-FRET assay (Selcia, Ongar, UK) was used to determine competitive CypA binding of C31 and CsA. Briefly, CypA was tagged with a polyhistidine sequence (6His) and formed a complex with an anti-6His antibody labelled with a fluorescent donor F(d), while CsA was tagged with a fluorescent acceptor F(a). C31 was added to the master mix containing the CypA/antibody/CsA complex, with a final concentration of detergent of 0.01%. After 30 min of incubation at room temperature, the plate was read on a SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) at 2 wavelengths to detect F(d) and F(a) emissions. The F(a)/F(d) ratio was calculated and the values were plotted against the inhibitor concentration in Log₁₀ molar and fitted using one-

site K_i nonlinear regression to determine the K_d . Non-labelled CsA and ALV were used as controls.

Protein-protein interaction assay

An NS5A-Rluc/CypA-6his *in vitro* interaction assay was developed to measure the efficiency of CypI disruption of the NS5A/CypA interaction by means of luminescence measurement.

After PCR amplification with primers 5'-AAA AAC TGC AGA TGT CCG GCT CGT GGC T-3' and 5'-AAA AAC CGC GGG CAG CAG ACG ACG TCC-3' and digestion with PstI and SacII (FastDigest, ThermoFischer Scientific), the genotype 1b NS5A-coding sequence was cloned in fusion with the Renilla luciferase into a pRluc-N3(h) plasmid (6310009, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). NS5A-D320E was generated by means of site-directed mutagenesis with oligonucleotides 5'-ATG GGC ACG CCC GGA ATA CAA CCC TCC ACT G-3' and 5'-CAG TGG AGG GTT GTA TTC CGG GCG TGC CCA T-3' and cloned in a similar way to WT-NS5A. Huh7.5 cells were then transfected with the pRluc-N-NS5A plasmid. Forty-eight hours later, cells were lysed with 4 thaw-freeze cycles and incubated 30 min at room temperature with 500 μ g of Ni-NTA magnetic beads preloaded with 30 μ g of purified CypA in an equilibration buffer (imidazole 10 mM, Tween-20 0.05% in PBS (-/-)). Increasing concentrations of the CypI were added during the incubation. The beads were then washed 3 times with a washing buffer (imidazole 20 mM, Tween-20 0.05% in PBS (-/-)) and elution was performed with imidazole 400 mM for 15 min at room temperature. Renilla luciferase

activity in eluates was measured by means of the Renilla Luciferase Assay System (Promega).

Molecular modelling and docking of C31 into CypA

Molecular modelling and docking experiment were performed using the @TOME-2 server (Pons and Labesse 2009), which integrates an original interface for comparative docking of small molecules detected in the Protein Data Bank file of each template. The search for homologous sequences and alignments was performed using the @TOME-2 server and the CypD sequence (P30405), with a 75% identity. In each structural model, the active site boundaries were deduced from the vicinity of the co-crystallized ligands (compounds C32, C34, C35 and C36 were selected as templates with the corresponding Protein Data Bank (PDB) accession numbers 4J59, 4J5C, 4J5B and 4J5E, respectively) using the @TOME-2 comparative option. In addition, the same chemical entities were used to define a shape restraint to guide docking in the automatically computed models. The files for the ligands were generated with MarvinSketch 6.2.2 for the SMILES and with Frog2 server for the mol2 (Miteva, Guyon et al. 2010). Figure 1A was generated using Pymol.

Assessment of compound 31 anti-*Flaviviridae* activity

Huh7 cells were infected for 48 h with the YFV strain Dakar HD 1279 (obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses – WRCEVA, Texas, USA), at an MOI of 7; or for 48 hours with DENV-4 strain Dominica 814669 (obtained from the Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) at an MOI of 10; or for 1 h with ZIKV strain MR766 (obtained from ATCC) at an MOI of 1. Infections were performed in the presence of different concentration of C31.

For DENV and YFV experiments, total RNA was extracted from cell cultures with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). First-strand complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with the RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Quantitative real-time PCR was performed on a real-time PCR system (QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems) with SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). The data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with all samples normalized to GAPDH. All experiments were performed in triplicate. Genome equivalent (GE) concentrations were determined by extrapolation from a standard curve generated from serial dilutions of the plasmid encoding a subgenomic YFV replicon. The sequences of the 17D-NS3 primers used for the RT-qPCR were the following: sense 5'-AGGTCCAGTTGATCGCGGC and antisense 5'-GAGCGACAGCCCCGATTTCT. The sequences of the pan-DENV primers were the following: sense 5'-TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC and antisense 5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC.

For ZIKV experiment, total RNA was extracted from cell culture with the SV96 Total RNA isolation system (Promega). Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed on a real-time PCR system (Applied Biosystems 7300) with TAQMAN gene expression master mix (Applied Biosystems) and the data were normalized to GAPDH. The sequences of the primers used were the following: sense 5'ATATCGGACATGGCTTCGGA and antisense 5'GTTCTTTTGCAGACATATTGAGTG.

RESULTS

C31 has potent pan-genotypic anti-HCV activity

The anti-HCV activity of the new SMCypI compound C31, our most potent inhibitor of Cyp PPIase activity, was tested in models of different HCV genotypes containing luciferase reporter genes, including an infectious chimeric J6/JFH1 (2a/2a) virus, genotype 1a, 1b, 2a, 3a, and 5a HCV-SGRs, and the chimeric 2a/4a HCV-SGR containing a genotype 4a NS5A sequence. In addition, the anti-HCV activity of C31 was evaluated in the recently developed full-length infectious HCV genotype 3a model (DBN-3acc) (Ramirez, Mikkelsen et al. 2016). ALV and CsA were used as controls in all experiments.

C31 equally inhibited the replication of genotype 1a, 1b, 2a, 3a, 5a and chimeric 2a/4a HCV-SGRs, with EC_{50} s ranging from 1.20 ± 0.83 to 7.76 ± 1.57 μ M (**Table 1**). C31 also inhibited the replication of the infectious J6/JFH1 virus, with a comparable EC_{50} of 2.80 ± 0.40 μ M. Finally, C31 potently inhibited DBN-3acc RNA replication in a dose-dependent manner, with a maximal 244-fold HCV RNA reduction at 10 μ M (**Supplementary Figure 1**). C31 did not affect cell viability, as previously reported (Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016). Altogether, these results demonstrate the pan-genotypic activity of the new SMCypI.

C31 anti-HCV activity is related to its binding to CypA and inhibition of CypA PPIase activity

To understand the molecular mechanism of anti-HCV action of our new SMCypI, the CypA binding modes of C31 and CsA were modelled. As shown in **Figure 1A**, the structure of CypA in complex with C31 revealed its expected dual binding into the “hydrophobic pocket”, the CypA PPIase active site, on the one hand, and the “gatekeeper pocket” on the other hand (Davis, Walker et al. 2010; Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016).

The CypA binding sites of C31 and CsA were partially overlapping, suggesting competitive binding to CypA. Thus, time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) was used to assess whether C31 competes with CsA for binding to the purified CypA. Both non-labelled CsA and ALV displaced labelled CsA from its CypA binding site, with K_d values of 8.4 and <5 nM, respectively (data not shown). As shown in **Figure 1B**, C31 also displaced labelled CsA with a K_d value of 105 nM, confirming competition with CsA binding to CypA.

Finally, we assessed whether the anti-HCV effect of the SMCypIs was related to their ability to inhibit CypA PPIase enzyme activity. For this, the anti-HCV activity of 6 different chemically-related SMCypIs listed in **Supplementary Table 1**, including C31, was determined in a genotype 1b HCV-SGR and plotted against their respective inhibitory activities in a PPIase enzyme assay. As shown in **Figure 1C**, the anti-HCV activity of the SMCypIs was strongly correlated to their ability to inhibit PPIase activity, with a Pearson's correlation coefficient of 0.96 and a p value <0.0001

Altogether, these results demonstrate that our new family of SMCypIs inhibits HCV replication by binding to both the PPIase catalytic pocket and the gatekeeper pocket of CypA and by blocking its PPIase catalytic activity.

C31 disrupts the CypA-NS5A interaction

Because CypA has been shown to play an important role in the HCV lifecycle through its interaction with the non-structural NS5A protein, we measured the effect of C31 on the NS5A/CypA interaction. Purified CypA tagged with a polyhistidine sequence (CypA-6his) was bound to Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) magnetic beads. A cell lysate containing WT-NS5A or D320E-NS5A fused with the Renillia luciferase (NS5A-Rluc) was incubated with the CypA-loaded magnetic beads in the presence or absence of C31 and of ALV, used as a control. After washing and elution with imidazole, luciferase activity corresponding to NS5A-Rluc/CypA-6his interacting complexes was measured. As shown in **Figure 2**, the CypA/NS5A interaction was disrupted by both ALV and C31 in a dose-dependent manner. The same result was observed with D320E-NS5A. Altogether these results indicate that SMCypIs disrupt the interaction between CypA and the HCV protein NS5A through their binding to CypA.

C31 exerts at least additive antiviral effects when combined with the NS5A inhibitor ledipasvir and is fully active against ledipasvir-resistant viruses

A combination study of C31 with the NS5A inhibitor LDV was performed in Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1a HCV-SGR. As shown in **Figure 3**, under G418 selective pressure, the combination of C31 and LDV at their respective EC₅₀s of 2.5 μ M and 10 pM, was more effective in curing cells from the replicons than each compound alone at the same concentration, suggesting at least an additive effect of C31 and LDV in combination. In addition, a genotype 1b HCV-SGR, containing the L31V and Y93H substitutions, which confer high-level resistance to ledipasvir (714-fold increase in LDV EC₅₀, data not shown), remained fully sensitive to C31 and ALV (**Table 2**).

Altogether, these results suggest that our new SMCypl family has at least additive effects with HCV DAAs targeting domain I of the NS5A protein, without cross-resistance.

C31 hardly selects amino acid substitutions conferring low-level or no resistance *in vitro*

Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR containing the Neomycin resistance gene were grown under G418 selective pressure in the absence or presence of increasing doses (1 μ M to 50 μ M) of C31. Two cellular clones growing in the presence of C31 were selected after 100 days. Because CsA and its non-immunosuppressive derivatives

were shown to select amino acid substitutions in the NS5A region of the HCV genome (Fernandes, Poole et al. 2007; Coelmont, Kaptein et al. 2009; Yang, Robotham et al. 2010), the NS5A-coding region of the two C31-resistant clones was sequenced. As compared to baseline, 8 amino acid changes were identified, including I133V and L183P in domain I, L303P, R304W, K308I, D320E and Y321H in domain II, and E442G in domain III of the NS5A protein (**Figure 4**). The NS5B-coding region was also sequenced and only the I585L change was observed (data not shown).

Each of the 8 amino acid substitutions selected was introduced in a WT transient genotype 1b HCV-SGR for phenotypic analysis (compound susceptibility and replication capacity) in the presence of C31, ALV and CsA (**Table 2**). Among them, only D320E and Y321H were associated with a mild increase in C31 EC₅₀ (approximately 2 to 5-fold), without impairment of the replicon replication capacity. L183P, located in NS5A domain I, drastically reduced the corresponding HCV-SGR replication capacity, so its impact on compound susceptibility could not be evaluated. Thus, only D320E and Y321H in domain II of the NS5A protein, that were selected by serial passages at increasing concentrations of C31, conferred low-level resistance to the SMCypl, as already reported with CsA and ALV.

C31 inhibits the replication of other members of the *Flaviviridae* family

We assessed whether C31 could exert antiviral activities against other members of the Flaviviridae family. Viral replication was assessed by qPCR 48 hours post-infection. A dose-dependent decrease of viral replication was observed in the presence of C31 for DENV

(EC₅₀: 7.3±3.5 µM), YFV (EC₅₀: 27.2±4.7 µM) and ZIKV (EC₅₀: 48.0±5.6 µM) with a CC₅₀ ≥100µM (Figure 5). These results suggest that the new family of SMCypI has broad anti-Flaviviridae antiviral activity.

DISCUSSION

Anti-HCV drug research highlighted the antiviral potential of Cyp inhibition through the clinical development of non-immunosuppressive derivatives of CsA. Unfortunately, all CypIs in development for HCV were structurally-related, and the only compound that reached late-phase clinical development, ALV, was halted due to severe adverse effects unrelated to Cyp inhibition. We recently reported our use of a complex fragment-based drug discovery approach using nucleic magnetic resonance, X-ray crystallography and structure-based compound optimization to generate a new family of non-peptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors (SMCypI) unrelated to CsA, with potent in vitro PPIase inhibitory activity and antiviral activity against HCV, HIV and coronaviruses (Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016).

Although ALV has been shown to potently inhibit HCV replication, its ability to block the replication of other members of the Flaviviridae family is unknown. The immunosuppressive CsA has been reported to bear antiviral activity against DENV-2, WNV and YFV (Qing, Yang et al. 2009), with less potency against WNV. Results regarding the susceptibility of ZIKV to CsA are limited and contradictory (Barrows, Campos et al. 2016). This sparseness of data prompted us to assess the anti-Flaviviridae activity of our new SMCypI. Here, we showed that C31, a potent SMCypI inhibitor of cyclophilin PPIase activity with potent anti-HCV activity in vitro, also inhibits the replication of several members of the Flaviviridae family in cell culture models. C31 was most effective against HCV and DENV replication, with EC50s in the low micromolar range. C31 inhibited YFV and ZIKV

replication to a lesser extent, with EC₅₀s in the micromolar range. Although the EC₅₀ was above 50 μ M, the highest concentration tested, a trend towards a decrease of viral replication was also observed with WNV (data not shown). In contrast, no effect of C31 against JEV replication has been observed in our experiments (data not shown). To our knowledge, C31 is the first SMCypI with broad anti-*Flaviviridae* activity. Given the chemical plasticity and simplicity of synthesis of this new family of SMCypIs, a large number of new compounds will be synthesized in the future. It is thus likely that C31 derivatives with greater effectiveness against the different members of the *Flaviviridae* family will be generated.

The susceptibility of *Flaviviridae* family members to SMCypIs suggests that cyclophilins play a pivotal role in their lifecycles. Our SMCypIs provide a unique, easy-to-use tool to explore this role. In the present study, we used C31 to decipher the role of cyclophilins in the HCV lifecycle and understand the mechanisms of its inhibition by the inhibitors. Our results complement previous results generated with CsA or ALV in various models (Watashi, Hijikata et al. 2003; Paeshuyse, Kaul et al. 2006; Fernandes, Poole et al. 2007; Coelmont, Kaptein et al. 2009; Coelmont, Hanouille et al. 2010; Yang, Robotham et al. 2010).

We showed here that, like ALV (Paeshuyse, Kaul et al. 2006; Coelmont, Kaptein et al. 2009; Coelmont, Hanouille et al. 2010), our family of SMCypIs has potent pan-genotypic anti-HCV activity (EC₅₀s in the low micromolar range for genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 4a and 5a), a high barrier to the selection of resistant viruses, and at least additive effects in combination with HCV DAAs. It has been previously demonstrated that CypA PPIase activity

is required for HCV replication (Chatterji, Bobardt et al. 2009; Kaul, Stauffer et al. 2009). Our library of SMCypI (supplementary table 1), providing us with a unique, thus far missing pharmacological tool to dissect the molecular mechanisms of Cyp/ virus interactions and of the antiviral effects of Cyp inhibition. The library of SMCypI proved to be particularly useful to discriminate PPIase-dependent antiviral activity than effects related to other functional roles of the Cyps. Using several SMCypI derivatives with different inhibitory potency of PPIase catalytic activity, we showed that the antiviral activity of the SMCypIs strongly correlates with their PPIase inhibitory potency, confirming that Cyp PPIase activity is required for HCV replication.

It has been shown that CypA directly interacts with the HCV NS5A protein to regulate key processes of the HCV lifecycle (Chatterji, Bobardt et al. 2009; Azhar, El-Kafrawy et al. 2014; Chatterji, Bobardt et al. 2015). Disruption of this key interaction by CsA or ALV impairs HCV replication, possibly explaining the anti-HCV effect of these compounds (Coelmont, Hanouille et al. 2010; Fernandes, Ansari et al. 2010). Whether similar mechanisms could be involved with other families of Cyp inhibitors remained unknown. We showed that the NS5A/CypA interaction was disrupted by C31. We also modeled the CypA binding mode of C31 and CsA. As expected, their superimposition revealed that both compounds shared a partially overlapping binding site. This result was confirmed by means of a TR-FRET assay, showing that C31 displaces CsA from the CypA catalytic site. Interestingly, we also observed that the aniline moiety of C31 deeply buried into a pocket contiguous to the canonical catalytic site, the gatekeeper pocket, out of reach for CsA, suggesting that the inhibition modes of CsA and SMCypIs may partially differ. This could

explain that CsA and ALV did not inhibit ZIKV replication in this study, whereas C31 did, possibly through a PPIase-independent mechanism different from that involved in HCV inhibition (data not shown).

Resistance experiments performed with ALV selected amino acid substitutions essentially clustering in domain II of the HCV NS5A protein, also suggesting that NS5A is the main viral partner of CypA (Coelmont, Hanouille et al. 2010). D320E and Y321H, both located in NS5A domain II, have been reported to confer low-level resistance to CsA and its non-immunosuppressive derivatives (Chatterji, Bobardt et al. 2010; Coelmont, Hanouille et al. 2010; Yang, Robotham et al. 2010). However, NS5A mutant proteins harboring the D320E substitution keep their capacity to interact with CypA *in vitro* and this interaction remains fully sensitive to ALV disruption (Coelmont, Hanouille et al. 2010). In our experiments, 100 days have been necessary to select two cellular clones growing in the presence of C31 under selective pressure from G418. Among the 8 amino acid changes identified in these clones, only D320E and Y321H in domain II of the NS5A protein were associated with a modest increase in C31 EC₅₀ (approximately 2 to 5-fold), without impairment of the replicon replication capacity. These properties were similar to those reported with CsA and ALV. The interaction of NS5A-D320E with CypA remained fully sensitive to C31 disruption. Altogether, these findings confirm that the mode of antiviral action of our SMCypIs is identical to that of CsA and its derivatives.

The fact that SMCypI do not target a viral function, but instead a host protein involved in a key step of the viral lifecycle suggested that they could bear additive or synergistic properties in combination with DAAs. We confirmed this hypothesis by

combining C31 with the potent HCV NS5A inhibitor ledipasvir. Both drugs together were more efficient in curing cells from HCV-SGR than each drug alone, suggesting at least an additive effect. In addition, C31 remained efficient against HCV-SGR harboring amino acid substitutions known to confer high-level resistance to LDV.

In conclusion, our new family of SMCypIs bears broad-spectrum antiviral properties against several members of the *Flaviviridae* family that represent important public health problems worldwide and remain without any therapeutic option. Their mechanism of antiviral action against one of these viruses, HCV, is related to Cyp binding, inhibition of the PPIase catalytic activity and disruption of the CypA/NS5A interaction, a mechanism common to other cyclophilin inhibitors derived from CsA. Non-immunosuppressive analogues of CsA suffer from serious caveats, including their large size resulting in poor cell permeability, their side effects unrelated to cyclophilin inhibition, their drug-drug interactions, and manufacturing issues they raise. Thus, because of its chemical plasticity, lack of cellular toxicity and simplicity of synthesis, our new family of SMCypIs represents a promising new class of drugs with broad-spectrum anti-Flaviviridae properties, as well as an invaluable tool to explore the role of cyclophilins in viral lifecycles and the mechanisms to block them.

FIGURES

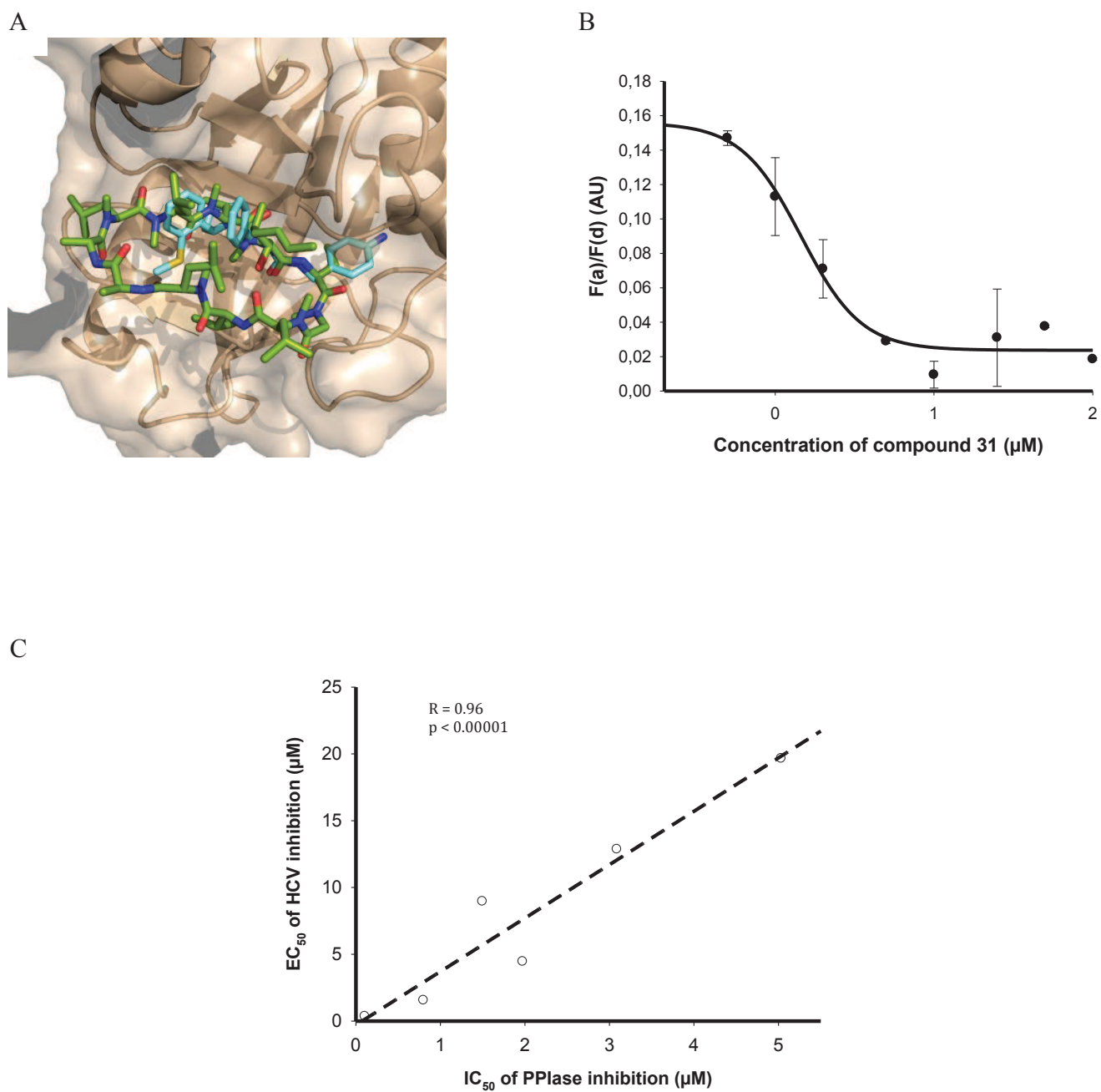


Figure 1: C31 anti-HCV activity is related to its binding to CypA and inhibition of CypA PPIase activity

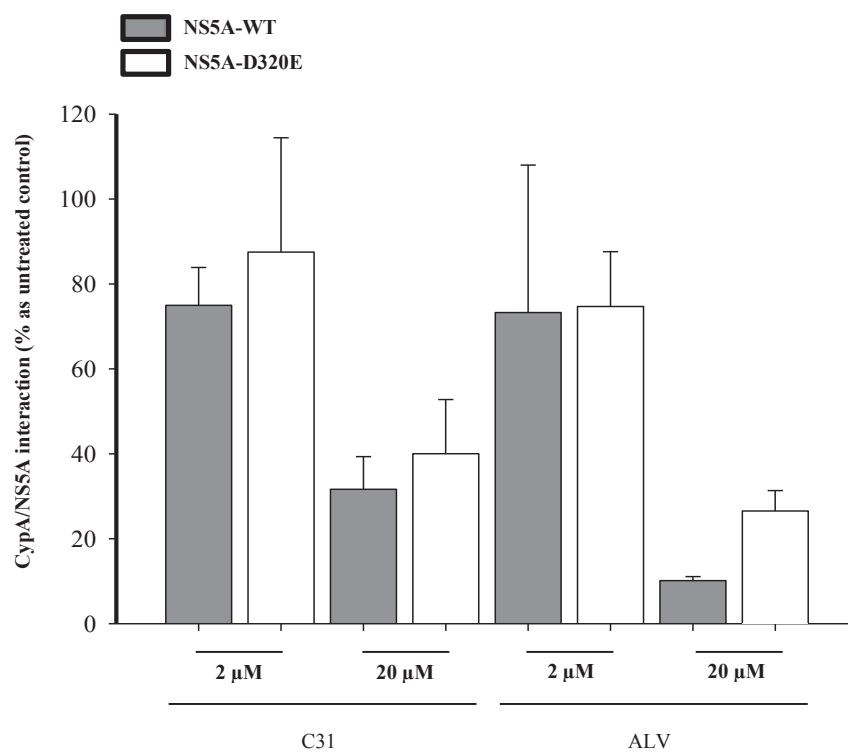


Figure 2: C31 disrupts the CypA-NS5A interaction

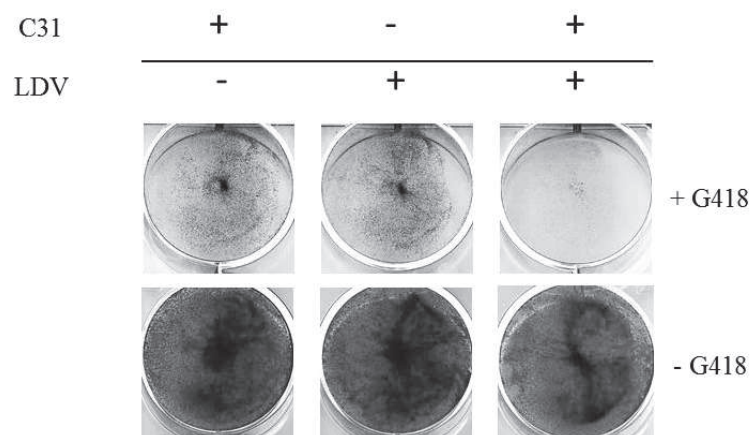


Figure 3: C31 exerts at least additive antiviral effects when combined with the NS5A inhibitor ledipasvir

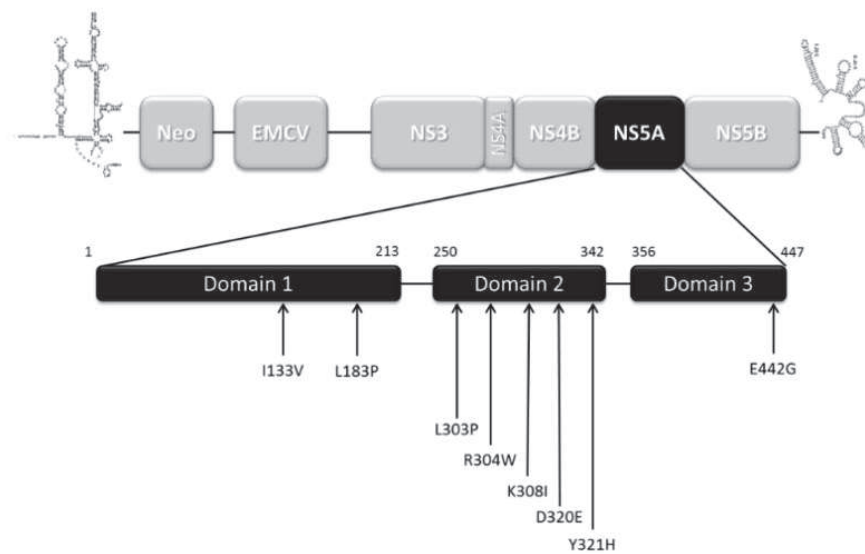


Figure 4: Amino acid changes selected by serial C31 passages at increasing concentrations in a genotype 1b HCV-SGR

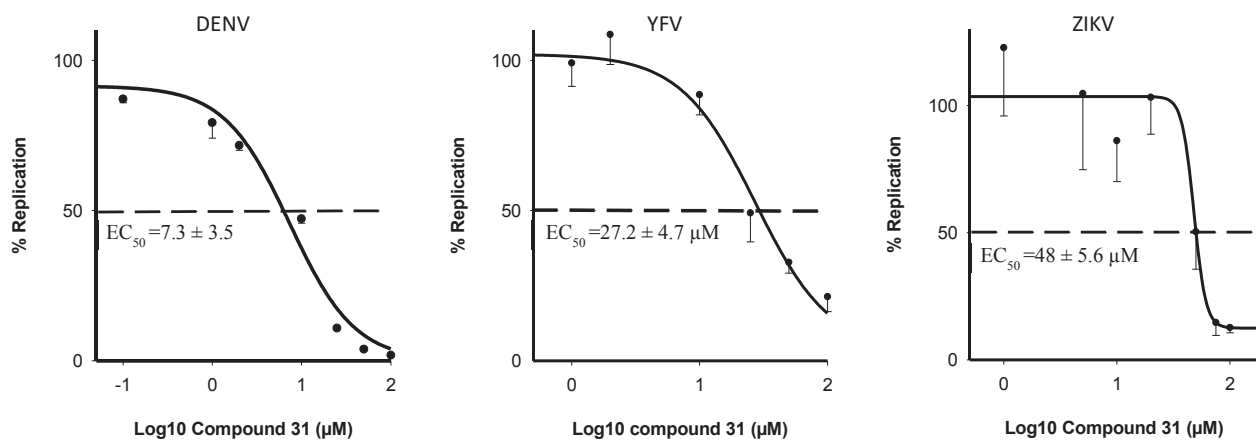


Figure 5: *In vitro* activity of C31 against three *Flaviviruses*

REFERENCES

1. De Clercq E, Li G. 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev* 29:695-747.
2. Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Assadi R, Bhala N, Cowie B, Forouzanfour MH, Groeger J, Hanafiah KM, Jacobsen KH, James SL, MacLachlan J, Malekzadeh R, Martin NK, Mokdad AA, Mokdad AH, Murray CJL, Plass D, Rana S, Rein DB, Richardus JH, Sanabria J, Saylan M, Shahrzaz S, So S, Vlassov VV, Weiderpass E, Wiersma ST, Younis M, Yu C, El Sayed Zaki M, Cooke GS. 2016. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 388:1081-1088.
3. Pawlotsky JM. 2016. Hepatitis C Drugs: Is Next Generation the Last Generation? *Gastroenterology* 151:587-90.
4. Flisiak R, Horban A, Gallay P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska-Drapalo A, Siwak E, Cielniak I, Higersberger J, Kierkus J, Aeschlimann C, Groscurin P, Nicolas-Metral V, Dumont JM, Porchet H, Crabbe R, Scalfaro P. 2008. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47:817-26.
5. Pawlotsky JM. 2015. Viral entry inhibition: too late for hepatitis C, but promising for other viral infections. *Gut* 64:362-4.
6. Zeuzem S, Flisiak R, Vierling JM, Mazur W, Mazzella G, Thongsawat S, Abdurakhmanov D, Van Kinh N, Calistru P, Heo J, Stanciu C, Gould M, Makara M, Hsu SJ, Buggisch P, Samuel D, Mutimer D, Nault B, Merz M, Bao W, Griffel LH, Brass C,

Naoumov NV. 2015. Randomised clinical trial: alisporivir combined with peginterferon and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype 1 infection (ESSENTIAL II). *Aliment Pharmacol Ther* 42:829-44.

7. de Wilde AH, Li Y, van der Meer Y, Vuagniaux G, Lysek R, Fang Y, Snijder EJ, van Hemert MJ. 2013. Cyclophilin inhibitors block arterivirus replication by interfering with viral RNA synthesis. *J Virol* 87:1454-64.

8. Chiramel AI, Banadyga L, Dougherty JD, Falzarano D, Martellaro C, Brees D, Taylor RT, Ebihara H, Best SM. 2016. Alisporivir Has Limited Antiviral Effects Against Ebola Virus Strains Makona and Mayinga. *J Infect Dis* 214:S355-S359.

9. de Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, Posthuma CC, Feldmann H, Perlman S, Snijder EJ. 2017. Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model. *Virus Res* 228:7-13.

10. Burse M, Shi J, Aiken C. 2017. Cyclophilin A potentiates TRIM5 α inhibition of HIV-1 nuclear import without promoting TRIM5 α binding to the viral capsid. *PLoS One* 12:e0182298.

11. Hopkins S, Gallay PA. 2015. The role of immunophilins in viral infection. *Biochim Biophys Acta* 1850:2103-10.

12. Vidotto A, Morais AT, Ribeiro MR, Pacca CC, Terzian AC, Gil LH, Mohana-Borges R, Gallay P, Nogueira ML. 2017. Systems Biology Reveals NS4B-Cyclophilin A Interaction: A New Target to Inhibit YFV Replication. *J Proteome Res* 16:1542-1555.

13. Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. 2011. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology* 412:211-9.
14. Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY. 2009. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3226-35.
15. Lin K, Gallay P. 2013. Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res* 99:68-77.
16. Chatterji U, Bobardt M, Tai A, Wood M, Gallay PA. 2015. Cyclophilin and NS5A inhibitors, but not other anti-hepatitis C virus (HCV) agents, preclude HCV-mediated formation of double-membrane-vesicle viral factories. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2496-507.
17. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Cala O, Douguet D, Bourguet W, Krimm I, Pawlotsky JM, Guichou JF. 2016. Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat Commun* 7:12777.
18. Saeed M, Scheel TK, Gottwein JM, Marukian S, Dustin LB, Bukh J, Rice CM. 2012. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5365-73.
19. Wose Kinge CN, Espiritu C, Prabdhial-Sing N, Sithebe NP, Saeed M, Rice CM. 2014. Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5386-94.

20. Maqbool MA, Imache MR, Higgs MR, Carmouse S, Pawlowsky JM, Lerat H. 2013. Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes. *J Virol* 87:5523-39.
21. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-3.
22. Ramirez S, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J. 2016. Robust HCV Genotype 3a Infectious Cell Culture System Permits Identification of Escape Variants With Resistance to Sofosbuvir. *Gastroenterology* 151:973-985 e2.
23. Kwon HJ, Xing W, Chan K, Niedziela-Majka A, Brendza KM, Kirschberg T, Kato D, Link JO, Cheng G, Liu X, Sakowicz R. 2015. Direct binding of ledipasvir to HCV NS5A: mechanism of resistance to an HCV antiviral agent. *PLoS One* 10:e0122844.
24. Pons JL, Labesse G. 2009. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res* 37:W485-91.
25. Miteva MA, Guyon F, Tuffery P. 2010. Frog2: Efficient 3D conformation ensemble generator for small compounds. *Nucleic Acids Res* 38:W622-7.
26. Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Ouyang H, Lee WH, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S. 2010. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8:e1000439.

27. Fernandes F, Poole DS, Hoover S, Middleton R, Andrei AC, Gerstner J, Striker R. 2007. Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology* 46:1026-33.
28. Yang F, Robotham JM, Grise H, Frausto S, Madan V, Zayas M, Bartenschlager R, Robinson M, Greenstein AE, Nag A, Logan TM, Bienkiewicz E, Tang H. 2010. A major determinant of cyclophilin dependence and cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus identified by a genetic approach. *PLoS Pathog* 6:e1001118.
29. Coelmont L, Kaptein S, Paeshuyse J, Vliegen I, Dumont JM, Vuagniaux G, Neyts J. 2009. Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 53:967-76.
30. Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, Prasanth KR, Schott-Lerner G, Soto-Acosta R, Galarza-Munoz G, McGrath EL, Urrabaz-Garza R, Gao J, Wu P, Menon R, Saade G, Fernandez-Salas I, Rossi SL, Vasilakis N, Routh A, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. 2016. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 20:259-70.
31. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38:1282-8.

32. Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43:761-70.
33. Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, Vandamme AM, Bartenschlager R, Gallay P, Lippens G, Neyts J. 2010. DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 5:e13687.
34. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, Vuagniaux G, Parkinson T, Gallay P. 2009. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 284:16998-7005.
35. Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R. 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5:e1000546.
36. Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 370:2499-505.
37. Fernandes F, Ansari IU, Striker R. 2010. Cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A. *PLoS One* 5:e9815.

38. Chatterji U, Bobardt MD, Lim P, Gallay PA. 2010. Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. J Gen Virol 91:1189-93.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Molecular modelling of the interaction of C31 and CsA with CypA, competition between C31 and CsA for CypA binding and relationship between the anti-PPIase activity of the SMCypI in an enzyme assay and their anti-HCV activity in a genotype 1b HCV-SGR. (A) A molecular modelling approach was used to compare the binding mode of CsA and C31 in the active site of CypA. Superimposition of the two drugs revealed a partially common binding site. **(B)** Competition between C31 and CsA for CypA binding was assessed by a TR-FRET assay. The graphs represent the FRET-emission ratios measured in the presence of increasing concentrations of C31. Unlabeled CsA and ALV were used as internal controls. **(C)** The graph represents the relationship between the IC_{50} in a CypA PPIase enzyme assay and the EC_{50} in a genotype 1b HCV-SGR assay of 6 SMCypIs related to C31 listed in Supplementary Table 1. The Pearson's correlation coefficient (R) and p value are shown on the graph.

Figure 2: Disruption of the CypA-NS5A interaction by the cyclophilin inhibitors. The interaction between NS5A-Rluc and CypA-6his was assessed by means of a Ni-NTA-magnetic beads protein-protein interaction assay. After loading of CypA-6His, the beads were incubated with a lysate of Huh7.5 cells expressing WT-NS5A-Rluc **(A)** or D320E-NS5A-Rluc **(B)** and two concentrations of C31 and ALV. After washing, CypA-6His interacting proteins were eluted with imidazole. The NS5A-Rluc activity was measured in the eluate. Huh7.5 cells expressing Rluc were used as a negative interaction control.

Figure 3: Combination studies of C31 (2.5 μ M) and LDV (10 pM) in a genotype 1a HCV-SGR in Huh7.5 cells. Huh7.5 cells stably expressing a genotype 1a HCV-SGR were cultured through 5 passages in the presence of C31 (2.5 μ M), LDV (10 pM) or both drugs, in the presence (upper panel) or in the absence (lower panel) of G418. The cells were stained with crystal violet.

Figure 4: Amino acid changes selected by serial C31 passages at increasing concentrations in a genotype 1b HCV-SGR. Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR were cultured in a medium containing 1.5mg/mL of G418 in the presence of increasing doses of C31 until resistant clones were selected. Total RNA of two resistant clones was extracted and the NS5A-coding region was sequenced. The figure shows the amino acid changes observed in the sequence of the NS5A region, domains I to III.

Figure 5: *In vitro* activity of C31 against three *Flaviviruses*. Dose-dependent curves of antiviral activity against 3 different infectious models of *Flaviviruses*, including DENV, ZIKV, YFV. Viral replication was assessed by qPCR 48 h post infection. The relative replication was expressed as percent of untreated control and plotted against the Log₁₀ concentration of C31. The EC₅₀ values are shown on the graph and represented by a dashed line.

TABLES

Table1: Activity of C31, ALV and CsA on HCV replication

	HCV-SGR EC ₅₀ (μM)						Infectious J6/JFH1 HCV EC ₅₀ (μM)
Compound	Genotype 1a	Genotype 1b	Genotype 2a	Genotype 3a	Genotype 2a/4a	Genotype 5a	Genotype 2a/2a
C31	3.80±1.90	2.95±0.60	2.30±1.20	7.76±1.57	1.40±1.10	1.20±0.83	2.80±0.40
ALV	0.04±0.03	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.002	0.01±0.01	0.03±0.002
CsA	0.60±0.20	0.17±0.02	0.20±0.04	0.19±0.12	0.04±0.03	0.13±0.04	0.06±0.01

EC₅₀: effective concentration 50%; C31: compound 31; ALV: alisporivir; CsA: cyclosporine A

Table 2: C31, ALV and CsA susceptibility and replication capacity of a wild-type genotype 1b HCV-SGR and effect of the introduction of amino acid substitutions selected by serial C31 passages at increasing concentrations

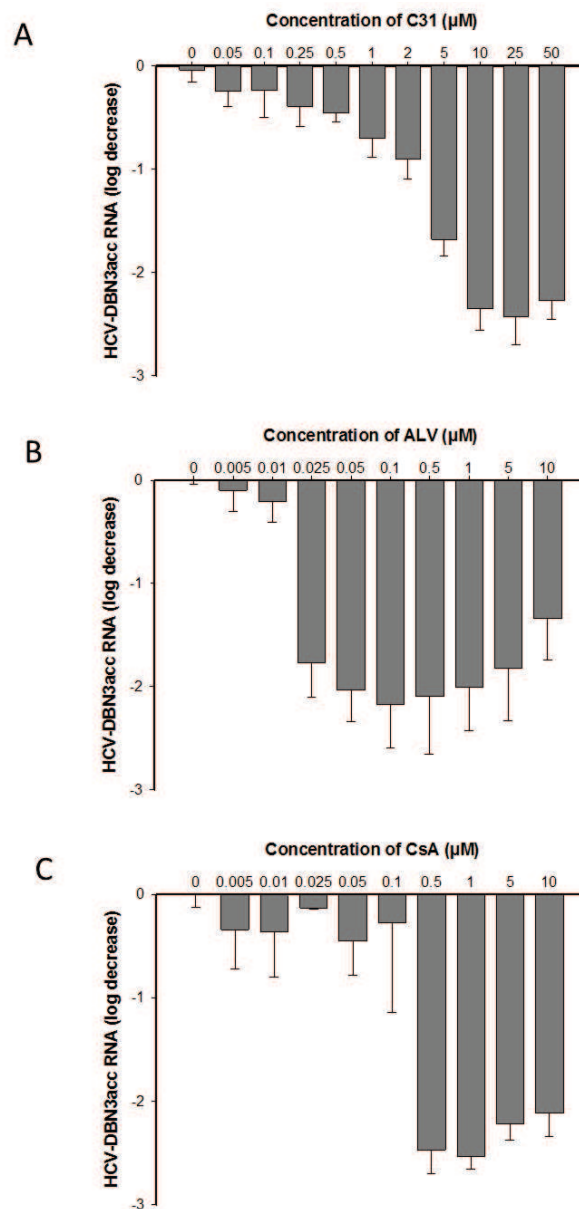
	C31		ALV		CsA		Replication capacity (%)
	EC ₅₀ (μM)	Fold-change	EC ₅₀ (μM)	Fold-change	EC ₅₀ (μM)	Fold-change	
WT	2.95±0.60	1.0	0.03±0.01	1.0	0.17±0.02	1.0	100
I133V	2.75±0.20	0.9	0.02±0.001	0.9	0.21±0.04	1.2	110±23
L183P	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2±1
L303P	3.05±0.40	1.0	0.04±0.01	1.3	0.23±0.04	1.4	57±7
R304W	2.47±0.20	0.8	0.03±0.004	1.1	0.21±0.004	1.2	91±4
K308I	2.59±0.20	0.9	0.04±0.004	1.3	0.17±0.03	1.0	103±3
D320E	8.73±1.10	3.0	0.12±0.05	4.4	0.51±0.04	3.0	82±16
Y321H	5.41±0.40	1.8	0.06±0.02	2.2	0.41±0.02	2.4	79±22
E442G	2.99±0.70	1.0	0.03±0.004	1.1	0.24±0.07	1.4	74±5
L31V/Y93H	1.20±0.10	0.8	0.01±0.001	0.5	ND	ND	92±4

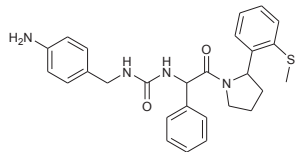
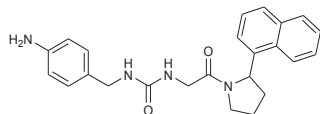
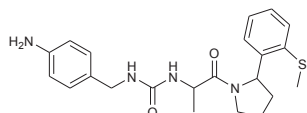
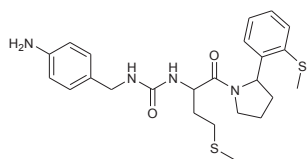
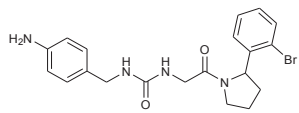
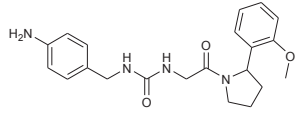
EC₅₀: effective concentration 50%; C31: compound 31; ALV: alisporivir; CsA: cyclosporine A; WT: wild-type.

NA: not available, due to the lack of replication of the mutated HCV-SGR; ND: not done.

SUPPLEMENTARY RESULTS

Supplementary Figure 1: Activity of C31, ALV and CsA on infectious genotype 3a DBN-3acc replication. Huh7.5 cells were transfected with the full-length genotype 3a RNA of HCV-DBN3acc. The figure shows the dose-dependent effects of C31 (A), ALV (B) and CsA (C), as quantified by RT-qPCR.



Compounds	Structure	PPIase inhibition IC ₅₀ (μM)	HCV Genotype 1b replicon EC ₅₀ (μM)
C31		0.10±0.01	0.40±0.01
C32		1.49±0.45	9.01±2.04
C33		3.08±1.17	12.94±1.2
C34		0.79±0.5	1.63±0.38
C35		1.97±0.42	4.51±0.52
C36		5.03±1.81	19.70±2.9

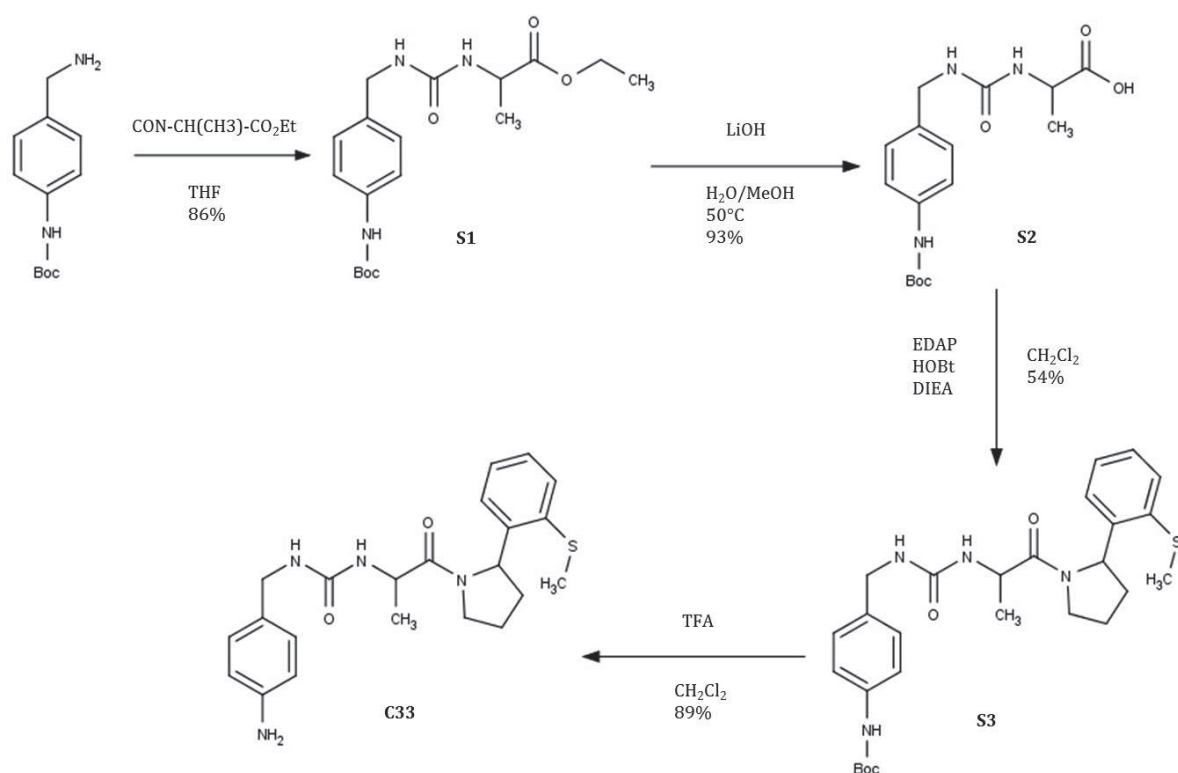
Supplementary Table 1: Chemical structures of the 6 SMCypIs tested and their IC_{50s} in a CypA PPIase enzyme assay and EC_{50s} in a genotype 1b HCV-SGR assay. CypA: cyclophilin A; PPIase: peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase; IC₅₀: inhibitory concentration 50%

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

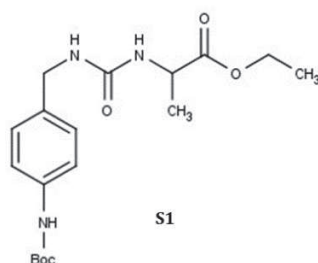
Compound synthesis

SMCypI compounds (**C31**, **C32**, **C34**, **C35** and **C36**) synthesis was performed as described in our previous report (Ahmed-Belkacem, Colliandre et al. 2016). The synthesis of compound **C33** was performed as described in Scheme 1.

Scheme 1. Synthesis of **C33**: 1-[(4-aminophenyl)methyl]-3-(1-{2-[2-(methylsulfanyl)phenyl]pyrrolidin-1-yl}-1-oxopropan-2-yl)urea **C33**

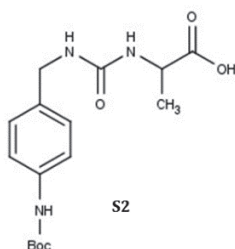


Synthesis of ethyl 2-({[(4-{{tert-butoxy}carbonyl}amino}phenylmethyl]carbamoyl}amino)propanoate **S1**



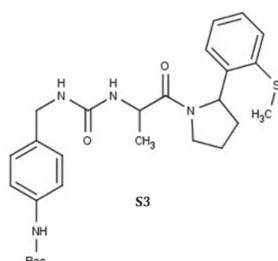
Ethyl 2-isocyanatopropanoate (310 mg, 2.17 mmol, 1.20 equiv) was dissolved in THF (0.4 M), then 4-(tert-butoxycarbonylamino)benzylamine (400 mg, 1.80 mmol, 1.00 equiv) was added in one portion and the reaction mixture was let 2 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated and 50 ml of AcOEt was added. The organic phase was washed with 10% citric acid and brine, then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. Purification by silica flash chromatography (EDP/EtOAc 5/5) yielded the urea **S1** (562 mg, 86%) as a white solid. **TLC:** R_f 0.25 (EDP/EtOAc 5/5). **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ 7.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.57 (broad s, 1H), 5.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.46 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). **ESI-MS** *m/z*: 366.3 [M + H]⁺.

Synthesis of 2-({[(4-{{(tert-butoxy)carbonyl}amino}phenylmethyl]carbamoyl}amino)propanoic acid **S2**



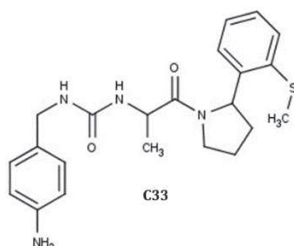
Ester **S1** (330 mg, 0.90 mmol) was dissolved in 10 ml of MeOH and 10 ml of water, LiOH (86 mg, 3.60 mmol, 4.00 equiv) was added and the reaction mixture was heated to 50°C for 2 h. The reaction mixture was concentrated and 100 ml of water was added; it was then extracted twice with AcOEt. The aqueous phase was acidified to pH 3 with concentrated HCl 36%, then extracted twice with AcOEt. The combined organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to yield **S2** (283 mg, 93%) as a white solid. **¹H NMR** (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.31 (broad s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.57 (broad s, 1H), 6.06 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H). **ESI-MS** *m/z*: 336.3 [*M* - H]⁻.

Synthesis of tert-butoxy N-[4-({[(1-{2-[2-(methylsulfanyl)phenyl]pyrrolidin-1-yl}-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl]aminomethyl)phenyl]carbamate **S3**



Acid derivative **S3** (227 mg, 0.84 mmol) was dissolved in 10 ml of CH₂Cl₂. o-thiomethyl-2-phenyl-pyrrolidine (179 mg, 1.10 equiv), hydroxybenzotriazole (136 mg, 1.2 equiv), diisopropylethylamine (319 μ l, 2.2 equiv) and 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide (192 mg, 1.2 equiv) were added successively and the reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated and 100 ml of AcOEt was added. The organic phase was washed with saturated NaHCO₃, 10% citric acid and brine, then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. Purification by silica flash chromatography (EDP/EtOAc 5/5) yielded the amide **S3** (232 mg, 54%) as a white solid. **TLC:** R_f=0.27 (EDP/EtOAc 7/3). **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ 9.27 (s, 1H), 7.35-7.15 (m, 8H), 6.59 (m, 1H), 6.06 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.38 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 2.48 (m, 3H), 2.21 (m, 1H), 2.03 (m, 2H), 1.83-1.79 (m, 3H), 1.56 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.32 (m, 6H). **ESI-MS** *m/z*: 513.3 [M + H]⁺.

Synthesis of 1-[(4-aminophenyl)methyl]-3-(1-{2-[2-(methylsulfanyl)phenyl]pyrrolidin-1-yl}-1-oxopropan-2-yl)urea **C33**



N-boc protected amine **S3** (200 mg, 0.39 mmol) was dissolved in 1 ml of CH₂Cl₂, then 1 ml of TFA was added and the reaction mixture was let 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated and purified by precipitation using diethylether to yield the deprotected amine **C33** (TFA salt, 176 mg, 89%) as a yellow solid. **TLC**: R_f=0.75 (MeOH). **¹H NMR** (200 MHz, DMSO-d₆): δ 6.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.32-6.21 (m, 2H), 4.99 (broad s, 2H), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.05 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.28 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). **ESI-MS** *m/z*: 413.3 [M + H]⁺.

Assessment of the antiviral effect of C31, ALV and CsA on full-length DBN-3acc replication

Huh7.5 cells were plated at the density of 1.5 x 10⁴ and transfected 24 hours later with 10 ng of HCV DBN-3acc RNA with the trans-IT mRNA transfection kit (Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin, USA). Four hours after transfection, the cells were washed with PBS

and cultured in complete DMEM containing increasing concentrations of C31, ALV and CsA for 120 hours. Total RNA was extracted with the SV96 Total RNA Isolation System (Promega) and quantified by means of RT-qPCR.

PPIase enzyme assay

CypA PPIase activity was measured at 20°C by means of the standard chymotrypsin coupled assay, as previously described (Ahmed-Belkacem et al. 2016 Nat. Commun). Briefly, the assay buffer (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.8) and CypA (1900 nM stock solution) were pre-cooled to 4°C. Five µL of 50 mg/ml chymotrypsin in 1 mM HCl was added. The reaction was initiated by adding 20 µL of 3.2 mM peptide substrate (Suc-Ala-Ala-cis-Pro-Phe-pNA) in LiCl/TFE solution with rapid inversion. After mixing, the absorbance of p-nitroaniline was followed at 390 nm until the reaction was complete (1 min). CsA was used as a positive control in all measurements. The percent inhibition of CypA PPIase activity was calculated from the slopes. The values represent the mean±SD of at least two independent measurements.

Assessment of anti-HCV activity in the replicon model

Huh7.5 cells stably harboring an HCV genotype 1b bicistronic replicon (*I389-Neo/NS3-3'/5.1*) were seeded at the low density of 5 000 cells. The cells were treated for 3 days with the tested compounds diluted in complete DMEM containing 1% DMSO without

G418. Total RNA was extracted using the RNeasy 96 kit (QIAgen). HCV-SGR RNA levels were measured by means of RT-qPCR using the Taqman technology with HCV-specific primers (sense 5'-CGC CCA AAC CAG AAT ACG A-3' and antisense 5'-AGA TAG TAC ACC CTT TTG CCA GAT G-3') and probe (5'-6-FAM-CAA TGT GTC AGT CGG-TAMRA-3'). The results were normalized to GAPDH. Each data point represents the average of at least 3 replicates in cell culture. HCV-SGR RNA level reductions after treatment were assessed by comparing the level of HCV-SGR RNA in compound-treated cells to those of control cells treated with 1 % DMSO.

C. Coronavirus et cyclophilines

Notre étude sur des virus de la famille des *Flaviviridae* nous a permis de valider les SMCypI comme un outil mécanistique dans l'étude des interactions Cyps/virus. En dehors du cas de l'infection par le HCV, ces interactions sont mal comprises. Plus particulièrement, l'implication des Cyps dans le cycle de vie des CoVs semble réelle, mais les données de la littérature manquent de clarté. Cette étude nous a semblé d'autant plus intéressante que les CoVs sont à l'origine de pathologies variées, parfois graves, en l'absence de tout vaccin ou traitement antiviral.

1) Caractérisation de l'effet des SMCypI lors de l'infection par HCoV-229E

c) Relation structure/activité des SMCypI

- Choix des molécules et crible

Les SMCypI sont constituées de 4 parties (**Figure 1**). Une partie commune, une zone R1 qui se fixe dans la poche catalytique, une zone R3 qui s'insère dans la poche gardienne et une zone R2, à l'interface entre les deux poches.

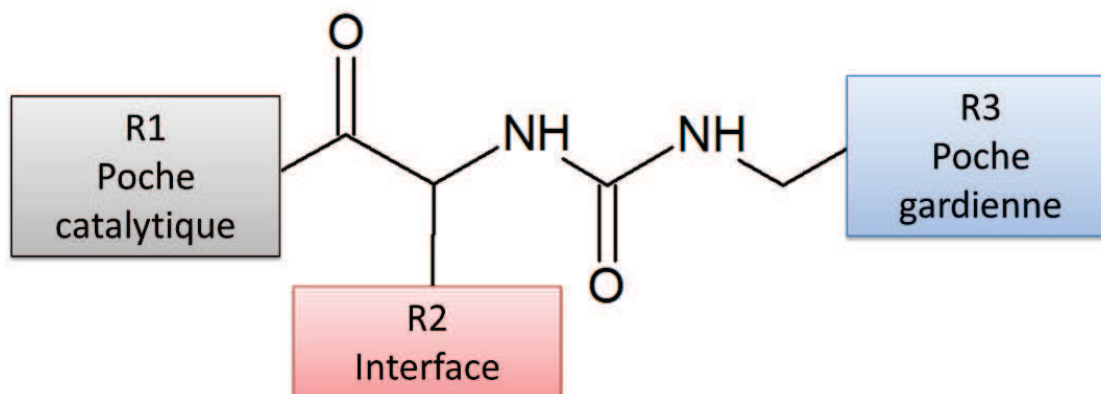


Figure 1 : Structure générale des petites molécules inhibitrices des cyclophilines – Les SMCypI sont composées d'une partie commune, représentée en noire, d'une zone R1 qui se fixe dans la poche catalytique, d'une zone R3 qui s'insère dans la poche gardienne, et d'une zone R2 à l'interface entre les deux poches.

Sur la base de leurs structures, nous avons sélectionné 31 SMCypI, qui diffèrent par leurs régions R1, R2 et R3, afin de disposer d'une vaste librairie de composés permettant d'identifier les groupements chimiques et les régions impliqués dans l'effet antiviral. Les 31 SMCypI ont été

testés à la concentration de 50 μ M pour leur aptitude à inhiber l'ECP viro-induit (A) et la production d'ARN viral intracellulaire (B) dans des cellules MRC5 infectées par HCoV-229E.

Comme le montre la **Figure 2A**, il existait une grande hétérogénéité dans l'efficacité des molécules sur l'ECP viro-induit (de 100 % d'ECP pour le F846 à 0 % d'ECP pour le F836). En revanche, deux groupes de composés se distinguaient dans l'inhibition de la quantité d'ARN viral intracellulaire (inhibition inférieure et supérieure à 100 « fold decrease ») (**Figure 2B**).

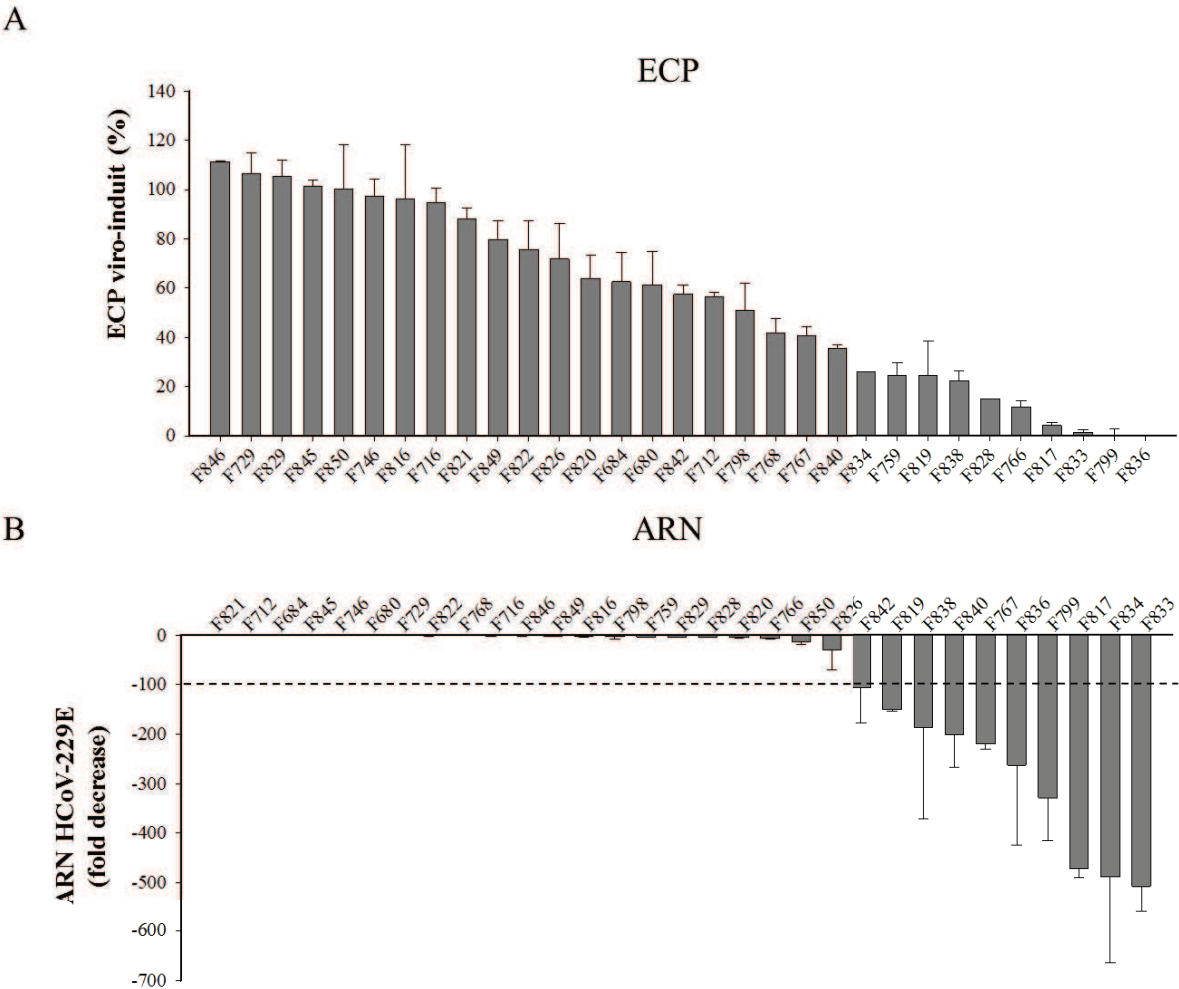
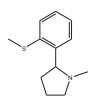
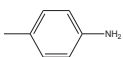
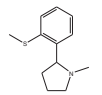
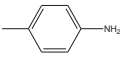
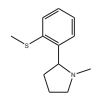
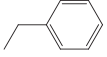
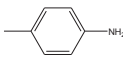
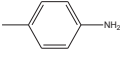
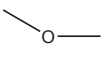
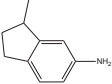
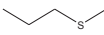
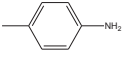


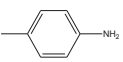
Figure 2 : Criblage anti-HCoV-229E des petites molécules inhibitrices des cyclophilines – Trente-un SMCypl ont été testés à la concentration de 50 μ M pour leur aptitude à bloquer l'ECP viro-induit (A) et la production d'ARN viral (B) du HCoV-229E dans des cellules MRC5.

- Analyse de la relation de structure / activité

Le **Tableau 1** regroupe l'ensemble des composés testés, leurs IC₅₀ sur l'inhibition de l'activité PPIase de la CypA, la protection de l'ECP et l'inhibition de la production d'ARN viral.

Tableau 1 : Noms, structures des regions R1, R2 et R3, IC₅₀ sur l'activité PPIase, protection de l'effet cytopathique viro-induit et inhibition de la production d'ARN viral par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines utilisées

Composé	R1	R2	R3	IC ₅₀ PPIase CypA (μM)	Protection ECP (%)	Inhibition ARN (fold change)
F821	Brevet en cours			> 10,0	12 ± 4	0,2 ± 0,03
F712				0,8 ± 0,1	44 ± 2	0,4 ± 0,04
F684				0,4 ± 0,1	37 ± 12	0,6 ± 0,1
F845	Brevet en cours			> 20,0	1 ± 3	0,7 ± 0,2
F746				> 20,0	3 ± 7	0,7 ± 0,2
F680				0,6 ± 0,2	39 ± 14	0,8 ± 0,1
F729				7,4 ± 6,8	6 ± 9	0,8 ± 0,1
F822	Brevet en cours			6,9 ± 2,7	24 ± 11	0,9 ± 1,1
F768	Brevet en cours			> 10,0	58 ± 6	1 ± 0,03
F716				1,2 ± 0,3	5 ± 6	1,2 ± 0,3
F846	Brevet en cours			> 20,0	11	1,3 ± 0,1

F849	Brevet en cours	$0,7 \pm 0,1$	20 ± 8	$2,1 \pm 0,9$
F816	Brevet en cours	$> 10,0$	4 ± 22	$2,9 \pm 1,6$
F798	Brevet en cours	$0,3 \pm 0,1$	49 ± 11	$3,2 \pm 5,1$
F759	  	$0,1 \pm 0,01$	76 ± 5	$3,2 \pm 0,3$
F829	Brevet en cours	$> 20,0$	6 ± 6	$3,6 \pm 1,2$
F828	Brevet en cours	$0,3 \pm 0,02$	85	$3,7 \pm 0,5$
F820	Brevet en cours	2,5	36 ± 9	$4,1 \pm 2,7$
F766	Brevet en cours	$0,4 \pm 0,1$	88 ± 3	$6 \pm 2,5$
F850	Brevet en cours	$> 20,0$	0 ± 18	$13,1 \pm 6,2$
F826	Brevet en cours	$> 10,0$	28 ± 14	$16,7 \pm 13,8$

F842	Brevet en cours	0,4 ± 0,1	43 ± 4	106,4 ± 71,3
F819	Brevet en cours	0,6 ± 0,2	76 ± 14	150,8 ± 3,7
F838	Brevet en cours	0,3 ± 0,04	78 ± 4	186,5 ± 185,0
F840	Brevet en cours	0,7 ± 0,1	64 ± 2	201,7 ± 66,3
F767	Brevet en cours	3,2 ± 1,0	59 ± 3	220,2 ± 11,1
F836	Brevet en cours	0,9 ± 0,1	102 ± 8	263,2 ± 161,9
F799	Brevet en cours	0,7 ± 0,1	100 ± 2	329,2 ± 86,6
F817	Brevet en cours	NT	96 ± 1	473,4 ± 18,2
F834	Brevet en cours	1,5 ± 0,2	74	489,0 ± 174,0
F833	Brevet en cours	NT	99 ± 1	508,6 ± 50,3

Comme le montre le tableau, aucun composé inactif sur l'activité PPIase de la CypA ne possédait d'activité antivirale significative (F821, F845, F746, F729, F822, F768, F846, F816, F829, F850, F826), ce qui laissait supposer que l'inhibition de l'activité PPIase était nécessaire à l'inhibition de l'infection.

En revanche, l'inhibition de l'activité PPIase n'était pas suffisante pour l'activité antivirale, car certains composés étaient de puissants inhibiteurs de l'activité enzymatique de la CypA mais ne bloquaient ni l'ECP viro-induit, ni la production d'ARN viral (F712, F684, F680, F716).

De manière très intéressante également, certains composés semblaient bloquer plus fortement l'ECP viro-induit que la production d'ARN viral dans les cellules infectées (C31 = F759, F828). Enfin, d'autres composés étaient de puissants inhibiteurs de l'infection, tant au niveau de l'ECP viro-induit que de l'ARN viral.

Sans pouvoir fournir ici toutes les structures des molécules non couvertes par un brevet, nous avons réalisé une relation de structure/activité des composés. Celle-ci révèle que la présence d'un groupement phényl en position R2 est critique pour l'effet antiviral. De manière encore plus surprenante, la substitution de ce groupement phényl, notamment par des atomes halogénés, augmente considérablement la capacité d'inhibition de la production d'ARN viral. Ces observations sont représentées sur la **Figure 3** ci-dessous.

Pas d'inhibition de l'activité PPIase → pas d'effet antiviral

Pas de groupement phényl en R2 → pas d'effet antiviral

Groupement phényl en R2 → inhibition de l'ECP
→ pas d'inhibition de l'ARN

Groupement phényl substitué en R2 → inhibition de l'ECP
→ inhibition de l'ARN

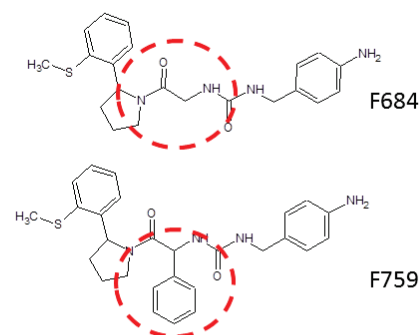


Figure 3 : Relation de structure / activité – Les conséquences des modifications des régions R1, R2 et R3 et de l'inhibition de l'activité PPIase sur l'efficacité anti-HCoV-229E sont indiquées, avec les structures des composés représentatifs de chaque groupe

A la suite de ces observations, nous avons donc corrélié les activités antivirales et anti-PPIase de l'ensemble des composés (**Figure 4**). L'activité anti-PPIase était davantage corrélée à l'inhibition de l'ECP qu'à l'inhibition de la production d'ARN. Lorsque l'on retirait de cette corrélation les composés ne possédant pas de cycle phényle en position R2, la corrélation anti-PPIase / anti-ECP était linéaire.

Ces résultats montraient que l'effet antiviral des SMCypI était très complexe et vraisemblablement modulée par différentes variables.

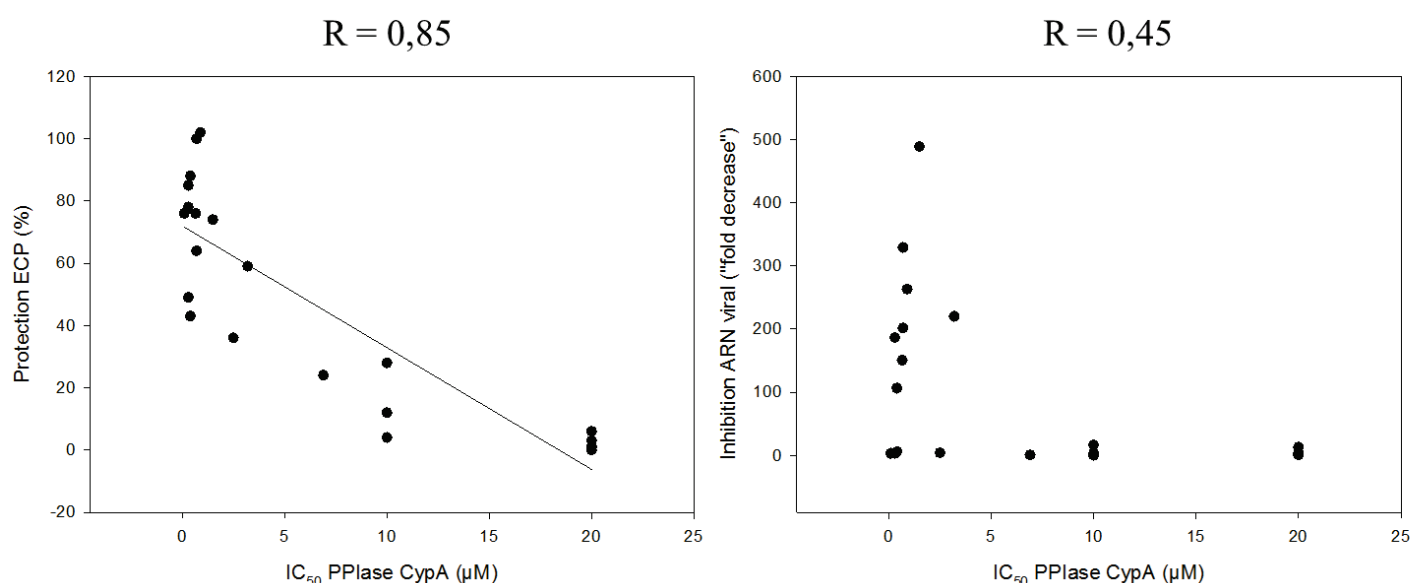


Figure 4 : Corrélation entre l'activité antivirale et l'activité anti-PPIase des petites molécules inhibitrices des cyclophilines – A gauche, corrélation entre l'inhibition de l'activité PPIase de la CypA et l'ECP viro-induit ; à droite, corrélation entre l'inhibition de l'activité PPIase de la CypA et la production d'ARN viral. Les coefficients de corrélation de Pearson sont indiqués en haut du graphe.

d) Sélection du « lead compound »

Nous avons par la suite réalisé des gammes de concentrations des meilleurs composés afin de sélectionner un « lead compound ». Les EC₅₀ sur l'inhibition de l'ECP viro-induit et les EC₁₀₀ sur l'inhibition de la production d'ARN viral ont été déterminées et nous avons identifié le F836 comme le « lead compound » de notre librairie (**Tableau 2**).

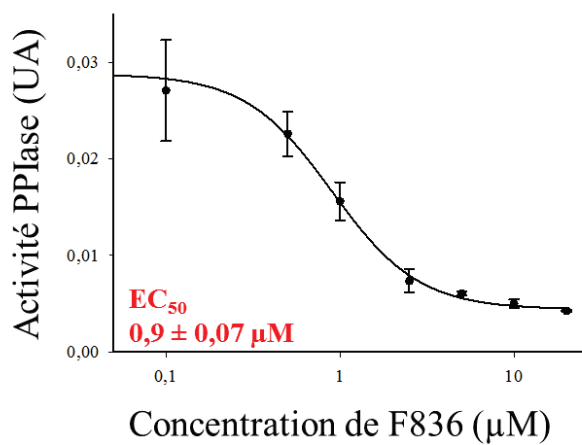
Tableau 2 : Noms, EC₅₀ sur l'inhibition de l'effet cytopathique viro-induit et EC₁₀₀ sur la production d'ARN viral du HCoV-229E par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines

Composé	EC ₅₀ ECP (μM)	EC ₁₀₀ ARN (μM)
Alisporivir	5 ± 0,3	12
F819	4,8 ± 0,8	25
F838	12,5 ± 1,8	150
F840	18,3 ± 8,6	50
F767	NT	NT
F836	4,4 ± 2,5	12
F799	12,7 ± 1,1	NT
F817	NT	NT
F834	12,4 ± 1,8	25
F833	NT	NT

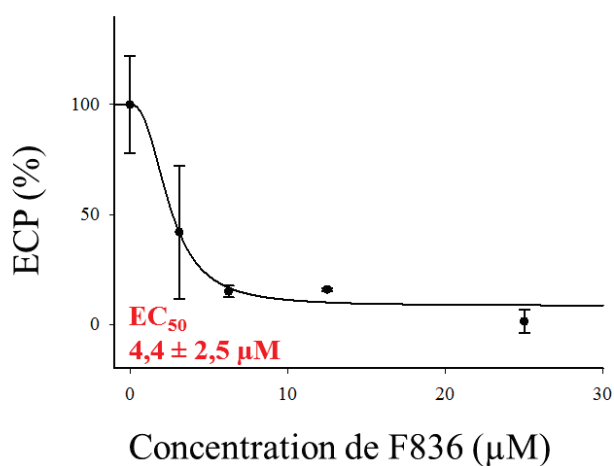
Le F836 inhibait l'ECP viro-induit du HCoV-229E avec une EC₅₀ de 4,4±2,5 μM, similaire à celle de l'ALV. Le composé exerçait son effet maximal sur la diminution de la production d'ARN viral dès 12 μM, là encore comme l'ALV. Le F836 ne présentait pas de cytotoxicité jusqu'à 50 μM, résultant en un index de sélectivité supérieur à 10 (résultats non montrés).

Les courbes d'inhibition de l'activité PPIase de la CypA, de l'ECP et de la production d'ARN viral par le F836 sont représentées sur la **Figure 5**.

PPIase



ECP



ARN

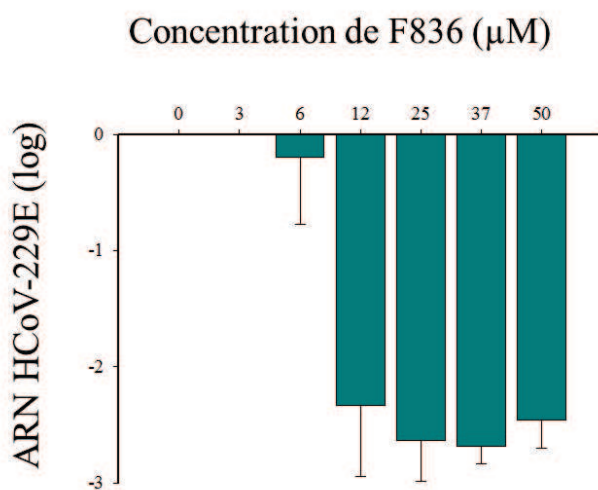


Figure 5 : Caractérisation de l'effet anti-HCoV-229E du F836 – De haut en bas, courbes représentatives d'inhibition de l'activité PPIase de la CypA, de l'ECP viro-induit et de la production d'ARN viral par le F836.

2) Recherche de l'étape du cycle viral ciblée par les petites molécules inhibitrices des cyclophilines

a) « Time-of-addition assay »

L'activité antivirale du F836 a été mesurée à la concentration de 12,5 μM , le composé étant ajouté au moment de l'infection (+ 0), ou à différents temps post-infection (**Figure 6**).

La **Figure 6** montre que dès 3 heures post-infection, le F836 perdait une grande partie de son efficacité (2 logs), suggérant une action sur une étape précoce de l'infection.

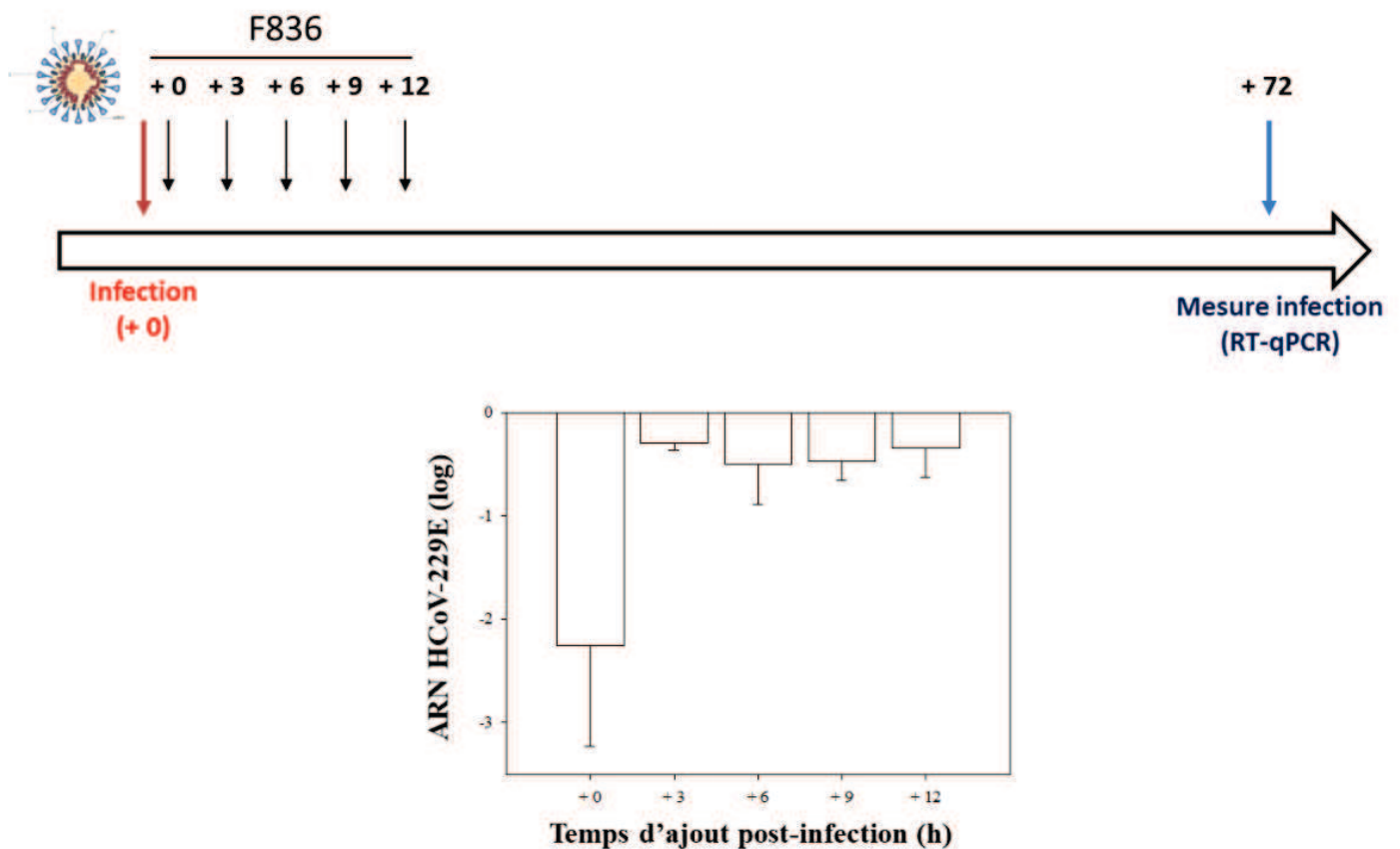


Figure 6 : « Time-of-addition assay » du F836 – Des cellules MRC5 ont été infectées par HCoV-229E à la M.O.I. de 1 et incubées pendant 72 heures en présence de 12,5 μM de F836. Le composé a été ajouté à différents temps post-infection. Le graphe représente la diminution de la production d'ARN viral à 72 heures post-infection.

b) « Time-of-removing assay »

Des cellules MRC5 ont été infectées pendant 3 heures en présence de 12,5 μM de F836, puis cultivées jusqu'à 72 heures post-infection en absence d'inhibiteur. De manière surprenante, le F836 présentait très peu d'effet antiviral lorsqu'il était présent pendant les 3 premières heures de l'infection (**Figure 7**).

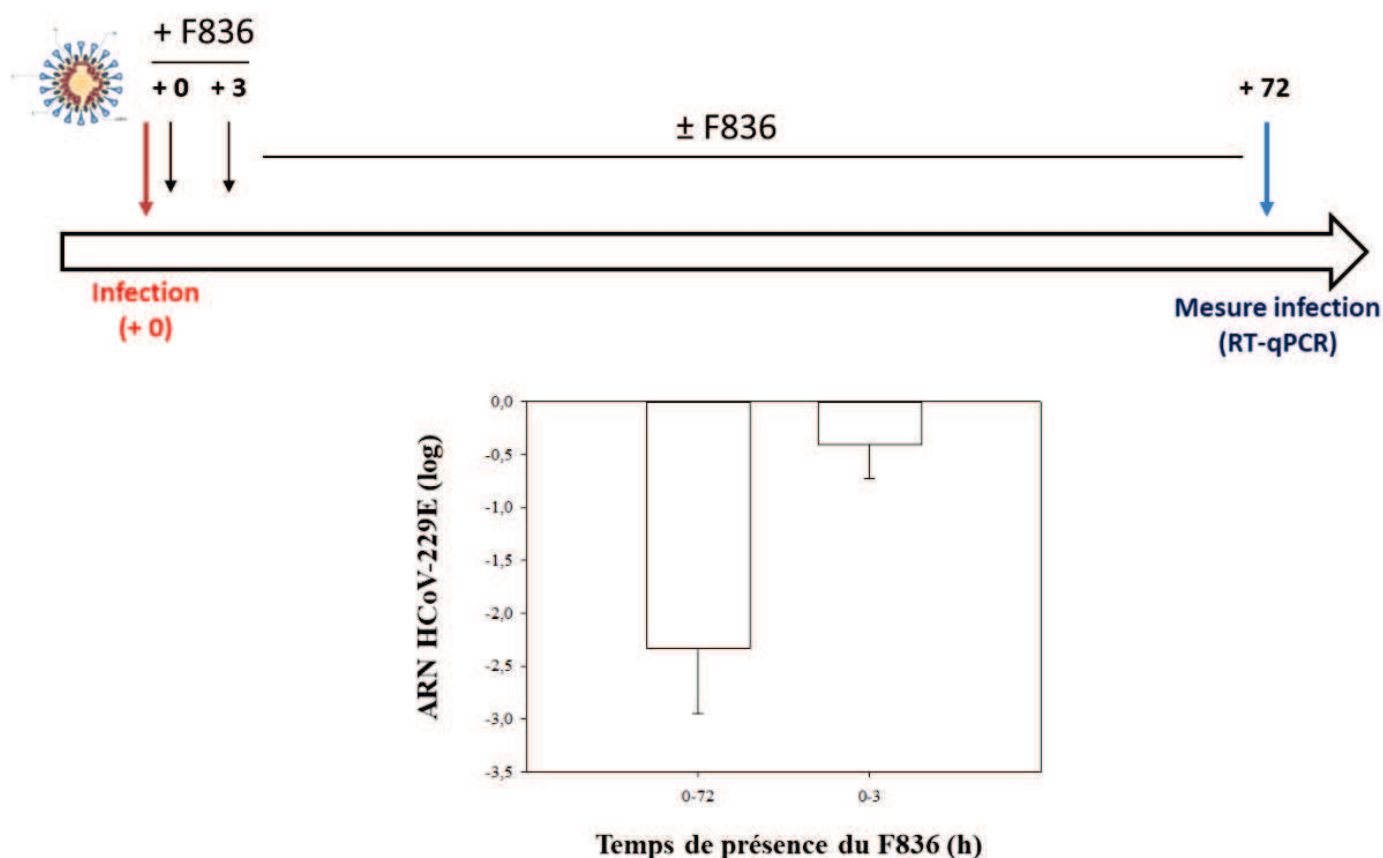


Figure 7 : « Time-of-removing assay » du F836 – Des cellules MRC5 ont été infectées pendant 3 heures à la M.O.I. de 1 par HCoV-229E en présence de 12,5 μM de F836, puis incubées pendant 69 heures supplémentaires en absence ou en présence de 12,5 μM de F836. Le graphe représente la diminution de la production d'ARN viral à 72 heures pos-infection.

c) « Entry assay »

Des cellules MRC5 ont été infectées à 4°C pendant 3 heures en présence de 50 μM de F836 puis incubées à 37°C jusqu'à 24 heures post-infection en l'absence d'inhibiteur (« Attachement »). Alternativement, des cellules MRC5 ont été infectées à 4°C pendant 3 heures afin de synchroniser l'attachement. Le F836 à la concentration de 50 μM a été ajouté au moment

du passage des cellules à 37°C (« Internalisation »). Trois heures après, le F836 a été retiré et les cellules cultivées jusqu'à 24 heures post-infection en l'absence d'inhibiteur.

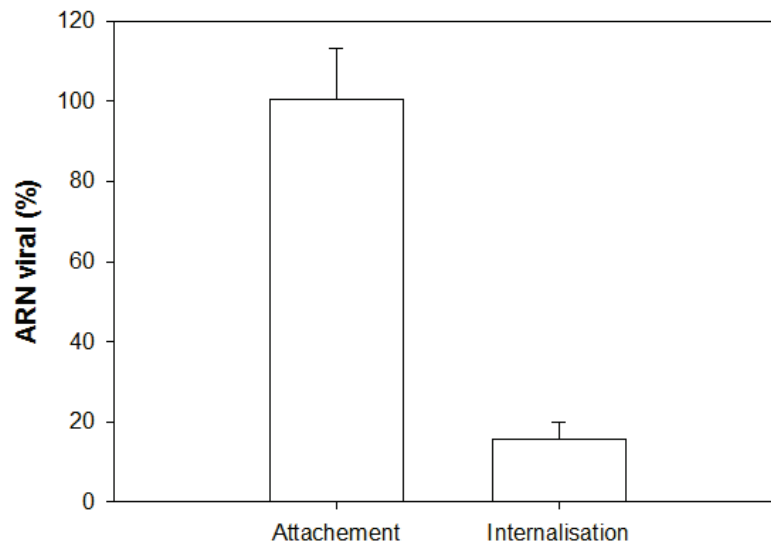
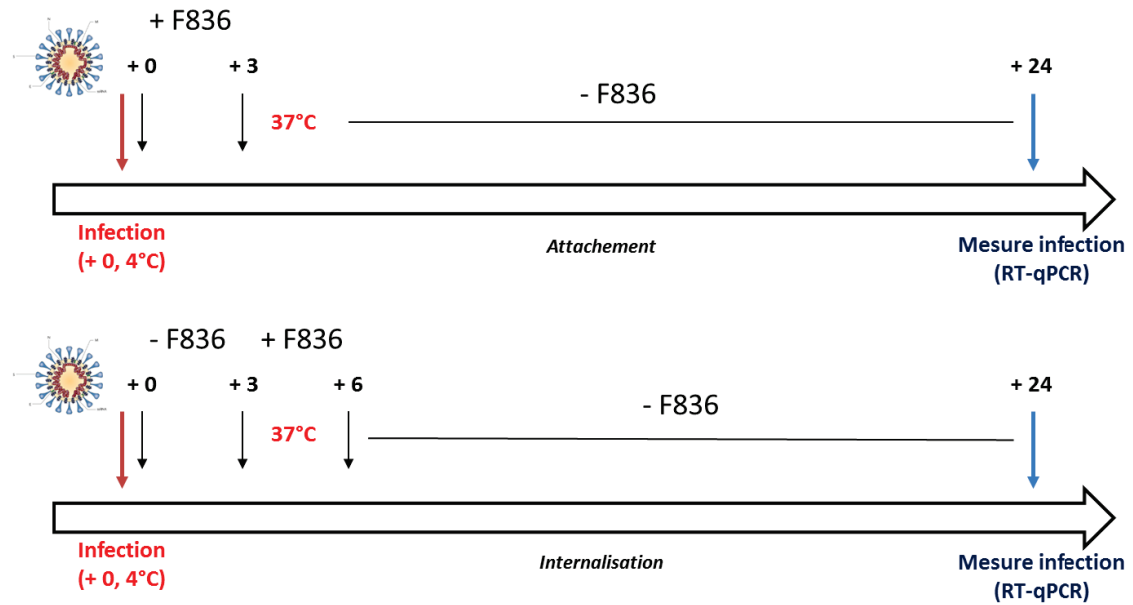


Figure 8 : « Entry Assay » du F836 – Des cellules MRC5 ont été infectées à 4°C en présence de 50 μ M de F836, puis cultivées pendant 21 heures supplémentaires en absence d'inhibiteur à 37°C (test d'attachement). Alternativement, des cellules MRC5 ont été infectées en 4°C, puis traitées par 12,5 μ M de F836 pendant 3 heures après le passage à 37°C. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 18 heures supplémentaires en l'absence d'inhibiteur (test d'internalisation). Le graphe représente la quantité d'ARN viral dans chaque condition.

Les résultats de la **Figure 8** montraient une activité antivirale 10 fois plus importante du F836 au moment de l'internalisation. Ces résultats suggèrent fortement une activité post-attachement du F836 sur l'entrée du HCoV-229E.

d) Effet antiviral à large spectre du F836 sur l'entrée des Coronavirus

L'activité antivirale du F836 a également été testée dans l'infection par le MERS-CoV (collaboration avec les Drs Jean K. Millet et Gary Whittaker, Université Cornell, New York, Etats-Unis). Des cellules Huh7 ont été infectées à la M.O.I. de 10 par le virus MERS pendant deux heures en absence ou en présence de F836, puis cultivées pendant 7 heures sans inhibiteur. L'entrée virale a été mesurée par une IF dirigée contre la protéine d'enveloppe du virus.

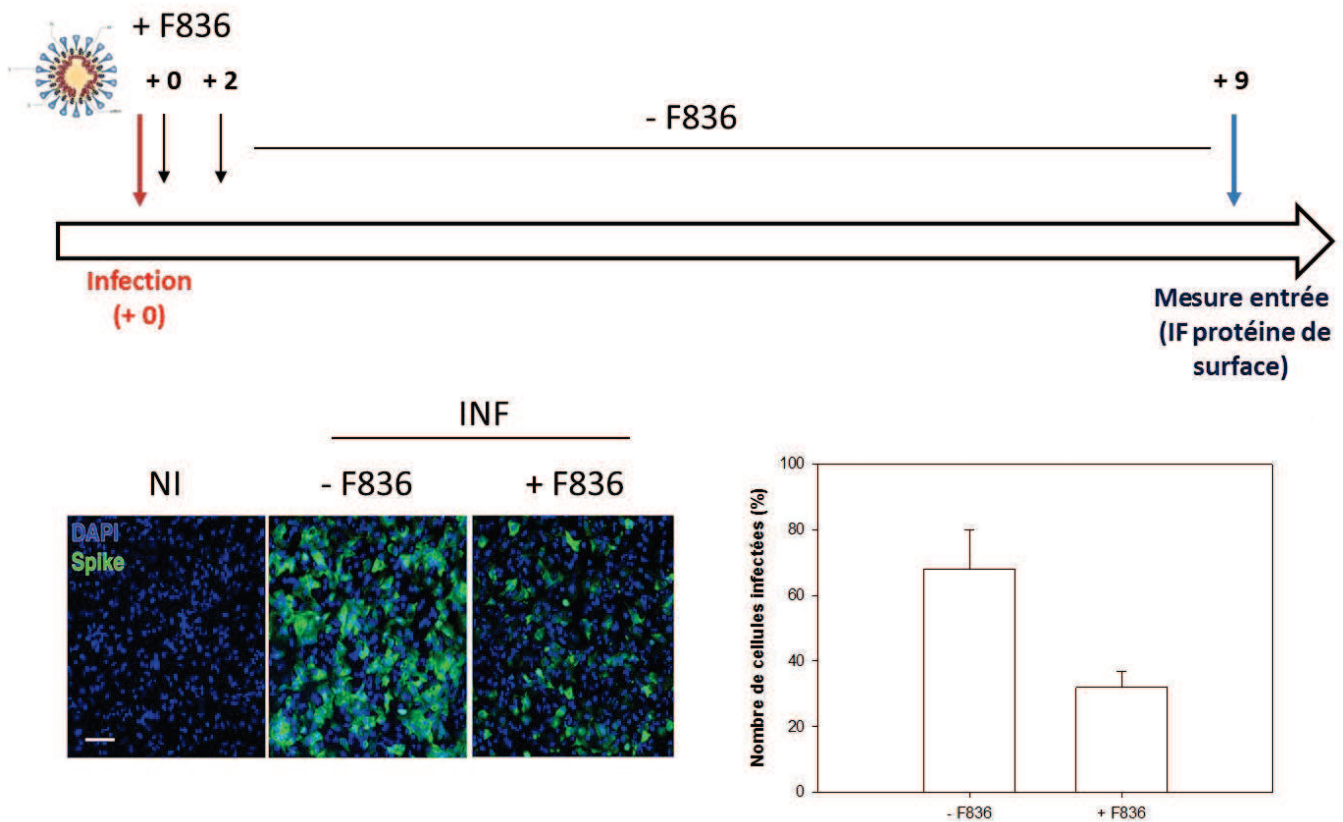


Figure 9 : Inhibition de l'entrée du MERS-CoV par le F836 – Des cellules Huh7 ont été infectées à la M.O.I. de 10 par MERS-CoV pendant 2 heures, en absence ou en présence de 50 µM de F836, puis les cellules ont été cultivées pendant 7 heures supplémentaires en absence de F836. L'infection a été mesurée par une IF dirigée contre la protéine d'enveloppe S du virus. Les photographies montrent les cellules positives (vertes) pour l'infection. Le graphique représente le pourcentage de cellules infectées en absence et en présence de F836.

La **Figure 9** montre une nette diminution du nombre de cellules Huh7 infectées en présence de 50 μ M de F836 pendant les 2 premières heures de l'infection. Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée Vero-81 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent une action antivirale à large spectre sur les infections par les HCoV et soulignent le potentiel thérapeutique de la famille de composés étudiée.

3) Identification de la cyclophiline impliquée dans l'infection par HCoV-229E

a) Etude du rôle extracellulaire des cyclophilines dans l'infection

Le F836 bloque une étape précoce de l'infection, et les Cyps ont été décrites dans la littérature comme pouvant jouer un rôle dans le milieu extracellulaire, y compris dans le contexte d'infections virales.

Une analyse par western-blot du surnageant de culture de cellules MRC5 infectées a été réalisée (**Figure 10A**).

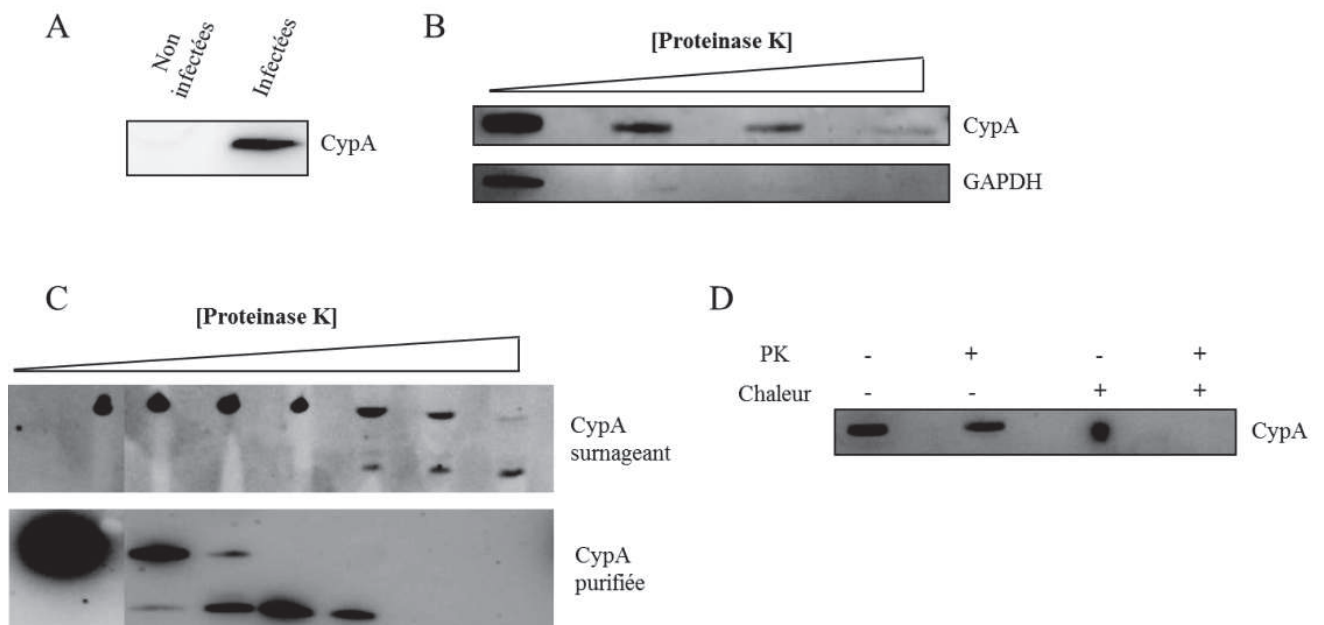


Figure 10 : Analyse biochimique de la cyclophiline A extracellulaire – A) La présence de la CypA dans le surnageant viral a été vérifiée par western-blot. B) Le surnageant viral a été soumis à une protéolyse par la PK, et le niveau d'expression de la CypA et de la GAPDH ont été étudiés par western-blot. C) La dégradation de la CypA du surnageant viral par la PK a été comparée à celle de la CypA purifiée par western-blot. D) La susceptibilité de la CypA à la protéolyse par la PK a été étudiée par western-blot avec ou sans pré-traitement du surnageant viral par la chaleur.

Cette analyse a montré que la CypA était présente dans le surnageant de culture viral en quantité importante. Le surnageant de culture viral a ensuite été incubé en présence de différentes concentrations de protéinase K. De manière intéressante, la CypA résistait davantage à la protéolyse que la GAPDH présente dans le surnageant (**Figure 10B**). La CypA présente dans le surnageant résistait également d'avantage à cette protéolyse que la CypA purifiée (**Figure 10C**). Enfin, le prétraitement du surnageant de culture viral par la chaleur augmentait l'efficacité de protéolyse de la CypA par la protéinase K (**Figure 10D**). L'ensemble de ces données indiquent que la CypA extracellulaire est localisée dans un compartiment qui la protège de l'action de la PK.

Le virus a été ultracentrifugé et les particules virales analysées par western-blot en absence ou en présence de β -mercaptoéthanol (**Figure 11**). En l'absence de β -mercaptoéthanol, la CypA a été identifiée dans les particules virales purifiées à une taille très supérieure à la taille attendue de 18 kDa (environ 50 kDa). En présence de β -mercaptoéthanol, la CypA a été détectée à la même taille ainsi qu'à sa taille attendue de 18 kDa. Ces résultats suggèrent que la CypA est en complexe au sein des particules virales.

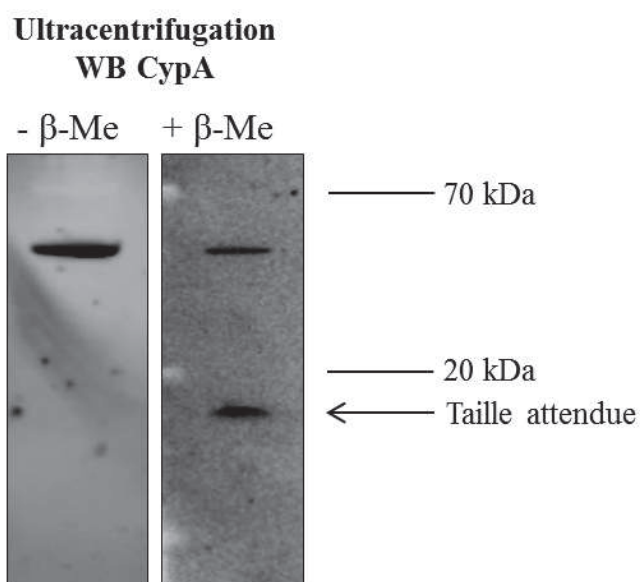


Figure 11 : Association de la cyclophiline A avec les particules virales de HCoV-229E – Le surnageant viral a été ultracentrifugé. La présence de la CypA dans le culot d'ultracentrifugation a été analysée par western-blot en conditions peu ($-\beta$ -Me) ou très ($+\beta$ -Me) dénaturantes.

Enfin, le virus HCoV-229E a été concentré et soniqué puis le « lysat » a été incubé en présence de différentes quantités de CypA purifiée. Les interactions ont été « cross-linkées » par l'ajout dans le milieu réactionnel de PFA et la CypA a été analysée par western-blot. La **Figure 12** montre qu'en présence de PFA, la CypA était détectée en monomères ainsi qu'en dimères. La dimérisation spontanée de la CypA était empêchée en présence du lysat de virus soniqué dans le milieu réactionnel, et ce même en présence de PFA. L'ajout de F836 dans le milieu réactionnel empêchait partiellement la disparition de la forme dimérique de la CypA. Ces résultats suggèrent qu'une protéine issue du lysat viral interagit avec la CypA, et que cette interaction est bloquée par le F836.

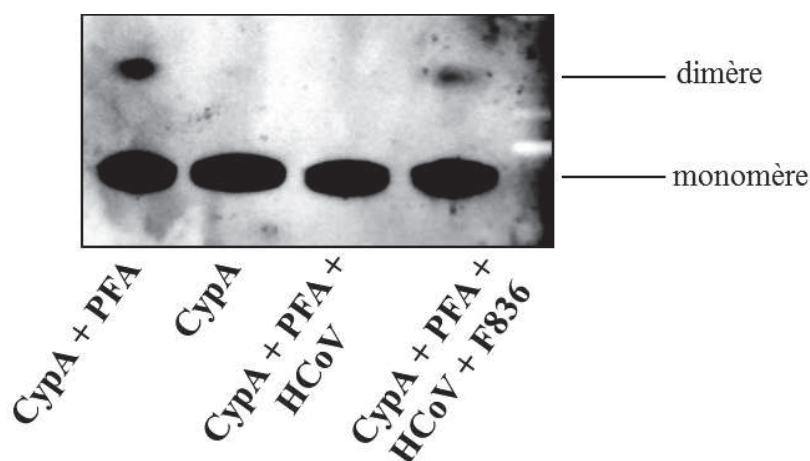


Figure 12 : Expériences de « cross-linking » – La CypA purifiée a été « cross-linkée » seule ou en présence d'un « lysat » de surnageant viral de HCoV-229E, en absence ou en présence de F836 à 50 μ M.

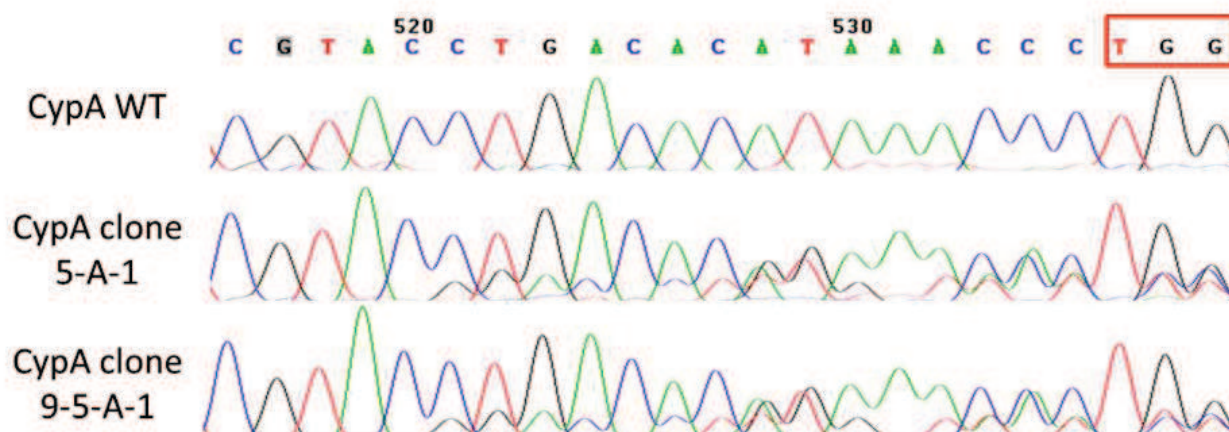
b) Génération d'une lignée cellulaire Huh7 CypA -/- par CRISPR-Cas9

Une lignée cellulaire Huh7 CypA KO a été générée afin d'étudier les conséquences de l'invalidation du gène codant cette protéine sur l'infektivité du HCoV-229E. Les clones cellulaires obtenus après isolement clonal (voir Matériels et Méthodes) ont été analysés par séquençage, génotypage et western-blot.

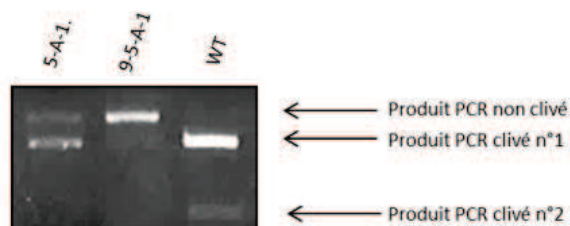
Le clone 5-A-1 (**Figure 13**) obtenu était caractérisé par un double profil en séquençage, trois bandes dans le test de génotypage précédemment décrit et une quantité de CypA diminuée par rapport aux cellules WT. Ce clone était hétérozygote pour le gène PPIA et a été utilisé pour

réaliser un nouvel isolement clonal après une seconde transfection. Le clone 9-5-A-1 obtenu était caractérisé par un double profil en séquençage, une seule bande dans le test de génotypage et une extinction de l'expression protéique de la CypA. Ce clone était KO pour le gène PPIA et sera appelé CypA KO dans la suite de ce manuscrit.

Séquençage



Génotypage



Western-Blot

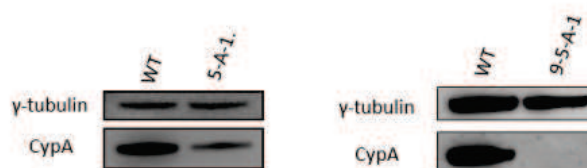


Figure 13 : Validation d'un clone CypA +/- et d'un clone CypA (-/-) KO – Les clones obtenus après isolement clonal ont été analysés par séquençage, génotypage et western-blot.

c) Rôles de la cyclophiline A dans l'infektivité du HCoV-229E

Des cellules Huh7 WT et CypA KO ont été infectées par HCoV-229E et les virus produits ont été récupérés 24 heures post-infection. Ces virus ont été utilisés pour infecter des cellules WT

pendant une heure et l'infection a été mesurée 24 heures après par IF de l'ARNdb et par RT-qPCR.

L'infection par les virus WT et CypA KO est identique dans ces conditions expérimentales (**Figure 14**), suggérant que l'association de la CypA aux particules virales n'a pas de rôle fonctionnel dans nos conditions expérimentales.

Par ailleurs, le blocage du récepteur des Cyps secrétées EMMPRIN/CD147 n'inhibait pas l'infection par HCoV-229E (**Figure 15**).

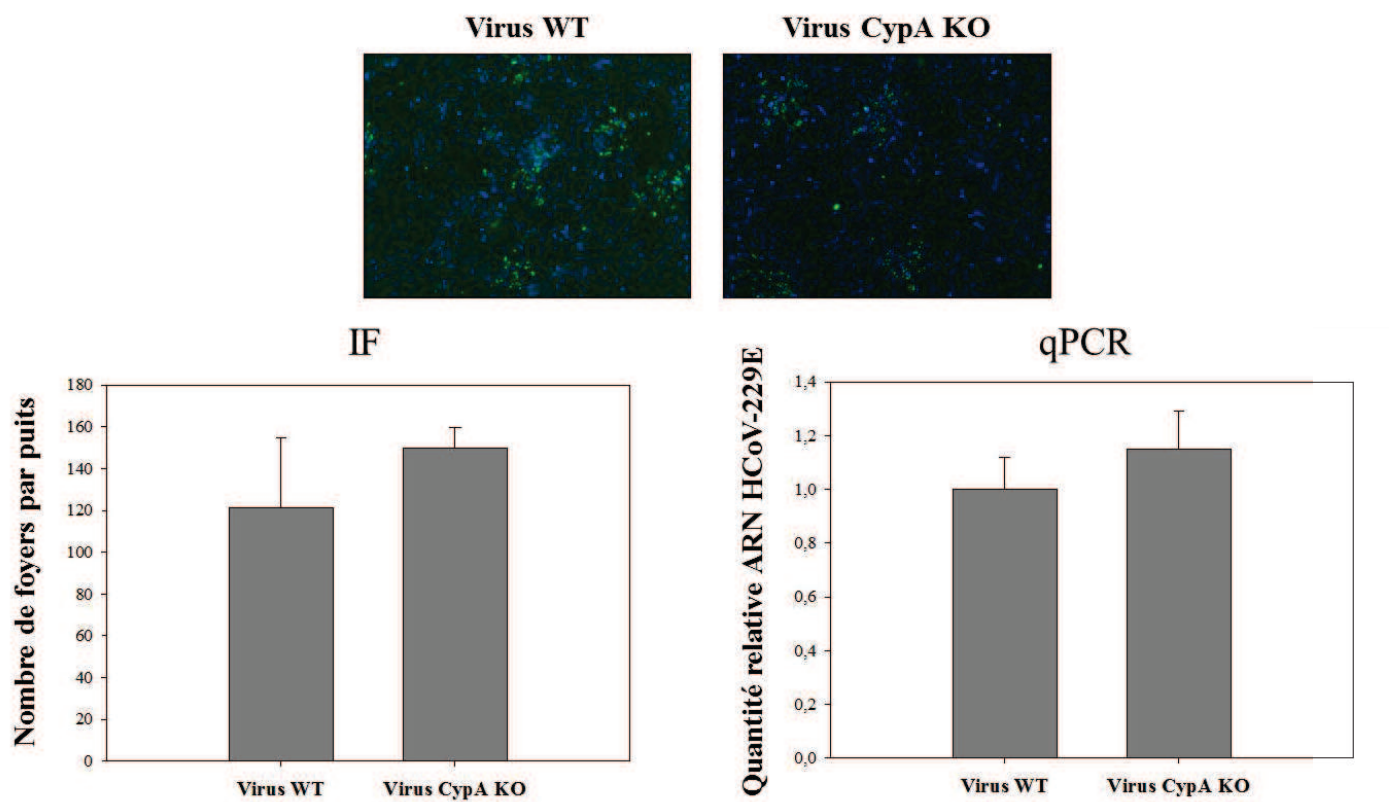


Figure 14 : Etude de l'infektivité du virus HCoV-229E produit dans des cellules Huh7 WT et CypA KO – Des cellules Huh7 WT ont été infectées par le virus HCoV-229E produit dans les cellules Huh7 WT (« Virus WT ») ou Huh7 CypA KO (« Virus CypA KO »). L'infection a été mesurée et quantifiée par une IF de l'ARNdb et par RT-qPCR.

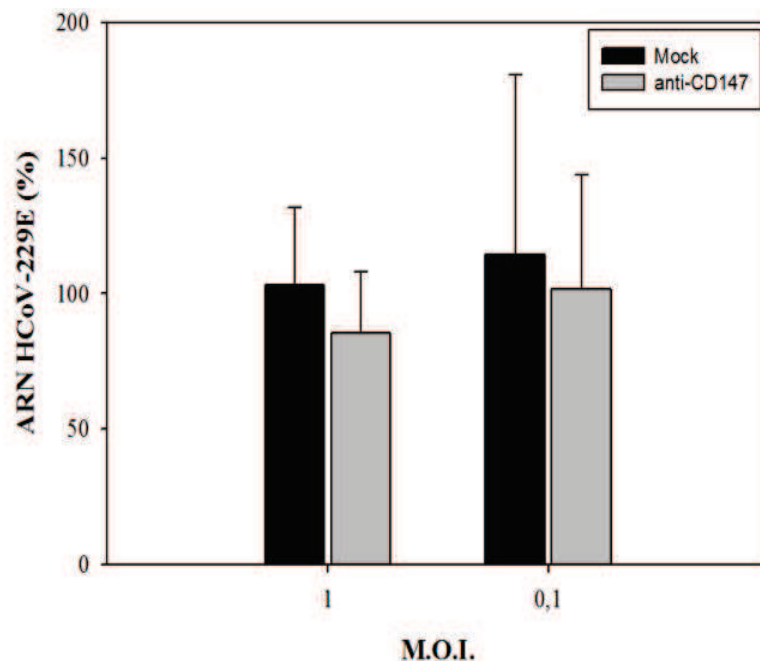


Figure 15 : Inhibition de EMMPRIN / CD147 et infection par HCoV-229E – Le récepteur des Cyps sécrétées EMMPRIN / CD147 a été bloqué par un anticorps spécifique, puis les cellules ont été infectées par HCoV-229E aux M.O.I. de 1 et 0,1. L'infection a été mesurée par RT-qPCR.

d) Rôle de la cyclophiline A dans l'infection par HCoV-229E

Les lignées Huh7 WT et CypA KO ont été infectées 1 heure à la M.O.I. de 1 par HCoV-229E et l'infection a été mesurée 24 heures après par IF de l'ARNdb et par RT-qPCR.

Les résultats de la **Figure 16** montrent une diminution du nombre de foyers d'infection dans les cellules CypA KO par rapport aux cellules WT. Ces résultats ont été confirmés par la quantification du nombre de foyers par puits. La quantification par RT-qPCR de l'ARN viral intracellulaire montrait une forte diminution (20 fois) de l'infection dans les cellules CypA KO par rapport aux cellules WT. Enfin, le F836 à la concentration de 50 μ M inhibait la quantité d'ARN viral intracellulaire de plus de 2 logs (150 fold decrease) dans les cellules Huh7 WT, tandis que son effet dans les cellules CypA KO était diminué d'un facteur 5 environ (30 fold decrease). Ces résultats suggèrent que la CypA est un facteur proviral de l'infection par HCoV-229E et qu'une partie importante de l'activité du F836 est médiée par la CypA.

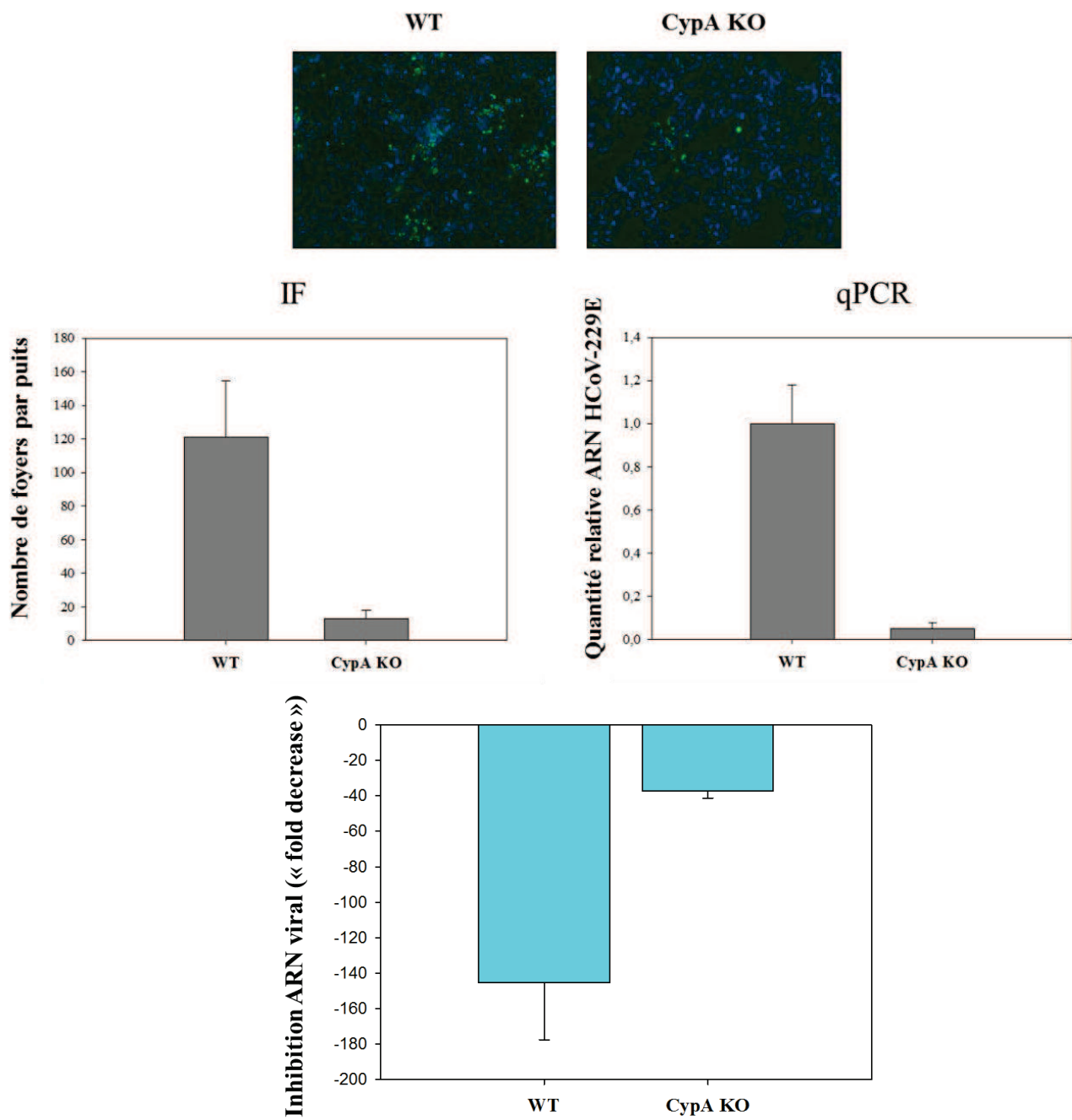


Figure 16 : Infection par HCoV-229E dans les lignées Huh7 WT et Huh7 CypA KO – Des cellules Huh7 WT et CypA KO ont été infectées par HCoV-229E, et l'infection a été mesurée par IF de l'ARNdb et par RT-qPCR. L'efficacité du F836 à la concentration de 50 μ M a été mesurée par RT-qPCR.

IV. Discussion

Les dernières années ont vu l'émergence ou la réémergence d'un nombre important de virus pathogènes. Certains ont concentré la majorité des efforts de la communauté scientifique en termes de recherche d'antiviraux. C'est notamment le cas des infections par le HIV et le HCV, qui sont aujourd'hui contrôlées (HIV) ou guéries (HCV) par des antiviraux spécifiques ayant considérablement amélioré l'espérance et la qualité de vie des patients. Bien que ces traitements représentent des succès thérapeutiques majeurs, cette recherche a pris un temps considérable ; ainsi, presque trente ans se sont écoulés entre la découverte du HCV et le développement de traitements efficaces chez presque 100 % des patients. Dans le contexte du nombre d'infections virales grevées d'une importante morbidité et mortalité, sans traitements disponibles et des risques d'émergence virale, la stratégie consistant dans le développement d'antiviraux ciblés sur un seul virus ne peut plus être la règle. Les récentes épidémies de MERS, d'Ebola ou de Zika ont montré qu'il était difficile de répondre efficacement à ces phénomènes. De plus, la recherche d'un antiviral ciblé contre une infection unique est onéreuse, et ne garantit pas un retour sur investissement industriel. Enfin, l'utilisation de DAA spécifiques se heurte souvent au développement de variants viraux résistants qui compliquent la prise en charge des patients.

Dans ce contexte, de nombreux laboratoires travaillent aujourd'hui au développement d'antiviraux à large spectre (Debing, Neyts et al. 2015). Plus particulièrement, les agents antiviraux dirigés contre l'hôte (HTA) bloquent des voies de signalisation et/ou des protéines cellulaires identifiées dans la littérature comme étant impliquées dans le cycle de vie de différents virus. Les Cyps représentent donc une cible de choix. En effet, même si les mécanismes par lesquels elles interviennent au cours de nombreuses infections virales sont mal compris, il apparaît qu'un nombre important de virus en sont dépendants. L'utilisation de CypI, capables de cibler toute cette famille de protéines, fait donc sens dans le développement d'antiviraux à large spectre.

La CsA et la SfA ont été identifiées il y a plusieurs années comme de puissants inhibiteurs de l'activité PPIase des Cyps. Cependant, leur caractère immunosuppresseur est un frein majeur à leur utilisation en clinique. Les analogues non immunosuppresseurs de ces composés, comme l'ALV, ont fait preuve de leur efficacité *in vivo* dans le cadre de la lutte contre le HCV (Flisiak,

Horban et al. 2008; Flisiak, Feinman et al. 2009), mais leur développement s'est arrêté en phase III d'essai clinique à cause d'effets secondaires sévères, non liés à leur activité anti-Cyp (Zeuzem, Flisiak et al. 2015). En outre, ces analogues sont des macromolécules, difficiles à synthétiser, qui pénètrent difficilement les membranes et exercent un effet sur un nombre important de facteurs cellulaires sans lien avec les Cyps. Enfin, ces molécules ne se fixent pas dans la poche gardienne du site actif des Cyps, qui serait le régulateur de la spécificité du substrat (Davis, Walker et al. 2010).

Au contraire de ces macrocycles, nous avons découvert et développé une famille de petites molécules inhibitrices des Cyps, ou SMCypI. Ces composés ont une masse molaire inférieure à 500 kDa et sont susceptibles de franchir plus aisément les barrières de l'organisme. De plus, leur synthèse est beaucoup plus aisée que celle des dérivés de la CsA. Au niveau structural, les résultats obtenus montrent que les SMCypI s'insèrent dans les deux poches du site actif des Cyps A et D. Ceci est un point crucial qui pourrait permettre la synthèse d'inhibiteurs isoforme-spécifiques d'une Cyp donnée. Une équipe écossaise a d'ailleurs récemment identifié de nouveaux fragments capables de se fixer dans la poche gardienne avec une meilleure spécificité d'isoforme que les molécules existantes, y compris les SMCypI (Georgiou, McNae et al. 2017).

Nos résultats de viabilité cellulaire *in vitro* montrent que les SMCypI sont 10 à 100 fois moins toxiques que la CsA et l'ALV. Le C31, composé le plus actif de notre collection sur l'activité PPIase des Cyps A, B et D, est actuellement utilisé *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique développé au laboratoire (pour ses propriétés de protecteur cellulaire liées à l'inhibition de la CypD, inhibant l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale, Panel, Ruiz et al., manuscrit en préparation). Même si la demi-vie du C31 est très courte, nous travaillons au développement de SMCypI beaucoup plus stables, comme le F818 dont la stabilité microsomale est 10 fois supérieure à celle du C31. L'ensemble de ces données font des SMCypI des candidats crédibles à un développement pharmacologique dans le futur.

Le but premier du développement des SMCypI était de disposer de molécules au potentiel antiviral à large spectre. Nous avons apporté dans ce travail la preuve de concept du potentiel à

large spectre des SMCypI sur l'infection par HIV, HCV, DENV, YFV, ZIKV, WNV, HCoV-229E, et MERS-CoV. Les SMCypI inhibent également l'infection par CHIKV, RSV et HCoV-OC43 (résultats non montrés). De manière intéressante, les EC₅₀ du C31 sur l'infection par WNV, ZIKV et HCoV-229E sont modestes (entre 30 et 60 μ M) et le composé est même inactif sur l'infection par JEV (résultats non présentés dans ce manuscrit). Ceci pourrait suggérer qu'il est utopique de croire à une utilisation pan-virale des SMCypI. Pourtant, certains de ces virus sont hautement susceptibles à des dérivés très proches du C31 (F836 pour HCoV-229E, F833 pour ZIKV). Un travail d'optimisation chimique va être mené afin de générer un composé possédant l'ensemble des critères structuraux des molécules actives sur les différents virus. Toutefois, la littérature nous apprend que les Cyps peuvent être des facteurs de restriction de certaines infections (IV, *Rotavirus* et HEV) (He, Mou et al. 2013; Wang, Zhou et al. 2014; Li, Chen et al. 2016). Un article récent a également montré que la CypA régulait négativement certaines infections par des virus à ARN en participant à l'activation de RIG-I, facteur antiviral connu (Liu, Li et al. 2017). Ces données doivent être considérées attentivement et pourraient tempérer l'idée d'une utilisation à très large spectre des SMCypI.

Hormis l'aspect thérapeutique, les SMCypI sont apparus au cours de nos recherches comme un excellent outil pour la compréhension des mécanismes par lesquels les Cyps interviennent dans le cycle de vie des virus. Nous avons, dans un premier temps, utilisé le HCV comme modèle d'étude. En effet, les interactions Cyps/HCV sont les mieux comprises parmi l'ensemble des virus. Nous avons montré que le C31 était un inhibiteur pan-génotypique du HCV comme c'était le cas des analogues de la CsA. Cent jours ont été nécessaires à l'obtention de clones résistants à de fortes concentrations en C31, ce qui témoigne d'une haute barrière génétique au développement de la résistance. Comme pour la CsA et ses dérivés non immunosuppresseurs, les mutations associées à la réduction de la sensibilité se localisaient principalement dans le domaine II de NS5A. Les substitutions amino-acidiques NS5A-D320E et Y321H réduisaient très faiblement la susceptibilité du HCV aux inhibiteurs, suggérant une fois encore un mécanisme d'action anti-HCV semblable à celui de la CsA et de ses dérivés.

Même si la structure du C31 en complexe avec la CypA n'a pu être résolue, les expériences de modélisation ont montré que le C31 possédait probablement un site de fixation dans le site actif de la CypA partiellement commun avec la CsA, malgré des modes de fixation

différents. Ces résultats sont confirmés par les expériences de FRET montrant que le C31 déplaçait la CsA du site actif de la CypA. Par ailleurs, à l'instar de la CsA et ses dérivés, le C31 rompait l'interaction entre NS5A et la CypA de manière dose-dépendante, phénomène vraisemblablement à l'origine de son effet anti-HCV.

Enfin, même si la dépendance du virus à l'activité PPIase de la CypA a été clairement démontrée (Chatterji, Bobardt et al. 2009; Yang, Robotham et al. 2010), ces deux paramètres n'ont jamais pu être finement corrélés, du fait de la disponibilité d'un nombre restreint d'analogues non immunosuppresseurs de la CsA (Ma, Boerner et al. 2006). En ce sens, notre librairie de dizaines de SMCypI est unique et permet d'étudier finement la dépendance d'un virus à l'activité PPIase des Cyps. Nous avons sélectionné de manière rationnelle 6 dérivés du C31, qui nous ont permis de trouver une forte corrélation entre l'inhibition de l'activité PPIase et le blocage de la réplication virale. Ce résultat démontre le potentiel de notre collection unique de SMCypI comme outil de compréhension du rôle des Cyps dans les cycles viraux.

Les interactions Cyps/HCV ont été étudiées de façon approfondie, de même que l'activité anti-HCV de la CsA et de ses dérivés. L'ensemble de nos données montrent que le C31 possède un mécanisme d'action anti-HCV au moins partiellement commun avec la CsA et ses analogues, malgré des structures et des modes de fixation dans le site actif des Cyps différents. Ces résultats n'ont cependant pas permis de découvrir de nouvelle fonction des Cyps dans l'infection par HCV. Elles ont toutefois le mérite de valider les SMCypI comme des molécules pertinentes pour l'étude des mécanismes par lesquels les Cyps modulent le cycle de vie d'autres virus.

A contrario, les interactions Cyps/HCoV ont été très peu étudiées et restent énigmatiques. Nous avons criblé 31 SMCypI pour leur aptitude à bloquer l'infection par HCoV-229E dans des cellules MRC5. Ce crible a laissé apparaître des disparités importantes d'efficacité entre les composés. L'analyse de la relation structure/activité a montré que la région des SMCypI située à l'interface entre les deux groupements se fixant dans les poches hydrophobe et gardienne (région R2, « linker ») était un déterminant clé de l'effet anti-HCoV-229E. L'inhibition de l'activité PPIase était nécessaire car aucun composé ne bloquant pas cette activité ne possédait d'action antivirale. En revanche, cette inhibition n'est pas suffisante, car un groupe de composés très puissants sur l'activité PPIase *in vitro* ne bloquait pas non plus l'infection. Nous avons

identifié la présence d'un groupement phényl substitué, de préférence avec des halogènes, comme nécessaire à une activité antivirale puissante. La présence d'un groupement phényl non substitué en R2 était associée à une inhibition de l'ECP viro-induit, mais pas de la quantité d'ARN viral produit. Ceci indique que nos composés sont potentiellement doués d'activités différentes et complémentaires, la protection contre l'ECP viro-induit n'étant pas nécessairement liée à une réduction de la production d'ARN viral. Cette dichotomie entre ECP et production d'ARN viral a été confirmée dans le modèle cellulaire Huh7 avec le C31 et le F712 (résultats non montrés). Ces résultats font écho à un article publié récemment (de Wilde, Falzarano et al. 2017) dans lequel les auteurs ont constaté des efficacités similaires de la CsA et de l'ALV sur l'infection par le SARS-CoV (EC_{50} d'environ 5 μ M), malgré la différence d'efficacité de ces composés sur l'activité PPIase de la CypA (environ 10 fois meilleure pour l'ALV). Cette absence de corrélation, ainsi que la relation structure/activité nous mènent à l'hypothèse que l'action des SMCypI, et *a fortiori* de la CsA et de l'ALV, peut être liée au blocage d'une interaction protéine-protéine entre la CypA et un partenaire viral et/ou cellulaire nécessaire à l'infection.

A ce stade, notre étude de relation structure/activité nous permet de conclure que les mécanismes d'action anti-HCV et anti-HCoV-229E des SMCypI sont différents. Ils suggèrent également que les mécanismes d'intervention des Cyps dans le cycle de vie de ces deux virus sont différents. Cette observation nous amène à proposer le modèle de l'« empreinte de structure/activité ». Nous proposons qu'au-delà d'un certain nombre de composés testés, un haut degré de similarité entre deux relations structure/activité témoigne d'un mécanisme d'action antivirale commun des SMCypI. Ce genre d'études, permis par la très grande librairie de composés que nous possédons (environ 900 fragments) représente un outil de recherche mécanistique d'un intérêt considérable.

Différentes gammes de concentrations de SMCypI ont été testées et nous avons identifié le F836 comme le composé le plus actif sur l'infection par HCoV-229E. Le F836 inhibe l'ECP du virus avec une EC_{50} du même ordre de grandeur que l'ALV (environ 5 μ M) malgré une IC_{50} sur l'activité PPIase des Cyps 15 fois plus élevée. De plus, le F836 réduit aussi puissamment que l'ALV la quantité d'ARN viral intracellulaire, avec une diminution de plus de 2 logs dès 12 μ M. Cela fait du F836, ou de dérivés, des candidats crédibles au développement d'une thérapeutique anti-HCoV, d'autant que les dernières expériences de caractérisation montrent un effet antiviral

sur MERS-CoV (β -HCoV, groupe C), virus éloigné du HCoV-229E (α -HCoV) au sein du genre *Coronavirus*.

Le fait qu'un de nos SMCypI puisse exercer une action antivirale aussi puissante que l'ALV peut paraître surprenant, même si nous avons montré l'absence de corrélation avec l'activité PPIase. Des données préliminaires du laboratoire montrent également l'absence de corrélation dans le cas des infections par RSV et ZIKV. De manière intéressante, la CsA et l'ALV n'ont pas d'activité antivirale dans ces deux modèles, alors que certains SMCypI diminuent ces infections de presque 3 logs. Ces résultats illustrent la grande complexité qui existe dans les interactions Cyps/virus, ainsi que l'apport des SMCypI par rapport à la CsA et ses dérivés non immunosuppresseurs.

Nous avons identifié l'étape du cycle viral bloquée par le F836 par des expériences de « time-of-addition assay ». Dès 3 heures post-infection, le F836 ne possédait plus d'activité antivirale, suggérant fortement l'inhibition d'une phase précoce de l'infection. Un article récent (Pfefferle, Schopf et al. 2011) suggère un blocage de la réplication au sens strict du SARS-CoV par la CsA, comme en témoigne son activité antivirale dans un modèle de réplicon non infectieux. Pourtant, les auteurs ne sont pas parvenus à distinguer si l'inhibition par la CsA était médiée par les Cyps ou par l'inhibition de NFAT. En effet, ces auteurs ont montré que le SARS-CoV était dépendant de la translocation nucléaire de NFAT pour répliquer. Des expériences de « time-of-addition assay » supplémentaires que nous avons générées confirment ces données, car contrairement au F836, la CsA conservait toute son activité antivirale jusqu'à 12 heures post-infection. Ce phénomène semblait bien lié à l'inhibition de NFAT car l'ALV perd, comme le F836, 2 logs d'efficacité entre 0 et 3 heures post-infection.

Des expériences de « time-of-removing assay » ont ensuite été effectuées avec le F836. Nous avons été surpris d'observer que, dans les 3 premières heures de l'infection, le F836 n'exerçait pas d'effet, ce qui semble contradictoire avec le résultat du « time-of-addition assay ». Nous avons alors émis l'hypothèse que le composé bloquait une étape post-attachement. Ce qui expliquerait qu'après le retrait du composé à 3 heures post-infection, le virus adsorbé soit rentré. L'infection étant mesurée 72 heures plus tard, il est logique d'imaginer que le virus traité 3 heures par le F836 ait « rattrapé » son retard sur le virus traité en conditions contrôles. Nous

avons mené ces expériences sur un temps plus court (24 heures post-infection) avec une concentration plus importante de F836 (50 μ M). Surtout, nous avons fait varier la température afin de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse. Lorsque le F836 a été ajouté pendant 3 heures à 4°C (condition « Attachement »), le F836 a exercé un effet antiviral dix fois moins important que lorsqu'il était ajouté à 37°C pendant les 3 heures qui suivaient la synchronisation de l'attachement à 4°C. Ces résultats suggèrent fortement une action du F836 au moment de l'internalisation des particules virales et/ou de la décapsidation. De tels mécanismes impliquant les Cyps ont déjà été décrits : ainsi, la CypB localisée au niveau de la membrane plasmique a été rapportée comme induisant un changement conformationnel de la protéine de capsid des HPV-16 et 18, permettant la pénétration de la particule virale dans la cellule (Bienkowska-Haba, Patel et al. 2009). Des expériences de « time-of-removing assay » du F836 ont été menées sur le MERS-CoV, et le HCoV-OC43 (résultats non montrés). Les résultats montrent que l'ajout du F836 pendant les 2 premières heures de l'infection suffisait à observer un effet antiviral, indiquant que le F836 exerce son effet anti-HCoVs à large spectre *via* une inhibition de l'entrée. Ces résultats ont été obtenus dans quatre types cellulaires différents (MRC5 pour HCoV-229E, Huh7 et Vero-81 pour MERS-CoV et HRT-18 pour HCoV-OC43), suggérant un rôle conservé d'une Cyp dans l'entrée des virus du genre *Coronavirus*.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle des Cyps dans l'infection par HCoV-229E. La CypA est encapsidée par de nombreux virus, notamment par le HIV et le SARS-CoV (Pushkarsky, Zybarth et al. 2001; Chen, Mi et al. 2005). De plus, le blocage du récepteur des Cyps secrétées EMMPRIN / CD147 inhibe l'infection par ces deux virus. La CypB serait également incorporée par le virus de la rougeole (MeV, « Measles Virus ») (Watanabe, Yoneda et al. 2010). Nous avons mis en évidence par western-blot la présence de CypA dans le surnageant de culture de cellules MRC5 infectées par HCoV-229E. Cette infection se caractérisant par une importante lyse cellulaire, la présence de la CypA dans le surnageant ne témoignait pas nécessairement d'un rôle fonctionnel. Les expériences de protéolyse par la protéinase K ont montré que la CypA résistait davantage à la dégradation que d'autres protéines présentes dans le surnageant, la GAPDH par exemple. Nous avons constaté que cette protection était levée lorsque le virus est préalablement chauffé, laissant penser que la CypA est protégée par un compartiment sensible à la chaleur. La CypA a été détectée par western-blot dans un culot d'ultracentrifugation

de surnageant viral, montrant qu'elle peut être associée aux virions. Cependant, la CypA a été détectée à une taille supérieure à sa taille attendue dans le culot d'ultracentrifugation (environ 50 kDa au lieu de 18 kDa), phénomène en partie annulé en conditions dénaturantes, suggérant fortement que la CypA est présente sous forme de complexes au niveau des particules virales. Les expériences de pontage ont enfin montré que la CypA pouvait se dimériser spontanément, sauf en présence d'un lysat de particules virales soniquées. Nous faisons ici l'hypothèse que la dimérisation de la CypA est empêchée par un interactant qui pourrait être une protéine structurale du HCoV-229E. La dimérisation étant retrouvée en présence de F836, nous suggérons que ce SMCypI perturbe l'association de la CypA avec son partenaire putatif.

Nous avons étudié le rôle extracellulaire des Cyps dans l'infection par HCoV-229E. Pour cela, les conséquences de l'invalidation de la CypA sur l'infectivité du virus ont été analysées. L'utilisation de siRNA dans l'étude des interactions Cyps/HCoVs est soumise à controverse. En effet, de Wilde et al. n'ont pas montré d'effet anti-SARS-CoV de siRNA dirigés contre les Cyps A et B, semblant indiquer une activité antivirale de la CsA CypA-indépendante (de Wilde, Zevenhoven-Dobbe et al. 2011). En revanche, Carbajo-Lozoya et al. ont montré un effet antiviral de l'ALV dans l'infection par HCoV-NL63, ainsi qu'une diminution de l'infection de cellules shCypA, suggérant que le « silencing » de de Wilde *et al.* n'était pas assez fort pour observer un effet sur l'infection par SARS-CoV (Carbajo-Lozoya, Ma-Lauer et al. 2014). Enfin, von Brunn *et al.* ont décrit une dépendance du HCoV-229E à la CypA dans des lignées shCypA ainsi qu'une abolition du phénotype par un plasmide codant la protéine délétée (von Brunn, Ciesek et al. 2015). Dans ce contexte, nous avons décidé de générer des KO définitifs de la CypA.

La technologie CRISPR/Cas9 a émergé comme une stratégie de choix pour la compréhension du rôle d'une protéine donnée lors d'une infection virale, malgré quelques écueils liés à cette technique (risque de compensation génique, dérive cellulaire liée à l'isolement clonal notamment). Dans un futur proche, une librairie de *Lentivirus* sera utilisée au laboratoire afin d'obtenir des clones cellulaires KO pour les 17 Cyps, car il est arbitraire de se concentrer sur une Cyp plutôt que d'autres, même si notre choix initial a été guidé par les résultats publiés suggérant une association de la CypA aux particules virales. Nous avons choisi le modèle de la lignée cellulaire immortalisée de carcinome hépatocellulaire Huh7 pour ces expériences. En effet, l'obtention de clones cellulaires KO nécessite une phase d'isolement clonal, rendant impossible

l'utilisation des cellules MRC5, diploïdes et donc sénescents après un nombre restreint de passages. Ceci peut poser la question de la pertinence d'utiliser une lignée hépatique dans l'étude de l'infection par un virus responsable de rhinites. Pourtant, et pour une raison qui reste à déterminer, les cellules Huh7 ont été montrées comme étant hautement susceptibles à l'infection par un nombre très importants de virus, notamment respiratoires (Freymuth, Vabret et al. 2005). De surcroît, la majorité des travaux s'intéressant aux relations Cyps/HCoVs ont été effectués dans ce type cellulaire (Pfefferle, Schopf et al. 2011; Carbajo-Lozoya, Ma-Lauer et al. 2014).

Malgré l'association de la CypA aux particules virales du HCoV-229E que nous avons observée, nous n'avons pas constaté de diminution de l'infectivité du virus produit dans les cellules CypA KO par rapport au virus WT. Cela suggère que l'association de la CypA à la particule virale ne joue pas un rôle fonctionnel important dans l'entrée du virus. Il est envisageable que la CypA participe, avec la protéine virale N, (dont l'interaction directe a été montrée dans le cas du SARS-CoV, (Luo, Luo et al. 2004)) à l'empaquetage des nouveaux génomes au moment de la sortie du virus, ce qui aurait pour conséquence son incorporation dans les virions. De la même manière, nous n'avons pas observé d'effet antiviral du blocage du récepteur des Cyps EMMPRIN/CD147 par un anticorps spécifique décrit dans la littérature (Song, Zhang et al. 2011), comme cela est le cas au cours des infections par le HIV et le SARS-CoV par exemple.

Les cellules CypA KO se sont révélées beaucoup moins susceptibles à l'infection que les cellules WT, suggérant un rôle proviral de la CypA intracellulaire. En effet, nous avons montré une diminution significative de l'efficacité du F836 dans les cellules CypA KO par rapport aux cellules WT, suggérant que la majeure partie de l'effet du F836 passe par une inhibition de la CypA, même si nous n'avons pas montré un rôle direct de la CypA intracellulaire dans l'entrée du virus.

La CypA pourrait donc jouer un rôle dans l'entrée du virus, par un mécanisme qui reste à déterminer dans des études futures, d'autant que l'entrée du HCoV-229E dans la cellule est un mal comprise et relativement peu étudiée. Il a été suggéré que l'entrée du HCoV-229E se produisait par endocytose caveoline-dépendante, après fixation du virus sur son récepteur CD13 au niveau de radeaux lipidiques (Nomura, Kiyota et al. 2004). Toutefois, une étude récente a

montré que les souches cliniques de HCoV-229E entraient par fusion à la membrane plasmique et non par fusion à la membrane de l'endosome. Dans ce modèle, la protéase transmembranaire TMPRSS2 activait la protéine de surface du virus pour permettre ce processus endosome-indépendant (Shirato, Kanou et al. 2017). L'adaptation de cette souche clinique après 20 passages en culture cellulaire la rendait dépendante de la voie endosomale et TMPRSS2-indépendante. De manière intéressante, cette même équipe a montré trois ans plus tôt une absence d'expression, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, de TMPRSS2 dans les cellules MRC5 (Shirato, Kawase et al. 2013). Il est donc envisageable que la souche adaptée à la culture cellulaire que nous utilisons entre dans la cellule par la voie endosomale. Nous nous sommes procuré les souches cliniques et adaptées afin de tester leur susceptibilité au F836 et leur capacité à infecter les cellules Huh7 WT et CypA KO.

Dans des expériences préliminaires, nous avons tenté d'inverser le phénotype observé dans les cellules CypA KO par la transfection d'un plasmide codant la CypA. Malgré un niveau d'expression égal à celui des cellules WT en western-blot, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'infection (résultats non montrés). Ce résultat nous amène à douter de la spécificité du phénomène que nous observons, et ce même si le F836 perdait de l'efficacité dans les cellules CypA KO et si l'importance de la CypA dans l'infection par HCoV-229E a été rapportée (von Brunn, Ciesek et al. 2015). Si nos observations sont bel et bien spécifiques, nous faisons l'hypothèse que la CypA apportée en *trans* ne possède pas la localisation subcellulaire nécessaire à son rôle proviral, ou qu'elle n'a pas été soumise aux mêmes modifications post-traductionnelles que la CypA endogène.

Nous nous sommes également intéressés au rôle d'autres Cyps dans l'infection par HCoV-229E. De la même manière que pour la CypA, nous avons généré des cellules CypB et CypD KO. De manière surprenante, les cellules CypD KO se sont montrées beaucoup plus susceptibles à l'infection que les cellules WT. Cette augmentation de l'infection était fonctionnelle car les virus produits dans les cellules CypD KO étaient infectieux. Cela montre la difficulté d'étudier précisément le mécanisme d'action d'un composé qui cible vraisemblablement plusieurs, si ce n'est tous les membres de la famille des Cyps. Malgré cela, l'effet global du F836 est antiviral, alors même qu'il semble que l'effet antiviral de la CypD soit plus fort que l'effet proviral de la CypA. Cela peut s'expliquer soit parce que l'action antivirale

de la CypD n'est pas médiée par son site actif, soit parce qu'il existe une ou plusieurs autres Cyps provirales.

En plus d'étudier le rôle des Cyps dans le cycle de vie de HCoV-229E, nous avons étudié les conséquences de l'infection sur l'expression des Cyps. Vingt-quatre heures après l'infection, les Cyps sont peu régulées par l'infection au niveau transcriptionnel. De manière notable, l'expression protéique de la CypA était drastiquement diminuée après l'infection. Compte-tenu du rôle proviral que nous lui supposons, cette extinction apparaît comme une réponse cellulaire antivirale à l'infection. D'ailleurs, des résultats non présentés ont montré une augmentation transcriptionnelle très forte de la CypD aux temps tardifs de l'infection (48 et 72 heures) dans les cellules MRC5 et Huh7, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique. Or, nos résultats sur les cellules CypD KO ont montré que la CypD pourrait être un facteur de restriction à l'infection par HCoV-229E. Là encore, cette augmentation semble être une réponse antivirale initiée par la cellule.

L'ensemble de ces résultats montre que le rôle des Cyps dans les infections virales, à l'exception peut-être du HCV, est multifactoriel et extrêmement complexe. D'autres études seront nécessaires pour comprendre plus en détail le mode d'action anti-HCoV-229E du F836, ainsi que les mécanismes par lesquels l'ensemble des Cyps modulent le cycle de vie des HCoVs.

V. Conclusion générale

Nous avons développé une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines, non peptidiques, non immunosuppressives, se fixant dans les deux poches du site actif des cyclophilines, et possédant un large spectre antiviral. La caractérisation de l'activité anti-*Flaviviridae* de ces composés a permis de démontrer qu'ils sont un outil mécanistique pertinent dans l'étude des mécanismes par lesquels les cyclophilines modulent le cycle de vie des virus. Le mécanisme d'action des SMCypI dans l'infection par les *Coronavirus* est plus obscur, mais ne bénéficie pas de toutes les données de la littérature qui étaient disponibles pour le virus de l'hépatite C, notamment grâce aux caractérisations approfondies de l'activité anti-HCV de la cyclosporine A et de ses analogues non immunosuppresseurs. En revanche, les SMCypI nous ont permis de découvrir un découplage entre les inhibitions de l'activité PPIase des cyclophilines et l'infection, un mécanisme d'action original dans l'entrée virale, et des rôles vraisemblablement multifactoriels des cyclophilines dans le cycle de vie du HCoV-229E.

Les SMCypI posséderont assurément un avenir dans l'étude des liens entre les cyclophilines et d'autres virus. Les études en cours au laboratoire montrent qu'aucun virus n'utilise ces protéines de la même manière. La caractérisation de l'activité antivirale des SMCypI pourra permettre, à terme, d'appréhender dans leur globalité les interactions entre cyclophilines et virus. La compréhension de ces mécanismes complexes aidera au développement rationnel d'inhibiteurs à très large spectre, dont l'utilité clinique semble évidente dans le contexte d'émergence et de réémergence de maladies virales.

VI. Références bibliographiques

- Ahmed-Belkacem, A., L. Colliandre, et al. (2016). "Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities." Nat Commun **7**: 12777.
- Al-Tawfiq, J. A. and Z. A. Memish (2017). "Update on therapeutic options for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)." Expert Rev Anti Infect Ther **15**(3): 269-275.
- Anderson, L. J., K. Lin, et al. (2011). "Inhibition of cyclophilins alters lipid trafficking and blocks hepatitis C virus secretion." Virology **8**: 329.
- Azhar, E. I., S. A. El-Kafrawy, et al. (2014). "Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus." N Engl J Med **370**(26): 2499-2505.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." Nature **434**(7033): 658-662.
- Barrangou, R. and L. A. Marraffini (2014). "CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity." Mol Cell **54**(2): 234-244.
- Barrows, N. J., R. K. Campos, et al. (2016). "A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection." Cell Host Microbe **20**(2): 259-270.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, et al. (2013). "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." Nat Rev Microbiol **11**(7): 482-496.
- Beigel, J. H., J. Voell, et al. (2018). "Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from transchromosomal cattle: a phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study." Lancet Infect Dis.
- Bienkowska-Haba, M., H. D. Patel, et al. (2009). "Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection." PLoS Pathog **5**(7): e1000524.
- Bienkowska-Haba, M., C. Williams, et al. (2012). "Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry." J Virol **86**(18): 9875-9887.
- Billich, A., F. Hammerschmid, et al. (1995). "Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions." J Virol **69**(4): 2451-2461.
- Blaising, J., P. L. Levy, et al. (2013). "Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking." Antiviral Res **100**(1): 215-219.
- Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." J Virol **80**(14): 6964-6972.
- Bobardt, M., S. Hopkins, et al. (2013). "HCV NS5A and IRF9 compete for CypA binding." J Hepatol **58**(1): 16-23.
- Borel, J. F., F. Di Padova, et al. (1990). "Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). I. Introduction." Pharmacol Rev **41**(3): 239-242.

- Bosco, D. A., E. Z. Eisenmesser, et al. (2002). "Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5247-5252.
- Bronnimann, M. P., C. M. Calton, et al. (2016). "Furin Cleavage of L2 during Papillomavirus Infection: Minimal Dependence on Cyclophilins." J Virol **90**(14): 6224-6234.
- Burse, M., J. Shi, et al. (2017). "Cyclophilin A potentiates TRIM5alpha inhibition of HIV-1 nuclear import without promoting TRIM5alpha binding to the viral capsid." PLoS One **12**(8): e0182298.
- Carbajo-Lozoya, J., Y. Ma-Lauer, et al. (2014). "Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including Alisporivir." Virus Res **184**: 44-53.
- Carbajo-Lozoya, J., M. A. Muller, et al. (2012). "Replication of human coronaviruses SARS-CoV, HCoV-NL63 and HCoV-229E is inhibited by the drug FK506." Virus Res **165**(1): 112-117.
- Castro, A. P., T. M. Carvalho, et al. (2003). "Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles." J Virol **77**(16): 9052-9068.
- Catanese, M. T., K. Uryu, et al. (2013). "Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(23): 9505-9510.
- Chan, J. F., K. H. Chan, et al. (2013). "Differential cell line susceptibility to the emerging novel human betacoronavirus 2c EMC/2012: implications for disease pathogenesis and clinical manifestation." J Infect Dis **207**(11): 1743-1752.
- Chatterji, U., M. Bobardt, et al. (2009). "The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication." J Biol Chem **284**(25): 16998-17005.
- Chatterji, U., M. Bobardt, et al. (2015). "Cyclophilin and NS5A inhibitors, but not other anti-hepatitis C virus (HCV) agents, preclude HCV-mediated formation of double-membrane-vesicle viral factories." Antimicrob Agents Chemother **59**(5): 2496-2507.
- Chatterji, U., M. D. Bobardt, et al. (2010). "Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes." J Gen Virol **91**(Pt 5): 1189-1193.
- Chen, J., S. Chen, et al. (2015). "Cyclophilin J is a novel peptidyl-prolyl isomerase and target for repressing the growth of hepatocellular carcinoma." PLoS One **10**(5): e0127668.
- Chen, Z., L. Mi, et al. (2005). "Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus." J Infect Dis **191**(5): 755-760.
- Chiramel, A. I., L. Banadyga, et al. (2016). "Alisporivir Has Limited Antiviral Effects Against Ebola Virus Strains Makona and Mayinga." J Infect Dis **214**(suppl 3): S355-S359.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-362.
- Ciesek, S., E. Steinmann, et al. (2009). "Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A." Hepatology **50**(5): 1638-1645.

- Coelmont, L., X. Hanouille, et al. (2010). "DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A." PLoS One **5**(10): e13687.
- Coelmont, L., S. Kaptein, et al. (2009). "Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **53**(3): 967-976.
- Colombani, P. M., A. Robb, et al. (1985). "Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes." Science **228**(4697): 337-339.
- Damaso, C. R. and N. Moussatche (1998). "Inhibition of vaccinia virus replication by cyclosporin A analogues correlates with their affinity for cellular cyclophilins." J Gen Virol **79** (Pt 2): 339-346.
- Davis, T. L., J. R. Walker, et al. (2010). "Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases." PLoS Biol **8**(7): e1000439.
- De Clercq, E. and G. Li (2016). "Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years." Clin Microbiol Rev **29**(3): 695-747.
- de Wilde, A. H., D. Falzarano, et al. (2017). "Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model." Virus Res **228**: 7-13.
- de Wilde, A. H., Y. Li, et al. (2013). "Cyclophilin inhibitors block arterivirus replication by interfering with viral RNA synthesis." J Virol **87**(3): 1454-1464.
- de Wilde, A. H., J. C. Zevenhoven-Dobbe, et al. (2011). "Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses." J Gen Virol **92**(Pt 11): 2542-2548.
- de Wit, E., N. van Doremalen, et al. (2016). "SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses." Nat Rev Microbiol **14**(8): 523-534.
- Debing, Y., J. Neyts, et al. (2015). "The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors." Curr Opin Infect Dis **28**(6): 596-602.
- del Real, G., S. Jimenez-Baranda, et al. (2004). "Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity." J Exp Med **200**(4): 541-547.
- Delang, L., J. Paeshuyse, et al. (2009). "Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development." Hepatology **50**(1): 6-16.
- Du, H., L. Guo, et al. (2008). "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease." Nat Med **14**(10): 1097-1105.
- Dube, K., L. Sylla, et al. (2017). "Research on HIV cure: Mapping the ethics landscape." PLoS Med **14**(12): e1002470.
- Engdahl, C., J. Naslund, et al. (2012). "The Rift Valley Fever virus protein NSm and putative cellular protein interactions." Virol J **9**: 139.

- Esser-Nobis, K., J. Schmidt, et al. (2016). "The cyclophilin-inhibitor alisporivir stimulates antigen presentation thereby promoting antigen-specific CD8(+) T cell activation." J Hepatol **64**(6): 1305-1314.
- Fehr, A. R. and S. Perlman (2015). "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis." Methods Mol Biol **1282**: 1-23.
- Feng, P., J. Park, et al. (2002). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis." J Virol **76**(22): 11491-11504.
- Fernandes, F., I. U. Ansari, et al. (2010). "Cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A." PLoS One **5**(3): e9815.
- Fernandes, F., D. S. Poole, et al. (2007). "Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B." Hepatology **46**(4): 1026-1033.
- Flisiak, R., S. V. Feinman, et al. (2009). "The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients." Hepatology **49**(5): 1460-1468.
- Flisiak, R., A. Horban, et al. (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus." Hepatology **47**(3): 817-826.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-362.
- Freytmuth, F., A. Vabret, et al. (2005). "Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line." J Med Virol **77**(2): 295-301.
- Furuta, Y., K. Takahashi, et al. (2009). "T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections." Antiviral Res **82**(3): 95-102.
- Garcia-Rivera, J. A., M. Bobardt, et al. (2012). "Multiple mutations in hepatitis C virus NS5A domain II are required to confer a significant level of resistance to alisporivir." Antimicrob Agents Chemother **56**(10): 5113-5121.
- Gautier, L., K. A. Hounghbedji, et al. (2017). "Use of a community-led prevention strategy to enhance behavioral changes towards Ebola virus disease prevention: a qualitative case study in Western Cote d'Ivoire." Glob Health Res Policy **2**: 35.
- Georgiou, C., I. McNae, et al. (2017). "Pushing the Limits of Detection of Weak Binding Using Fragment-Based Drug Discovery: Identification of New Cyclophilin Binders." J Mol Biol **429**(16): 2556-2570.
- Graham, R. L., E. F. Donaldson, et al. (2013). "A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses." Nat Rev Microbiol **11**(12): 836-848.
- Guan, Y., B. J. Zheng, et al. (2003). "Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China." Science **302**(5643): 276-278.

- Hamamoto, I., K. Harazaki, et al. (2013). "Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle." Jpn J Infect Dis **66**(4): 276-283.
- Hansson, M. J., S. J. Moss, et al. (2015). "Bioengineering and semisynthesis of an optimized cyclophilin inhibitor for treatment of chronic viral infection." Chem Biol **22**(2): 285-292.
- He, H., Z. Mou, et al. (2013). "Proteomic methods reveal cyclophilin A function as a host restriction factor against rotavirus infection." Proteomics **13**(7): 1121-1132.
- He, H., D. Zhou, et al. (2012). "Cyclophilin A inhibits rotavirus replication by facilitating host IFN-I production." Biochem Biophys Res Commun **422**(4): 664-669.
- Heffernan, A., E. Barber, et al. (2018). "Aiming at the Global Elimination of Viral Hepatitis: Challenges Along the Care Continuum." Open Forum Infect Dis **5**(1): ofx252.
- Hilditch, L. and G. J. Towers (2014). "A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry." Curr Opin Virol **4**: 32-36.
- Hopkins, S. and P. A. Gallay (2015). "The role of immunophilins in viral infection." Biochim Biophys Acta **1850**(10): 2103-2110.
- Huai, Q., H. Y. Kim, et al. (2002). "Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12037-12042.
- Hui, D. S., N. Lee, et al. (2018). "The role of adjuvant immunomodulatory agents for treatment of severe influenza." Antiviral Res **150**: 202-216.
- Inoue, K., K. Sekiyama, et al. (2003). "Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial." J Gastroenterol **38**(6): 567-572.
- Jaenisch, T., K. D. Rosenberger, et al. (2017). "Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016." Bull World Health Organ **95**(3): 191-198.
- Kambara, H., H. Tani, et al. (2011). "Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus." Virology **412**(1): 211-219.
- Kaul, A., S. Stauffer, et al. (2009). "Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics." PLoS Pathog **5**(8): e1000546.
- Kawasaki, H., E. S. Mocarski, et al. (2007). "Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus infection via a cyclophilin-dependent pathway specifically in neural stem/progenitor cells." J Virol **81**(17): 9013-9023.
- Keyes, L. R., M. G. Bego, et al. (2012). "Cyclophilin A is required for efficient human cytomegalovirus DNA replication and reactivation." J Gen Virol **93**(Pt 4): 722-732.
- Kipper, S., D. Avrahami, et al. (2016). "Screening for Host Factors Directly Interacting with RSV Protein: Microfluidics." Methods Mol Biol **1442**: 165-174.
- Kumari, S., S. Roy, et al. (2013). "Cyclophilins: proteins in search of function." Plant Signal Behav **8**(1): e22734.

- Kwon, H. J., W. Xing, et al. (2015). "Direct binding of ledipasvir to HCV NS5A: mechanism of resistance to an HCV antiviral agent." PLoS One **10**(4): e0122844.
- Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med **345**(1): 41-52.
- Leung, G. M., A. J. Hedley, et al. (2004). "The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients." Ann Intern Med **141**(9): 662-673.
- Li, J., C. Chen, et al. (2016). "Cyclophilin A protects mice against infection by influenza A virus." Sci Rep **6**: 28978.
- Li, J., R. Huang, et al. (2012). "Dengue virus utilizes calcium modulating cyclophilin-binding ligand to subvert apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **418**(4): 622-627.
- Lin, K. and P. Gallay (2013). "Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors." Antiviral Res **99**(1): 68-77.
- Liu, W., J. Li, et al. (2017). "Cyclophilin A-regulated ubiquitination is critical for RIG-I-mediated antiviral immune responses." Elife **6**.
- Liu, X., L. Sun, et al. (2009). "Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication." Cell Microbiol **11**(5): 730-741.
- Liu, X., Z. Zhao, et al. (2012). "Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through cyclophilin A-dependent and -independent pathways." PLoS One **7**(5): e37277.
- Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-113.
- Luo, C., H. Luo, et al. (2004). "Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A." Biochem Biophys Res Commun **321**(3): 557-565.
- Ma, S., J. E. Boerner, et al. (2006). "NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon." Antimicrob Agents Chemother **50**(9): 2976-2982.
- Madan, V., D. Paul, et al. (2014). "Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation." Gastroenterology **146**(5): 1361-1372 e1361-1369.
- Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-826.
- Maqbool, M. A., M. R. Imache, et al. (2013). "Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes." J Virol **87**(10): 5523-5539.
- Marston, H. D., G. K. Folkers, et al. (2014). "Emerging viral diseases: confronting threats with new technologies." Sci Transl Med **6**(253): 253ps210.
- McMullan, L. K., S. M. Folk, et al. (2012). "A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri." N Engl J Med **367**(9): 834-841.

- Miteva, M. A., F. Guyon, et al. (2010). "Frog2: Efficient 3D conformation ensemble generator for small compounds." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W622-627.
- Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007). "Replication of hepatitis C virus." Nat Rev Microbiol **5**(6): 453-463.
- Nabel, G. J. (1999). "A transformed view of cyclosporine." Nature **397**(6719): 471-472.
- Nakagawa, M., N. Sakamoto, et al. (2005). "Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins." Gastroenterology **129**(3): 1031-1041.
- Nigro, P., G. Pompilio, et al. (2013). "Cyclophilin A: a key player for human disease." Cell Death Dis **4**: e888.
- Nkongolo, S., Y. Ni, et al. (2014). "Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor." J Hepatol **60**(4): 723-731.
- Nomura, R., A. Kiyota, et al. (2004). "Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae." J Virol **78**(16): 8701-8708.
- Obata, Y., K. Yamamoto, et al. (2005). "Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3." J Biol Chem **280**(18): 18355-18360.
- Paeshuyse, J., A. Kaul, et al. (2006). "The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro." Hepatology **43**(4): 761-770.
- Pawlotsky, J. M. (2012). "The science of direct-acting antiviral and host-targeted agent therapy." Antivir Ther **17**(6 Pt B): 1109-1117.
- Pawlotsky, J. M. (2015). "Viral entry inhibition: too late for hepatitis C, but promising for other viral infections." Gut **64**(3): 362-364.
- Pawlotsky, J. M. (2016). "Hepatitis C Drugs: Is Next Generation the Last Generation?" Gastroenterology **151**(4): 587-590.
- Peel, M. and A. Scribner (2013). "Cyclophilin inhibitors as antiviral agents." Bioorg Med Chem Lett **23**(16): 4485-4492.
- Perlman, S. and J. Netland (2009). "Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis." Nat Rev Microbiol **7**(6): 439-450.
- Pfefferle, S., J. Schopf, et al. (2011). "The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors." PLoS Pathog **7**(10): e1002331.
- Phillips, S., S. Chokshi, et al. (2015). "Alisporivir inhibition of hepatocyte cyclophilins reduces HBV replication and hepatitis B surface antigen production." Gastroenterology **148**(2): 403-414 e407.
- Pons, J. L. and G. Labesse (2009). "@TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W485-491.
- Potena, L., G. Frascaroli, et al. (2004). "Hydroxymethyl-glutaryl coenzyme a reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells." Circulation **109**(4): 532-536.

- Pushkarsky, T., V. Yurchenko, et al. (2005). "Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60." J Biol Chem **280**(30): 27866-27871.
- Pushkarsky, T., G. Zybarth, et al. (2001). "CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6360-6365.
- Puyang, X., D. L. Poulin, et al. (2010). "Mechanism of resistance of hepatitis C virus replicons to structurally distinct cyclophilin inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 1981-1987.
- Qing, J., Y. Wang, et al. (2014). "Cyclophilin A associates with enterovirus-71 virus capsid and plays an essential role in viral infection as an uncoating regulator." PLoS Pathog **10**(10): e1004422.
- Qing, M., F. Yang, et al. (2009). "Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein." Antimicrob Agents Chemother **53**(8): 3226-3235.
- Ramirez, S., L. S. Mikkelsen, et al. (2016). "Robust HCV Genotype 3a Infectious Cell Culture System Permits Identification of Escape Variants With Resistance to Sofosbuvir." Gastroenterology **151**(5): 973-985 e972.
- Ruckert, C. and G. D. Ebel (2018). "How Do Virus-Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence?" Trends Parasitol.
- Saeed, M., T. K. Scheel, et al. (2012). "Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells." Antimicrob Agents Chemother **56**(10): 5365-5373.
- Saphire, A. C., M. D. Bobardt, et al. (2002). "trans-Complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent of its isomerase activity." J Virol **76**(5): 2255-2262.
- Sawicki, S. G., D. L. Sawicki, et al. (2007). "A contemporary view of coronavirus transcription." J Virol **81**(1): 20-29.
- Schaller, T., K. E. Ocwieja, et al. (2011). "HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency." PLoS Pathog **7**(12): e1002439.
- Schreiber, S. L. (1992). "Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways." Cell **70**(3): 365-368.
- Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree (1992). "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506." Immunol Today **13**(4): 136-142.
- Seizer, P., K. Klingel, et al. (2012). "Cyclophilin A affects inflammation, virus elimination and myocardial fibrosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis." J Mol Cell Cardiol **53**(1): 6-14.
- Shen, Z., H. He, et al. (2013). "Cyclosporin a inhibits rotavirus replication and restores interferon-beta signaling pathway in vitro and in vivo." PLoS One **8**(8): e71815.

- Shimura, S., K. Watashi, et al. (2017). "Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity." *J Hepatol* **66**(4): 685-692.
- Shirato, K., K. Kanou, et al. (2017). "Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry." *J Virol* **91**(1).
- Shirato, K., M. Kawase, et al. (2013). "Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2." *J Virol* **87**(23): 12552-12561.
- Song, F., X. Zhang, et al. (2011). "Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147." *J Biol Chem* **286**(10): 8197-8203.
- Stanaway, J. D., A. D. Flaxman, et al. (2016). "The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet* **388**(10049): 1081-1088.
- Steadman, V. A., S. B. Pettit, et al. (2017). "Discovery of Potent Cyclophilin Inhibitors Based on the Structural Simplification of Sanglifehrin A." *J Med Chem* **60**(3): 1000-1017.
- Sweeney, Z. K., J. Fu, et al. (2014). "From chemical tools to clinical medicines: nonimmunosuppressive cyclophilin inhibitors derived from the cyclosporin and sanglifehrin scaffolds." *J Med Chem* **57**(17): 7145-7159.
- Tanaka, Y., Y. Sato, et al. (2012). "Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A." *Vet Res* **43**: 41.
- Tanaka, Y., Y. Sato, et al. (2013). "Suppression of coronavirus replication by cyclophilin inhibitors." *Viruses* **5**(5): 1250-1260.
- Teraoka, S., S. Mishiroy, et al. (1988). "Effect of cyclosporine on proliferation of non-A, non-B hepatitis virus." *Transplant Proc* **20**(3 Suppl 3): 868-876.
- Thali, M., A. Bukovsky, et al. (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." *Nature* **372**(6504): 363-365.
- Tian, X., C. Zhao, et al. (2010). "Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection." *J Virol* **84**(7): 3373-3381.
- Towers, G. J., T. Hatzioannou, et al. (2003). "Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors." *Nat Med* **9**(9): 1138-1143.
- Vabret, A., J. Dina, et al. (2009). "[Human coronaviruses]." *Pathol Biol (Paris)* **57**(2): 149-160.
- Vidotto, A., A. T. Morais, et al. (2017). "Systems Biology Reveals NS4B-Cyclophilin A Interaction: A New Target to Inhibit YFV Replication." *J Proteome Res* **16**(4): 1542-1555.
- Vigant, F., A. Hollmann, et al. (2014). "The rigid amphipathic fusion inhibitor dUY11 acts through photosensitization of viruses." *J Virol* **88**(3): 1849-1853.

- von Brunn, A., S. Ciesek, et al. (2015). "Genetic deficiency and polymorphisms of cyclophilin A reveal its essential role for Human Coronavirus 229E replication." Curr Opin Virol **14**: 56-61.
- von Hahn, T., C. Schiene-Fischer, et al. (2012). "Hepatocytes that express variants of cyclophilin A are resistant to HCV infection and replication." Gastroenterology **143**(2): 439-447 e431.
- Waley, I., K. Weise, et al. (1991). "Differentiation of herpes simplex virus-induced fusion from without and fusion from within by cyclosporin A and compound 48/80." J Gen Virol **72** (Pt 6): 1377-1382.
- Wang, N., L. Zhang, et al. (2015). "Cyclophilin A Interacts with Viral VP4 and Inhibits the Replication of Infectious Bursal Disease Virus." Biomed Res Int **2015**: 719454.
- Wang, Y., X. Zhou, et al. (2014). "Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus." Gastroenterology **146**(7): 1775-1783.
- Wang, Z., X. Liu, et al. (2011). "Cyclophilin E functions as a negative regulator to influenza virus replication by impairing the formation of the viral ribonucleoprotein complex." PLoS One **6**(8): e22625.
- Watanabe, A., M. Yoneda, et al. (2010). "CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells." J Virol **84**(9): 4183-4193.
- Watashi, K., M. Hijikata, et al. (2003). "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." Hepatology **38**(5): 1282-1288.
- Watashi, K., N. Ishii, et al. (2005). "Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase." Mol Cell **19**(1): 111-122.
- Watashi, K., A. Sluder, et al. (2014). "Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)." Hepatology **59**(5): 1726-1737.
- Wolf, M. C., A. N. Freiberg, et al. (2010). "A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3157-3162.
- Wose Kinge, C. N., C. Espiritu, et al. (2014). "Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents." Antimicrob Agents Chemother **58**(9): 5386-5394.
- Xu, C., S. Meng, et al. (2010). "Chicken cyclophilin A is an inhibitory factor to influenza virus replication." Virol J **7**: 372.
- Yang, F., J. M. Robotham, et al. (2010). "A major determinant of cyclophilin dependence and cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus identified by a genetic approach." PLoS Pathog **6**(9): e1001118.
- Yang, Y. M., C. Y. Hsu, et al. (2017). "Impact of Comorbidity on Fatality Rate of Patients with Middle East Respiratory Syndrome." Sci Rep **7**(1): 11307.
- Ylinen, L. M., T. Schaller, et al. (2009). "Cyclophilin A levels dictate infection efficiency of human immunodeficiency virus type 1 capsid escape mutants A92E and G94D." J Virol **83**(4): 2044-2047.

- Zeuzem, S., R. Flisiak, et al. (2015). "Randomised clinical trial: alisporivir combined with peginterferon and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype 1 infection (ESSENTIAL II)." Aliment Pharmacol Ther **42**(7): 829-844.
- Zhao, C., C. Y. Fang, et al. (2007). "Proteomic analysis of hepatitis B surface antigen positive transgenic mouse liver and decrease of cyclophilin A." J Med Virol **79**(10): 1478-1484.
- Zhao, K., J. Li, et al. (2017). "Cyclophilin B facilitates the replication of Orf virus." Virol J **14**(1): 114.
- Zhong, N. S., B. J. Zheng, et al. (2003). "Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003." Lancet **362**(9393): 1353-1358.