

**THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT**

SPÉCIALITÉ : VIROLOGIE

Unité de Génomique Virale et Vaccination
Ecole Doctorale BIO SPC

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Pasteur,
le 30 septembre 2016 par

Samira KHIAR

**Etude de molécules antivirales originales
ciblant les fonctions cellulaires et la réponse
immunitaire innée**

Directeur de thèse : Dr. Pierre-Olivier VIDALAIN

Composition du Jury :

Président du jury :	Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI
Rapporteurs :	Dr. Vincent LOTTEAU Pr. Mathias FAURE
Examineurs :	Dr. Romain VOLMER Dr. Florence MARGOTTIN
Membre invité :	Dr. Frédéric TANGY

**THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS-DIDEROT**

SPÉCIALITÉ : VIROLOGIE

Unité de Génomique Virale et Vaccination
Ecole Doctorale BIO SPC

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Pasteur,
le 30 septembre 2016 par

Samira KHIAR

**Etude de molécules antivirales originales
ciblant les fonctions cellulaires et la réponse
immunitaire innée**

Directeur de thèse : Dr. Pierre-Olivier VIDALAIN

Composition du Jury :

Président du jury :	Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI
Rapporteurs :	Dr. Vincent LOTTEAU Pr. Mathias FAURE
Examineurs :	Dr. Romain VOLMER Dr. Florence MARGOTTIN
Membre invité :	Dr. Frédéric TANGY

« *Where there is a will, there is a way* »

*À la mémoire de **Amir Abdenour KHIAR**,
le plus adorable des petits frères,
tu as ensoleillé notre vie et tu es parti beaucoup trop tôt,
ton courage et ton sourire face à la maladie est une très belle
leçon de vie remplie d'espoir et d'amour qui m'a toujours
accompagnée tout au long de ces années, repose en paix mon
ange et j'espère que d'où tu es, tu es fier de ta grande sœur qui
ne t'oubliera jamais...*

Remerciements

Au terme des trois années de cette extraordinaire expérience scientifique et humaine, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et sans qui, il ne serait pas ce qu'il est. Un grand merci à ***l'institut Pasteur ainsi qu'à la DGA (Direction générale de l'armement)*** qui m'ont donné la chance de vivre cette belle aventure par leur soutien financier.

Aux membres du jury

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Au Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Au Dr. Vincent LOTTEAU et au Pr. Mathias FAURE qui ont accepté d'être mes rapporteurs. Au Dr. Florence MARGOTTIN et au Dr. Romain VOLMER du temps et de l'intérêt qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture de ce manuscrit, et de l'honneur qu'ils m'ont fait d'en être les examinateurs.

À mon directeur de thèse

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, Pierre-Olivier Vidalain, pour avoir dirigé cette thèse avec autant de passion et de patience. Merci pour ton soutien sans faille, ta justesse, tes conseils pertinents et toujours bienveillants, tes encouragements et surtout ta positivité. Merci pour toutes ces conversations tellement enrichissantes scientifiquement. Ton oeil critique et ton aide m'ont été très précieux pour structurer ce manuscrit. Enfin merci pour ton humanité qui est vraiment rare. Un énorme merci à TOI Pierrot, c'est un réel plaisir de travailler et d'apprendre avec toi.

Aux membres de l'Unité de Génomique Virale et Vaccination

Un très grand merci à Frédéric Tangy, le directeur de l'unité de Génomique Virale et Vaccination pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. J'ai eu une chance inouïe de faire partie d'une telle équipe si accueillante qui est devenue tout simplement ma deuxième famille. Je n'arrive pas à trouver les mots pour exprimer ma gratitude pour ces 3 années de thèse où je me suis sentie entourée, soutenue, aimée et tellement encouragée, et ceci a été vraiment précieux pour m'aider à garder mon sourire dans des moments difficiles autant au niveau personnel qu'au niveau de l'avancement de mon projet de thèse. Je te remercie Fred pour ta simplicité, ta générosité et ton soutien sans faille. Marianne, un grand merci pour tout ce que tu m'as appris pendant mon année de M2, cela a été tellement précieux pendant ces années de thèse. Merci pour tous tes conseils et ton soutien et puis bien sûr d'être toi même : tu es unique et irremplaçable maman labo! Mille merci pour l'aide que tu m'a apporté ces derniers mois, sans toi l'écriture de ce manuscrit aurait tellement plus pénible! Un merci spécial pour toi ma Val, tu as vraiment été ma source précieuse de réconfort et d'encouragements. Tu as toujours trouvé les mots pour me faire reprendre confiance en moi. Chanchan, notre source de bonne humeur, mille merci pour ce sourire qui ne s'efface jamais et qui rend le labo un lieu de travail tellement plus agréable. Marie, bientôt ton tour ma chérie, courage! Merci pour tes encouragements, ton soutien, ton écoute! Raulito, el doctor de tous les temps, on a vraiment grandi ensemble et muri au cours de ces années. Tant d'épisodes de disputes suivis de grands moments de

réconciliations et de complicité! « Qui aime bien, châtie bien », n'est-ce pas ? Merci pour ton soutien, toutes ces discussions scientifiques passionnantes et toutes ces soirées inoubliables au labo! On a vraiment tissé ce lien d'amitié unique et spécial qui nous a permis à tous les 2 de se soutenir mutuellement. Je te souhaite le meilleur pour la suite! Anastassia, super maman AK, Merci pour m'avoir soutenue, aidée et surtout guidée pendant les moments difficiles et remis les idées en place! Et enfin, merci à : maman Claude pour ta bonne humeur, notre précieuse Marie-Laurence qui est tellement investie et qui m'a aidée et guidée depuis mon arrivée au laboratoire, Atousa, Stéphanie, Hai, Jérémy, Maxime, Alice, Lucie, Daniela, Evgenia, Laura, Ségolène, Emmanuelle, Jean-Nicolas, Alexandre, Jibby et Nicolas.

À l'équipe de l'université Paris Descartes. Je voudrai remercier plus particulièrement Sébastien Nizole, un grand merci pour les manip réalisées. Je remercie également pour leurs conseils et leur œil critique sur mon projet de thèse : Nassima Bekaddour, Benatia, Nikaia Smith, Jean-Philippe Herbeuval et Mounira Chelbi-Alix. **À toute l'équipe dirigée par Hélène Munier-Lehmann.** Merci pour le criblage des chimiothèques ainsi que pour son aide précieuse dans l'avancement du projet. **À Yves Janin,** Merci pour tes encouragements et ta disponibilité et surtout ton aide sur la partie « chimie » de ce travail. **À toutes les équipes du projet ANVIE,** c'est un plaisir de travailler avec vous tous sur ce projet, merci pour vos encouragements. Enfin, je n'oublie pas **Maryline Bourguine** pour sa participation dans ce projet ainsi que **Mickael**, une vraie source d'encouragements et de positivité.

À l'équipe de la MAASCC de l'Institut Pasteur, Elise et Nathalie : Merci de m'avoir aidée à trouver ma voie. Quant à toi Marianna, tu nous as laissé un vide au labo, toujours prête à nous aider, merci pour tes encouragements pendant cette année de M2, ta gentillesse et ta douceur.

À toutes les équipes du service Immunologie à l'Institut Pasteur d'ALGER, Pr Abbadi, Pr Amroun, Pr Saleh : Merci de m'avoir ouvert les portes de vos unités où j'ai rencontré des personnes passionnées qui m'ont transmis leurs connaissances avec une indescriptible générosité! **Fethi Meçabih :** tu as été la plus belle rencontre tout au long de ces stages, tu m'as prise sous ton aile et tu m'as appris tellement de choses dans une ambiance si agréable qu'il me tardait chaque matin d'arriver au labo pour commencer une nouvelle journée! Merci pour tous ces moments de fous rires inoubliables! A toutes ces personnes qui sont devenues aujourd'hui d'irremplaçables amies: **Narjoussa, Nesma, Samoura, Sana, Kahina, Nesrine, Ines, Soumia et Imène.** Merci également à toi **Fethi Dehri**, qui m'as soutenue à travers ces années, tes encouragements m'ont réellement aidée à avancer, tu as toujours trouvé les mots pour m'encourager et me propulser vers l'avant.

IAAASS Great People, Pouya, Monica, Fatima, Patrick, Angela, Florencia, Lukasz, Ricardo, Pavel, Lora, Franchesca : the BEST friends EVER!!! THANK YOU SO MUCH! Your support and love light up my days! Pouya, thank you so much for being here by msg during those hard-working nights and for your precious advices, you always find the words to dissipate that awful stress! FATI, Thank you SO much for your precious help!

À mes très chers parents, Pour l'amour qu'ils me donnent, pour ne vouloir que mon bonheur, pour leurs paroles réconfortantes, leur soutien sans faille et leur confiance en moi. Merci de m'avoir transmis les valeurs qui me guident maintenant dans ma vie professionnelle et personnelle. Maman, tu m'as appris la persévérance, j'ai toujours admiré ta force, ton esprit combatif et ta patience. Papa, tu m'as appris l'endurance, j'admire ton combat face ce cancer qui n'a jamais réussi à voler ta bonne humeur même dans les moments les plus difficiles. C'est à vous que je dois tout, je ne saurais jamais vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi. **À Celya, ma petite sœur adorée,** Tu es ma source de motivation et mon soleil. Tu es dotée de ce don de me faire sourire même quand tout va mal. J'ai hâte de te voir trouver ta voie, de faire des études et de réaliser de grands projets. Tu prends la relève, COURAGE! Merci pour tous ces moments uniques de complicité! **À Idir, mon petit frère,** Tu es notre machine de bonne humeur QUELQUE SOIT la situation! MERCI! **À Mouhoub et Karima, Wassim et Aniss,** Merci de m'avoir adoptée, pour votre amour et votre soutien! Ces stages en Algérie ont été tellement plus agréables auprès de vous, que des moments inoubliables! **À Kamel, Mina, Sarah,** Merci pour vos encouragements si précieux et tous ces bons moments partagés.

À Tonton Djamel Idoui, mon deuxième papa, Merci pour ton soutien sans faille et surtout pour ton aide précieuse tout au long de ces années et de m'avoir toujours encouragée à aller le plus loin possible dans mes études.

À toute la famille Daoud, Merci pour votre amour et votre générosité, je suis admirative devant votre courage. Aek, merci infiniment pour ton écoute et tes encouragements et puis tous ces moments de fous rires interminables!

À Ramdane, Mon coach mental de toujours, tu as trouvé les mots pour me remplir de volonté et de persévérance pour que je puisse atteindre mon but aujourd'hui. Mille Merci, je te dédie ce travail, c'est le fruit de tous ces encouragements, de tous ces efforts, de ton investissement pour me transmettre ta passion!

À Mohameden, best friend and best « binôme » ever! Merci pour ton soutien, tes encouragements et surtout ta confiance en moi à travers toutes ces années d'études et ces longues journées de TP qui ont permis à une simple connaissance de se transformer en une très forte amitié!

À toutes ces personnes que la maladie nous a arraché durant ces trois dernières années, Mon cher et unique grand père qui nous a laissé un si grand vide. Ma chère grand-mère et ma tante Louisa Saïdi, avec toute votre tendresse et votre amour. Vous ne quittez pas mes pensées et j'espère que de là-haut, vous êtes fiers de moi.

Résumé

Alors que les infections virales représentent toujours un problème majeur de santé publique, notamment en raison de l'émergence de nouveaux virus, notre arsenal thérapeutique reste limité. Les antiviraux à action directe existant sont généralement très spécifiques d'une espèce virale donnée générant l'apparition de souches résistantes aux traitements. L'objectif au laboratoire a donc été de chercher de nouveaux antiviraux à large spectre ciblant l'hôte. Pour cela, deux systèmes de criblage distincts ont été mis au point au laboratoire. La première stratégie de criblage, basée sur la combinaison d'infections *in vitro* par les virus recombinants de la rougeole et du chikungunya, a permis d'identifier deux molécules actives : le ChX-77 qui est une triaminopyrimidine, et le sr1057 qui est une pyrroloquinoxaline. Dans ce travail, nous décrivons les propriétés antivirales puissantes *in vitro* de ChX77 aussi bien contre les virus de la rougeole et du chikungunya que contre le virus Cocksackie B3, trois virus à ARN très distincts. La molécule sr1057, quant à elle, présente une activité inhibitrice non seulement contre des virus à ARN tels que le virus de la rougeole, le virus du chikungunya et le virus Ebola, mais aussi contre des virus à ADN tels que les virus de l'herpès simplex humains et équins *in vitro*. Ce qui en fait des molécules antivirales à large spectre qui cibleraient probablement l'hôte car elles ont la capacité d'inhiber la réplication des virus de familles complètement différentes. La seconde stratégie développée a permis d'identifier ChX79, un dérivé 1H-benzimidazole-4-carboxamides, stimulant la réponse immunitaire innée par l'utilisation d'une lignée rapportrice exprimant la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse aux interférons (ISRE ; Interferon-Stimulated Response Element). Cette molécule présente de remarquables propriétés immunostimulatrices et induit spécifiquement certains gènes impliqués dans la réponse interféron de type I *via* la protéine adaptatrice MAVS et le facteur de transcription IRF1. Par ailleurs, cette molécule induit un programme de stress cellulaire intégré associé notamment à des dommages à l'ADN. Enfin, l'originalité de cette molécule demeure dans sa capacité à agir de façon synergique sur la réponse cellulaire à de l'ADN exogène permettant la production des quantités importantes d'interféron de type I *via* une voie STING dépendante. Ces résultats éclairent les mécanismes susceptibles de moduler la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique, un PAMP associé aux infections par des virus ou des bactéries, mais également à des stress génotoxiques liés à des radiations ou des agents carcinogènes.

Abstract

While viral infections are still a major public health problem, particularly because of the emergence of new viruses, our therapeutic arsenal remains limited. The existing Direct-acting antivirals are usually very specific for a given virus species generating the development of resistance to treatment. The objective of the laboratory was looking for new broad-spectrum antivirals targeting the host. For this, two different screening systems have been developed in the laboratory. The first strategy, based on the combination of infections *in vitro* with recombinant measles and chikungunya viruses, allowed us to identify two active molecules: the ChX-77 which is a triaminopyrimidine, and the sr1057 which is a pyrroloquinoxaline. In this work we describe the powerful antiviral properties *in vitro* of ChX77 against both measles and chikungunya viruses and against the Cocksackievirus B3, three very distinct RNA viruses. The sr1057 molecule, for its part, has an inhibitory activity not only against RNA viruses such as measles, chikungunya and Ebola viruses, but also against DNA viruses such as human and equine herpes simplex virus *in vitro*. These results suggest that these drugs, with a broad-spectrum antiviral activity, target probably the host because they have the ability to inhibit the viral replication of viruses from completely different families. The second strategy developed allowed us to select ChX79, a 1H-benzimidazole-4-carboxamides, stimulating the innate immune response by using a rapporteur line expressing luciferase under the control of an interferon response element (ISRE: Interferon-Stimulated Response Element). This molecule has remarkable immunostimulatory properties and induces specifically genes involved in type I interferon response *via* the mitochondrial signaling protein MAVS and the transcription factor IRF1. Finally, the originality of this molecule remains in its ability to prime efficiently cellular response to transfected plasmid DNA as assessed by potent synergistic effects on IFN- β secretion and ISG expression levels *via* STING-dependent pathway. All together, These results bring tools to decipher the mechanisms that modulate the cellular response to the cytosolic DNA, a PAMP associated to infections by viruses or bacteria, but also to genotoxic stress related to radiation or carcinogens.

Liste des abréviations

A

AADs : Antiviraux à Action Directe
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AP-1 : Activator Protein-1
ARNdb : ARN double brin
ATP : Adénosine TriPhosphate

C

CARD : Caspase recruiting domain
cDCs : conventional Dendritic Cells
cGAS : cyclic GMP-AMP synthase
CH1 : Constant Heavy-chain
CH25H : cholestérol-25-hydroxylase
CHIKV : Chikungunya Virus
CMA : 10-carboxymethyl-9-acridanone

D

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns
DDX41 : DEAD-Box Helicase 41
DCs : Dendritic Cells
DENV : Dengue Virus
DHX9 : DEAH-Box Helicase 9
DHX36 : DEAH-Box Helicase 36
DMXAA : 5,6-di-methylxanthenone-4-acetic acid
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase

E

EBV : Virus d'Epstein-Barr
ECMV : Encephalomyocarditis **virus**

F

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
FDA : Food and Drug Association
FPPS : Farnésyl PyroPhosphate Synthase

G

GOF : Gain Of Function
GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GS : Granules de Stress
GSK : GlaxoSmithKline

H

25HC : 25-hydroxycholestérol
HcAb : Heavy chain only Antibodies
HEPT : 1-(2-(2-hydroxyethoxymethyl)-6-(phenylthio)thymine
HMG CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase

HSPs : Heat Shock Protein
HSV-1 : Virus Herpes Simplex de type 1
HSV-2 : Virus Herpes Simplex de type 2
HTAs : Host-Targeting Antivirals (antiviraux ciblant l'hôte)
HTS : High-Throughput Screenings

I

IDU : 5-iodo-2'-déoxyuridine
IFI16 : Interferon Gamma Inducible Protein 16
IFIH1 : Interferon Induced with Helicase C Domain 1
IFIT1 : IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFIT2 : IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
IFITM : Interferon-Induced TransMembrane proteins
IFN : Interféron
IFNAR : Interferon- α/β Receptor
IKK ϵ : I κ B kinase ϵ
IKpDC : Interferon producing killer pDC
IL-1 : Interleukine 1
IL-2 : Interleukine 2
IMPDH : Inosine Monophosphate Déshydrogénase
INNTI : Inhibiteurs Non Nucléosidiques inhibant la Transcriptase Inverse
IPC : Interferon Producing Cells
IRF : Interferon Regulatory Factor
ISGs : IFN-Stimulated Genes
ISG15 : Interferon stimulated gene 15
ISRE : Interferon-Stimulated Response Element

J

JAK : Janus Kinases

K

KAR : Killer Activation Receptors
KSHV : Virus de l'Herpès associé au Sarcome de Kaposi

L

LGP2 : Laboratory of genetics and physiology-2
LPS : lipopolysaccharides
LRR : Leucine-Rich Repeat
LRRFIP1 : Leucine Rich Repeat (In FLII) Interacting Protein 1

M

MAM : mitochondrial associated membranes
MAMP : Microbial-Associated Molecular Patterns
MAVS : Mitochondrial antiviral signaling protein
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated gene 5
MERS-CoV : Coronavirus du Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient
Myd88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

N

NA : Neuraminidase A
NF- κ B : Nuclear Factor- κ B
NK : cellules natural killer
NTZ : Nitazoxanide

O

OAS : 2',5'-OligoAdénylate Synthétase
OASL : 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Like

P

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
P-bodies : mRNA-Processing bodies
pDC : plasmacytoid Dendritic Cells
PIAS : Protein inhibitor of activated STAT
PKR : Protéine Kinase R
Poly I:C : acide polyinosinique-polycytidylque
PRRs : Pathogen Recognition Receptors

R

RD : Repressor Domain
RIG-I : Retinoic acid-Inductible Gene I
RIP1 : Receptor-Interacting Protein 1
RLRs : Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptor
RSV : Virus Respiratoire Syndical

S

SFV : Semliki Forest virus
SINV : Sindbis Virus
SIV : Simian immunodeficiency viruses
SOCS : Suppressor of cytokine signalling
SRAS-CoV : Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
STING : Stimulator of IFN Genes
SUMO (pour Small Ubiquitin-like Modifier)

T

TBK1 : TANK-binding kinase 1
TIBO : Tétrahydro-Imidaso-Benzodiazépines)
TLRs : Toll Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIF : TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- β
TRIM : tripartite motif

U

USP18 : Ubiquitin Specific Peptidase 18

V

VH : Variable Heavy (domain)

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHS : Virus de herpès simplex

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VR : Virus de la rougeole

VS : Virus de la Stomatite Vésiculaire

VZV : Varicella-Zoster Virus (virus varicelle-zona)

W

WNV : West Nile Virus

Tables des matières

Introduction	1
Chapitre I : Antiviraux à large spectre	2
1 Antiviraux à large spectre, un vrai besoin	2
1.1 Les émergences virales : un problème majeur de santé publique	2
1.2 Quelles sont les causes de ces émergences virales ?	4
1.2.1 Les changements climatiques	5
1.2.2 Les échanges internationaux	6
2 Stratégies développées pour l'identification de molécules antivirales	7
2.1 Molécules antivirales d'origine biologique	7
2.1.1 Vaccins	7
2.1.2 Anticorps neutralisants	9
2.1.3 Immunostimulateurs	11
2.2 Molécules antivirales d'origine chimique	12
2.2.1 Antiviraux à action directe	12
2.2.1.1 Analogues nucléosidiques et nucléotidiques : inhibiteurs des réplases ou transcriptases virales	15
2.2.1.2 Les Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	21
2.2.1.3 Inhibiteurs de protéases virales	22
2.2.1.4 Autres inhibiteurs viraux	25
2.2.2 Antiviraux à large spectre ciblant l'hôte	26
2.2.2.1 Molécules interagissant avec les lipides ou leur métabolisme	27
A. Les modulateurs du métabolisme des lipides : Les statines	27
B. Antiviraux interagissant directement avec les lipides	28
i. Umifenovir (Arbidol)	28
ii. LJ001	29
iii. La squalamine	30
2.2.2.2 Inhibiteurs de l'acidification des endosomes	30
A. l'amantadine et son dérivé, la rimantadine	30
B. La chloroquine	31
2.2.2.3 Autres molécules ciblant les facteurs cellulaires	32
A. Nitazoxanide	32
B. Le celgosivir ou MX-3253	33
C. Maraviroc	33
D. Les antagonistes des cyclophilines	33
Chapitre II : Réponse immunitaire innée : première barrière face aux virus	37

1	Senseurs de l'immunité innée antivirale	39
1.1	Découverte et rôle des IFN de type I au sein des infections virales	39
1.2	Les PAMPs viraux	39
1.3	Les PRRs qui reconnaissent les PAMPs viraux	40
1.3.1	Les recepteurs Toll-like – TLRs	41
1.3.2	Les récepteurs RIG-I-like – RLRs	43
1.3.3	Récepteurs à l'ADN	45
2	La réponse cellulaire aux IFNs de type I	46
2.1	La cascade de signalisation induite par les IFN de type I	46
2.2	Effecteurs de la réponse IFN	47
2.2.1	Facteurs inhibant l'entrée des virus	48
2.2.1.1	CH25H	48
2.2.1.2	IFITM	49
2.2.2	Facteurs ciblant directement les ribonucléocapsides virales	50
2.2.2.1	Mx	50
2.2.2.2	TRIM	51
2.2.3	Facteurs inhibant la synthèse des protéines virales	52
2.2.3.1	PKR	52
2.2.3.2	OAS	52
2.2.3.3	ISG54 et ISG56	52
2.2.4	Facteurs inhibant l'assemblage et la libération des particules virales	53
2.2.4.1	Vipérine	53
2.2.4.2	Téthérine	53
2.2.5	Boucles de régulation positive et négative de la réponse IFN	54
2.2.5.1	Quelques exemples de régulateurs positifs	54
A.	IRF7	54
B.	TRIM25	55
C.	ISG15	55
D.	UNC93B1	55
2.2.5.2	Quelques exemples de régulateurs négatifs	56
A.	PIAS	56
B.	SOCS	56
C.	USP18	57
D.	ULK1	57
3	Les mécanismes cellulaires antiviraux autres que la réponse IFN	58
3.1	Granules de stress et P-bodies	58
3.2	Autophagie	61
3.3	Apoptose ou mort cellulaire programmée.	62
3.4	Effecteurs cellulaires de l'immunité innée antivirale	63

3.4.1	Phagocytes: les monocytes/les macrophages -----	63
3.4.2	Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) -----	64
3.4.3	Cellules natural killer-NK -----	64
Chapitre III : Molécules stimulant l'immunité innée-----		66
1	Les petites molécules ligands des TLR induisant les interférons de type I -----	67
2	Les composés activateurs de STING -----	70
3	Interactions entre les voies de biosynthèse des nucléosides et la réponse interféron 71	
4	Des composés orphelins identifiés par criblage à haut débit-----	72
Projet de thèse et résultats-----		77
Chapitre I : ChX79, un composé qui amplifie la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique (Manuscrit N°1)-----		82
1	Présentation du manuscrit -----	82
2	Données complémentaires-----	87
Chapitre II : Les composés sr1057 et ChX77, des petites molécules antivirales à large spectre -----		92
1	Etude du composé sr1057 -----	92
1.1	Etude du composé ChX54 (Manuscrit N°2) -----	97
Manuscrit N°1 -----		101
Manuscrit N°2 -----		102
Discussion -----		102
1	Caractérisation de deux molécules antivirales à large spectre de cible inconnue ---	104
1.1	ChX77 -----	104
1.2	Sr1057 -----	106
2	ChX710 : une composé immunostimulateur inducteur de stress cellulaire. -----	107
3	Quel mode d'action pour cette famille de composés ? -----	109
4	ChX710, un facteur de stress qui altère le processus de traduction -----	110
5	Le ChX710, un agent intercalant qui induit des dommages à l'ADN? -----	114
6	Les peroxyosomes, cibles potentielles du ChX710 ? -----	115
7	Quel rôle pour le stress oxydatif ?-----	117
8	Dommages à l'ADN et amplification de la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique --	119
Références bibliographiques-----		123
Annexes -----		141



Introduction

Chapitre I : Antiviraux à large spectre

1 Antiviraux à large spectre, un vrai besoin

Les émergences virales : un problème majeur de santé publique

A l'heure actuelle, les infections virales représentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale et pourtant notre arsenal thérapeutique reste très limité. En effet, les récentes épidémies dues au virus Ebola en Afrique de l'Ouest et au coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) en Corée du Sud et au Moyen-Orient montrent le besoin urgent de développer de nouveaux antiviraux contre un certain nombre de virus hautement pathogènes pour l'homme et contre lesquels aucun traitement n'est actuellement disponible. De plus, malgré les progrès considérables réalisés dans le développement de traitements pour les virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite C (VHC) ainsi que pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ces agents infectieux continuent à sévir à travers le monde entier et sont à l'origine d'environ, respectivement, 0,6 million, 0,5 million et 2 millions de morts par an (tableau 1) [1]. Le virus de la grippe, quant à lui, est considéré comme le virus le plus meurtrier de tous les temps. Doté d'une capacité à muter et d'une variabilité impressionnante, il est à l'origine d'une nouvelle épidémie chaque année. De plus, le pic d'infectiosité est atteint dans les sécrétions nasales deux jours seulement après l'infection [2], ce qui lui permet de se propager d'un continent à un autre de manière très efficace et très rapide par le biais des échanges internationaux. Par ailleurs, en dépit de l'existence d'un vaccin efficace et de la mise en place d'une couverture vaccinale mondiale de 84% des enfants, le virus de la rougeole a néanmoins causé près de 120.000 morts en 2012 [3]. De plus, il n'existe pas de vaccins contre un grand nombre de virus qui sont la cause de milliers de décès chaque année tels que le virus respiratoire syncytial humain (hRSV) qui est responsable à lui seul d'environ 3,4 millions d'infections respiratoires sévères et d'au moins 66.000 décès chez les enfants de moins de cinq ans [4].

En outre, l'émergence croissante d'agents infectieux tels que le SRAS-CoV (coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère), le MERS-CoV, l'Ebola, le chikungunya, la dengue et, plus récemment, Zika entraîne l'apparition imprévisible de

pandémies qui sont alarmantes. D'autant plus qu'aujourd'hui, nous n'avons aucun moyen pour lutter contre de tels pathogènes. Dans le cas du virus de la dengue, bien que la plupart des infections restent asymptomatiques, le nombre de cas de dengues « classiques » et de dengues hémorragiques a significativement augmenté au cours de ces dernières décennies [5]. De plus, les épidémies mortelles citées précédemment ont atteint tout de même des taux de mortalité élevés estimés à 10% dans le cas du SRAS-CoV en 2003 [6], 30% dans le cas du MERS-CoV en 2012 [7], et jusqu'à 90% dans le cas du virus Ebola en Afrique de l'Ouest en 2014 [8].

Outre ceux présents dans notre environnement naturel, il existe des virus potentiellement dangereux dans certains laboratoires de recherche. Par exemple, la variole a tué environ 300 à 500 millions de personnes au cours du XX^{ème} siècle [9]. Certes, la variole a été éradiquée en 1979 grâce à des efforts internationaux considérables et l'existence d'un vaccin efficace contre ce virus [10]. Toutefois, nos meilleures connaissances en génétique inverse pourraient permettre la reconstitution d'un virus artificiel de la variole, qui pourrait être utilisé à des fins malveillantes. Par ailleurs, des virus génétiquement modifiés appelés GOF (pour gain of function) sont développés dans certains laboratoires de recherche. Ce sont des virus mutants n'ayant jamais existé, potentiellement plus virulents et/ou transmissibles que la souche virale d'origine [11]. Nous pourrions donc imaginer les conséquences dévastatrices que pourrait avoir la libération de ces virus artificiels au sein d'une population non-vaccinée, que ce soit par erreur ou bien de manière délibérée dans le cadre d'une attaque terroriste, d'autant plus qu'aucun traitement n'aura été mis au point préalablement pour faire face à de tels risques [12]. Ainsi, compte tenu de l'émergence d'épidémies virales imprévisibles dues à d'anciennes ou à de nouvelles souches virales, il est indispensable de mettre en place très rapidement des stratégies innovantes et de développer de nouvelles thérapeutiques afin de prévenir et faire face aux crises de santé publique de portée mondiale.

D'autre part, la capacité des virus à évoluer afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte reste un facteur important qui nécessite le développement de stratégies innovantes pour pallier ce problème. Ainsi, l'apparition de ces mutations dans le génome viral peut entraîner une absence de reconnaissance de l'agent pathogène par la mémoire immunitaire et dans ce cas-là, le système immunitaire de

l'hôte est beaucoup moins efficace face au nouveau virus laissant toute une population sans protection. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il est indispensable de renouveler la composition du vaccin de la grippe chaque année afin de l'adapter au virus grippal circulant.

En outre, la très grande diversité des virus responsables d'infections chez l'homme d'une part et le coût très élevé que cela représenterait d'autre part rendent impossible le développement de traitements spécifiques contre chacun d'entre eux. Il est donc indispensable de développer des molécules à large spectre, qui soient actives contre différents virus, ce qui nous permettrait de traiter les infections virales existantes et de faire face à des émergences et l'apparition de nouvelles souches virales plus virulentes que la souche virale initiale.

Quelles sont les causes de ces émergences virales ?

L'émergence ou la réémergence des virus est la conséquence de nombreux facteurs qui peuvent être économiques, écologiques, environnementaux ou encore démographiques [13]. Sont notamment impliqués :

- les échanges internationaux : l'augmentation rapide de la mobilité humaine et le commerce à longue distance, ce qui implique non seulement le déplacement de personnes mais aussi le transport de biens ;
- les flux de populations des zones rurales vers les villes pour des raisons socio-économiques (pauvreté, chômage), entraînant ainsi la formation de bidonvilles où une hygiène rudimentaire s'ajoute à une forte densité de population ;
- le déplacement en masse de populations à cause des conflits armés ;
- la pénétration de l'homme dans des milieux naturels isolés, ce qui augmente la promiscuité entre les hommes et les hôtes réservoirs ;
- l'utilisation de matériel médical non stérile dans le cadre de thérapeutique et/ou de vaccination de masse ;
- la diminution de l'intérêt de la surveillance et du contrôle des maladies infectieuses ;
- et les changements environnementaux induits par l'homme, y compris la déforestation généralisée et le changement climatique.

Je développerai dans cette partie deux facteurs qui sont décrits comme des facteurs jouant un rôle majeur dans le développement et la dissémination des maladies virales : les changements climatiques et les échanges internationaux.

1.1.1 Les changements climatiques

Au cours du siècle dernier, une augmentation fulgurante des activités industrielles a entraîné des changements climatiques (réchauffement global, modification du régime des pluies, humidité, etc...) qui ont fortement affecté l'environnement et ont déclenché d'une part la réorganisation de la répartition des espèces, animales et végétales, ainsi que des vecteurs (arthropodes), et d'autre part, l'accroissement de leurs effectifs de population. La modification de la composition atmosphérique a provoqué une destruction partielle de la couche d'ozone et un important effet de serre qui ont été à l'origine d'une augmentation de la température sur Terre d'environ 0,3 à 0,6°C durant le XXème siècle [14]. La température, la pluie, l'humidité sont des facteurs majeurs influençant le développement et la survie des moustiques et des tiques [15]. L'augmentation des températures hivernales pourrait ainsi prolonger la période d'activité des vecteurs et changer complètement le profil épidémiologique des maladies vectorielles à moustiques et à tiques (transmission continue qui serait la conséquence d'une quasi-absence de diapause). En outre, pendant les périodes de sécheresse, l'eau est stockée dans des citernes, favorisant ainsi la prolifération des moustiques. A l'inverse, de fortes précipitations sont à l'origine de la formation de points d'eau qui sont des sites favorisant le développement des moustiques et par là, la dissémination des infections transmises par ces vecteurs. Ainsi, les infections par les arbovirus (arthropod-borne viruses), les virus transmis par les insectes piqueurs, devraient s'étendre géographiquement et pourraient être par exemple à l'origine d'une augmentation globale du nombre de cas de fièvre jaune, de dengue et de la fréquence de leurs complications hémorragiques. De plus, l'activité maximale des tiques est observée dans des régions où les températures sont douces. La fréquence des infections transmises par ces insectes devrait augmenter suite au réchauffement climatique (encéphalite à tiques). Par ailleurs, les climats plus chauds et plus humides favorisent la prolifération, la pérennisation des habitats et l'expansion géographique d'espèces réservoirs et d'organismes pathogènes [16, 17]. Ainsi, l'accroissement des populations de

rongeurs sous l'effet des changements climatiques pourrait amplifier la circulation de deux groupes de virus dont ces animaux sont le réservoir, les hantavirus et les arénavirus. Par ailleurs, la déforestation, qui aggrave l'émission de gaz à effet de serre (dioxyde de carbone), favorise également les contacts entre l'homme et des réservoirs forestiers de virus[18].

1.1.2 Les échanges internationaux

Les échanges internationaux qui ont considérablement augmenté au cours de ces dernières décennies favorisent fortement la propagation des virus à travers le monde entier. Ces échanges concernent aussi bien les déplacements de personnes facilités par l'essor des moyens de transports internationaux que les échanges de biens matériels. Ainsi, le transport d'objets pouvant être contaminés ou abritant un animal infecté est une source potentielle de la dissémination d'une infection virale. Les infections à coronavirus (SRAS-CoV et MERS-CoV), qui sont à l'origine de maladies respiratoires graves, illustrent tout à fait le rôle des déplacements des personnes contaminées dans la dissémination très rapide de l'agent infectieux à travers le monde entier. Le SRAS est apparu pour la première fois dans la province du Guangdong, en Chine du Sud-Est, suite à la consommation de viande de civette infectée. Ces cas ont ensuite déclenché une chaîne de transmission interhumaine propageant l'infection à différentes villes des environs de Guangzhou, puis le virus a été introduit à Hong Kong en février 2003. Il s'est ensuite répandu au Vietnam, à Singapour, au Canada, aux Philippines, au Royaume-Uni ou encore aux Etats-Unis, suite aux déplacements de personnes infectées. De façon très surprenante, un lien a été établi entre plus de la moitié des infections et un seul patient arrivé à Hong Kong le 21 février 2003. Lors de cette épidémie, 8000 personnes avaient été infectées et 800 sont mortes. Le MERS, causé par un virus apparenté, a émergé en 2012 dans la péninsule arabique et des cas de personnes infectées ont été ensuite signalés en Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique du Nord suite à des déplacements de personnes originaires du Moyen-Orient vers ces différentes régions du monde.

2 Stratégies développées pour l'identification de molécules antivirales

Face à l'émergence croissante de nouvelles épidémies chaque année, de nombreuses équipes de recherche ont développé différentes stratégies afin d'identifier de nouveaux antiviraux. Plusieurs laboratoires ont notamment cherché à identifier une molécule dotée d'une activité antivirale à large spectre. L'objectif qui paraissait le plus réalisable à court terme était le développement de molécules pouvant cibler plusieurs virus proches au sein d'une même famille virale. Toutefois, un composé antiviral actif contre un large éventail de familles virales permettrait de lutter contre les épidémies actuelles et de prévenir celles à venir. Même si une telle molécule reste un rêve de virologue, notre meilleure compréhension de l'immunité innée et des voies métaboliques suggèrent que des possibilités existent. Plusieurs laboratoires académiques et industriels cherchent à identifier de telles molécules. Ainsi, les travaux actuels sur les antiviraux à large spectre visent à cibler une protéine virale commune à différents virus en inhibant sa fonction enzymatique, à toucher un facteur de l'hôte indispensable à la réplication virale, ou à stimuler la réponse immunitaire [19].

L'arsenal antiviral dont nous disposons aujourd'hui est constitué d'une part de molécules biologiques et d'autre part de molécules chimiques. Ces deux groupes distincts de molécules antivirales englobent deux classes d'antiviraux : les antiviraux à action directe, dirigés contre le virus lui-même (AADs), et les antiviraux ciblant l'hôte (HTAs pour Host-Targeting Antivirals). J'aborderai dans cette partie les molécules biologiques de manière succincte, puis je focaliserai le reste de mon exposé sur les molécules antivirales chimiques qui comportent non seulement des AADs mais aussi des HTAs.

Molécules antivirales d'origine biologique

2.1.1 Vaccins

Certes, les armes classiques de prévention contre les infections virales sont les vaccins. Après avoir été appliqué empiriquement en Chine ancienne pendant plus de 2500 ans, le principe de la vaccination a vu le jour en Europe dès le XII^{ème} siècle

lors des campagnes de « variolisation » (l'inoculation volontaire de la variole, ayant été prélevée soit sur un sujet faiblement malade, ou bien un patient déjà variolisé). En 1796, Edward Jenner a montré qu'une protection contre la variole était obtenue par injection intradermique de liquide biologique provenant de lésions liées à l'infection par le Cowpox, ou virus de la vaccine, qui est apparenté à la variole humaine. C'est cette découverte qui permettra l'éradication de la variole deux siècles plus tard. En 1885, Louis Pasteur réalise la première vaccination contre le virus de la rage en inoculant un virus atténué sur un jeune garçon mordu par un chien enragé. Le développement d'autres vaccins s'en est suivi et ce sont des outils qui jouent un rôle central dans le combat contre les infections virales. Toutefois, leur mise au point requière énormément de temps. En effet, l'efficacité d'un vaccin antiviral est évaluée d'une part par le niveau de protection induit par l'immunisation, et d'autre part par la durée cette protection. Les paramètres qui déterminent l'efficacité d'un vaccin sont notamment la nature et la qualité (présentation) de l'antigène viral, la voie d'administration du vaccin, et enfin l'utilisation d'adjuvants. En outre, ce vaccin ne devra ni induire des effets indésirables graves (tolérance), ni présenter des complications d'administration aux patients (nombre d'administrations, conditions de conservation, coût) [20]. Tout ceci explique d'une part la complexité des tests nécessaires à l'évaluation de nouveaux vaccins et d'autre part le temps requis pour leur mise au point, car il s'écoule généralement plusieurs années entre l'évaluation d'un candidat vaccin, les phases précliniques et sa mise sur le marché (Figure 1). Enfin et surtout, le principe même du vaccin qui repose sur la mémoire immunitaire adaptative est très spécifique d'un virus donné, et ne protège que contre celui-ci. La mise au point de plateformes vaccinales versatiles, comme celle de la rougeole, permet d'accélérer le processus de développement d'un nouveau vaccin. Cependant, seule une molécule antivirale à large spectre permettrait d'affronter une épidémie virale dans les premiers mois qui suivent son apparition.

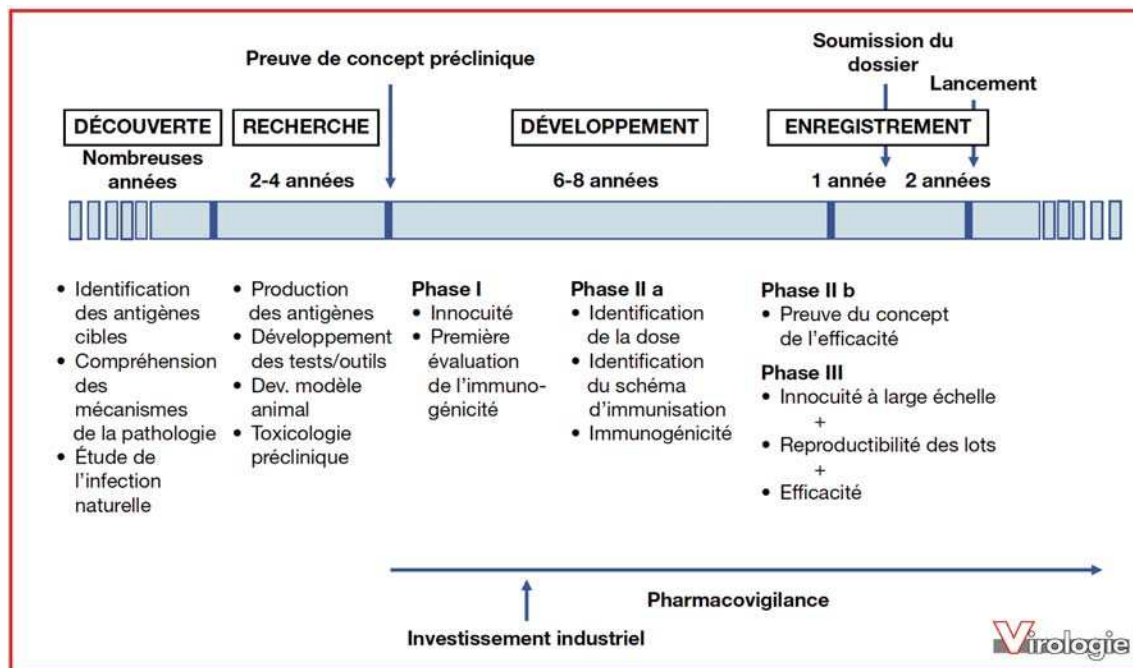


Figure 1. Les principales étapes de la chaîne de développement d'un vaccin humain (Bruno Guy *et al.*, 2010).

2.1.2 Anticorps neutralisants

Par ailleurs, de nombreuses équipes de recherche se sont focalisées sur le développement d'anticorps thérapeutiques neutralisants. Ces anticorps reconnaissent un épitope spécifique d'un virus donné, se lient à la particule virale avec une certaine affinité, et inhibent ainsi son entrée dans la cellule. Ce biomédicament empêche alors l'interaction entre le virus et sa cible cellulaire. Dans le cadre de la prévention des infections virales, il existe des préparations polyclonales d'IgG humaines constituées d'anticorps neutralisants anti-VHB ou contre le virus de la varicelle. En outre, le palivizumab qui est un anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre la protéine de fusion F du VRS a obtenu son AMM (autorisation de mise sur le marché) en France en 1999 et est prescrit pour la prévention des infections respiratoires basses graves, nécessitant une hospitalisation chez les enfants à risque élevé d'infection à VRS. Ces anticorps ont une visée prophylactique, et il est donc primordial qu'ils aient une demi-vie longue, c'est pour cela qu'il s'agit d'IgG entières et non de fragments d'anticorps. Toutefois, ces traitements sont extrêmement coûteux, ce qui limite leur utilisation aux cas de patients à risque très élevé comme c'est le cas pour le palivizumab. Par ailleurs, en

1993, l'équipe de Hamers-Casterman C *et al.* a mis en évidence la présence d'anticorps conventionnels mais aussi d'anticorps dépourvus de chaînes légères et de domaines constants CH1 de la chaîne lourde dans le sérum de dromadaires [4]. Ces anticorps, désignés sous le nom de HcAb pour « heavy chain only antibodies » se fixent à leurs cibles par un seul domaine variable nommé V_HH (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain Antibody) afin de ne pas le confondre avec les domaines variables VH conventionnels de la chaîne lourde, et sont exprimés naturellement chez tous les camélidés, incluant les chameaux, lamas et vigognes. Ainsi, les V_HH, qui correspondent au plus petits fragments actifs de ces anticorps de camélidés, sont également désignés sous le nom de nanobodies. Ces V_HH présentent de nombreux avantages : stabilité, solubilité, capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules, forte affinité pour leur cible qui reste comparable à celle des anticorps conventionnels, et enfin leur production qui est bien plus facile. La formation de molécules multivalentes et multispécifiques peut être réalisée par l'assemblage de plusieurs de ces domaines uniques. Par ailleurs, ces domaines sont dotés de boucles variables longues formant des extensions, ce qui leur confère une capacité à s'insérer dans des cavités normalement inaccessibles comme les sites actifs d'enzymes, ce qui en fait de potentiels inhibiteurs [21] et par là une excellente source d'antiviraux. Ceci est illustré par les travaux de Surasak J. *et al.* qui ont identifié des V_HH capables d'inhiber l'activité enzymatique de la protéase NS3/4A du VHC en se logeant dans son site actif [22] (Figure 2).

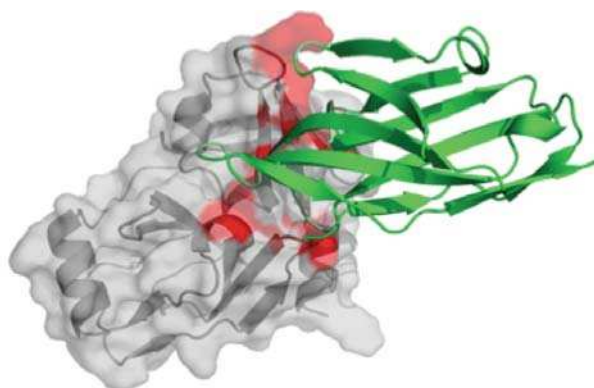


Figure 2. Interaction moléculaire spécifique entre la protéase NS3/4A du VHC et le V_HH28. Le V_HH28 (en vert) inhibe l'activité de la protéase NS3/4A du VHC (en gris) en se blottissant dans son site enzymatique (en rouge) par interaction avec plusieurs chaînes latérales d'acides aminés. (Surasak J. *et al.*, 2015).

Les V_HH ont la capacité de se lier à des épitopes conservés et peu accessibles sur certaines protéines d'agents infectieux. A ce titre, ils représentent une source potentielle d'anticorps antiviraux neutralisants à large spectre [23]. Cependant, des preuves de concept doivent encore être établies pour illustrer ce principe.

2.1.3 Immunostimulateurs

Enfin, les principaux traitements antiviraux à large spectre qui utilisent des molécules biologiques sont basés sur les interférons recombinants de type I (IFN- α/β), lesquels jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée antivirale. Une fois synthétisés, les IFNs de type I vont induire, dans la cellule infectée ainsi que dans les cellules avoisinantes non infectées, l'expression de gènes antiviraux permettant d'établir un état antiviral. L'IFN- α sous forme pégylé (Peg-Interferon), associé ou non à un autre antiviral comme la ribarivine, constitue le traitement de référence des hépatites B et C et l'espoir de guérison varie de 50 à 90% selon les types de virus. De plus, la pégylation de l'IFN, qui correspond à la fixation d'un résidu polyéthylène glycol inerte sur l'IFN, permet d'avoir une molécule avec une demi-vie plus longue permettant de diminuer la fréquence d'injection. Toutefois, l'IFN recombinant est très mal toléré par certains patients et son utilisation est donc limitée. Par ailleurs, il est inefficace contre de très nombreuses infections virales, la plupart des virus ayant développé des mécanismes pour bloquer la cascade de signalisation en aval du récepteur aux IFN. Cependant, l'utilisation de stimulateurs de la réponse immunitaire innée antivirale tel que l'IFN est une stratégie qui fait actuellement l'objet de multiples projets de recherche qui semblent très prometteurs. En effet, de telles molécules devraient être efficaces contre un large éventail d'agents pathogènes viraux car la réponse immunitaire de l'hôte repose sur une multiplicité d'effecteurs antiviraux qui ont la capacité de bloquer les virus à plusieurs étapes de leur réplication. Je développerai ce point en détails dans la dernière partie de mon introduction de thèse.

Molécules antivirales d'origine chimique

2.1.4 Antiviraux à action directe

Les AADs sont des molécules ciblant directement les constituants du virus (les protéines virales ou les génomes viraux). En mars 2014, 50 AADs spécifiques ont été approuvés par la Food and Drug Association (FDA) américaine sachant que 26 de ces molécules sont dirigées contre le VIH et les autres cibles sont principalement les virus des hépatites B et C, les différents virus de l'herpès et ceux de la grippe (source : Antiviral InteliStrat, <http://www.antiviralintelistrat.com>). De plus, les AADs existants n'assurent qu'une activité "virostatique" et de ce fait, ils ne sont capables que de bloquer la réplication de manière réversible et non pas d'éradiquer l'infection. Les AADs agissent principalement sur les polymérases et les protéases virales. Néanmoins, chaque étape du cycle virale est une cible potentielle pour le développement de nouveaux AADs [24].

Ainsi, le cycle de réplication virale implique les étapes suivantes: l'attachement puis l'entrée de la particule virale dans la cellule, suivie de la décapsidation, l'expression des gènes viraux, la réplication du génome viral, l'assemblage, la maturation et enfin la libération des nouveaux virions. La première étape correspondant à la fixation du virus sur la cellule hôte est dépendante d'une interaction spécifique entre une protéine d'attachement virale et un récepteur cellulaire. Le récepteur est souvent protéique, mais il peut également s'agir de carbohydrates ou de glycolipides. L'entrée du virus dans la cellule dépend totalement de la structure de la particule virale. En effet, les virus enveloppés pénètrent dans la cellule via la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte, afin de livrer le contenu de la particule virale dans le cytoplasme. La fusion membranaire peut avoir lieu soit directement à la membrane plasmique lorsque le virus se lie à son récepteur ou bien suite à l'internalisation de la particule virale par endocytose. D'autre part, dans le cas des virus non enveloppés, la capside de certains d'entre eux est capable de se réorganiser après la fixation sur son récepteur, et de former ainsi un pore protéique qui traverse la membrane plasmique de la cellule hôte. Le génome du virus passe ensuite dans le cytoplasme cellulaire. En revanche, chez d'autres virus non enveloppés, la capside entière traverse la membrane cellulaire, le plus souvent suite à l'internalisation des particules virales dans des endosomes. Par

la suite, les protéines de capside détruisent la membrane endosomiale, ce qui entraîne le passage de la capside vers le cytoplasme. L'étape suivante correspond à décapsidation permettant la libération de l'acide nucléique du génome viral dans le cytoplasme, ce qui permettra l'expression des gènes viraux et la réplication du génome viral. Lors de la décapsidation, le génome et la capside virale sont physiquement séparés. Pour de nombreux virus (par exemple, les *Picornaviridae*), la décapsidation est réalisée en même temps que l'étape d'entrée, tandis que pour d'autres il s'agit d'une étape bien distincte. En effet, particulièrement dans le cas des virus à ADN qui se répliquent dans le noyau (par exemple, les *Adenoviridae* et les *Herpesviridae*), la décapsidation se déroule lors de l'arrivée des capsides virales aux pores nucléaires, et ceci donc bien après l'entrée du virus dans la cellule. Les stratégies utilisées pour l'expression et la réplication des génomes viraux varient en fonction du groupe auquel appartient un virus tel que cela est défini dans la classification de Baltimore [25] décrite dans la figure 3.

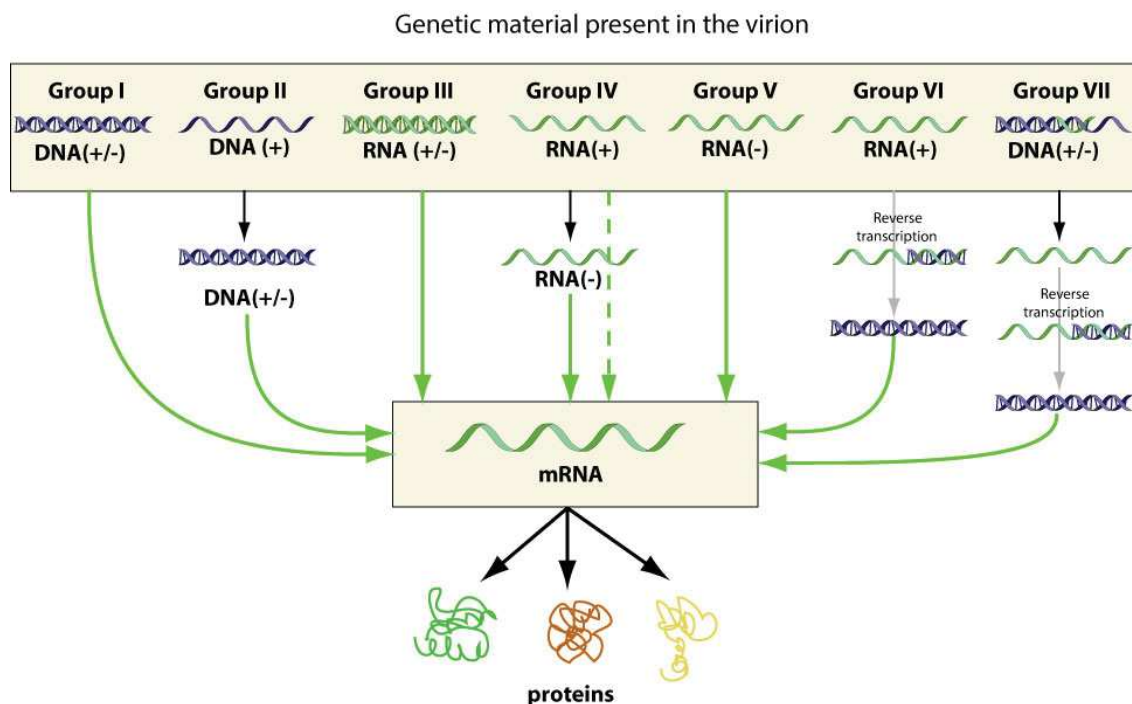


Figure 3. Classification des virus de Baltimore. Proposée en 1971 par David Baltimore et constituée de sept groupes distincts, cette classification est fondée sur la nature du génome et la stratégie de réplication virale. (Source : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html)

L'expression des gènes viraux est donc suivie de la synthèse des protéines virales, et la réplication, quant à elle, permet l'accumulation de multiples copies du génome viral. L'assemblage de nouvelles particules virales a lieu lors de l'association des protéines de structure virales avec l'acide nucléique viral et marque ainsi la fin de la phase d'éclipse. De plus, une étape de maturation est nécessaire dans certains cas où les particules virales formées initialement sont immatures – c'est-à-dire que ses composants doivent encore être transformés par clivage protéolytique ou différents réarrangements. Enfin, la dernière étape est la libération des particules virales nouvellement formées. Elles sont libérées par la lyse cellulaire, ou dans les cas des virus enveloppés, par bourgeonnement. Le processus de bourgeonnement laisse la cellule hôte intacte et permet ainsi à certains virus enveloppés de maintenir une infection productive de façon persistante. Toutefois, il faut garder à l'esprit que toutes les particules virales libérées par une cellule infectée ne sont pas forcément infectieuses et le rapport entre particules non-infectieuses et infectieuses varie selon le virus (Figure 4).

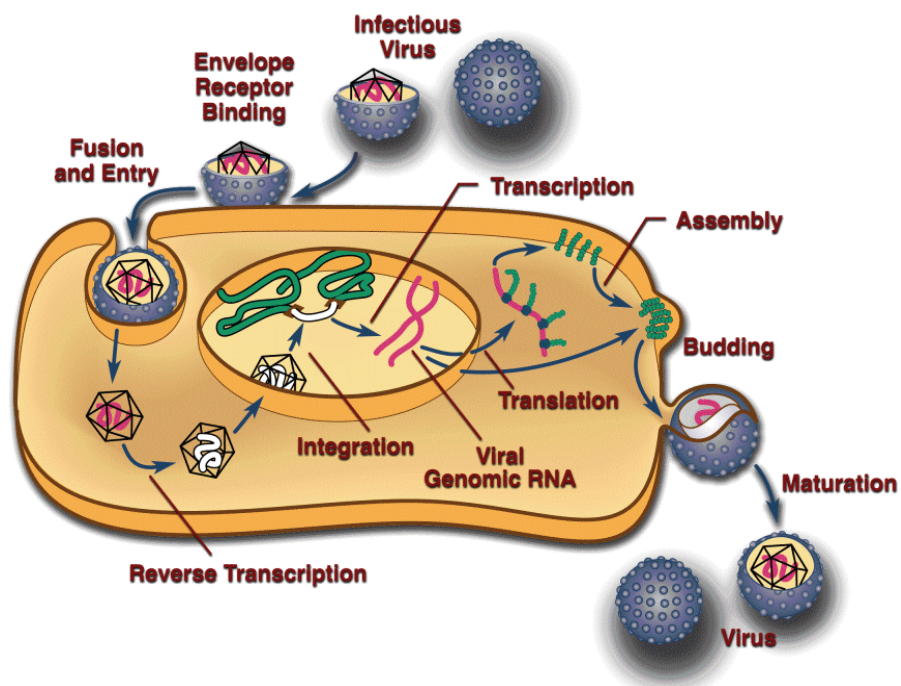


Figure 4. Les différentes étapes du cycle viral et cibles des antiviraux. (Hongxuan He, 2013).

Actuellement, les étapes du cycle de réplication du virus ciblées sont : la fixation virus/cellule cible, la fusion des membranes, la synthèse des acides nucléiques avant intégration, l'intégration du génome virale au génome de la cellule hôte pour les rétrovirus (Groupe VI de la classification de Baltimore), la maturation protéique des virions et la libération des virions. Enfin, la limite principale d'utilisation de ces molécules est due essentiellement à l'apparition d'un phénomène de résistance au traitement.

2.1.4.1 Analogues nucléosidiques et nucléotidiques : inhibiteurs des répliques ou transcriptases virales

Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques ont pour fonction principale de perturber la synthèse des acides nucléiques viraux. Toutefois, les analogues nucléosidiques doivent impérativement subir une triple phosphorylation dans la cellule pour entrer en compétition avec les nucléotides triphosphates naturels.

Le début de l'ère des antiviraux fut marqué par la description de la synthèse de l'IDU (5-iodo-2'-désoxyuridine) en 1959 par William Prusoff [26, 27]. Ce composé fut synthétisé dans un premier temps dans le cadre d'un projet de recherche d'anti-tumoraux [28], mais deviendra plus tard la première molécule antivirale commercialisée sous le nom d'Iduviran® pour le traitement local des infections herpétiques de l'œil. En 1961, Herrmann décrit pour la première fois l'utilisation potentielle de ce composé comme antiviral contre les virus de la vaccine et celui de l'herpès simplex *in vitro* [29]. Toutefois, ce sont les travaux de Kaufman *et al.* publiés en 1962, décrivant l'efficacité de l'IDU dans la kératite herpétique chez le lapin et chez l'homme, qui ont révolutionné la chimiothérapie antivirale [30-32]. Par ailleurs, le mécanisme d'action de l'IDU a été étudié et décrit en détails par Prusoff et Goz en 1975. Ils montrent en effet que cette molécule est un inhibiteur de l'ADN polymérase virale. C'est un analogue structural de la thymidine (la 5-méthyl-2'-désoxyuridine) où le méthyl en position 2 est remplacé par un atome d'iode. Ainsi, lors de la réplication de l'ADN, l'IDU s'incorpore dans l'ADN à la place de la thymidine, entraînant des erreurs de codage dans l'ADN viral et l'inhibition de la réplication virale. Toutefois, ces erreurs se retrouvent également dans l'ADN cellulaire, ce qui induit une forte toxicité limitant malheureusement son utilisation. En effet, son usage thérapeutique

n'a été possible que par voie locale dans les conditions très particulières de la kératite herpétique humaine (HSV-1 et -2), une infection où l'ADN des cellules cornéennes à divisions très espacées incorpore infiniment moins d'IDU que l'ADN viral qui a tendance à se répliquer rapidement. Plus tard, d'autres inhibiteurs de l'ADN polymérase qui sont des dérivés proches de l'IDU, tels que la bromodéoxyuridine, la trifluridine et l'aeduridine ont été utilisés pour traiter la même pathologie.

Par la suite, le traitement des infections herpétiques a été bouleversé en 1980 par l'introduction de l'aciclovir en clinique. Pionnier des antiherpétiques de deuxième génération, l'aciclovir est un analogue acyclique de la guanosine qui est phosphorylé dans la cellule par la thymidine kinase virale. C'est pour cela que les cellules non infectées ne sont quasiment pas affectées, ce qui confère à cette classe d'antiviraux une bien moindre toxicité mais en contrepartie un spectre d'activité très étroit, limité à quelques *Herpesviridae* ayant l'enzyme adéquate. Il inhibe la réplication des HSV-1 et -2, du virus varicelle-zona (VZV) et, dans une certaine mesure, du virus d'Epstein-Barr (EBV). En outre, d'autres dérivés de l'aciclovir ont ensuite été développés tels que : le ganciclovir, le penciclovir, le valaciclovir et le famciclovir [33].

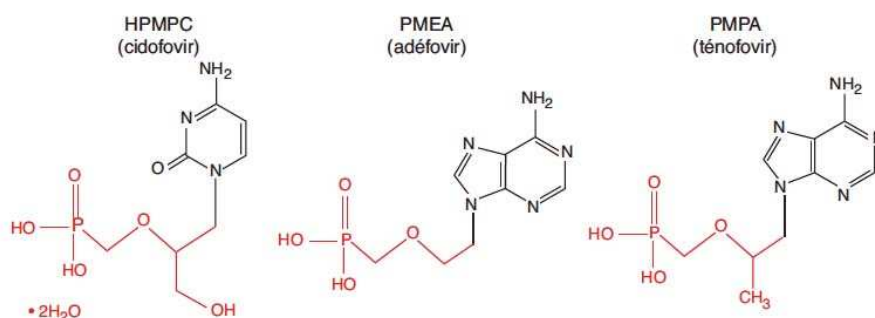


Figure 5. Dérivés acycliques nucléosidiques, antiviraux à spectre élargi. (C. Deback *et al.*, 2007).

Ensuite, les dérivés acycliques nucléosidiques qui ont été synthétisés ont permis une grande avancée dans la lutte contre le VIH (par exemple, Adéfovir, Cidofovir, Ténofovir, Emtricitabine) (Figure 5). Ces antiviraux ne nécessitent plus la kinase virale et présentent une activité antivirale avec un spectre beaucoup plus large en particulier contre des virus faisant partie de la famille des *Hepadnaviridae* (ex : virus de l'hépatite B) et des *Retroviridae* (ex : le VIH) [34, 35]. Le moins toxique et le plus actif d'entre eux est le Ténofovir (le premier approuvé en Europe) [36].

C'est un analogue de l'adénosine utilisé en association avec d'autres antiviraux comme inhibiteur de la rétrotranscriptase du VIH. Cet analogue nucléosidique s'est également montré actif contre le VHB [37]. Toutefois, l'AZT, également connue sous le nom de l'azidothymidine ou zidovudine, est la molécule la plus utilisée dans la trithérapie dans le contexte de l'infection par le VIH. Tout comme l'IDU, elle a été développée au départ comme un anti-cancéreux puis la découverte de son activité antirétrovirale a amené à son utilisation pour le traitement des patients infectés VIH dès 1987 [38-40]. Elle agit d'un inhibiteur compétitif qui se lie à la rétrotranscriptase du VIH entraînant la terminaison de la synthèse d'ADN. À l'heure actuelle, il y a huit inhibiteurs de transcriptase inverse qui sont approuvés par la FDA INTI: abacavir (ABC, Ziagen), didanosine (ddI, Videx), emtricitabine (FTC, Emtriva), lamivudine (3TC, Epivir), stavudine (d4T, Zerit), zalcitabine (ddC, Hivid), zidovudine (AZT, Retrovir) et ténofovir fumarate disoproxil (FDT, Viread) (figure X)[40] (Figure 6).

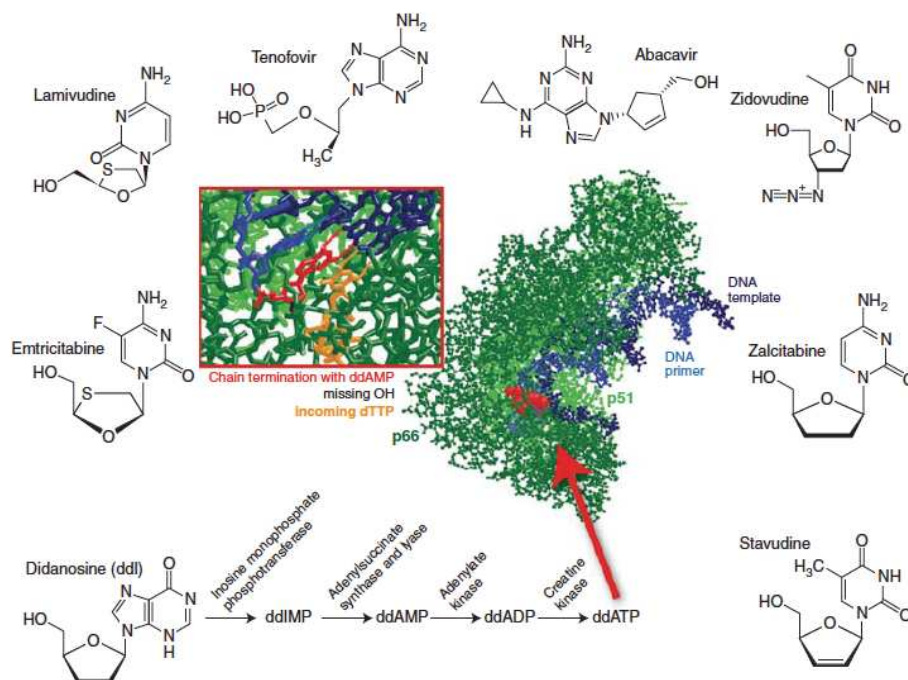


Figure 6. Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse du VIH-1 approuvés par la FDA. Structure chimique des huit inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH-1 et structure cristalline déterminée par diffraction de rayons X de l'interaction de la didanosine avec la transcriptase inverse du VIH-1. (Eric J. Arts *et al.*, 2012).

Toutefois, l'analogue nucléosidique le plus connu pour son activité antivirale à large spectre est la ribavirine [1-(β -D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide]. Synthétisée en 1972 par l'équipe de Sidwell, la ribavirine est constituée d'un ribose et d'un noyau triazole qui se rapproche du noyau imidazole des bases puriques et du noyau des bases pyrimidiques (Figure 7) [41]. Peu après sa synthèse, l'activité antivirale de la ribavirine a été démontrée *in vitro* contre un large panel de virus : des rhinovirus de type 1A, 2, 8, 56 et 143, le virus de la stomatite vésiculeuse, des virus para-influenza de type 1 et 3, le virus de la forêt de Semliki, le virus de la maladie de Newcastle et le virus de la rougeole [42, 43]. Toutefois, son AAM est limitée actuellement au traitement des hépatites chroniques C et E en association avec l'interféron [44-46], et dans le traitement des infections sévères dues au VRS. En effet, suite aux travaux de Caroline Breese Hall [2,19], la ribavirine (sous forme d'aérosol) a été approuvée aux Etats-Unis pour le traitement des infections par le VRS. Elle est le seul agent antiviral approuvé aux Etats-Unis, ou ailleurs, pour le traitement de l'infection par le VRS [47]. Toutefois, son efficacité reste très discutable. De plus, la ribavirine doit être administrée sous forme d'aérosol, ce qui pose des problèmes techniques chez les jeunes enfants et reste très coûteux [48]. Elle est également utilisée en clinique pour traiter les infections dues à certains virus des fièvres hémorragiques, dont le virus de Lassa [49]. En outre, son activité antivirale à large spectre est le principal atout de cette molécule, ce qui permet de l'utiliser dans des situations de crise contre les virus émergents, et son utilisation lors de l'épidémie de SRAS en 2003 illustre tout à fait le potentiel antiviral de cette molécule [50]. En revanche, la ribavirine est responsable d'effets secondaires significatifs qui limitent son utilisation.

La ribavirine agirait par cinq modes d'action directs et indirects distincts (figure 7) [51]. Les mécanismes directs décrits sont d'une part, l'inhibition de l'activité de coiffage des ARN en interagissant directement avec les enzymes responsables du coiffage, l'ARN phosphatase, l'ARN guanylyltransférase et l'ARN (guanine-7-) méthyl-transférase, ou en s'incorporant à la coiffe. En outre la ribavirine est capable d'inhiber la polymérase virale, car elle subit une triple phosphorylation dans la cellule, ce qui lui permet d'entrer en compétition avec les pools cellulaires de guanosine triphosphate (GTP) et d'adénosine triphosphate (ATP). Enfin, la ribavirine agirait également en induisant une augmentation de la fréquence des mutations en s'incorporant dans les génomes nouvellement synthétisés, ce qui représente une

source d'accumulation de mutations délétères pour la population virale. Il est tout à fait intéressant de noter que cette caractéristique de la ribavirine est liée à la rotation du groupement carboxamide de la pseudo-base, ce qui aboutit à la création d'un pont hydrogène avec l'une ou l'autre des deux bases pyrimidiques. Plusieurs travaux décrivent ce dernier mécanisme dans l'activité antivirale de la ribavirine contre le poliovirus, le VHC, les virus Hantaan et West Nile [52-55]. Les mécanismes indirects impliqués dans l'effet antiviral de la ribavirine sont d'une part l'inhibition compétitive de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) qui est impliquée dans la biosynthèse *de novo* des purines, ce qui induit une diminution drastique du pool intracellulaire de GTP et inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Enfin, la ribavirine agirait en tant qu'immunomodulateur en maintenant la réponse immunitaire T-cellulaire de type 1 (Th1), antivirale, et en limitant la réponse des lymphocytes T-auxiliaires de type 2 (Th2), associée au développement de maladie chronique dans le cadre de l'infection par le virus de l'hépatite C [55]. En effet, des travaux chez la souris ont également montré que la ribavirine induit la production d'IL-12, ce qui favorise la réponse Th1 [56] (Figure 7).

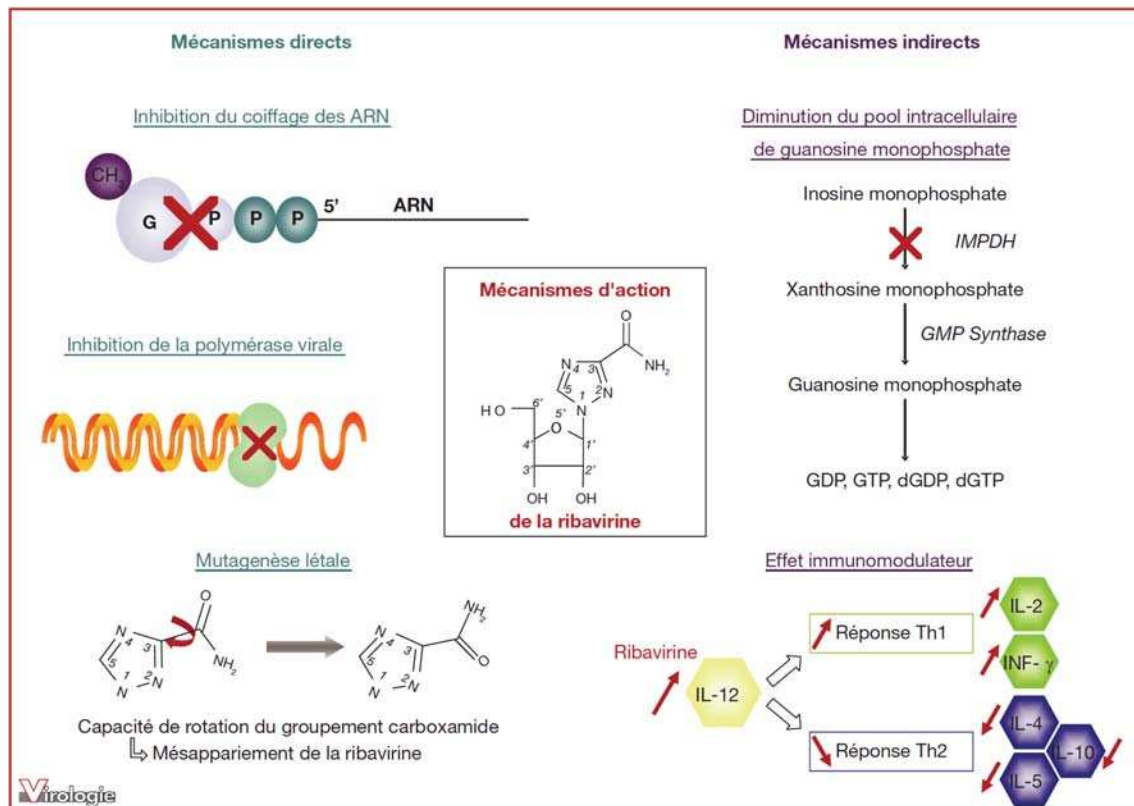


Figure 7. Mécanismes antiviraux de la Ribavirine. (H. Jeulin *et al.*, 2009).

Par ailleurs, divers nucléosides méthylés en position 2' découverts dans un premier temps pour leur activité antivirale contre le VHC, se sont révélés par la suite être également des inhibiteurs de la réplication de plusieurs virus à ARN de polarité positive. Le Sofosbuvir (sous forme de prodrogue : 2'-désoxy-2'- α -fluoro- β -C-méthyluridine), utilisé aujourd'hui en clinique, a totalement révolutionné le traitement des infections par le VHC mais semble moins efficace contre d'autres virus à ARN [57, 58]. En revanche, l'inhibiteur prototype, le 2'-C-méthylcytidine présente une activité antivirale contre un plus large éventail de virus à ARN positif tels que les flavivirus, les norovirus ou encore les picornavirus [59, 60].

Par ailleurs, le favipiravir (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide), également connu sous le nom T-705, a une activité antivirale non seulement contre les virus à ARN positif mais aussi contre les virus à ARN négatif [61]. Cette molécule est décrite comme étant une nucléobase qui, une fois dans la cellule, est métabolisée en un analogue nucléotidique qui inhibe l'ARN polymérase-ARN dépendante du virus de la grippe. Le favipiravir a été approuvé au Japon pour le traitement des infections par le virus de la grippe. Il est également actif contre les arénavirus (Junin, Machupo et Pichinde), les phlébovirus (Vallée du Rift, la fièvre phlébotome et Punta Toro), les hantavirus (Maporal, Dobrava et Prospect Hill), les flavivirus (fièvre jaune et du Nil occidental), les entérovirus (poliovirus et les rhinovirus), les alphavirus (le virus de l'encéphalite équine occidentale), les paramyxovirus (VRS) et les norovirus.

De même, la molécule BCX4430, un analogue de l'adénosine, a le même mode d'action que le favipiravir et s'est montré très efficace *in vitro* contre un grand nombre de virus à ARN positif et à ARN négatif. Son activité antivirale *in vivo* a été montré chez des primates infectés par des filovirus [62].

Néanmoins, ces analogues nucléosidiques et nucléotidiques présentent soit une toxicité et des effets secondaires importants (Par exemple 2'-C-méthylcytidine, et la ribavirine), soit une efficacité clinique limitée à un petit groupe de virus. De plus, certains d'entre eux qui semblent prometteurs ne sont encore que dans les phases initiales de leur développement, et il est difficile d'envisager leur utilisation en clinique à court terme [63-65]. Enfin, le spectre de l'activité antivirale de ces molécules reste

trop restreint pour qu'on puisse les considérer comme étant des antiviraux à large spectre efficaces *in vivo*.

2.1.4.2 Les Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Face à l'épidémie de SIDA, des efforts considérables ont été développés pour mettre au point de nouveaux inhibiteurs de la transcriptase inverse de ce virus. Des inhibiteurs non nucléosidiques inhibant la transcriptase inverse (INNTI) de façon non compétitive ont ainsi été identifiés. De plus, il ne s'agit pas de pro-drogues nécessitant une phosphorylation par les enzymes cellulaires. Ces caractéristiques en font de puissants antirétroviraux, très sélectifs de la transcriptase inverse. Les TIBO (tétrahydro-imidaso-benzodiazépines) et les HEPT (1-(2-2-hydroxyethoxyméthyl)-6-(phenylthio)thymine) sont les premiers INNTI identifiés [66] (Figure 8).

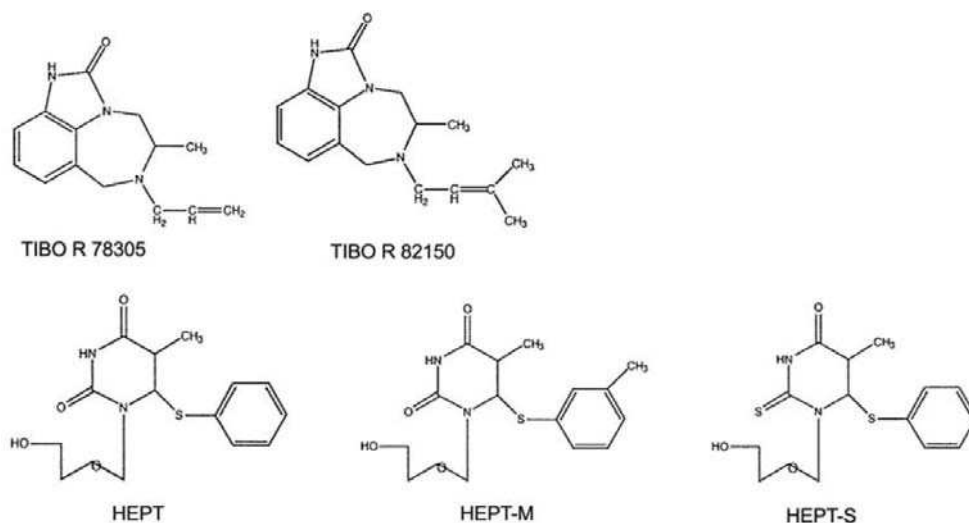


Figure 8. Premiers Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH. Structure chimique des TIBO (tétrahydro-imidaso-benzodiazépines) et les HEPT (1-(2-2-hydroxyethoxyméthyl)-6-(phenylthio)thymine) (H. SEBBAG *et al.*, 2005).

Par la suite, la néviparine (dipyridodiazépinone) a été le premier INNTI commercialisé aux Etats-Unis [66], puis d'autres INNTI ont été identifiés, notamment l'etravirine, la delavirdine et l'efavirenz qui sont largement utilisées dans les trithérapies (Figure 9) [40, 66]. Toutefois, le spectre d'activité de ces molécules est très étroit car leur utilisation reste limitée uniquement au traitement d'infections par

les rétrovirus.

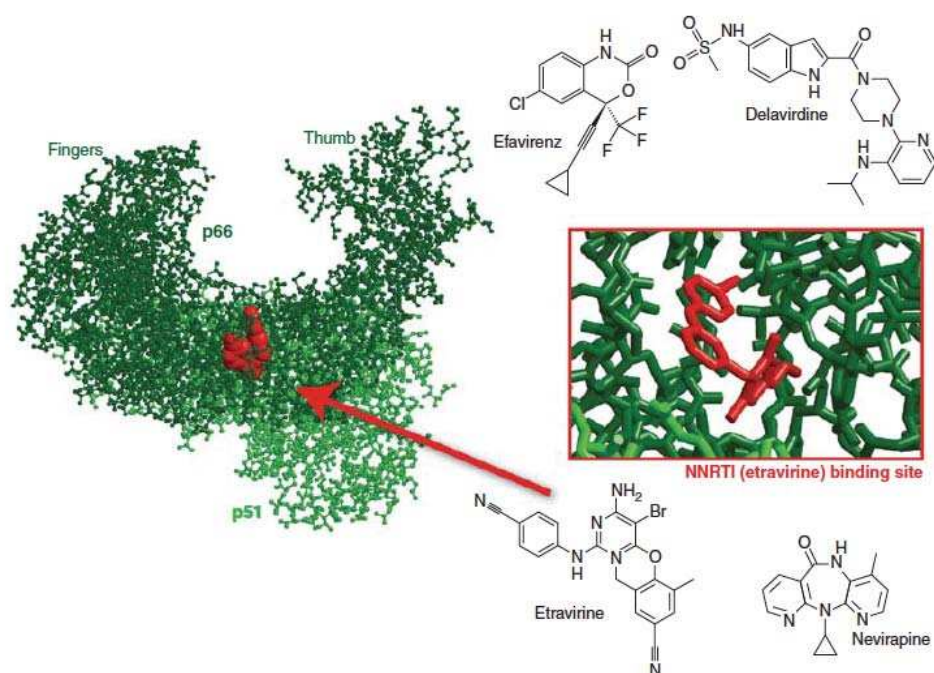


Figure 9. Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1. Structure chimique des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1 et structure cristalline déterminée par diffraction de rayons X de l'interaction de la l'Etravirine avec la transcriptase inverse du VIH-1. (Eric J. Arts *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Inhibiteurs de protéases virales

Les protéases virales constituent également des cibles potentielles dans le développement d'antiviraux à large spectre. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de protéase est déjà un succès dans le traitement des infections à VHC et dans la trithérapie contre le VIH. En effet, dans le cas du VIH, la protéase est essentielle à la maturation des protéines codées par les gènes POL et GAG. Ainsi, les antiviraux existant inhibent la protéase en se logeant dans le site actif ou sur les parties mobiles qui le bordent. Dix ont été approuvés et sont actuellement utilisés en clinique : amprénavir (APV, Agenerase), atazanavir (ATZ, Reyataz), darunavir (TMC114, Prezista), fosamprénavir (Lexiva), indinavir (IDV, Crixivan), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV, Viracept), le ritonavir (RTV, Norvir), saquinavir (SQV, Fortovase / Invirase), et tipranavir (TPV, Aptivus) (Figure 10) [40, 67]. En revanche, ces traitements sont lourds et contraignants pour les patients car ils impliquent

plusieurs prises quotidiennes, et ils sont prescrits afin de contourner des problèmes de résistance aux traitements conventionnels.

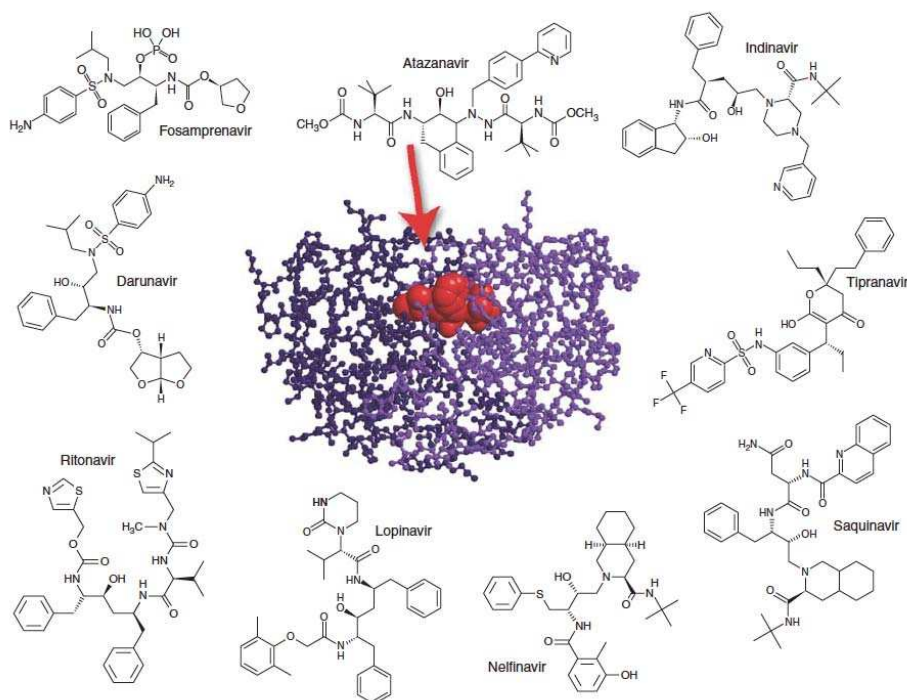
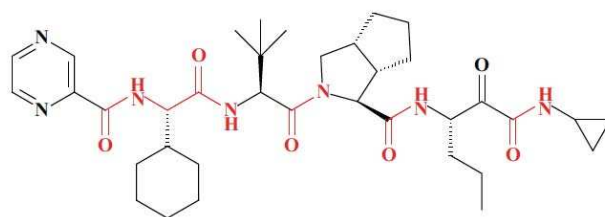


Figure 6. Protease inhibitors and the crystal structure of HIV-1 protease complexed with atazanavir (CA Schiffer, unpubl.) (3EKY).

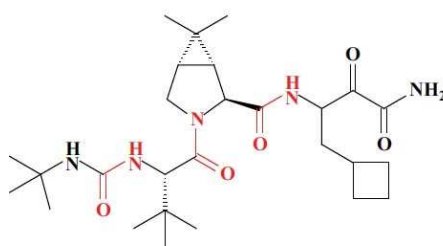
Figure 10. Inhibiteurs de la protéase du VIH et structure cristalline de l'interaction de l'Atazanavir avec la protéase du VIH-1. (Eric J. Arts *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les nouveaux traitements développés dans le cadre de l'infection par le VHC, le télaprévir (VX-950) [68] et le bocéprévir (SCH 503034) [67, 69], sont deux puissants inhibiteurs de la sérine protéase NS3/NS4A du VHC (Figure 11). Cette enzyme est essentielle pour la maturation – par clivage protéolytique – de la polyprotéine virale. En outre, cette protéase virale est également responsable de l'inactivation de plusieurs facteurs intracellulaires de l'hôte impliqués dans la réponse immunitaire innée. De ce fait, son inhibition permet non seulement l'arrêt de la réplication virale mais aussi celui des effets délétères du virus au niveau de certaines fonctions de défense de l'hôte contre les infections.

8



Telaprevir
(VX-950)



Boceprevir
(SCH-503034)

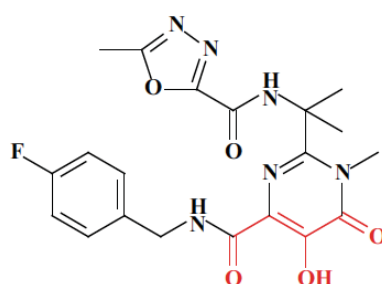
Figure 11. Inhibiteurs de la sérine protéase NS3/NS4A du VHC. (Erik De Clercq, 2011).

Le développement d'inhibiteurs de protéase, pouvant cibler plusieurs familles de virus à la fois, est une stratégie très intéressante qui pourrait permettre l'obtention d'antiviraux à large spectre. L'analyse phylogénétique est un outil qui permet de regrouper plusieurs familles virales au sein d'un même super-groupe où tous les virus ont pour point commun la protéase virale. Ceci peut être illustré par le super-groupe des Picorna-like (ou picornavirus-associated) qui est constitué des picornavirus, des calicivirus, et des coronavirus. Tous ces virus codent pour une protéase de type 3C qui a une conformation ressemblant à celle de la chymotrypsine. Ces protéases sont caractérisées par un site actif constitué d'une triade catalytique : d'une part, la cystéine qui est le nucléophile et qui correspond donc à l'acide aminé qui va réagir avec le substrat et d'autre part, l'histidine et l'acide aspartique qui contribuent à rendre la cystéine particulièrement réactive. Le développement d'antiviraux capables d'agir au niveau de ce site catalytique est donc envisageable. Par exemple, le Rupintrivir (ou AG7088), qui inhibe de façon irréversible la protéase 3C, avait été initialement utilisé pour le traitement des infections à rhinovirus chez l'homme [70]. Des travaux ont décrit son activité antivirale contre d'autres familles virales telles que les picornavirus, les coronavirus ou encore les norovirus [71, 72]. De même, d'autres inhibiteurs de protéases de type

3C se sont révélés efficaces contre à la fois des calicivirus et des coronavirus félins [73]. Ainsi, la conception de molécules ciblant des protéases virales de différentes familles virales semble possible et pourrait être une bonne stratégie pour développer des antiviraux à large spectre.

2.1.4.4 *Autres inhibiteurs viraux*

D'autres antiviraux à action directe en développement visent d'autres enzymes que celles décrites précédemment. En particulier, dans le cas des rétrovirus, l'intégrase a suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche et elle figure toujours parmi les cibles potentielles. Le Raltegravir est un inhibiteur de l'intégrase du VIH et a été approuvé en 2007 par la FDA (Figure 12) [40] [74]. D'autres inhibiteurs de l'intégrase ont également été approuvés récemment, ou sont dans des phases avancées de développement.



Raltegravir
(MK-0518)

Figure 12. Inhibiteur de l'intégrase du VIH, le Raltegravir. (Erik De Clercq, 2011).

L'étude de la fusion du virion avec la cellule hôte, toujours dans le cadre de l'infection par le VIH, a permis de développer des inhibiteurs de fusion. Parmi eux, le T-20, encore appelé enfuvirtide (Fuzeon), est la molécule pionnière dans cette classe d'antiviraux et a été approuvée par la FDA en 2003. Cette molécule se fixe sur la protéine gp41, et l'empêche de remplir son rôle en inhibant la fusion des membranes et l'entrée du VIH dans les cellules hôtes telles que les lymphocytes T [40]. En revanche, c'est un médicament qui est utilisé en dernier recours car il est administré en injection sous-cutanée et entraîne des effets indésirables importants chez les patients (diarrhées, nausées, neuropathie périphérique, perte de poids, sinusite,

infection des oreilles...etc.). Utilisé en association avec d'autres médicaments anti-VIH, il est prescrit uniquement à des adultes séropositifs déjà traités présentant une résistance à d'autres médicaments anti-VIH. Les mécanismes de fusion des virus enveloppés étant largement conservés, la conception d'inhibiteurs de fusion à large spectre est envisageable.

Par ailleurs, des inhibiteurs de la neuraminidase ont été mis au point. Néanmoins, cette glycoprotéine exprimée à la surface de la particule virale du virus de la grippe mute facilement et échappe à ces inhibiteurs, ce qui limite fortement leur utilisation. Les premiers médicaments dans cette classe d'antiviraux approuvés par la FDA en 1999 sont : le Zanamivir commercialisé par le laboratoire GlaxoSmithKline (GSK) sous le nom de Relenza et l'Oseltamivir commercialisé par Roche sous le nom de Tamiflu. Ces traitements ciblent la dernière étape du cycle viral : ils piègent en effet les virions nouvellement formés à la surface cellulaire et empêchent ainsi leur libération et l'infection des cellules avoisinantes.

Toutefois, la limite d'utilisation majeure commune à toutes ces drogues reste leur spectre d'activité antivirale qui est très étroit. De plus, peu d'entre elles sont efficaces contre les virus à ARN qui sont les principaux virus impliqués dans les phénomènes d'émergence. En outre, l'apparition de résistances aux traitements en raison de la fréquence de mutation du matériel génétique du virus reste un obstacle considérable dans l'utilisation des antiviraux à action directe. Ainsi, ces limites d'utilisation ont incité les chercheurs à développer rapidement d'autres stratégies innovantes afin de contourner ces difficultés avec de nouvelles thérapeutiques.

2.1.5 Antiviraux à large spectre ciblant l'hôte

Dans un deuxième temps, plusieurs équipes de recherche se sont tournées vers une nouvelle idée, celle de développer des antiviraux à large spectre ciblant l'hôte ou HTAs. En effet, cette seconde stratégie consiste à cibler un facteur cellulaire essentiel à la réplication de virus appartenant à différentes familles. Elle est encore controversée car en inhibant certains facteurs cellulaires qui sont indispensables à l'hôte, ces drogues pourraient présenter une forte toxicité et par là d'induire des effets indésirables chez le patient traité. De plus, certains paramètres

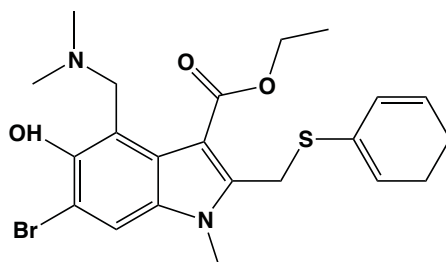
tels que le polymorphisme et la variabilité du niveau d'expression du facteur cellulaire ciblé d'un patient à l'autre représentent des limites à cette stratégie. Toutefois, elle permet de contourner le problème de résistance au traitement dû à la capacité de mutation du matériel génétique du virus qui reste un obstacle considérable dans l'utilisation des antiviraux à action directe. Tout repose entièrement sur le facteur cellulaire choisi comme cible et le rôle qu'il occupe d'une part dans la fonction cellulaire et d'autre part dans le cycle viral. Des modulateurs du métabolisme des lipides, tels que nitazoxanide, et les inhibiteurs des cyclophilines sont des antiviraux ciblant l'hôte considérés comme de potentiels antiviraux à large spectre.

2.1.5.1 Molécules interagissant avec les lipides ou leur métabolisme

Le métabolisme des lipides dans la cellule hôte est une cible majeure dans le développement d'antiviraux à large spectre car il joue un rôle primordial dans la réplication de nombreux virus [75].

A. Les modulateurs du métabolisme des lipides : Les statines

La classe de modulateurs de lipides la plus connue et la plus utilisée est celle des statines, des molécules induisant une diminution du taux de cholestérol dans le sang. Les statines inhibent la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase (HMG CoA réductase), une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol dans le foie. L'activité antivirale des statines a été démontrée *in vitro* contre divers virus, tels que le VHC, le poliovirus, le cytomégalovirus, le virus de la dengue, le VIH ou encore le VRS [76-80]. Néanmoins, les études évaluant l'efficacité antivirale des statines chez les patients ont donné des résultats contradictoires. Chez les patients atteints de l'hépatite C chronique et en fonction des études, aucun effet antiviral n'a été observé lors de leur utilisation en monothérapie ou seulement des effets très modestes. En revanche, l'association des statines avec de l'interféron- α pégylé ou de la ribavirine a montré un effet synergique et une amélioration tout à fait significative de la réponse antivirale, nettement supérieure à celle observée avec la bithérapie constituée de l'interféron- α pégylé et de la ribavirine, le traitement généralement utilisé pour le traitement de l'hépatite C chronique [81, 82]. L'utilisation potentielle des statines comme antiviraux à large spectre nécessitera toutefois une étude plus approfondie pour prouver leur efficacité antivirale *in vivo*.

B. Antiviraux interagissant directement avec les lipides**i. Umifenovir (Arbidol)****Figure 13. Umifenovir (Arbidol).**

D'autres molécules antivirales interagissent directement avec les lipides cellulaires. Par exemple, l'umifenovir, un dérivé d'indole, qui est approuvé en Chine et en Russie en prophylaxie, mais aussi comme traitement de la grippe et d'autres infections virales respiratoires (Figure 13). Cette molécule inhibe également la réplication de nombreux autres virus enveloppés et non enveloppés à ARN et à ADN, y compris le VHB, le VHC et le virus du chikungunya [83]. Des études récentes suggèrent que l'umifenovir a un double mécanisme d'action: il serait capable d'interagir non seulement avec les lipides membranaires mais aussi avec les acides aminés aromatiques de la glycoprotéine de l'enveloppe virale [84]. De cette façon, il interfère à la fois avec l'entrée virale et la fusion membranaire. En outre, l'umifenovir présente d'une part une bonne biodisponibilité et d'autre part peu d'effets indésirables chez les patients traités, ce qui en fait un candidat prometteur comme agent antiviral à large spectre [85]. Cependant, à l'heure actuelle, très peu d'études ont confirmé son effet antiviral *in vivo*.

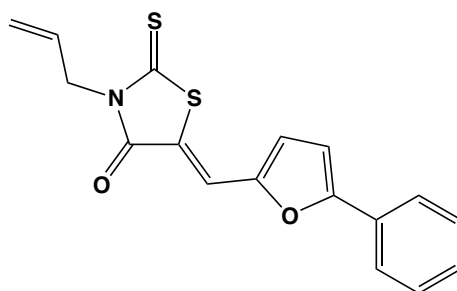
ii. **LJ001**

Figure 14. LJ001, un dérivé lipophile de thiazolidine.

Le LJ001, un dérivé lipophile de thiazolidine, est efficace contre plusieurs virus enveloppés, y compris le virus de la grippe, le VIH et les filovirus [86] (Figure 14). En revanche, ce composé n'a pas d'effet sur les virus non enveloppés. Ainsi, en interagissant avec les lipides de l'enveloppe virale, le LJ001 inhibe la fusion virus-cellule hôte. Des études récentes ont montré que le LJ001 induit l'oxydation des lipides, ce qui altère les propriétés biophysiques des membranes (telles que la courbure et la fluidité) qui sont essentielles pour la fusion virale [86]. Cependant, la poursuite du développement clinique de cette molécule s'est avérée impossible à cause d'une part d'une très faible stabilité métabolique et d'autre part, de la nécessité d'une étape de photoactivation pour son activité antivirale. Par la suite, de nouveaux analogues ont été développés afin d'optimiser cette molécule [87]. Ces analogues présentent une meilleure activité antivirale, de meilleures propriétés pharmacocinétiques, et ils ne nécessitent plus la lumière pour leur effet antiviral. Toutefois, testées dans un modèle de souris d'infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift, ces molécules étaient seulement capables de retarder le moment de la mort des animaux mais pas d'arrêter l'infection [87]. Bien que cette classe particulière de molécules semble être moins adaptée pour le développement clinique, la membrane plasmique de l'hôte reste une cible potentielle dans le développement d'antiviraux à large spectre ayant la capacité de bloquer la fusion virale.

iii. La squalamine

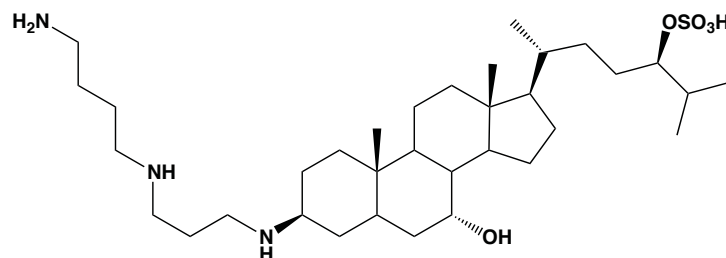


Figure 15. Squalamine.

La squalamine est un autre composé qui cible la membrane lipidique de l'hôte, mais son mécanisme d'action diffère de celui de LJ001 et ses analogues (Figure 15). La squalamine a été isolée à partir du requin roussette et de la lamproie marine en 1993 par le Professeur Michael Zasloff. Elle inhibe la réplication des virus enveloppés à ARN et à ADN, et son activité antivirale a été décrite à la fois *in vitro* et *in vivo* [88]. Elle agit en neutralisant les charges négatives portées par les phospholipides constituant le feuillet interne de la membrane plasmique, ce qui rend l'environnement cellulaire moins favorable à la réplication virale en laissant intacte la structure de la membrane cellulaire. De plus, la squalamine peut être facilement synthétisée en laboratoire et son utilisation a déjà été étudiée chez l'homme dans plusieurs essais cliniques de phase II dans le cadre du développement de traitement pour le cancer et pour les vasculopathies rétiniennes sans montrer d'effets indésirables graves [89]. Il serait donc intéressant d'explorer son utilisation comme un agent antiviral à large spectre.

2.1.5.2 Inhibiteurs de l'acidification des endosomes

A. l'amantadine et son dérivé, la rimantadine

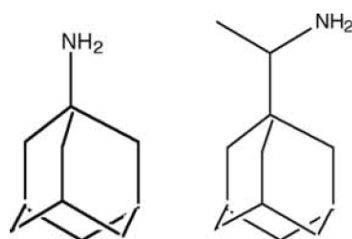


Figure 16. Amantadine et son dérivé, la rimantadine. (H. SEBBAG, 2005)

L'amantadine (Symmetrel) et son dérivé, la rimantadine inhibent la protéine M2 virale formant un canal ionique permettant la libération de l'ARN viral du virus de la grippe au sein de la cellule hôte (Figure 16). Ainsi, l'action de l'amantadine et de la rimantadine bloque l'acidification des endosomes, et diminuerait la fusion membranaire permettant l'internalisation du virus [90]. En revanche, ces molécules sont efficaces uniquement contre le virus grippal de type A et les virus y sont devenus largement résistants. Dans une étude du « Center for Disease Control and Prevention », les auteurs décrivent la résistance de tous les virus de sous-type H1N1 de la pandémie de 2009 à l'amantadine et au rimantadine [91]. Ces inhibiteurs de la protéine M2 sont donc de moins en moins utilisés.

B. La chloroquine

La chloroquine est une aminoquinoléine connue depuis 1934 pour ses propriétés antipaludiques (Figure 17).

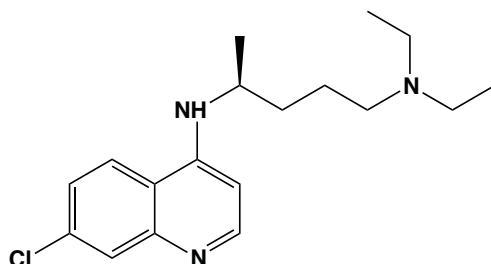


Figure 17. Chloroquine.

En outre, la chloroquine a été décrite pour son activité antivirale *in vitro* contre le VIH [92], le virus de la grippe [93], le virus de la Dengue [94], le virus de l'encéphalite Japonaise [95], le virus du Nil Occidental [96] et plus récemment, contre le virus ZIKA [97]. La chloroquine est une base faible qui agirait en augmentant le pH à l'intérieur des endosomes et inhibe ainsi les étapes de la réplication virale qui sont pH-dépendantes. Toutefois, la chloroquine s'est avérée inefficace dans un essai clinique impliquant des patients atteints d'une infection par le virus du chikungunya. Lors de cet essai clinique en double aveugle [98] mené à la Réunion (Océan Indien), aucune différence statistique n'a été observée entre les patients traités avec la chloroquine et les groupes placebo. En revanche son utilisation dans le traitement d'autres infections virales reste à explorer.

2.1.5.3 Autres molécules ciblant les facteurs cellulaires

A. Nitazoxanide

Le Nitazoxanide (NTZ) a été initialement développé et commercialisé comme un agent anti-protozoaire et a été approuvé aux États-Unis en tant que médicament orphelin pour le traitement de la diarrhée causée par le *Cryptosporidium parvum* et *Giardia intestinalis* [99]. Il est également utilisé très largement en Inde et en Amérique latine pour traiter les infections parasitaires intestinales. Par ailleurs, en plus de son activité anti-parasitaire, le NTZ inhibe la réplication d'un large éventail de virus à ARN et à ADN non apparentés [100]. Par exemple, dans le contexte d'une infection par le virus de la grippe, le NTZ inhibe la réplication virale en interférant au niveau des modifications post-traductionnelles de l'hémagglutinine virale, bloquant ainsi sa maturation [101]. Par ailleurs, une équipe a montré que le NTZ bloque la synthèse protéique virale dans les cultures de cellules infectées par le VHC [102]. Ainsi, le NTZ agirait en activant la protéine kinase R (PKR) qui entraîne à son tour la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction (eIF-2 α) et un certain nombre d'évènements cellulaires qui vont aboutir à l'arrêt de la traduction. En outre, une étude clinique de phase IIb/III chez des patients atteints de la grippe a montré que le NTZ diminue non seulement la durée des symptômes cliniques, mais également l'excrétion virale par rapport au placebo. Des essais cliniques de phase 3 sont en cours [103]. Des études de phase 2 ont également montré que le NTZ réduit significativement la durée des symptômes chez les patients infectés par les rotavirus ou les norovirus [104]. Dans le cas de patients infectés par le VHC, l'association de l'interféron pegylé à du NTZ a permis d'avoir une meilleure réponse [105]. Cependant, l'autorisation de la mise sur le marché d'antiviraux à action directe pour le traitement de l'infection par le VHC qui a eu lieu récemment a entraîné l'interruption du développement clinique du NTZ. Le NTZ reste toutefois un candidat très prometteur dans le développement d'antiviraux à large spectre. En effet, l'efficacité de ce composé a été prouvée dans différents essais cliniques dans le cadre du traitement d'infections causées par différents virus et aucune résistance au traitement n'a été observée. Il serait donc intéressant, au vu des résultats déjà obtenus, de se concentrer sur le développement clinique de ce médicament dans le cadre d'infections respiratoires et de gastro-entérites virales.

B. Le celgosivir ou MX-3253

Le celgosivir ou MX-3253 est une prodrogue orale de la castanospermine, dérivée des graines du châtaignier d'Australie (*Castanospermum Austral*). Cette molécule agit en inhibant de façon compétitive les α -glucosidases du réticulum endoplasmique et bloque ainsi la glycosylation des protéines d'enveloppe et interfère avec l'assemblage des virions. Elle ne montre aucune efficacité lorsqu'elle est utilisée en monothérapie. Toutefois, elle a démontré un effet synergique lorsqu'elle est administrée en association avec l'interféron pégylé et la ribavirine dans le traitement de l'infection par le VHC [106] [107].

C. Maraviroc

Par ailleurs, des inhibiteurs d'entrée du VIH ont été développés tel que le Maraviroc (Celsentri) [40] [74]. C'est un antagoniste compétitif du récepteur au VIH, le CCR5, exprimé à la surface de la cellule hôte comme le lymphocyte T. Toutefois, son utilisation n'est possible que chez les patients présentant une infection par le VIH à tropisme uniquement CCR5. La même stratégie a été utilisée pour le développement de thérapeutiques dans la lutte contre d'autres virus, mais on est loin d'un antiviral à large spectre, sauf si le récepteur ciblé est utilisé par différents virus.

D. Les antagonistes des cyclophilines

Les cyclophilines sont des chaperonnes ubiquitaires impliquées dans le repliement de certaines protéines de l'hôte [108] et jouent également un rôle primordial dans le cycle de vie de nombreux virus [109]. C'est pour cela que les chercheurs se sont intéressés à un potentiel effet antiviral de molécules exerçant un effet inhibiteur sur les cyclophilines telles que la cyclosporine A ou encore la sanglifehrine A [110]. Toutefois, ces molécules ont de puissantes propriétés immunosuppressives car ils inhibent également la calcineurine, une phosphatase régulant l'activité de différents facteurs de transcription (comme NFAT) qui interviennent notamment dans la synthèse de l'IL-2. C'est pour cela qu'elles sont largement utilisées dans la prévention des rejets de greffe et dans le traitement de maladies auto-immunes. Dans un premier temps, des dérivés de la cyclosporine dénués d'effet immunosuppresseur inhibant uniquement les cyclophilines ont été

développés puis différentes équipes de recherche ont montré leur efficacité sur une large gamme de virus à ARN et à ADN, à la fois *in vitro* et dans des modèles animaux [109]. De plus, il s'est avéré que l'activité antivirale de ces analogues est nettement supérieure à celle observée avec la cyclosporine.

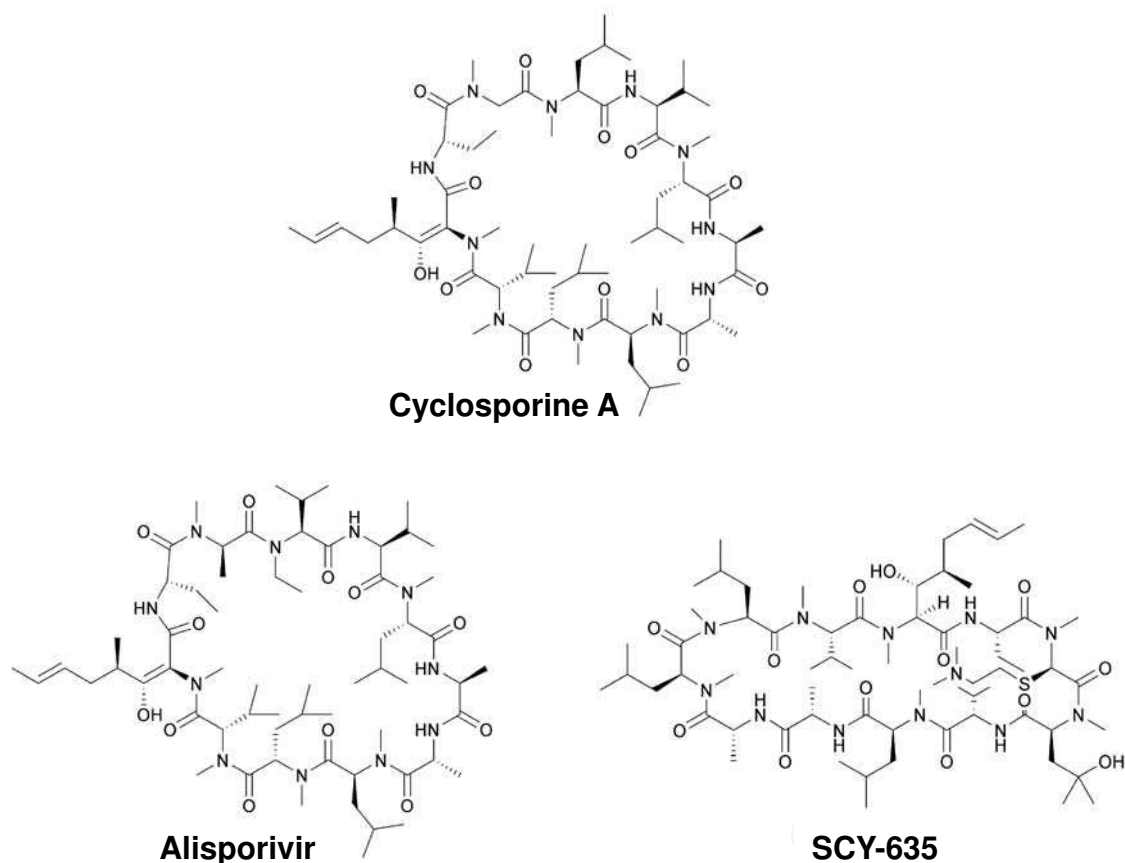


Figure 18. La cyclosporine A et ses deux analogues, l'alisporivir et le composé SCY-635 (J. P. Martinez *et al.*)

Parmi ces molécules, l'alisporivir et le composé SCY-635 sont celles dont le développement clinique est plus avancé (Figure 18). En outre, leur efficacité thérapeutique a été démontrée chez les patients infectés par le VHC [111, 112]. Par ailleurs, des études ont montré que la cyclophiline A (CypA) agirait en se liant à la protéine NS5A du VHC, suggérant que l'apparition d'une mutation au sein de la protéine NS5A peut entraîner une résistance au traitement par l'alisporivir [113, 114]. Toutefois, des travaux ont permis de montrer que de multiples mutations dans NS5A étaient nécessaires pour conférer une résistance *in vitro* à l'alisporivir, ce qui suggère que le risque de développer une résistance au traitement reste relativement faible [114, 115]. Dans le cas du VIH, il a été rapporté que CypA se lie à la protéine p24 de

la capside [116]. Bien que les inhibiteurs de CypA se soient révélés très efficaces dans l'infection par le VIH *in vitro* et dans le cas de la majorité des patients traités, des variants naturels d'enveloppe du VIH induisent une résistance au traitement, ce qui limite l'utilisation thérapeutique des inhibiteurs de CypA seulement aux patients infectés par certains sérotypes du VIH [117, 118]. Cependant, comme les cyclophilines sont indispensables à la réplication de nombreux virus, ces protéines restent des cibles potentielles pour le développement d'antiviraux à large spectre. De plus, des études réalisées *in vitro* dans une lignée de cellules humaines n'exprimant pas CypA, et *in vivo* dans un modèle de souris déficientes (KO) pour le gène CypA, suggèrent que la CypA n'est pas une protéine essentielle [119, 120], ce qui nous permet de contourner d'ores et déjà le problème de toxicité cellulaire avec ce type de molécule. Toutefois, l'efficacité *in vivo* des inhibiteurs de CypA devra être démontrée pour d'autres virus.

Enfin, le système immunitaire constitue en soi un système naturel de défense à large spectre contre les infections virales. Ce système permet le contrôle et l'élimination rapide des nombreux virus avec lesquels nous entrons en contact chaque jour. Au sein du système immunitaire, la réponse innée, qui est immédiatement mobilisable et ne nécessite aucune phase d'apprentissage, joue un rôle clé dans l'élimination des virus. Cette première ligne de défense repose sur l'induction d'un vaste ensemble de gènes et de facteurs qui agissent de concert. Cependant, certains virus sont capables d'inhiber ou de dévier la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui leur permet de se répliquer [121]. Si la réplication virale est souvent associée à la destruction des tissus infectés, la réponse immunitaire elle-même, lorsqu'elle est exacerbée ou inadaptée, peut aussi être préjudiciable pour l'hôte [122]. Une approche thérapeutique originale vise, à l'aide de molécules chimiques ou biologiques, à restaurer une réponse immunitaire antivirale efficace. L'exemple le plus connu repose sur l'utilisation d'interféron de type I recombinant qui stimule l'expression des gènes antiviraux dans les cellules. Comme cela a été évoqué précédemment, l'interféron, un puissant immunostimulateur produit par la cellule infectée, est déjà utilisé comme thérapie dans le contexte notamment de l'infection par le VHB et le VHC. En outre, notre meilleure connaissance des mécanismes de production des IFN de type I par la cellule suite à l'infection virale et de leurs effets nous permet d'envisager de nouveaux antiviraux modulant la réponse

IFN de type I. Ainsi, c'est cette stratégie qui a été explorée par l'équipe de l'unité de Génomique Virale et Vaccination à l'Institut Pasteur, et qui est l'objet principal de mon travail de thèse. Dans la suite de mon exposé, j'aborderai tout d'abord les caractéristiques principales de la réponse immunitaire antivirale innée, et je présenterai ensuite les composés capables d'induire cette réponse dans la dernière partie de mon introduction.

Chapitre II : Réponse immunitaire innée : première barrière face aux virus

L'homme a acquis au cours de l'évolution un système immunitaire dont la finalité est de le protéger en permanence non seulement contre les agressions externes qu'elles soient d'origine bactérienne, parasitaire ou virale (le non soi) mais aussi contre les agressions internes à l'organisme (le soi altéré) telles que les cellules mortes ou cellules tumorales par exemple. Ce système immunitaire est divisé en deux composantes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, dite « immédiate », constitue une première ligne de défense grâce à laquelle la plupart des agents pathogènes sont éliminés rapidement de l'organisme. En outre, de par ses modalités de reconnaissance, il est généralement qualifié de système immunitaire non-spécifique déclenchant une réponse très rapidement dans les minutes suivant l'infection. Son rôle est donc essentiel car il permet à l'hôte de détecter les signaux de danger et d'y répondre immédiatement. La réponse immunitaire adaptative nécessite en revanche plus de temps pour se mettre en place. Orchestrée par l'interaction des cellules présentatrices d'antigènes (notamment les cellules dendritiques) avec les lymphocytes T et B, elle est très spécifique et caractérisée par une mémoire immunitaire à long terme qui confère une protection plus rapide et plus efficace en cas de réinfection. Au-delà de cette vision cloisonnée des deux composantes du système immunitaire, il faut garder à l'esprit que leurs mécanismes se complètent. L'immunité adaptative a longtemps occupé une place majeure dans les études menées sur le système immunitaire. Toutefois, suite à l'étude des récepteurs Toll par Bruce Beutler, Charles Janeway et Jules Hoffmann, et la caractérisation des cellules dendritiques par Ralph Steinman au début des années 90, notre compréhension de la réponse immunitaire innée antivirale a progressé de façon fulgurante. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, les travaux réalisés sur l'immunité innée ont permis de mettre en évidence son rôle essentiel dans la lutte contre les pathogènes et en particulier dans la lutte antivirale. En effet, toutes les cellules de l'organisme et en particulier les effecteurs cellulaires de l'immunité innée expriment à leur surface des récepteurs membranaires ou intracellulaires regroupés sous le nom de Pathogen Recognition Receptors (PRRs). Dans le cadre des infections virales, la reconnaissance de l'agent infectieux par ces PRRs induit la

production des IFN de type I qui constituent la première ligne de défense contre les virus. Ces cytokines inhibent la réplication virale dans les cellules infectées et confèrent une protection rapide et non spécifique aux cellules avoisinantes. Les acides nucléiques naturels ou artificiels tels que l'acide polyinosinique-polycytidylique (ou poly I:C), un mime artificiel d'ARN bicaténaire, sont décrits comme de puissants inducteurs de ces cytokines dès 1967[123].

Ainsi, la détection initiale des pathogènes constitue une étape cruciale dans le développement de la réponse immunitaire innée. Comme nous l'avons évoqué précédemment, cette reconnaissance se fait grâce aux PRRs qui sont particulièrement exprimés par les acteurs de l'immunité innée que sont les macrophages, les neutrophiles, les cellules épithéliales, les cellules dendritiques (DCs) mais aussi les cellules $T\gamma\delta$ et les cellules natural killer (NK). Ces récepteurs lient des motifs moléculaires hautement conservés exprimés par les pathogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou MAMP (Microbial-Associated Molecular Patterns), qui sont pour le système immunitaire une signature moléculaire des microorganismes. En 1994, dans une publication intitulée «Tolerance, Danger and the Extended Family», Polly Matzinger introduit la théorie du « danger » où elle suggère que le système immunitaire réagit non pas seulement au « non soi », mais à n'importe quel « danger », endogène ou exogène, dans l'organisme[124]. Par la suite, il a été démontré à travers divers travaux que les PRRs sont également capables de reconnaître les DAMPs « damage-associated molecular patterns » qui sont des molécules endogènes libérées dans le milieu extracellulaire suite à un stress ou un dommage tissulaire, et ceci même en l'absence de toute infection [125, 126]. En outre, les DAMPs activent les mêmes voies de signalisation que les PAMPs. Les plus connus d'entre elles sont l'adénosine triphosphate (ATP), l'acide urique, les Heat Shock Protein (HSPs), les cristaux de cholestérol et les acides nucléiques cellulaires.

Ainsi lors d'une infection virale, les PRRs sont capables de détecter des motifs moléculaires hautement conservés exprimés par le virus, et d'activer ainsi des cascades de signalisation intracellulaires qui induisent d'une part l'expression de gènes antiviraux, et d'autre part, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et des interférons de type I. Les IFNs de type I sont essentiels à la réponse antivirale et

constitue de ce fait la première ligne de défense contre l'infection, la multiplication et la dissémination des virus. Dès les premiers signes de l'infection, ils ont un effet antiviral rapide et non spécifique sur les cellules infectées (effet autocrine) et protègent de l'infection les cellules avoisinantes (effet paracrine). Je décrirai dans une première partie les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans la production des IFNs de type I, puis dans une deuxième partie les réponses cellulaires induites par ces cytokines antivirales.

1 Senseurs de l'immunité innée antivirale

Découverte et rôle des IFN de type I au sein des infections virales

En 1957, Alick Isaacs et Jean Lindenmann étudient le phénomène d'interférence virale, c'est-à-dire la capacité d'une cellule à résister à l'infection par un virus lorsque celle-ci a préalablement été exposée à une préparation de virus inactivé. Ils montrent alors que ce phénomène de résistance repose sur la sécrétion d'un facteur soluble par les cellules traitées et le baptisent « *interféron* » [127]. Par la suite, Isaacs et son équipe montrent que les acides nucléiques isolés à partir de préparations de virus purifiés sont capables d'induire l'*interféron* [128], ou plus exactement les interférons de type I, qu'il faut distinguer de l'interféron de type II, ou IFN- γ , qui sera découvert en 1965 et qui est produit notamment par les cellules NK et les lymphocytes T activés [129]. Les interférons de type I se répartissent en cinq classes chez l'homme : IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω [130]. Chacun de ces interférons de type I est le produit d'un seul gène, à l'exception des IFN- α qui sont codés par treize gènes différents. Les IFN- α/β sont les mieux caractérisés, et jouent un rôle prépondérant dans la réponse innée antivirale. Les acides nucléiques présents dans les particules infectieuses et ceux produits au cours du cycle viral, sont les principaux inducteurs des interférons de type I [131]. Depuis maintenant près de 50 ans, les IFNs- α/β ont suscité l'intérêt des chercheurs non seulement pour leurs propriétés antivirales, mais aussi pour leurs propriétés immunomodulatrices et antitumorales.

Les PAMPs viraux

Les acides nucléiques reconnus par les cellules comme des signaux de

danger sont les ARN bicaténaires, les ARN 5'-triphosphates et l'ADN, notamment lorsque celui-ci contient des motifs nucléotidiques CpG. La localisation de ces acides nucléiques joue également un rôle fondamental, de sorte qu'un même acide nucléique n'entraînera pas la même réponse cellulaire s'il se concentre à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule, que ce soit dans le cytoplasme ou le noyau. La liaison du PAMP à son récepteur spécifique permet la transduction du signal à l'intérieur de la cellule aboutissant ainsi à l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire : cytokines pro-inflammatoires, IFNs de type I, chimiokines et protéines régulatrices[132]. Le rôle crucial des récepteurs innés dans la reconnaissance des agents infectieux et l'induction de la réponse inflammatoire de l'hôte furent l'objet d'études approfondies. Toutefois, en l'absence de tout agent infectieux, des traumatismes ou des blessures entraînant des dommages tissulaires induisent également une réponse inflammatoire dans laquelle les senseurs cellulaires de l'immunité innée agissent de concert dans le processus de réparation tissulaire.

Les PRRs qui reconnaissent les PAMPs viraux

Les senseurs des acides nucléiques viraux sont représentés par trois familles de récepteurs de l'immunité innée regroupés sous le nom de Pattern Recognition Receptors (PRRs): les TLRs (Toll-Like Receptor), les RLRs (Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptor) et les senseurs d'ADN cytosolique. Ces trois types de récepteurs sont donc capables de détecter le virus dès son entrée dans l'organisme et *in fine*, induire la synthèse d'IFNs de type I et/ou de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'infection. Cependant, les voies de signalisations empruntées par chaque type de récepteurs afin d'activer les facteurs de transcription nécessaires à l'expression de ces cytokines sont différentes. Les cascades de signalisation activées par l'engagement de ces différents récepteurs convergent vers les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (« Interferon Regulatory Factor »), NF- κ B et AP-1. Les protéines IRF3 et IRF7 se lient aux éléments de réponse aux IRF (« IRF Response Elements » ou IRE), dont la séquence consensus est AANNGAAA (avec N = A, G, T ou C), et qui se retrouvent dans le promoteur des gènes induits par ces facteurs de transcription, et notamment des gènes IFNA et IFNB. Cependant, les variations observées autour de cette séquence consensus confèrent, d'un gène à l'autre, une sensibilité plus ou moins stricte vis à vis d'IRF3 ou d'IRF7. Le troisième facteur de

transcription qui joue un rôle clé dans l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISGs pour Interferon-Stimulated Genes) et la réponse innée antivirale est IRF1 mais sa localisation dans cette voie de signalisation reste encore inconnue [133]. Enfin, il est à noter que le promoteur du gène *IFNB* présente également des éléments de réponse aux facteurs NF- κ B (« Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») et AP-1 (Activator Protein-1), ce qui permet d'augmenter la transcription et la synthèse d'IFN- β . Les IFN de type I synthétisés vont alors agir de manière autocrine et paracrine en se liant à leur récepteur présent à la surface cellulaire et induisent ainsi l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT, ce qui va aboutir à l'expression d'une deuxième vague de gènes antiviraux (Figure 19).

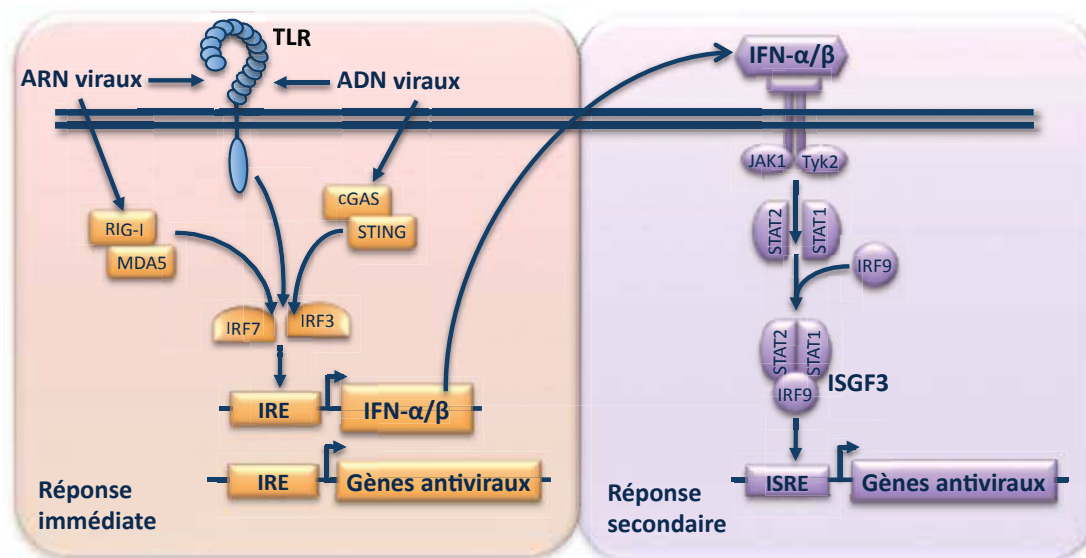


Figure 19. Induction des interférons de type I et leurs gènes cibles. (S. KHIAR *et al.*, 2015).

1.1.1 Les récepteurs Toll-like – TLRs

La famille des TLRs est la plus connue et la mieux étudiée des familles des PRRs. Elle permet la détection de motifs conservés des pathogènes à la fois à l'extérieur de la cellule et dans des compartiments intracellulaires [134]. Les TLRs sont des protéines transmembranaires, de la famille du récepteur à l'IL-1, qui possèdent un domaine N-terminal extracellulaire riche en répétitions leucine (LRR) pour la fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire, le domaine TIR, permettant la transduction du signal. Par ailleurs, parmi les 10 membres de cette famille présents chez l'homme, les TLR3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux et l'induction

des interférons de type I. TLR3, qui se trouve en surface ou dans les endosomes en fonction du type cellulaire et de l'état d'activation des cellules, reconnaît par son domaine extracellulaire les ARN bicaténaires. Il est exprimé par les cellules épithéliales, en particulier dans les voies respiratoires, et par les cellules dendritiques conventionnelles du sang périphérique (cDC). TLR7 et 8, qui sont principalement localisés dans les endosomes, reconnaissent quant à eux les ARN monocaténaires. Enfin, TLR9 est un récepteur spécifique des ADN riches en motifs CpG non méthylés. Alors que TLR8 est fortement exprimé par les monocytes, TLR7 et 9 sont exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules représentent moins de 1% des leucocytes du sang périphérique mais elles produisent 1000 à 10000 fois plus d'IFN- α que les autres types cellulaires. A ce titre, les pDC jouent un rôle majeur dans la réponse antivirale innée aux infections virales. Enfin, il est important de noter que TLR4, dont les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont le principal ligand, serait également impliqué dans la reconnaissance de certaines glycoprotéines d'enveloppes virales. Son rôle dans la réponse immunitaire innée antivirale, et notamment dans l'induction des interférons de type I, reste cependant moins bien défini.

Lors de la reconnaissance des PAMPs/DAMPs viraux, les TLRs subissent le plus souvent un changement conformationnel, aboutissant ainsi à l'activation de molécules adaptatrices associées, les plus étudiées d'entre elles étant *Myeloid differentiation primary response gene 88* (Myd88) et *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- β* (TRIF), et *in fine* à l'induction de la transcription de nombreux gènes antiviraux [134]. A l'exception de TLR-3, la voie dépendante de Myd88 joue un rôle central dans la signalisation de tous les TLRs. Elle permet le recrutement séquentiel de nombreuses molécules de signalisation, ce qui conduit d'une part à la translocation du facteur de transcription NF- κ B et d'autre part à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. De plus, un autre complexe de transcription de gènes inflammatoires est également activé par la voie des kinases MAP active, appelé AP-1. Surtout, le recrutement de Myd88 en aval de TLR-7 et -9 induit la production des IFNs de type I *via* Myd88 et le facteur de transcription IRF-7 [132].

En revanche, l'engagement de TLR3 par de l'ARNdb conduit au recrutement de TRIF et à l'activation d'IRF-3. Le TLR-4, quant à lui, active non seulement les

voies dépendant de MyD88 mais aussi celles dépendantes de TRIF. La voie TRIF-dépendante permet la libération de cytokines proinflammatoires, *via* NF- κ B, mais induit aussi l'expression des IFNs de type I. TRIF recrute en effet des kinases qui vont phosphoryler le facteur de transcription IRF-3, qui subit une translocation nucléaire pour induire la production d'IFNs de type I et d'ISG [135, 136] (Figure 20).

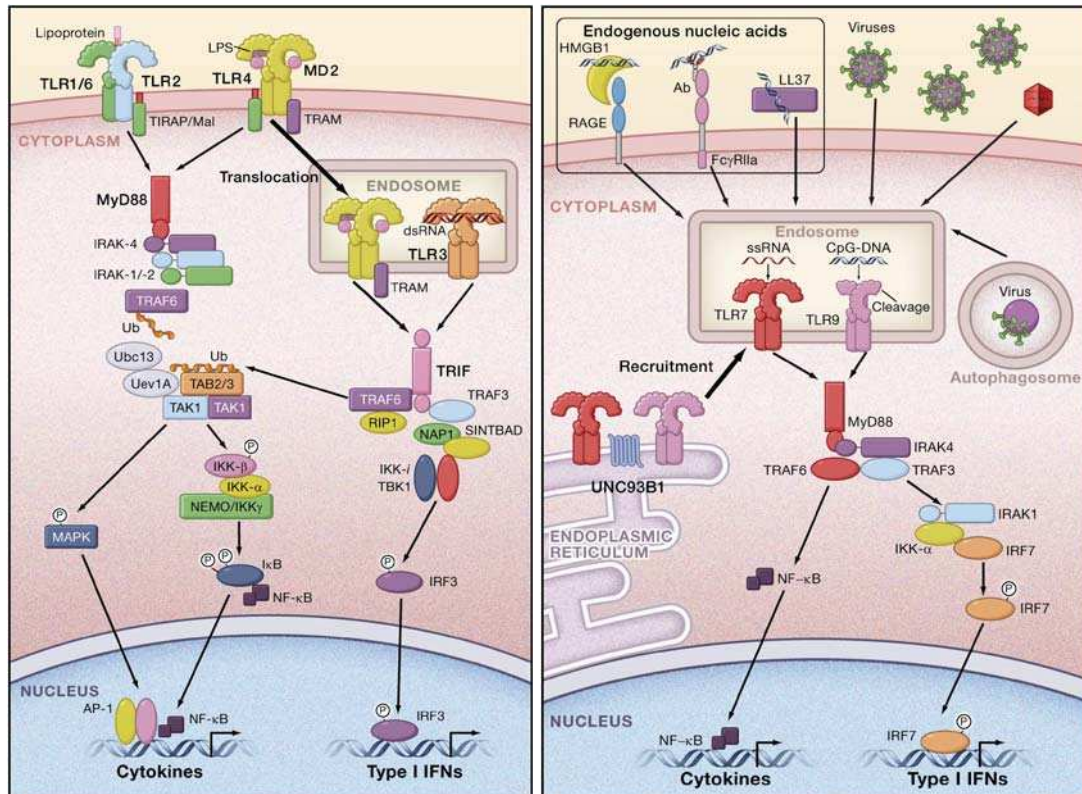


Figure 20. Localisation cellulaire et voies de signalisation induites par les TLRs . (Takeuchi et Akira, 2010).

1.1.2 Les récepteurs RIG-I-like – RLRs

Contrairement aux TLRs, les membres de la famille des RLR sont cytoplasmiques [131]. Ainsi, si les TLR assurent la détection des virus présents dans le milieu extracellulaire, notamment dans les vésicules endosomiales une fois les particules virales partiellement digérées pour exposer leurs acides nucléiques, les RLR sont nécessaires à la détection des ARN viraux présents dans le cytosol des cellules infectées. Deux membres de cette famille sont bien caractérisés : RIG-I (Retinoic acid-Inductible Gene I), également appelé DDX58, qui reconnaît les ARN 5'-triphosphates bicaténaires, et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated gene 5), également appelé IFIH1, qui lie les ARN bicaténaires de grande taille. RIG-I et

MDA5 sont constitués d'un domaine hélicase et de deux domaines CARD (caspase recruiting domain) à leur extrémité N-terminale leur permettant la transduction du signal qui, *in fine*, aboutit à la production des IFNs de type I et des cytokines pro-inflammatoires. En effet, RIG-I et MDA5 interagissent par leurs domaines CARD avec un facteur mitochondrial comportant un domaine similaire nommé MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) et identifié simultanément par plusieurs groupes sous les noms de VISA, IPS1 ou CARDIF[137, 138]. L'interaction de RIG-I ou MDA5 avec MAVS induit l'activation de la voie classique de synthèse d'IFN passant par les kinases IKK ϵ et TBK1 et aboutissant à l'activation d'IRF3 et/ou IRF7. Par ailleurs, MAVS participe également à l'activation de la voie NF- κ B via des molécules adaptatrices telles que FADD et RIP1. En outre, un troisième membre de la famille RLR, la protéine LGP2 (Laboratory of genetics and physiology-2), jouerait un rôle de régulateur positif ou négatif en s'associant à RIG-I. C'est une hélicase cytoplasmique permettant également la détection des ARN viraux mais elle est dépourvue des domaines CARD. En revanche, tout comme RIG-I, elle contient un domaine répresseur (RD), ce qui lui permet de se lier à RIG-I par le biais d'une interaction homotypique des domaines RD/RD entraînant ainsi un changement de la structure conformationnelle de RIG-I et inhibant la transduction du signal en aval (Figure 21).

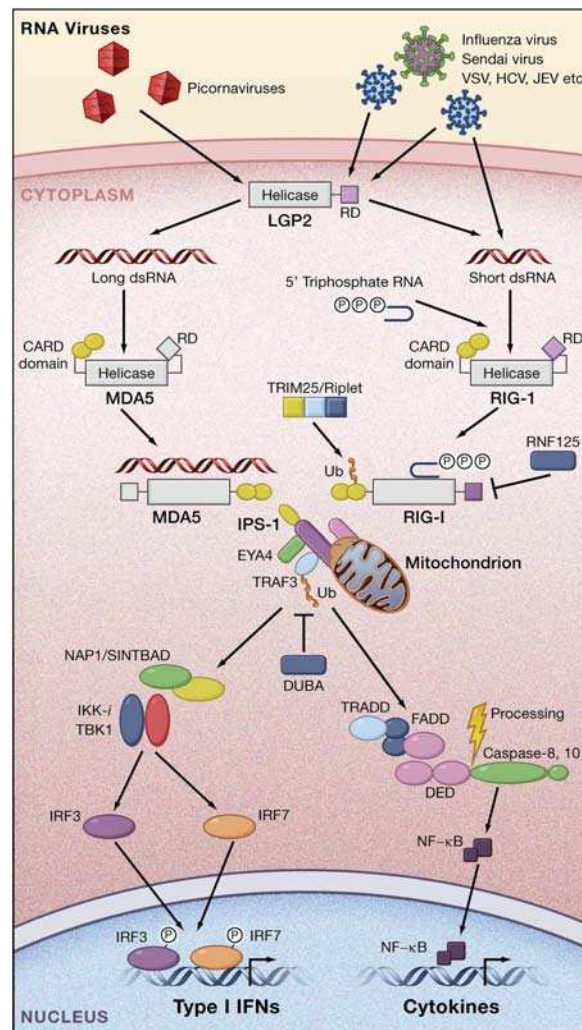


Figure 21. Voies de signalisation induites par les RLRs. (Takeuchi et Akira, 2010).

RIG-I est particulièrement impliquée dans la réponse à l'infection par des *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* ou des *Flaviviridae*. MDA5, quant à elle, possède une spécificité pour la reconnaissance des picornavirus tels que le virus de l'encéphalomyocardite (ECMV) et le virus de la Dengue[139].

1.1.3 Récepteurs à l'ADN

Les récepteurs cytoplasmiques qui induisent les interférons de type I en réponse aux ADN viraux n'ont été caractérisés que très récemment, et forment un ensemble hétérogène [140]. Le récepteur le mieux caractérisé à ce jour est cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), une nucléotidyltransférase qui reconnaît l'ADN

cytoplasmique, et synthétise en réponse un médiateur intracellulaire, le 2'3'-cGAMP. Cette molécule se lie alors au récepteur STING (Stimulator of IFN Genes), une protéine à 4 domaines transmembranaires ancrée au réticulum endoplasmique, ce qui déclenche une cascade de signalisation conduisant à la synthèse des interférons de type I. Ces dernières années, la caractérisation de la protéine cellulaire STING et la compréhension de son mécanisme d'activation en réponse à l'ADN cytoplasmique ont permis des avancées majeures [140]. Outre une région transmembranaire qui assure son ancrage au réticulum endoplasmique, STING possède un domaine globulaire cytoplasmique. En réponse à différents stimuli, notamment le 2'3'-cGAMP, ce domaine de STING passe d'un état « ouvert » à une conformation « fermée ». Cette transition permet alors le recrutement de TBK1 pour activer IRF3 et NF- κ B, ce qui induit ainsi les interférons de type I et la réponse immunitaire innée antivirale. Une dizaine d'autres récepteurs à ADN ont également été identifiés, parmi lesquels on trouve IFI16, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DDX41, Ku70, DNA-PK et MRE11. Pour plusieurs de ces récepteurs, il a été montré que l'induction des interférons de type I dépendait de STING, ce qui fait de cette protéine un acteur central dans la réponse cellulaire aux virus à ADN. Cependant, les détails mécanistiques de l'activation de STING par ces récepteurs sont encore mal caractérisés.

2 La réponse cellulaire aux IFNs de type I

La cascade de signalisation induite par les IFN de type I

Une fois sécrétés, les IFN- α/β induisent de façon autocrine et paracrine un ensemble de gènes acteurs de la réponse antivirale : les ISG (Interferon-Stimulated Genes)[141]. Les IFN- α/β ont pour récepteur un dimère composé de deux protéines membranaires, IFNAR1 et IFNAR2c (Figure 19). Ces protéines sont associées par leur domaine cytoplasmique aux kinases TYK2 et JAK1 qui phosphorylent les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces derniers s'associent alors à IRF9 pour former le complexe ISGF3. Une fois dans le noyau, ISGF3 se fixe aux éléments de réponse ISRE (« Interferon-Stimulated Response Elements ») présents dans le promoteur des ISG. Les IFN- α/β activent ainsi la transcription d'environ 200 à 500 gènes en fonction du type cellulaire considéré et de la concentration locale

d'interférons. La séquence consensus pour l'élément de réponse ISRE est A/GNGAAANNGAAACT, de sorte que des sites de liaison à IRF3 ou IRF7 peuvent se superposer à ce motif. Il en découle que de nombreux ISG sont à la fois induits par IRF3/7 et par une boucle autocrine/paracrine faisant intervenir la sécrétion d'IFN- α/β et l'activation d'ISGF3 [142]. Les ISG codent pour un large éventail de facteurs antiviraux qui assurent l'inhibition du cycle viral à différentes étapes, depuis l'entrée du virus jusqu'à la libération des particules virales néoformées [141]. A titre d'exemple, on peut citer la tétherine (ou BST2) qui piège les particules virales néoformées à la surface des cellules infectées. C'est l'ensemble de cette réponse, multifactorielle et à large spectre, que de nombreuses équipes cherchent à stimuler avec des composés chimiques dans le but de développer de nouvelles thérapies antivirales.

Effecteurs de la réponse IFN

Les gènes induits par les IFN de type I ou ISGs orchestrent une multitude de fonctions au sein de la cellule. Ces ISG sont qualifiés d'ISG tardifs car ils sont induits par une boucle autocrine/paracrine faisant intervenir la sécrétion d'IFN- α/β et l'activation d'ISGF3. Toutefois, il faut garder à l'esprit que de nombreux ISG, désignés généralement sous le nom d'ISG précoces, sont également induits directement par l'activation des PRRs et les facteurs de transcription IRF1, 3 ou 7 [142].

Une fois induits, les ISGs agissent de concert pour assurer l'inhibition du cycle viral à différentes étapes, depuis l'entrée du virus jusqu'à la libération des particules virales néoformées [141, 143] (Figure 22). Cependant, d'autres ISG codent pour des facteurs cellulaires impliqués dans la réponse innée antivirale précoce et tardive, tels que les PRRs, mais également pour des régulateurs positifs ou négatifs des cascades de signalisation en aval de ceux-ci. Les paragraphes qui suivent présentent quelques exemples d'ISGs bien caractérisés pour leur rôle dans la réponse antivirale innée.

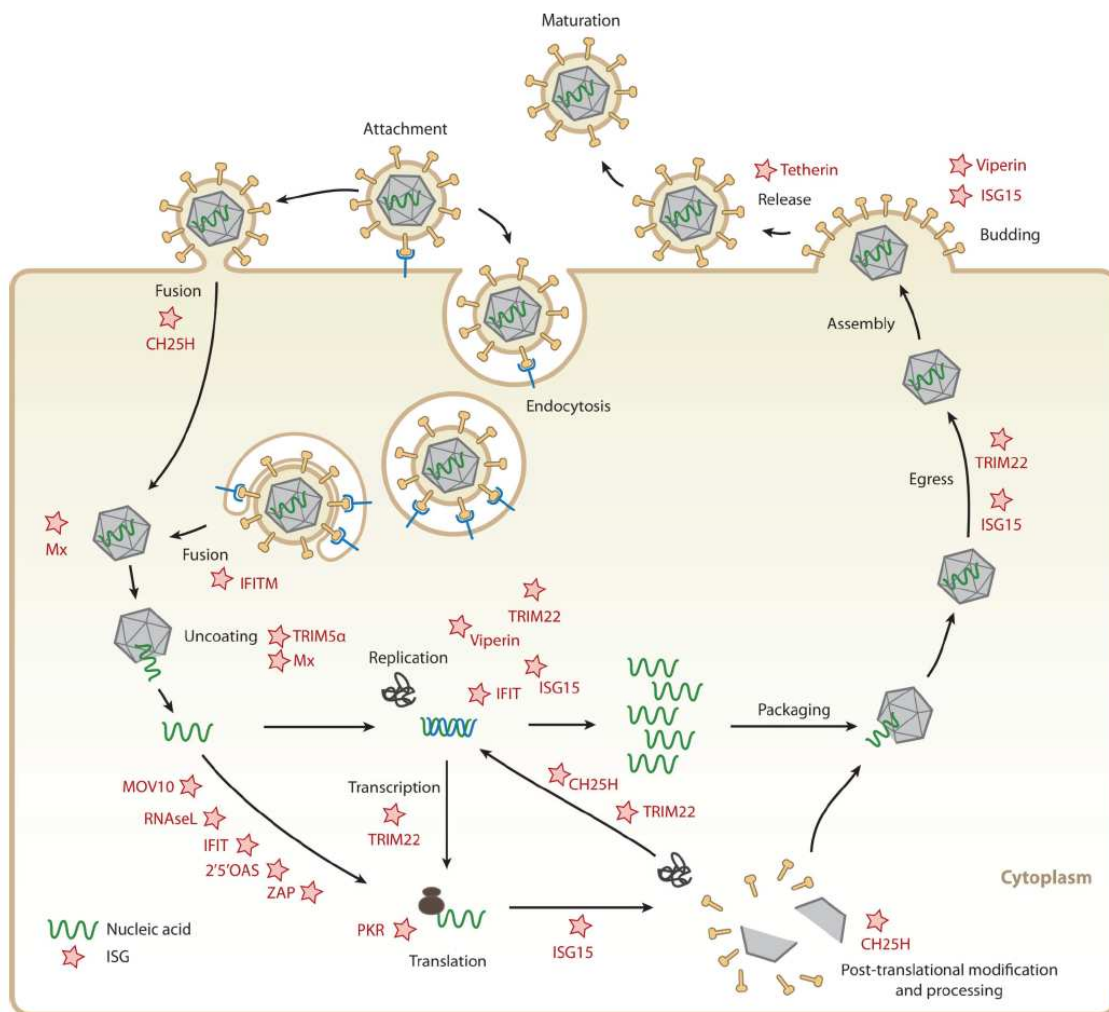


Figure 22. Les effecteurs de la réponse IFN ciblant les différentes étapes du cycle viral. (William M. Schneider et al., 2014)

2.1.1 Facteurs inhibant l'entrée des virus

2.1.1.1 CH25H

L'expression du gène CH25H est régulée positivement par les interférons de type I et de type II [144-146]. La cholestérol-25-hydroxylase (CH25H) est une enzyme qui convertit le cholestérol en 25-hydroxycholestérol (25HC). Ainsi, traiter les cellules directement avec du 25HC ou avec les surnageants provenant de cellules exprimant la CH25H confère une protection contre l'infection par différents virus enveloppés, mais aucun effet antiviral n'a été observé dans le cas de l'infection par l'adénovirus, un virus non enveloppé [147, 148]. Ces résultats suggèrent que le 25HC agit lors d'une étape précoce du cycle viral. Ce composé induirait des

changements dans les propriétés physiques des membranes ce qui inhiberait l'étape de la fusion virus-cellule hôte [147]. Ainsi, l'activité antivirale de la CH25H résulterait de son implication dans la régulation de la voie de biosynthèse des stérols.

2.1.1.2 IFITM

Les protéines IFITM (pour Interferon-Induced TransMembrane proteins) ont été décrites pour la première fois en 1984 dans un criblage de protéines induites par l'interféron [149]. Toutefois, il a fallu attendre 2009 pour comprendre les propriétés antivirales de certaines protéines IFITM à travers les travaux de Brass et al. En effet, ces travaux ont montré un effet inhibiteur puissant de ces protéines sur la réplication du virus de la grippe de type A H1N1, du virus du Nil occidental et du virus de la dengue [150]. Par la suite, divers travaux ont montré le rôle primordial des IFITM dans la lutte contre une large gamme de virus. Structuellement, les protéines IFITM sont constituées d'un domaine très conservé formé de deux hélices transmembranaires et de 2 domaines N- et C-terminaux hypervariables. Chez l'homme, la famille des protéines IFITM est constituée de quatre membres : IFITM1, IFITM2, IFITM3 et IFITM5 dont les gènes sont regroupés au sein du même cluster sur le chromosome 11 [151]. Elles bloquent l'entrée de nombreux virus dans la cellule hôte en modifiant les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires telles que la courbure et la fluidité, perturbant ainsi la fusion des virions. En outre, il existe une sélectivité dans les virus qui sont ciblés par les protéines IFITM. A titre d'exemple, tandis que IFITM1 induit une meilleure réponse antivirale que IFITM3 dans le cas de l'infection par le SRAS-CoV et les filovirus Ebola et Marburg [152]. A contrario, IFITM3 montre un effet inhibiteur beaucoup plus puissant que la protéine IFITM1 sur la réplication du virus de la grippe de type A. L'infection par le VHC est inhibée par IFITM1, mais IFITM3 ne semble avoir aucun effet sur la réplication de ce virus [153]. Dans le cas du VIH-1, alors que IFITM2 et IFITM3 affectent aussi bien l'étape de l'entrée du virus que la production des virions [154], IFITM1 inhibe seulement la production de particules virales [154]. Pour ce type de virus, les IFITM semblent exercer un autre effet antiviral en s'associant aux membranes des virions nouvellement produits et en diminuant ainsi leur potentiel infectieux. Par ailleurs, de manière tout à fait surprenante, il a été montré récemment que IFITM3 inhibe également l'infection par des virus non enveloppés tels que les réovirus dont le cycle

de réplication ne comporte pourtant aucune étape de fusion virale [155]. Toutefois, la modification des propriétés physicochimiques de la membrane plasmique induits par les IFITM joue probablement un rôle dans le mécanisme de restriction de l'entrée de ces virus.

2.1.2 Facteurs ciblant directement les ribonucléocapsides virales

2.1.2.1 Mx

Le facteur Mx1 figure parmi les premiers ISG décrits pour leur capacité à interférer avec les étapes précoces du cycle viral. Les cellules humaines expriment deux protéines Mx : MX1 et MX2 (également connues sous le nom de MxA et MxB, respectivement). Ce sont des protéines qui appartiennent à la superfamille des grandes GTPases apparentées structurellement à la dynamine. En outre, elles sont connues pour leur implication dans les mécanismes d'invagination des membranes cellulaires et le trafic vésiculaire. Dans le cadre d'une infection virale, la protéine humaine MxA est fortement induite par les IFN de type I et participe à la lutte contre un large éventail de virus à ARN, notamment les virus de la famille des Orthomyxoviridae et des Bunyaviridae. La structure de MxA a été récemment décrite et a permis une meilleure compréhension de son mode d'action [156]. Des études suggèrent que MxA interagit directement avec les constituants de la particule virale dès leur entrée dans la cellule. A titre d'exemple, il a été décrit que dans le cas des virus Thogoto et La Crosse, MxA inhibe la réplication virale en séquestrant les nucléocapsides virales qui ne sont alors plus disponibles pour former de nouvelles particules virales. De plus, MxA est caractérisée par sa capacité à s'auto-assembler et à former des homo-oligomères pour former des structures en anneaux et hélices dans lesquels sont probablement emprisonnés les constituants viraux. Toutefois, pour de nombreux virus contre lesquels Mx1 est efficace, les mécanismes antiviraux impliqués ne sont pas encore élucidés.

Mx2 a été décrite récemment pour ses propriétés antirétrovirales [157-159]. Il a été montré à travers plusieurs études que la surexpression de Mx2 inhibe fortement les VIH-1 et 2, et son expression est par ailleurs nécessaire à l'effet de l'IFN- α sur ces virus [157-159]. En revanche, elle s'est révélée peu ou pas du tout efficace contre d'autres rétrovirus [157-159] ou encore contre le virus influenza A [159]. Lors des infections par VIH-1 ou 2, Mx2 empêche l'entrée de l'ADN viral dans

le noyau (produit de la transcription inverse qui a eu lieu dans le cytoplasme) et inhibe ainsi son intégration dans l'ADN cellulaire [157-159]. Des mutations dans la protéine de capsid du VIH-1 confèrent une résistance à ce facteur de restriction, suggérant ainsi que Mx2 interagit avec la capsid virale [157-159].

2.1.2.2 TRIM

Les protéines TRIM (tripartite motif) sont caractérisées par la présence dans leurs extrémités N-terminal d'un motif hautement conservé TRIM/RBCC qui est composé d'un domaine RING suivi d'une ou deux boîtes B (B-Box) et d'un domaine « coiled-coil ». La famille des TRIM est constituée d'environ 60 protéines chez l'homme et chez la souris. Elles sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires, y compris l'ubiquitinylation en jouant le rôle d'ubiquitine ligase E3 [160]. Les domaines B-box et le domaine RING servent de plate-forme pour les interactions protéine-protéine et sont essentiels à la fonction d'ubiquitine ligase des TRIM. Cependant, les fonctions des facteurs TRIM ne sont pas limitées à l'ubiquitinylation, et comme beaucoup de ligases E3, ils peuvent également être impliqués dans la SUMOylation [161] et l'ISGylation [162]. La protéine TRIM qui a été le plus documentée est TRIM5 α . Elle a tout d'abord été identifiée comme un inhibiteur puissant des stades précoces de l'infection par les retrovirus [163]. En effet, lors de l'entrée du virus dans la cellule, TRIM5 α se lie directement à des protéines de la capsid virale, conduisant à un désassemblage accéléré de la capsid qui expose le complexe de pré-intégration rétroviral [164]. Outre TRIM5 α , une activité antivirale a également été décrite pour de nombreux membres de la famille des protéines TRIM [165]. TRIM22 montre une activité antivirale dans le contexte de l'infection par VIH-1 [166]. L'importance de TRIM22 comme un facteur de restriction du VIH-1 a été mise en évidence *in vivo* où il a été observé chez les patients une corrélation entre les niveaux d'expression de TRIM22, une charge virale faible et un nombre élevé de lymphocytes T CD4 + [167]. En outre, l'activité antivirale de TRIM22 a également été démontrée dans le cadre d'infections causées par d'autres virus [168], notamment le virus de l'hépatite B [169] et le virus de la grippe de type A [170]. D'autres membres de la famille TRIM notamment TRIM19, également connu sous le nom de la protéine PML et principal composant des corps nucléaires PML, joue également un rôle essentiel dans la défense antivirale [171].

2.1.3 Facteurs inhibant la synthèse des protéines virales**2.1.3.1 *PKR***

La protéine PKR, synthétisée sous une forme inactive, se dimérise et s'active en réponse à l'ARNdb produit au cours de la réplication virale. PKR va alors phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , inhibant ainsi la synthèse protéique et notamment celle des protéines virales [172]. L'activité antivirale de PKR a été décrite contre de nombreux virus tels que le virus de l'encéphalomyocardite [173], le virus de la fièvre aphteuse [174], le VHC [175], le VHS-1 [176], le VIH [177], ou encore VSV [178]. De plus, la phosphorylation d'eIF2 α peut activer l'autophagie, que je décrirai plus tard dans mon exposé et qui limite également la réplication virale [179, 180].

2.1.3.2 *OAS*

La 2',5'-oligoadénylate synthétase (OAS) appartient à une famille d'enzymes qui catalysent la polymérisation de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en une série de 2'-5' phospho oligoadénylates (2,5 oligo A). Ces derniers vont alors agir en tant que seconds messagers intracellulaires pour activer la nucléase RNase L (L pour latente) qui à son tour va assurer la dégradation des ARNs viraux et cellulaires [181, 182]. En outre, la RNase L est au centre d'une boucle d'amplification de la réponse immunitaire innée. Elle permet produit en effet de nouvelles molécules d'ARNsb par clivage d'ARN cellulaire, ce qui active les récepteurs de la famille RLR. Cette famille d'effecteurs viraux est constitué de 4 membres : OAS1, OAS2, OAS3 et OASL. Des travaux ont décrit l'effet antiviral d'OAS1/2/3 contre la réplication de nombreux virus comme le CHIKV, DENV, EMCV, VHC, le virus de la forêt de Semliki (SFV), SINV ou encore WNV. OASL, quand à lui, exerce un effet inhibiteur sur l'étape de la traduction au sein du cycle viral du HSV et du VHC [143].

2.1.3.3 *ISG54 et ISG56*

Enfin, les protéines ISG54 (IFIT2) et ISG56 (IFIT1) sont des protéines de la même famille dont la fonction est d'inhiber la synthèse protéique en interagissant avec le complexe multiprotéique d'initiation de la traduction eIF3 [183, 184]. En effet, le complexe eIF3 est impliqué dans l'initiation de traduction à plusieurs étapes, y

compris l'assemblage du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt, la formation du complexe de pré-initiation 43S, le recrutement de l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S, ainsi que dans le balayage de l'ARNm à la recherche du codon d'initiation AUG. A titre d'exemple, dans le contexte d'une infection par le VHC, des travaux ont montré que ISG56 inhibe la réplication virale en inhibant la fonction de l'IRES du VHC, un site d'entrée interne des ribosomes (IRES) qui permet l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction sur l'ARNm viral indépendamment d'une coiffe 5'. En revanche, une protéine ISG56 mutante incapable de se lier à eIF3 ne montre aucun effet antiviral contre le VHC [185].

2.1.4 Facteurs inhibant l'assemblage et la libération des particules virales

2.1.4.1 Vipérine

La Vipérine, également connue sous le nom de RSAD2, est l'un des effecteurs antiviraux le plus fortement induit et le mieux étudié. Elle peut être induite suite à l'activation de deux voies de signalisation différentes: via la voie de signalisation JAK-STAT [186] ou encore par une activation directe par les facteurs de transcription IRF1 et IRF3 [187, 188]. La vipérine inhibe la réplication de nombreux virus enveloppés via des mécanismes antiviraux différents [189], notamment pour le VIH-1 et le virus de la grippe de type A. Son mode d'action n'est pas encore complètement élucidé, mais il a été montré qu'elle inhibe la farnésyl pyrophosphate synthase (FPPS), une enzyme impliquée dans la biosynthèse de lipides dérivés de l'isoprénoïde. Cette inhibition empêcherait la formation de complexes lipidiques appelés « lipid rafts » qui sont essentiels dans l'assemblage et le bourgeonnement de nombreux virus comme dans le cas du VIH-1 et du virus de la grippe de type A [190, 191].

2.1.4.2 Téthérine

La téthérine, également appelée BST2, inhibe le bourgeonnement des virions nouvellement formés. En effet, BST2 possède un domaine transmembranaire et une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) qui lui permettent de physiquement séquestrer les virions au niveau de la membrane plasmique et d'empêcher leur diffusion dans le milieu extracellulaire [192]. Depuis sa découverte en 2009, divers

travaux ont montré l'activité antivirale de la tétherine contre de nombreux virus enveloppés [193]. Par ailleurs, l'importance de la tétherine est telle qu'un grand nombre virus ont développé des systèmes d'échappement à la réponse induite par ce facteur de restriction virale. En effet, la tétherine est la cible d'un certain nombre de protéines virales telles que la protéine Vpu du VIH-1, la protéine env du VIH-2, le facteur Nef du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), la glycoprotéine de surface VP40 du virus Ebola, l'ubiquitine ligase K5 du KSHV (le virus de l'Herpès associé au sarcome de Kaposi) et la glycoprotéine neuraminidase A du virus de la grippe (NA). Il a été décrit que les protéines Vpu du VIH-1 et K5 du KSHV sont impliqués dans l'ubiquitination de la tétherine [193]. Quant à Env du VIH-2 et Nef du SIV, ils semblent agir en séquestrant la tétherine loin du site d'assemblage des virions. Dans le cas de l'infection par le VIH-2, la protéine Env agit non seulement en séquestrant la tétherine dans le réseau trans-Golgi, perturbant le trafic proprement dit, mais il déclenche aussi son endocytose de façon dépendante de la clathrine pour induire sa dégradation [194-196]. Enfin, la protéine VP40 du virus Ebola et la NA du virus grippal de type A semblent séquestrer la tétherine au niveau de la surface de la cellule pour l'empêcher d'assurer sa fonction [197].

2.1.5 Boucles de régulation positive et négative de la réponse IFN

La voie de signalisation des IFNs de type I est également sous le contrôle de boucles de régulation positives, afin d'amplifier la réponse, et négatives pour éviter une sur-activation pouvant avoir des effets délétères. A ce titre, ces facteurs de régulation sont des cibles potentielles pour des antiviraux à large spectre destinés à amplifier la réponse immunitaire innée antivirale.

2.1.5.1 Quelques exemples de régulateurs positifs

A. IRF7

Comme décrit précédemment, IRF7 est l'un des régulateurs clé dans l'induction de la transcription des IFNs de type I au cours d'une infection virale. IRF7 est localisé dans le cytoplasme et sa phosphorylation au niveau d'une sérine en région C-terminale permet sa dimérisation puis sa translocation au noyau. Une fois activé, IRF7 va former des homodimères ou des hétérodimères avec l'IRF3, ces dimères ayant des effets différents sur l'induction des membres de la famille des

IFNs de type I [198]. Contrairement à la plupart des cellules où elle est inductible, l'expression d'IRF-7 est constitutive dans les pDC, ce qui montre le rôle déterminant de ce facteur dans ces cellules [199].

B. TRIM25

La transduction du signal par RIG-I est aussi régulée par ubiquitination. En effet, tripartite motif 25 (TRIM25), une E3 ubiquitine ligase contenant un domaine de type RING Finger, régule positivement cette voie en interagissant avec le domaine CARD de RIG-I situé en N-terminal [200]. Ainsi, TRIM25 ubiquitinye RIG-I, permettant la mise en place d'une plateforme d'ancrage pour CARDIF. TRIM25 influence donc l'activation de cette voie de signalisation et la production des IFNs de type I en réponse aux infections virales. Une autre E3 ubiquitine ligase, désignée sous le nom de Riplet (également appelé RNF135 ou REUL), a été décrite dans la régulation de RIG-I. Des études *in vivo* ont montré l'importance de Riplet dans la régulation de RIG-I. En effet, des souris déficientes pour Riplet produisent moins d'IFN et sont beaucoup plus sensibles à l'infection par le VSV que les souris sauvages [201].

C. ISG15

ISG15 (ou Interferon stimulated gene 15), quant à elle, fut identifiée comme une protéine de 15kDa induite par l'IFN [202]. Proche de l'ubiquitine, ISG15 est une protéine qui a la capacité de se conjuguer avec d'autres protéines selon un mécanisme similaire à l'ubiquitination : l'ISGylation [203]. Toutefois, contrairement à l'ubiquitination, l'ISGylation ne conduit pas les protéines à la dégradation, mais elle favorise plutôt leur activation et elle peut concerner des protéines virales ou cellulaires. En outre, l'implication d'ISG15 dans la réponse à de nombreux virus comme VIH, Ebola ou encore le virus B de la grippe a été décrite à travers divers travaux [204-206]. Par ailleurs, le processus de la déISGylation est assuré par l'isopeptidase USP18 (Ubiquitin Specific Peptidase 18) qui va alors catalyser l'hydrolyse d'ISG15 et rompre ainsi la liaison entre ISG15 et sa protéine cible [207].

D. UNC93B1

UNC93B1 est un facteur jouant un rôle primordial en régulant le trafic des TLR

endosomaux à partir du RE. En effet, UNC93B1 interagit directement avec les TLR-7 et -9 intracellulaires et permet leur localisation au niveau des endosomes [208].

2.1.5.2 Quelques exemples de régulateurs négatifs

A. PIAS

L'endocytose et le recyclage du récepteur aux IFN de type I jouent un rôle important dans la réduction rapide du niveau d'activation de la voie de JAK-STAT [209]. D'autres acteurs cellulaires y participent tels que les phosphatases qui inactivent les protéines JAK et STAT [210, 211], ou encore les protéines PIAS (Protein inhibitor of activated STAT) qui inhibent l'activité des facteurs STAT en se liant uniquement à leur forme activée [212]. Toutefois, malgré des années de recherche, les mécanismes précis par lesquels les protéines PIAS inhibent l'activation de la voie IFN restent flous. Toutes les protéines de la famille PIAS peuvent réguler l'expression de gènes de manière positive ou négative, principalement au niveau transcriptionnel par le biais de divers mécanismes moléculaires et le principal d'entre eux est la SUMOylation de leur protéines cibles [213]. La SUMOylation est un processus au cours duquel la protéine PIAS va fixer par liaison covalente une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice de sa protéine cible. Dans le cas des facteurs de transcription, cette modification post-traductionnelle va inhiber leur liaison à l'ADN. Même s'il a été montré que PIAS1 inhibe STAT1 sans la nécessité d'une SUMOylation [214], d'autres études suggèrent que les protéines STAT1 peuvent être SUMOylées, et que cette modification a un effet négatif sur l'induction de certains ISG [215].

B. SOCS

Afin d'assurer leur fonction inhibitrice, les protéines SOCS (pour Suppressor of cytokine signalling) sont dotées d'une structure commune très conservée avec deux domaines fonctionnels importants. Le domaine SH2 qui permet la liaison des protéines SOCS aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs ou à ceux des protéines JAKs activées. Le deuxième domaine de ces protéines est appelé « socs-box » (ou motif SC), il est situé en C-terminal, et très conservé constitué d'environ 40 acides aminés. Il permet le recrutement des éléments du

complexe d'ubiquitine ligase E3 et l'ubiquitination des protéines associées. C'est ainsi que les protéines SOCS entraînent la dégradation de leur cible par la voie du protéasome [216]. Dans le cadre de la régulation de la voie de signalisation JAK/STAT, il a été montré que la protéine SOCS-1 induit l'ubiquitination et la dégradation de la kinase JAK2 par le protéasome [217].

C. USP18

USP18, quant à elle, est une isopeptidase qui assure le processus de la déISGylation en catalysant l'hydrolyse d'ISG15, elle effectue ainsi la rupture de liaison entre ISG15 et sa protéine cible [207]. Par conséquent, les souris *Usp18*^{-/-} présentent une augmentation considérable du niveau d'ISGylation [218, 219]. Elles sont hypersensibles aux IFN de type I et plus résistantes aux infections virales [220]. En 2003, des études réalisées sur des cellules déficientes en USP18 ont permis de montrer qu'en absence d'USP18, l'IFN- β induit une activation fortement prolongée de la voie de signalisation JAK-STAT et une augmentation spectaculaire de l'apoptose, ce qui suggère qu'USP18 joue un rôle primordial dans la régulation négative de la réponse IFN. Il n'était pas clair à cette époque si cet effet de rétrocontrôle négatif était dû à la fonction de déISGylation d'USP18 [219]. Toutefois, il a ensuite été montré qu'une forme mutée d'USP18 catalytiquement inactive confère le même niveau de régulation négative de la réponse IFN que la protéine sauvage [221]. L'effet de rétrocontrôle négatif sur la réponse IFN assuré par USP18 est indépendant de l'activité isopeptidase de cette enzyme, et reposerait sur la liaison d'USP18 au domaine intracellulaire d'IFNAR2, ce qui empêche la liaison de JAK1 et l'activation de cette voie. De plus, la mutation de résidus arginine permettant la rupture de la liaison de USP18 à IFNAR2 altère sa capacité à inhiber la réponse IFN [221]. Ces résultats démontrent clairement que le rôle majeur de USP18 dans l'inhibition de la signalisation JAK-STAT est indépendant des processus ISGylation/déISGylation.

D. ULK1

ULK1, un facteur impliqué dans l'induction de l'autophagie lors d'une carence de nutriments, assure une autre fonction importante en régulant négativement STING. Il induit en effet la phosphorylation, et par là l'inactivation de STING [222]. En outre, une étude récente a montré que des rayonnements UV entraînent la

dégradation de ULK1 et l'empêchent ainsi d'inhiber STING. Le résultat de cette dérégulation est une augmentation de la réponse IFN à de l'ADN cytosolique [223].

3 Les mécanismes cellulaires antiviraux autres que la réponse IFN

Granules de stress et P-bodies

La cellule peut être soumise à une grande variété d'agressions, qu'elles soient physiques (traumatismes, irradiations, hyper ou hypothermie), chimiques (acidose), métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance) ou encore infectieuses. Toutes ces sources de stress cellulaire affectent fortement les mécanismes cellulaires tels que la traduction, la transcription, l'épissage, la stabilité des ARNm et l'export nucléo-cytoplasmique des transcrits [224]. Afin de survivre, les fonctions métaboliques seront alors inhibées et des mécanismes seront induits pour réduire le stress. Ces mécanismes de défense incluent la formation de différentes structures cytoplasmiques tels que les granules de stress et les P-bodies, qui sont impliquées dans le contrôle de la traduction. La mise en place de telles structures faisant partie de tout un programme de stress cellulaire est une partie intégrante des mécanismes de défenses antivirales développées par la cellule lors d'une infection virale (Figure 23).

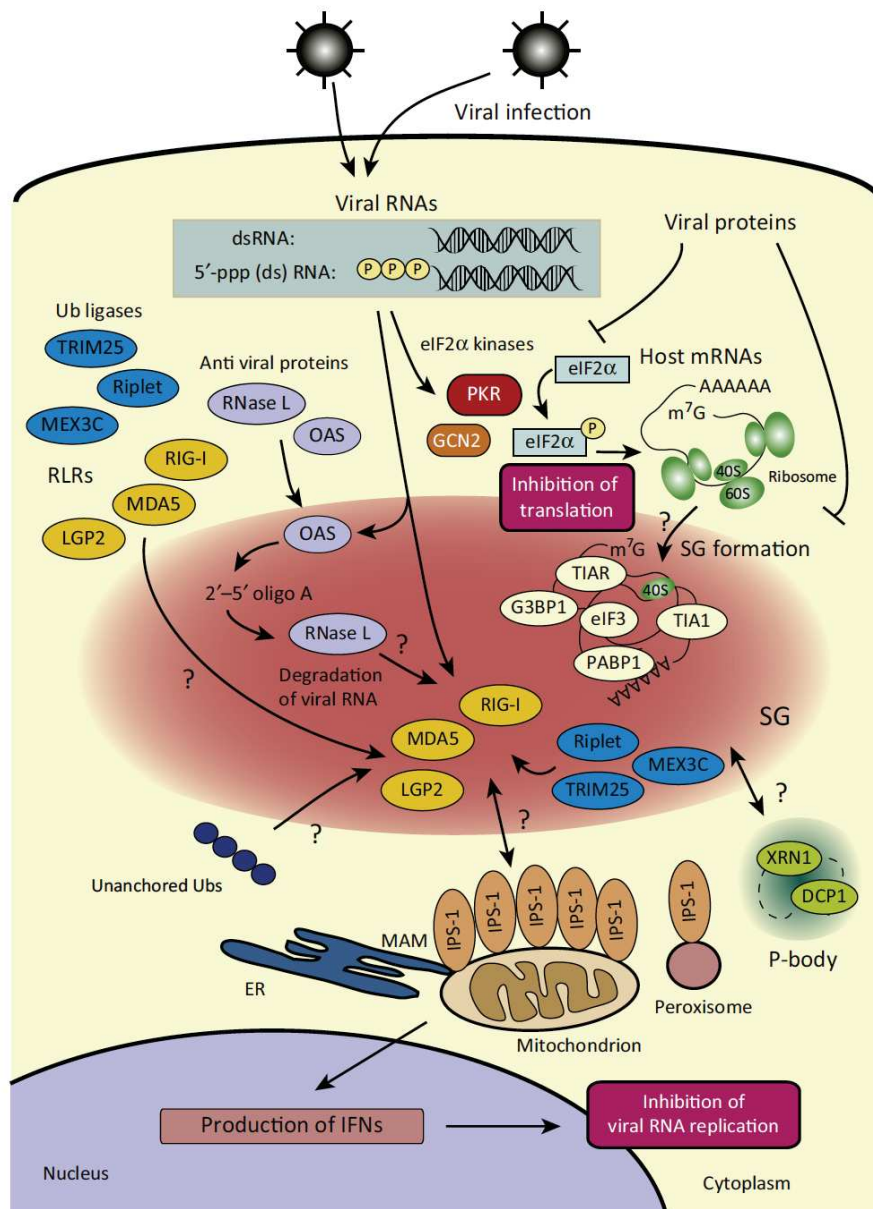


Figure 23. Un modèle de la fonction antivirale des granules de stress. (Koji Onomoto et *al.*, 2014).

Les granules de stress (GS) sont décrits comme des sites d'accumulation des ARNm où la traduction est réprimée [172]. Ils contiennent les ARNm, les protéines associées aux ARNm et des éléments de la machinerie de traduction tels que les protéines de la petite sous-unité ribosomale 40S ainsi que les facteurs d'initiation de la traduction eIF1A, eIF2, eIF3, eIF2B, eIF4A, eIF4B et eIF4E et eIF4G et des répresseurs de la traduction comme TIA1, TIAR, FMRP, LSM14A et CPEB1 [225]. Toutefois, cette machinerie traductionnelle n'est pas fonctionnelle dans les GS : l'initiation de la traduction des ARNm y est bloquée et reprend une fois que le stress

cellulaire se dissipe.

La formation des granules de stress est consécutive à la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (ser51) par une famille des kinases (GCN2 : general control non-derepressible-2, PKR : protein kinase RNA, HRI : haem-regulated inhibitor kinase et PERK : PKR-like ER kinase). Dans les granules de stress, les sous-unités 40S déjà engagées dans l'initiation de la traduction d'ARNm, appelés 48S*, sont dépourvus de certains facteurs d'initiation comme eIF2 et eIF5 [225], mais sont associés à des RBPs (RNA-Binding Protein) comme TIA1 (T-cell Internal Antigen 1) et G3BP1 (Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-Binding-Protein 1) qui contiennent des domaines d'agrégation et jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des GS. En effet, dans les cellules de mammifères, la surexpression de G3BP1 ou de TIA1 est suffisante pour induire la formation de granules de stress, en l'absence de tout autre stress. En revanche, l'assemblage des granules de stress est inhibé en l'absence de G3BP1 et TIA1 [226, 227]. Il est important de noter qu'en microscopie, on observe la formation de nombreux granules de stress de petite taille qui vont alors fusionner progressivement en structures plus grandes. Une fois le stress dissipé, ces granules vont se dissocier en quelques heures, et la synthèse protéique va reprendre. En outre, il a été décrit que dans le cas où le stress persiste, les ARNm sont transférés à d'autres structures cytoplasmiques portant le nom de P-bodies (pour «mRNA-Processing bodies») où ils sont finalement dégradés. Les P-bodies sont des granules cytoplasmiques ribonucléoprotéiques constitués de composants de la machinerie de dégradation d'ARN 5' $\rightarrow$ 3' et des complexes impliqués dans l'ARN interférence. Par ailleurs leur assemblage nécessite plusieurs protéines dont DDX6 et qui est essentielle à leur formation [228].

Plusieurs travaux ont montré que les virus, et plus particulièrement les virus à ARN, induisent la formation des granules de stress. En effet, dans le cadre d'une infection virale, PKR joue un rôle essentiel car elle lie les ARN viraux double brins puis phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ce qui correspond à la fois au point de départ de l'assemblage des granules de stress et au blocage de la synthèse protéique et donc de la réplication virale. Les ARNm non traduits peuvent alors être transférés vers les P-bodies, où ils seront dégradés. En outre, les ARN viraux sont également reconnus par les RLRs, qui sont recrutés au niveau des GSs ainsi que de nombreux facteurs antiviraux (OAS, RNase L) et des ubiquitines ligases

(TRIM25, Riplet, MEX3C). Ensuite, la voie OAS-RNase L permet le clivage des ARN viraux qui vont servir de ligands pour les RLRs, et induire ainsi leur activation et amplifier la réponse innée antivirale. En cas d'infection, l'adaptateur MAVS, qui est normalement localisé au niveau des mitochondries et/ou au niveau des MAM (mitochondrial associated membranes), se retrouve également avec les RLRs associé aux GSs [172].

Autophagie

Présent chez tous les eucaryotes, l'autophagie est un processus jouant un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. C'est un mécanisme de dégradation lysosomale de matériel intracellulaire (organelles intracellulaires et complexes protéiques de grosse taille) permettant, dans des conditions normales, le renouvellement des protéines à durée de vie longue et de certains organites comme la mitochondrie. De plus, lors d'une carence en nutriments, elle permet l'apport de constituants de base pour la synthèse protéique ou lipidique. Lors de ce processus, des éléments cytosoliques sont engloutis dans des vésicules à double membrane portant le nom d'autophagosomes formés à partir d'une membrane isolée appelée le phagophore. Ce dernier va alors fusionner avec les lysosomes pour former les autolysosomes où a lieu la dégradation. Un marqueur fréquemment utilisé pour suivre l'autophagie est la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II [229]. En effet, La protéine LC3 existe sous deux formes : une forme non lipidée cytosolique appelée LC3-I et une forme lipidée ancrée dans la membrane des autophagosomes appelée LC3-II. La conversion LC3-I en LC3-II peut être analysée en immunofluorescence et par western blot puisque les deux formes de LC3 possèdent des poids moléculaires différents de 18 kDa et 16 kDa pour LC3-I et LC3-II respectivement.

En outre, l'autophagie fait partie intégrante des mécanismes de défense activés lors de la réponse innée antivirale. Elle permet d'une part l'élimination directe des pathogènes présents dans le cytoplasme dans les autolysosomes (la xénophagie) et participe d'autre part à l'induction de la réponse interféron. Dans ce deuxième cas, il se produit une fusion des autophagosomes avec des endosomes avant qu'ils ne fusionnent avec les lysosomes, constituant ainsi une structure appelée amphisome. Les PRRs et en particulier les TLR endosomaux vont se lier aux PAMP, tels que des ARN viraux séquestrés par autophagie, et induire ainsi

l'activation d'une réponse IFN-I et l'expression des ISGs. Plusieurs travaux ont montré l'importance de ce processus dans la réponse antivirale. En effet, Lee *et al.* ont démontré en 2007 que l'autophagie est fortement stimulée dans des pDC murines infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Englobés dans des autophagosomes, les ARN viraux provenant de la réplication du VSV sont reconnus par les TLR7 suite à la formation de l'amphisome, et ceci aboutit à la production de d'IFN de type I [230]. Par la suite, d'autres équipes ont décrit le même mécanisme dans des pDC humaines infectées par le VIH [231] ou l'EBV [232]. Contrairement à ce qu'on observe dans des pDC, l'autophagie inhiberait plutôt la production d'IFN-I dans les autres types cellulaires. En effet, Jounai *et al.* décrivent en 2007 une association constitutive entre les protéines associées à l'autophagie ATG5/ATG12, et RIG-I/MAVS dans des fibroblastes embryonnaires murins, et ces interactions inhiberaient l'activation de RIG-I et la production d'IFN-I [233]. Par ailleurs, il a été montré que certains virus tel VHC utilisent la machinerie d'autophagie pour inhiber la réponse IFN-I et promouvoir ainsi leur réplication [234].

Apoptose ou mort cellulaire programmée.

Contrairement à la nécrose qui est considérée comme une mort cellulaire accidentelle, l'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée (programmed cell death ou PCD) essentiel pour le développement normal et l'homéostasie des organismes pluricellulaires. Les liens fonctionnels entre apoptose et défense antivirale innée sont illustrés à travers de nombreux travaux. Ainsi, une des deux voies constituant ce processus est la voie extrinsèque. C'est une voie directe passant par l'intermédiaire des récepteurs de mort et des membres de la famille du TNF, notamment TRAIL (pour TNF-related apoptosis-inducing ligand) et ses récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Une étude menée en 1999 a montré que des fibroblastes qui étaient résistants à TRAIL devenaient sensibles à TRAIL suite à une infection par le cytomégalovirus humain [235]. Ainsi, dans ce modèle, le ligand TRAIL serait capable de tuer sélectivement les cellules infectées par le virus, tout en épargnant les cellules saines. Une autre équipe a décrit le rôle essentiel de TRAIL dans la réponse antivirale par les cellules NK [236]. Ainsi, suite à une infection par un cardiovirus, les cellules infectées qui produisent des quantités massives d'interférons de type I vont stimuler l'expression de TRAIL sur les cellules NK. En effet, les

auteurs ont mis en évidence la présence d'un élément de réponse aux interférons (*IFN-stimulated response element*, ou ISRE) au sein du promoteur de TRAIL. *In vitro*, ce mécanisme entraîne alors la mort des cellules infectées *via* TRAIL. En outre, des travaux réalisés *in vivo* ont permis de montrer qu'en bloquant le ligand TRAIL exprimé par les cellules NK, on induit non seulement une augmentation significative du titre viral mais aussi la mort prématurée des souris infectées [236]. De la même manière, les souris TRAIL-/- sont plus sensibles au virus de la grippe que les souris de type sauvage [237]. Ces travaux soulignent la fonction de TRAIL et le rôle de l'apoptose au cours de la réponse antivirale.

Effecteurs cellulaires de l'immunité innée antivirale

Des PRRs sont exprimés par toutes les cellules de l'organisme, leur conférant ainsi une capacité de mettre en place une réponse immunitaire innée antivirale via la production d'IFN de type I et l'expression des facteurs antiviraux. Toutefois, certaines cellules jouent un rôle particulier en tant qu'effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire innée. Il s'agit notamment des monocytes/macrophages, des cellules « natural killer » (NK), et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).

3.1.1 Phagocytes: les monocytes/les macrophages

Parmi les phagocytes circulants dans le sang, les monocytes/macrophages sont les cellules sentinelles jouant un rôle prépondérant dans la lutte antivirale non seulement par la détection et la destruction des agents infectieux par phagocytose mais aussi à travers d'autres mécanismes. En effet, ils sont capables de se mobiliser rapidement au niveau des sites d'infection puis de capter, d'ingérer et de détruire les pathogènes en utilisant des systèmes de reconnaissance non spécifiques constitués de récepteurs dit « éboueurs ». En outre, les macrophages expriment des PRR leur permettant de reconnaître les PAMPs viraux, ce qui conduit à leur activation. Lors du contact entre l'agent infectieux et la membrane du phagocyte, il y a alors une modification du cytosquelette avec la formation d'un pseudopode qui va englober la particule. Celle-ci se retrouve alors dans une vacuole de phagocytose, le phagosome. Celui-ci va ensuite fusionner avec des lysosomes pour former des phagolysosomes où aura lieu la destruction du pathogène. Ces structures cytoplasmiques, riches en enzymes protéolytiques, vont également produire des médiateurs microbicides tels

que les dérivés oxygénés (anion superoxyde O_2° , radical hydroxyle OH° , eau oxygénée H_2O_2) et le monoxyde d'azote (NO) qui vont participer à la dégradation chimique de la particule infectieuse. Ces mêmes substances toxiques sont aussi libérées par le phagocyte afin d'éliminer les pathogènes présents dans le milieu extracellulaire [238]. Les macrophages activés secrètent également des IFN de type I et II, mais aussi des cytokines inflammatoires tels que l'IL1 et le TNF qui vont alors stimuler le recrutement des neutrophiles, des monocytes et de lymphocytes T effecteurs sur le site d'infection [239].

3.1.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC sont primordiales dans la lutte antivirale. Elles sont d'origine lymphoïde et représentent seulement 0,2 à 0,7 % des cellules mononuclées du sang périphérique. Elles expriment constitutivement des niveau élevé de TLR-7, TLR9 et IRF7, ce qui leur permet de produire des quantités importantes d'IFN- α au contact de très nombreux virus. A ce titre, elles produisent de 100 à 1000 fois plus d'IFN- α que les autres types cellulaires, ce qui leur a valu le nom d'IPC (« Interferon Producing Cells »).[240]. A titre d'exemple, lors d'une infection par le VIH, le virus pénètre dans les pDC après s'être fixé sur son récepteur CD4 présent à la surface des pDC. Cela induit l'activation de la voie d'endocytose, la dégradation du virus, la liaison de l'ARN viral à TLR7 dans les endosomes, et l'induction d'IFN- α en grandes quantités. Une fois activées, les pDC circulantes expriment les marqueurs de maturation CD80/CD83/CD86, d'activation CD40, mais aussi TRAIL ce qui leur confère une activité cytotoxique. Les pDC vont alors se transformer en cellules tueuses, les IKpDC (pour Interferon producing killer pDC), qui migrent vers les organes lymphoïdes pour induire la mort des LT CD4+ infectés par le VIH [241].

3.1.3 Cellules natural killer-NK

Les cellules Natural Killer (NK) sont un des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée et jouent un rôle essentiel dans les défenses antivirales. En effet, les cellules NK exercent une cytotoxicité naturelle grâce à un équilibre dynamique entre différents signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires exprimés à leur surface. Ainsi, les molécules du CMH de classe I sont

reconnues par des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des NK, notamment les récepteurs KIR-L (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor), CD94/NKG2 et ILT (Immunoglobulin-Like Transcript ou CD85), ce qui inhibe leur cytotoxicité. Les NK contrôlent ainsi le niveau d'expression du CMH de classe I à la surface des cellules de l'organisme. L'engagement de ces récepteurs inhibiteurs permet, par le recrutement de tyrosines phosphatases, de bloquer l'activité cytotoxique des NK. Comme certains virus réduisent l'expression des molécules du CMH-I afin d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T, ces cellules deviennent par défaut la cible des NK. Par ailleurs, les cellules infectées expriment à leur surface un certain nombre de ligands activateurs, tels que MICA et MICB, qui activent les cellules NK via les récepteurs activateurs de type KAR (Killer Activation Receptors). Suite à la reconnaissance de la cellule cible, la cellule NK libère à la synapse le contenu de ses granules cytoplasmiques, notamment les perforines qui vont former des pores dans la membrane de la cellule cible.

Chapitre III : Molécules stimulant l'immunité innée

Notre meilleure compréhension de la réponse immunitaire innée antivirale a incité de très nombreuses équipes de recherche à se focaliser sur le développement de petites molécules capables d'induire l'expression des interférons de type I. A l'heure actuelle, cette stratégie innovante ouvre de nouvelles possibilités de développement de traitements antiviraux. En recherchant le type d'acide nucléique qui pourrait induire le plus efficacement la production des interférons de type I, un mime artificiel d'ARN bicaténaire, le poly I:C, est identifié comme un très puissant inducteur de ces cytokines [123]. Au début des années 1970, l'idée de petites molécules capables d'induire les interférons, et plus généralement un état antiviral dans les cellules traitées, fait son chemin [242]. Ces travaux conduisent à l'identification du 2,7-bis(2-diethylaminoethoxy)fluoren-9-one ou tilorone, un composé capable de stimuler la sécrétion d'interférons et qui présente une activité antivirale à large spectre [243, 244]. Par la suite, plusieurs composés hétérocycliques inducteurs des interférons de type I sont isolés, notamment le CMA (10-carboxyméthyl-9-acridanone) et différents dérivés de l'acridine (Acranil®, mépacrine) [245-247], des 1,5-diamino anthraquinones [248], des quinolines comme le BL-20803 [249], des dérivés des pyrimidines comme la bropirimine [250], des dérivés diaminés tels que le CP-20,961 [251], et enfin l'acide flavone acétique [252]. Plusieurs de ces molécules présentent une puissante activité antivirale chez la souris qui corrèle avec leur capacité à induire les interférons de type I [243, 248, 251, 253-255], mais les tests réalisés chez l'homme ont été très décevants sans que l'on en comprenne véritablement les raisons [256]. A la fin des années 80, les travaux sur ces composés se marginalisent, sauf en Russie où le tilorone hydrochloride et le CMA sont toujours prescrits comme antiviraux [257].

Grâce aux avancées récentes sur la réponse immunitaire innée, nous commençons à comprendre les raisons des échecs des années 70-80. Avec ce nouveau cadre conceptuel et la démocratisation des technologies de criblage à haut débit, les petites molécules capables d'induire les interférons focalisent à nouveau l'attention de nombreuses équipes [258]. En effet, de telles molécules permettraient de contourner les problèmes rencontrés avec les antiviraux à action directe dont la limite d'utilisation principale est l'apparition d'une résistance au traitement. Ces

nouveaux composés ravivent l'espoir de développer des antiviraux avec une spectre d'activité antivirale beaucoup plus large et d'avoir des thérapeutiques qui ne seront pas seulement virostatiques mais qui permettront d'éradiquer complètement l'infection.

1 Les petites molécules ligands des TLR induisant les interférons de type I

Suite à la découverte du rôle majeur des TLR dans l'immunité anti-infectieuse, de nombreux laboratoires se sont intéressés à l'identification des petites molécules agonistes de ces récepteurs comme de potentiels antiviraux à large spectre. Ceci leur a également permis de comprendre le mode d'action de certaines molécules immunostimulatrices préalablement identifiées [259].

Découverte au début des années 80, les imidazoquinolines ont été identifiées comme des composés anti-herpétiques lors d'un crible réalisé par la société 3M [260]. Ainsi, la molécule pionnière de cette série chimique est l'imiquimod (ou R837 ; Figure 24A) qui est utilisée dans le traitement local des verrues génitales et péri-anales externes à papillomavirus (condylomes acuminés). Par la suite, les travaux de Shizuo Akira *et al.* en 2002 ont permis d'identifier TLR7 comme le récepteur de ce composé immunostimulateur et inducteur des interférons de type I [261]. Les travaux sur ces molécules se sont poursuivis aboutissant ainsi au développement du resiquimod (ou R848) pour le traitement de l'herpès génital et de l'hépatite C, mais cette molécule fut abandonnée à cause de son manque d'efficacité et/ou en raison d'effets inflammatoires indésirables [262]. En effet, Le problème auquel étaient confrontés les chercheurs avec ce type de composé concernait son affinité pour TLR8 qui constituait une source d'effets secondaires délétères pour le patient. Ainsi, cette molécule active la réponse immunitaire innée en liant à la fois TLR7 dans les pDC et TLR8 à la surface des monocytes et des cellules dendritiques myéloïdes. La liaison à TLR8 conduirait, en plus d'induire la synthèse d'interféron de type I, à l'induction de cytokines inflammatoires comme le TNF- α [263]. De ce fait, de nombreux laboratoires cherchent à mettre au point des ligands plus spécifiques de TLR7. Des dérivés de la guanosine, notamment l'isatoribine, la 7-deazaguanosine et la loxoribine (Figure 24B), ainsi que la broprimine, un dérivé de la pyrimidine, sont des ligands de TLR7 actuellement en développement [264, 265]. Différents dérivés

de la 8-hydroxyadénine (ex : SM-276001) et de la 8-oxo-deazapurine (ex : PF-4171455) ont également été décrits comme de puissants ligands de TLR7 et sont évalués pour leurs propriétés antivirales et anti-cancéreuses (Figure 24C) [266-269]. Récemment, l'optimisation de ces composés a permis le développement du GS-9620 (Figure 24D). Cette molécule permet de réduire très efficacement la charge virale chez des chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite B [270]. Enfin, des ligands artificiels de TLR9 ont été mis au point par plusieurs équipes à partir d'oligodésoxynucléotides (ODN) de synthèse riches en motifs CpG [259]. De même, le poly I:C et son dérivé moins toxique le rintatolimod sont utilisés comme ligands artificiels de TLR3, et le développement de ces ARN bicaténaires artificiels se poursuit. Toutefois, ces oligonucléotides de synthèse restent de grosses molécules, de 20 bases minimum pour les ODN à plusieurs centaines de bases pour le poly I:C, ce qui pose des problèmes pharmacologiques (pharmacocinétique, biodistribution, administration, etc.). A l'heure actuelle aucune petite molécule n'a été décrite comme ligand de TLR9 ou TLR3.

Cependant, de nombreux travaux ont démontré à travers des modèles animaux les propriétés antivirales des ligands artificiels de TLR3, notamment du poly I:C, et cela pour un large éventail de virus [271, 272]. Il en est de même des ODN riches en CpG qui se lient à TLR9 et des petites molécules identifiées comme ligands de TLR7 [271, 273]. Toutefois, ces activateurs de TLR3, 7, 8 ou 9, sont des molécules qui présentent souvent des effets très toxiques en particulier lorsqu'ils sont administrés par la voie générale [259]. Outre une toxicité aiguë, caractérisée par le déclenchement d'un syndrome grippal, la stimulation répétée de ces récepteurs peut conduire au développement d'immunopathologies chroniques sévères (lymphopénie, arthrites rhumatoïdes, diabète, etc.). De plus, le second problème est l'inefficacité de ces traitements lorsqu'ils sont administrés après l'infection dans un but thérapeutique. Il est probable qu'une fois l'infection virale établie, les virus échappent à l'action antivirale des interférons et des ISG induits par ces ligands de TLR3, 7, ou 9 grâce aux facteurs de virulence qu'ils produisent. Aussi, la priorité aujourd'hui est de réduire cette toxicité aiguë en développant de nouveaux systèmes visant à obtenir une libération progressive dans le temps. Par exemple, l'encapsulation du poly I:C dans des liposomes permet d'en réduire la toxicité. En effet, l'étude de Wong et al a démontré que l'administration de ce ligand de TLR3 encapsulé protège des animaux contre une infection virale pendant plus de quinze

jours, ce qui présenterait un intérêt certain en cas d'épidémie [274].

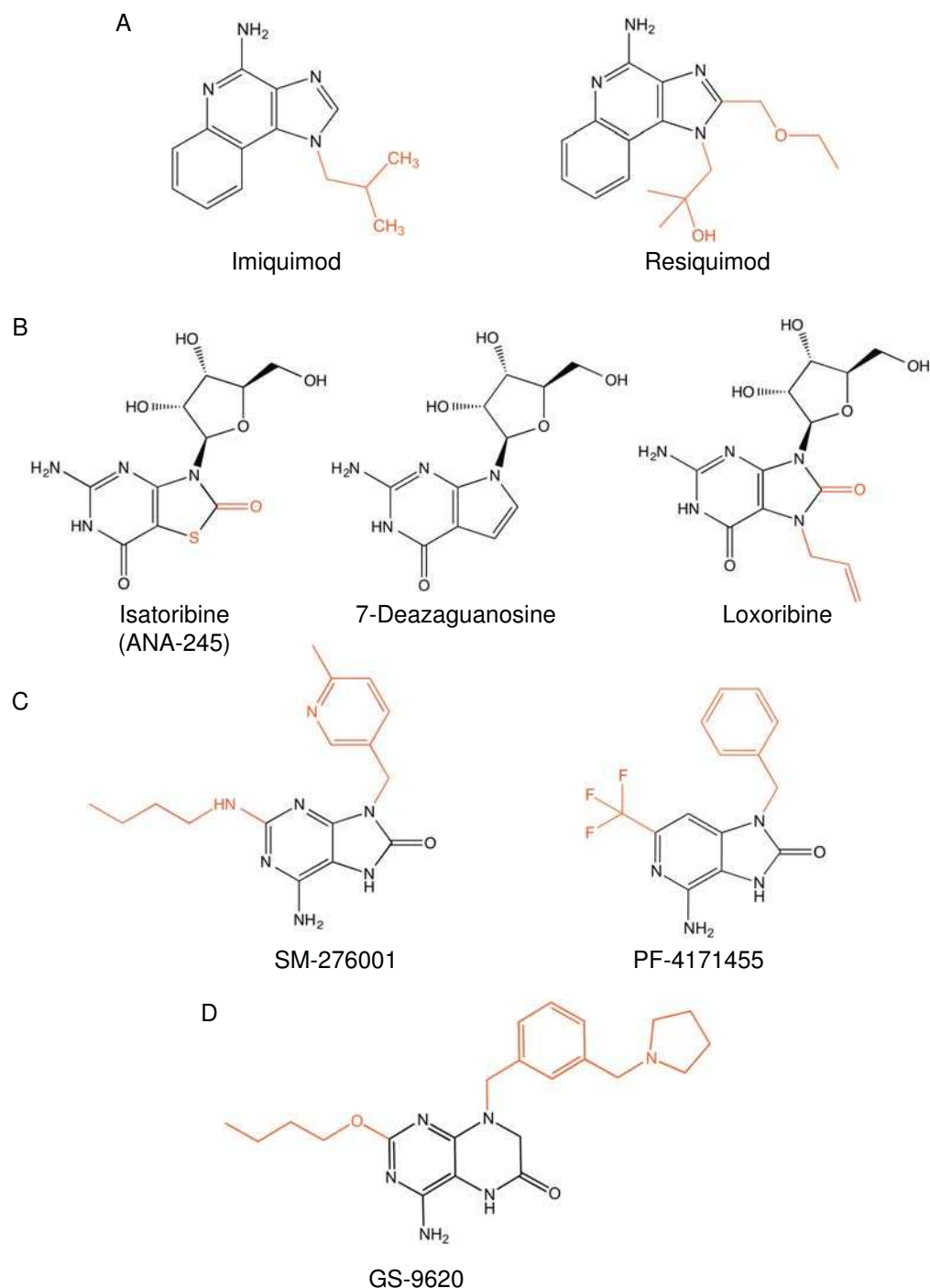


Figure 24. Ligands de TLRs. (A) Structure de l'imiquimod et du résiquimod, deux membres de la famille des imidazoquinolines. (B) Structure de l'isatoribine (ANA-245), de la 7 d'eazaguanosine et de la loxoribine, trois analogues de la guanosine. (C) Structure du SM-276001, un dérivé de la famille des 8-oxoadénines, et du PF4171455, un dérivé de la famille des 8-oxo-d'eazapurines. (D) Structure du GS-9620, une molécule dont le groupe principal est proche d'une oxoadénine. Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir. (S. Khiar et *al.*,

2015).

2 Les composés activateurs de STING

Ces dernières années, la caractérisation de la protéine cellulaire STING et la compréhension de son mécanisme d'activation en réponse à l'ADN cytosolique ont permis des avancées majeures [140].

Récemment, il a été montré que STING est le récepteur du DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid), du CMA et de l'acide flavone acétique, trois molécules identifiées comme anticancéreux et inducteurs des interférons de type I chez la souris [275-278](Figure 25B). Ces composés se lient à STING globalement au même site que le 2'3'-cGAMP (Figure 25A), et induisent de la même façon son activation, même si les résidus impliqués sont différents. Cependant, ces interactions sont spécifiques de la protéine STING de souris et les composés cités ci-dessus sont incapables d'activer la protéine STING humaine malgré une homologie de séquence de 81% [275-278]. Ainsi, une protéine STING humaine dans laquelle la glycine 230 est remplacée par une isoleucine comme chez la souris (G230I) lie le DMXAA (Figure 25B)[279]. Ces résultats pourraient expliquer la puissante activité antivirale et anticancéreuse du DMXAA, du CMA et de l'acide flavone acétique chez la souris et l'absence d'efficacité chez l'homme. Ils suggèrent également que d'autres petites molécules identifiées dans les années 70-80 comme inducteurs des IFN- α/β (tilorone ou dérivés de l'acridine), sont également des ligands spécifiques de la protéine STING de souris. Corolaire de ces conclusions, plusieurs équipes cherchent désormais à développer des composés capables d'activer la protéine STING humaine, qu'ils s'agisse d'analogues métaboliquement stables du 2'3'-cGAMP ou de dérivés du DMXAA [280, 281].

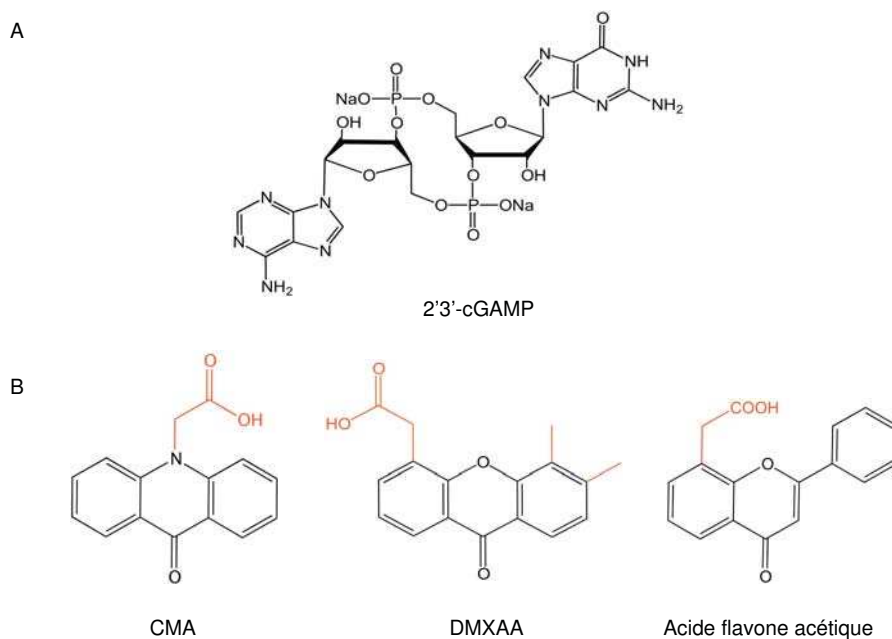


Figure 25. Ligands de STING. (A) Structure de la molécule 2'3'-cGAMP, une dinucléotide cyclique. (B) Structure de la molécule DMXAA (un dérivé de la xanthone), structure du CMA (un dérivé de l'acridanone) et la structure de l'acide flavone acétique (appartenant aux flavones). Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir. (S. Khier et *al.*, 2015).

3 Interactions entre les voies de biosynthèse des nucléosides et la réponse interféron

De façon remarquable, il a été montré que la ribavirine et l'acide mycophénolique, deux inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des purines, induisent les ISG et/ou amplifient leur expression en réponse aux IFN- α/β [282, 283, 284]. Cependant, les récepteurs cellulaires qui réagissent à des déséquilibres dans les pools de nucléosides restent à identifier, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes doivent encore être caractérisés.

Il est tentant de rapprocher ces observations relativement récentes du phénomène de « superinduction » des interférons de type I décrit il y a plus de cinquante ans et tombé pratiquement dans l'oubli depuis [285]. Plusieurs équipes avaient alors montré que des composés inhibant la transcription (actinomycine D) ou la traduction (cycloheximide ou puromycine) augmentaient la production d'IFN- α/β . Lorsque ces inhibiteurs sont ajoutés au bon moment dans les heures qui suivent la

stimulation par des ARN viraux ou du poly I:C, il est possible de multiplier par 100 la quantité d'IFN- α/β secrété par des cellules en culture. Ce phénomène de « superinduction » est tellement efficace qu'il a été utilisé pendant des années pour produire l'IFN- β utilisé en clinique à partir de surnageants de fibroblastes. Comment expliquer l'effet paradoxal de ces inhibiteurs de la synthèse protéique sur la production d'interférons ? Il a été montré que l'ARNm codant pour l'IFN- β contient des séquences ARE (AU-rich element) et CRID (Coding Region Instability Determinant) dans sa partie 3' non-traduite. Ces séquences favorisent la dégradation de l'ARNm codant pour l'IFN- β en recrutant notamment un facteur non identifié de 65 kDa [286]. La demi-vie de cette protéine dans la cellule étant courte, l'inhibition de la synthèse protéique par l'actinomycine, la cycloheximide ou la puromycine empêcherait son renouvellement, ce qui aboutirait à sa disparition progressive. Il en résulterait une stabilisation des ARNm codants pour l'IFN- β , et ainsi une augmentation de la synthèse d'IFN- β . De la même façon, les antimétabolites qui bloquent la biosynthèse *de novo* des nucléosides pourraient, en réduisant la synthèse protéique, favoriser la stabilisation de l'ARNm codant pour l'IFN- β .

4 Des composés orphelins identifiés par criblage à haut débit

Depuis quelques années, les outils permettant la mise en œuvre de cribles à haut débit (« high-throughput screenings », HTS) se sont largement démocratisés. Les grands instituts de recherche académique se sont ainsi dotés de plateformes équipées de chimiothèques de plusieurs milliers de molécules, d'automates de pipetage, de lecteurs de plaques multimodes et de logiciels adaptés au stockage et à l'analyse des données HTS. Plusieurs groupes ont ainsi réalisé des cribles phénotypiques utilisant des tests cellulaires pour identifier des composés capables d'induire les interférons de type I et/ou l'expression des ISG. La plupart de ces tests utilisent des lignées de cellules humaines exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur du gène de l'IFN- β ou d'éléments de réponse ISRE inducibles par les interférons de type I. Ces cribles ont permis l'identification d'une dizaine de composés ayant des propriétés immunostimulatrices (Figure 26).

En utilisant une lignée de carcinome hépatocellulaire HepG2 exprimant la

luciférase sous contrôle de cinq éléments de réponse ISRE, l'équipe de Fei Wang a criblé une chimiothèque de 1431 produits naturels [287]. Quatre substances naturelles, l'émodine, la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, ont montré des propriétés immunostimulatrices (Figure 26A). Les analogies de structure entre l'émodine, le DMXAA et le CMA d'une part, et la quercétine, l'apigénine, la lutéoline et l'acide flavone acétique d'autre part sont frappantes, suggérant que ces composés naturels lient la protéine STING pour induire l'expression des ISG. Une autre étude a également montré l'effet de l'aloé-émodine, un analogue de l'émodine appartenant également à la famille des anthraquinones, sur l'expression des interférons de type I ainsi que son activité antivirale *in vitro* [288]. Au « Vaccine and Gene Therapy Institute » de Portland, une équipe a développé un système de criblage basé sur une lignée de fibroblastes humains exprimant la luciférase sous contrôle d'éléments de réponse ISRE (THF-ISRE). Ce test fonctionnel a été utilisé pour cribler une chimiothèque de 51.632 composés, ce qui a permis d'identifier la molécule G10 qui présente un puissant effet inhibiteur sur la réplication de différents alphavirus (virus du chikungunya, virus de l'encéphalite équine vénézuélienne, virus Sindbis). Ces travaux décrivent G10 comme un activateur indirect de STING, car des analyses biochimiques ont permis de montrer que G10 ne se lie pas directement à STING. Toutefois, ils ont montré le rôle essentiel d'un axe impliquant IRF3 et STING ainsi que STAT1 dans l'activité antivirale de G10 [289]. Un autre crible, réalisé par la société Kineta et utilisant une lignée de carcinome hépatocellulaire Huh7 exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur ISG54, a permis d'isoler les composés KIN100 et KIN101 à partir d'une chimiothèque de 20.000 composés [290]. Ces composés sont des isoflavones qui activent IRF3 (Figure 26B), induisent certains ISG et inhibent efficacement la réplication des virus de la grippe et de l'hépatite C *in vitro*. Leur mode d'action et le rôle éventuel de STING dans l'activité de ces molécules restent à déterminer. En outre, des travaux publiés récemment par la société Kineta décrivent le composé KIN1400 et ses analogues appartenant à la famille chimique des quinoléines qui sont, tout comme, KIN100 et KIN101, des activateurs d'IRF3 et des inducteurs de nombreux ISG dans les cellules traitées. Toutefois, le spectre d'activité antivirale de ces nouveaux composés semble beaucoup plus large que la série des molécules décrites précédemment. En effet, ces molécules montrent une puissante activité antivirale *in vitro* contre les virus de la famille des *Flaviviridae*, y compris le virus du Nil occidental, le virus de la dengue et

le virus de l'hépatite C, ainsi que les virus de la famille des *filoviridae* (virus Ebola), des *Orthomyxoviridae* (virus grippal A), des *Arenaviridae* (Lassa virus) et des *Paramyxoviridae* (virus respiratoire syncytial, virus Nipah). De façon intéressante, l'étude du mécanisme de ces molécules lors de ces travaux, a permis de montrer que KIN1400 et ses analogues activent IRF3 via une voie dépendante de l'adaptateur mitochondriale MAVS [291].

A la « Mount Sinai School of Medicine », l'équipe de Peter Palese et Megan Shaw a utilisé une stratégie comparable pour identifier des composés inducteurs des interférons de type I. Une lignée rapportrice dérivée de cellules HEK-293T exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur de l'IFN- β a été développée, puis utilisée pour cribler une chimiothèque de 94.000 molécules [292]. Trois composés ont finalement été étudiés à l'issue de ce crible pour leurs propriétés immunostimulatrices, notamment la molécule C3 (Figure 26C). Là encore, le mode d'action de ce composé reste à déterminer. D'autres molécules identifiées comme des activateurs du promoteur IFN- β dans le cadre de ce crible sont des agents intercalants de l'ADN et des inhibiteurs de la topoisomérase II comme des anthracyclines (doxorubicine, Figure 26D), des dérivés de l'acridine (aminacrine) et l'ellipticine (Figure 26E). L'équipe de Michael J. Holtzman a isolé la même classe de molécules en recherchant des composés capables d'amplifier la réponse cellulaire aux interférons de type I [293]. Pour cela, cette équipe a criblé, en présence de doses suboptimales d'IFN- β (5 IU/ml), une chimiothèque de 2240 composés à l'aide de cellules humaines 2fTGH exprimant la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse ISRE. La molécule la plus active isolée dans ce crible, l'idarubicine, est un agent intercalant de la famille des anthracycline comme la doxorubicine. Enfin, en cherchant à isoler des composés qui amplifient la réponse cellulaire au poly I:C, l'équipe de Jinhong Chang a isolé le composé RO 90-7501 qui appartient à la famille des bis-benzimidazoles (Figure 26F), une classe de molécules connues pour se lier au petit sillon de l'ADN [294]. Ces résultats corroborent ainsi des travaux plus anciens montrant qu'un stress génotoxique peut induire l'activation d'IRF3, la synthèse d'IFN- α/β et l'expression des ISG [295].

Des composés qui stimulent la réponse interféron de type I ont également été isolés par le biais de cribles à haut débit visant à identifier des antiviraux à large spectre. Ainsi, à partir d'un test de répllication virale *in vitro*, l'équipe de Richard K.

Plempner a isolé la molécule 09167 (Figure 26G) [296]. Ce composé antiviral à large spectre induit l'expression de certains ISG, mais pas l'expression de l'IFN- β . De même, le composé GSK983 (Figure 26H), lui aussi identifié au départ pour son activité antivirale à large spectre, induit certains ISG dans différentes lignées de cellules humaines [297]. Par ailleurs, une étude récente décrit GSK983 comme étant un inhibiteur de la DHODH, la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines [298]. Enfin, en utilisant un test cellulaire pour la réplication du virus de l'hépatite C, l'équipe de Masayuki Sudoh a identifié une molécule, RO4948191 (Figure 26I), capable de lier directement le récepteur aux interférons de type I [299]. Ce composé se lie en effet directement à IFNAR2c, ce qui active JAK1 et stimule l'expression des ISG.

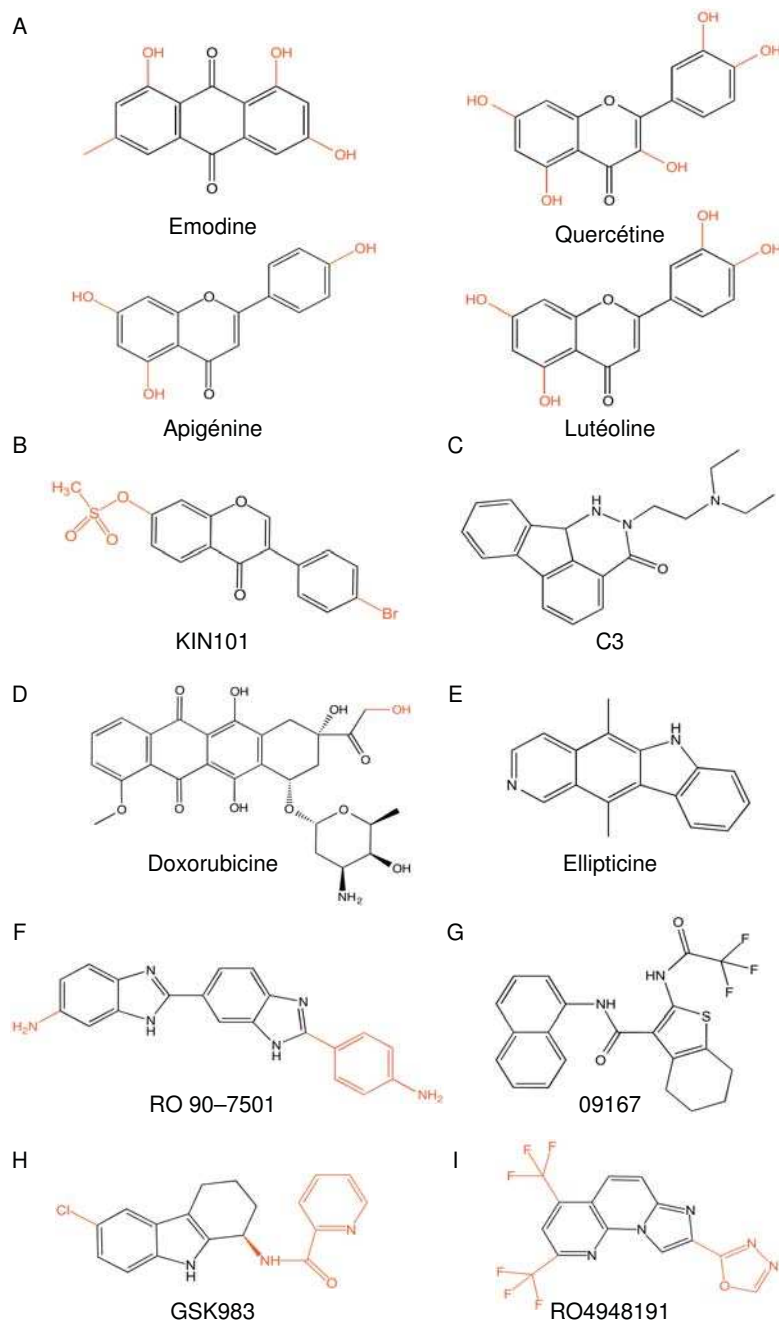


Figure 26. Composés identifiés par criblage à haut débit. (A) Structures de l'émodyne, un membre de la famille des anthraquinones, et de la quercétine, de l'apigénine et de la lutéoline, trois membres de la famille des flavones. (B) Structuré de la molécule KIN101, un membre de la famille des isoflavones. (C) Structure de la molécule C3. (D) Structure de laédoxorubicine, un membre de la famille des anthracyclines. (E) Structure de l'ellipticine. (F) Structure de la molécule RO90-7501, un dérivé de la famille des benzimidazoles. (G) Structure de la molécule 09167. (H) Structure de la molécule GSK983, un dérivé de la famille des tétrahydrocarbazoles. (I) Structure de la molécule RO4948191, un dérivé de la famille des imidazonaphthyridines. Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir. (S. Khier et *al.*, 2015).



Projet de thèse et résultats

Comme décrit dans l'introduction de ce mémoire de thèse, le développement de molécules antivirales à large spectre qui ciblent l'hôte, et notamment la réponse immunitaire innée antivirale, semble être une alternative crédible aux thérapies actuelles basée principalement sur l'inhibition directe de la machinerie de réplication virale. Afin d'identifier de telles molécules, l'Unité de Génomique Virale et Vaccination (G2V) à l'Institut Pasteur a développé deux tests cellulaires qui ont ensuite été utilisés pour cribler différentes chimiothèques. Ce projet a été piloté au sein de l'unité G2V par mon directeur de thèse Pierre-Olivier Vidalain, en collaboration avec le groupe d'Hélène Munier-Lehmann (Unité de Chimie et biocatalyse, Institut Pasteur).

Présentation des systèmes de criblage mis en place au laboratoire

Stratégie de criblage n°1 : un test cellulaire basé sur la réplication de différents virus

La première stratégie de criblage mise au point dans l'équipe est basée sur la combinaison d'infections *in vitro* par les virus recombinants de la rougeole (rMV2/Luc) et du chikungunya (CHIK/Ren) exprimant la luciférase comme rapporteur de la réplication virale et d'un test de la viabilité cellulaire (Figure 1). Ce protocole de criblage à haut débit permet d'isoler, à partir de chimiothèques de plusieurs milliers de molécules, des composés non toxiques capables d'inhiber à la fois des virus à ARN de polarité positive tels que le virus du chikungunya (CHIKV) et négative tels que le virus de la rougeole (MeV). Les molécules ainsi sélectionnées peuvent ainsi être considérées comme des antiviraux à large spectre, tout au moins vis à vis des virus à ARN. La première étape du criblage permet de sélectionner tout d'abord les composés non toxiques et actifs contre le MeV, puis ces molécules sont testées pour leur activité antivirale contre le CHIKV. Seules les molécules qui sont non toxiques et actives contre les deux virus sont sélectionnées. Cette méthode a été présentée dans le journal JOVE qui utilise la vidéo comme principal média [300].

Avant mon arrivée au laboratoire, ce protocole a été utilisé pour cribler deux chimiothèques obtenues respectivement auprès de la société Chem-X-Infinity (10.000 composés) et du Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie (4640 composés, CERMN, Caen), ce qui a permis de sélectionner les composés ChX-77 (Chem-X-Infinity) et sr1057 (CERMN) pour leur puissante activité antivirale. **L'objet d'une partie de ma thèse a été d'étudier les propriétés**

antivirales de ces deux molécules, d'établir leur spectre d'activité ainsi que des relations structure/activité, et enfin de préciser si possible leur mode d'action.

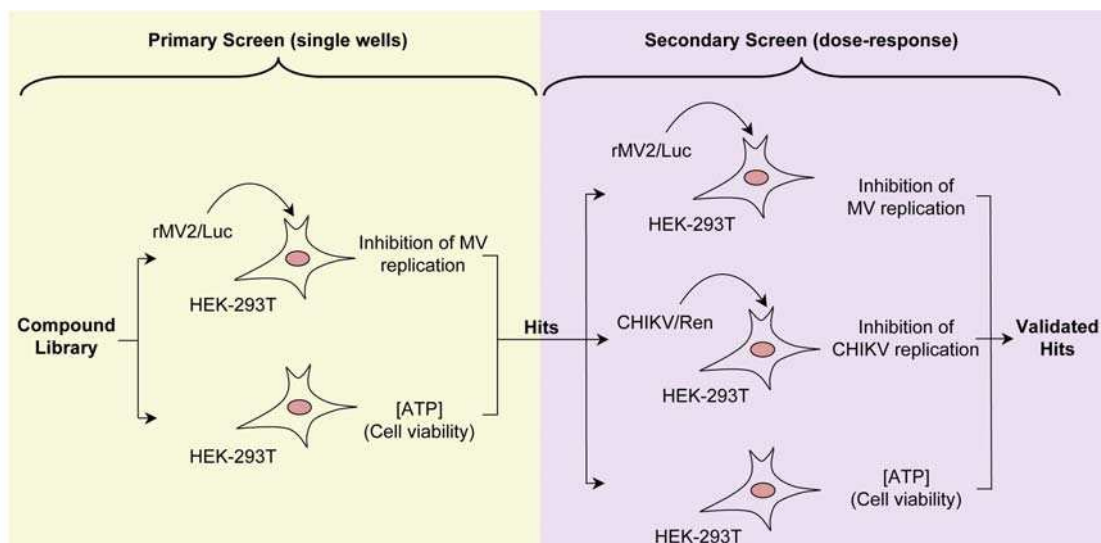


Figure 1 : Protocole de criblage pour l'identification de composés antiviraux à large spectre. rMV2/Luc et CHIKV/Ren désignent des souches recombinantes des virus de la rougeole et du chikungunya qui expriment la luciférase comme rapporteur de la réplication virale.

Stratégie de criblage n°2 : un test cellulaire mesurant l'induction de la réponse innée

La seconde stratégie de criblage développée dans l'équipe vise à identifier des composés stimulant la réponse immunitaire innée. Pour identifier de telles molécules, un test de criblage à haut débit basé sur l'utilisation de cellules humaines HEK-293 transfectées par un gène rapporteur ISRE-luciférase a été développé (Figure 2). L'élément de réponse ISRE (« Interferon-Stimulated Response Element ») étant présent dans le promoteur des 200 à 300 gènes cellulaires antiviraux induits par les IFN- α/β (Interferon-Stimulated Genes ou ISG), ce test fonctionnel permet théoriquement de sélectionner des molécules capables de stimuler la réponse immunitaire innée antivirale.

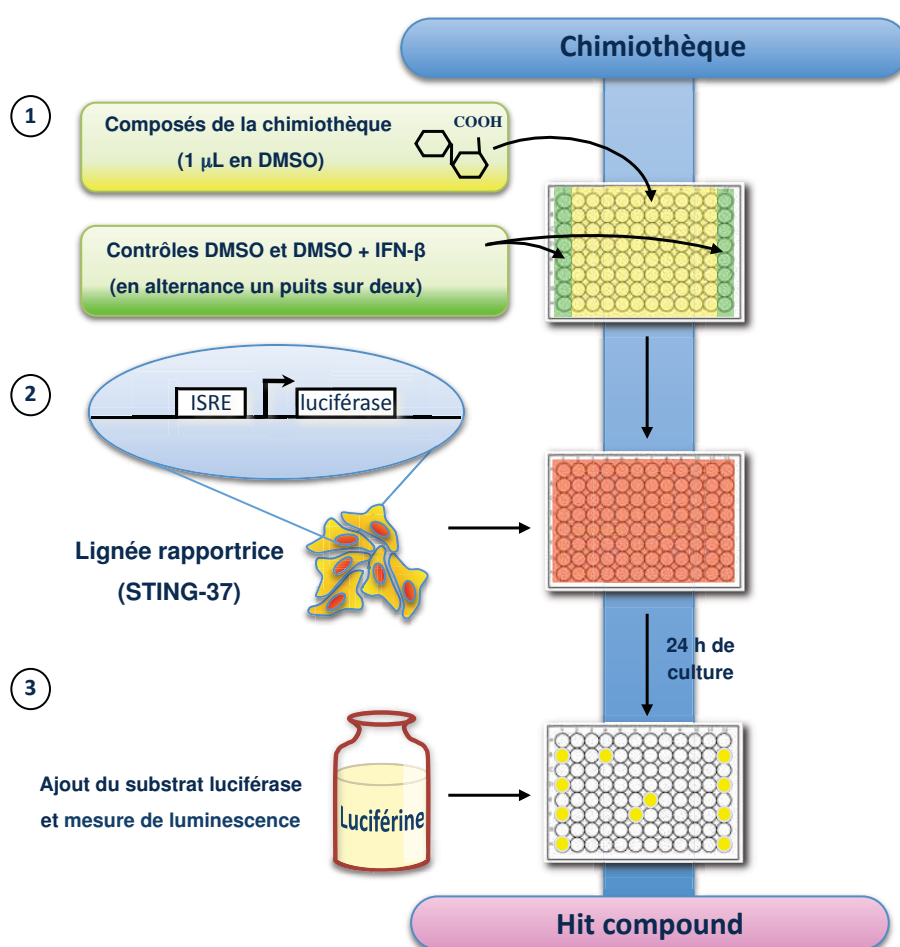


Figure 2. Protocole de criblage de composés à haut débit utilisant le système ISRE-luciférase.

Ce test fonctionnel a été utilisé au départ pour cribler plusieurs chimiothèques dont la « Chimiothèque Nationale » soit 60.000 entités chimiques environ. Trois séries de molécules ont été retenues pour leur faible toxicité et leur capacité à induire le gène rapporteur ISRE-luciférase : les molécules 129G03/DD264 et 123G05/DD363 issues des travaux de Daniel Dauzonne (Institut Curie, CNRS) sur les flavonoïdes, et le composé IPPA15C08 issu du travail d'Yves Janin (Institut Pasteur, CNRS) sur les alkoxyypyrazoles [301].

La molécule 129G03/DD264 a fait l'objet d'une première publication en 2013 décrivant non seulement sa capacité à amplifier l'expression des ISG en réponse à l'ARN 5'-triphosphate ou aux IFN- α/β , mais aussi sa puissante activité antivirale *in vitro* contre des virus appartenant à différentes familles (Annexe n°1). Au cours de mon stage de Master 2 au sein de l'unité G2V, j'ai ainsi participé à l'étude du mode d'action de cette molécule. Plusieurs approches ont montré que cette molécule est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des pyrimidines ciblant la 4^{ème} enzyme de cette voie métabolique : la dihydroorotate deshydrogénase (DHODH). Nous avons

ensuite montré que l'état antiviral induit par ces molécules résultait de l'effondrement du pool de pyrimidines dans la cellule, ce qui a pour conséquence d'amplifier la réponse immunitaire innée antivirale. Ceci a permis d'établir un tout nouveau lien entre l'inhibition de cette voie métabolique et l'amplification de l'expression des gènes antiviraux. Par la suite, l'équipe a montré que les composés IPPA15C08 et 123G05/DD363 sont également des inhibiteurs de la voie de biosynthèse des pyrimidines, et que leurs propriétés antivirales et immunostimulatrices sont liées au même mécanisme. Récemment, plusieurs groupes de recherche ayant une approche similaire à celle développée dans l'équipe G2V ont confirmé ces résultats. A titre d'exemple, la molécule GSK983 a été décrite dans un premier temps comme un puissant antiviral *in vitro* capable de stimuler la réponse immunitaire innée, mais a récemment été caractérisée comme un inhibiteur de la DHODH [298].

D'un point de vue fondamental, ce lien entre immunité innée et voie de biosynthèse des pyrimidines est très intéressant à étudier. Cependant, l'activation de cette voie *in vivo* dans un but thérapeutique reste difficile. En effet, outre la voie de biosynthèse des pyrimidines, la cellule recycle ses nucléosides par dégradation des ARNm, et peut également s'approvisionner en pyrimidines par absorption de l'uridine qui est présente dans le sang à de fortes concentrations (entre 8 et 20 μ M). Ces mécanismes, qui permettent à de nombreux types cellulaires de s'affranchir de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines, pourraient expliquer les échecs rencontrés lors de tests *in vivo* d'inhibiteurs de cette voie métabolique comme traitements antiviraux dans des infections virales systémiques [302-304]. Afin de trouver d'autres molécules stimulant l'immunité innée antivirale et empruntant une autre voie que celle de l'inhibition de la DHODH, l'équipe G2V a choisi de cribler une chimiothèque originale de 10,000 molécules développées par la société Chem-X-Infinity (Romainville), ce qui a permis d'isoler la molécule ChX79.

Dans les deux chapitres de la partie « résultats » de ce manuscrit, je détaillerai le travail réalisé sur les trois molécules isolées par ces différentes stratégies de criblage, c'est à dire ChX77, sr1057 et ChX79, afin d'établir leur spectre d'activité, des relations structure/activité et enfin leur mode d'action.

Chapitre I : ChX79, un composé qui amplifie la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique (Manuscrit N°1)

1 Présentation du manuscrit

L'essentiel de mon travail de thèse a été d'étudier la molécule ChX79, un composé appartenant à la famille chimique des benzimidazoles et sélectionné pour sa capacité à stimuler le gène rapporteur ISRE-luciférase dans des cellules STING37 (Test de criblage n°2). Parmi les 10.000 molécules testées, seuls deux composés se sont avérés capables d'induire le gène rapporteur ISRE-luciférase d'un facteur supérieur à 3, et ont ainsi été sélectionnés (Table S1). Ce sont des dérivés 1H-benzimidazole-4-carboxamide désignés sous le nom de ChX0275199 et ChX67779. Ce dernier étant le plus actif, il a été choisi pour le reste des études fonctionnelles et désigné par l'abréviation "ChX79".

Avant d'explorer le mode d'action de cette molécule, j'ai vérifié que l'effet immunostimulateur de ChX79 n'était pas lié à une l'inhibition de la DHODH conduisant à un blocage de la voie de biosynthèse des pyrimidines. J'ai ensuite confirmé en dose-réponse l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase dans les lignées STING-37 (Fig. 1A), mais également dans des cellules HEK-293T exprimant transitoirement ce même gène rapporteur (Fig. 1D). Les résultats obtenus montrent une courbe en cloche où le facteur d'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase atteint un maximum de 10 à une dose de 50 μ M de ChX79 puis baisse drastiquement jusqu'à 2 à une dose de 100 μ M de ChX79 suggérant une certaine toxicité de la molécule (Fig. 1A). Afin de vérifier l'effet de la molécule sur la viabilité cellulaire, nous avons quantifié l'ATP présent dans les puits de culture, ce qui reflète l'activité métabolique des cellules traitées par des doses croissantes de ChX79 (Fig. 1B). Les résultats montrent ainsi une toxicité cellulaire déjà marquée à 25 et 50 μ M de ce composé, mais particulièrement prononcée à 100 μ M (Fig. 1B), ce qui pourrait expliquer la diminution du signal luciférase observée à cette dose (Fig. 1A). Par ailleurs, une étude cinétique montre que l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par le ChX79 s'observe à des temps tardifs, après 8h à 16h de traitement (Fig. 1C). En outre, j'ai montré que le composé ChX79 n'active pas un gène

rapporteur luciférase sous contrôle d'un élément de réponse à NF- κ B. Ce résultat a permis de confirmer que l'activation de la séquence promotrice ISRE est spécifique par cette molécule (Fig. 1D). Ces résultats démontrent que ChX79 stimule spécifiquement l'élément de réponse ISRE avec toutefois une toxicité cellulaire significative.

J'ai ensuite montré par qRT-PCR que sur un panel de 11 gènes induits par les IFNs de type I (Interferon-Stimulated Genes ou ISGs), seul certains (IFI27, IFI6) sont significativement activés par le ChX79 dans des cellules HEK-293T et A549. En revanche, ChX79 n'induit pas l'expression de ces ISGs dans les MRC5, et induit principalement ISG15 et Mx1 dans les cellules Vero (Fig. 2A). Ces résultats montrent que contrairement à une stimulation par l'IFN- β recombinant, le composé ChX79 n'induit que certains ISGs et cela de façon variable d'un type cellulaire à l'autre. De plus, une analyse cinétique de l'expression d'IFI27 a permis de confirmer que ChX79 induit les ISGs après 8h à 16h de traitement (Fig. 2B), ce qui rejoint les résultats obtenus précédemment (Fig. 1C). Enfin, le ChX79 apparaît comme un inducteur faible des ISGs comparé à l'IFN- β , avec des facteurs d'induction 10 à 100 fois plus faibles (Fig. 2C).

Par la suite, et afin d'établir une relation structure activité (Fig. 3A), nous avons testé 50 analogues de ChX79 pour caractériser le pharmacophore responsable de l'activité immuno-stimulatrice. Nous avons d'abord testé plusieurs substitutions sur le groupe carboxamide. Un composé dans lequel le carboxamide a été remplacé par un acide carboxylique était totalement inactif (CID11207170, ce dernier dénommé CID70), montrant ainsi le rôle clé de cette partie de la molécule (Fig. 3A). De façon intéressante, ce composé inactif a montré un impact très limité sur la viabilité cellulaire (Fig. S1A), ce qui conforte l'idée d'un lien entre induction des ISGs par le ChX79 et toxicité cellulaire. Ensuite, nous avons testé des substitutions du groupe aminoéthylpipéridine de ChX67779 par diverses amines (tableau S1). La plupart d'entre eux étaient totalement inactifs, à l'exception de quelques analogues, y compris le ChX0275199 qui avait été identifié dans le criblage initial. ChX0306710 (appelé ici ChX710) était significativement plus actif que ChX67779 avec un pic d'induction à 25 μ M (Fig. 3A). En revanche, la molécule a perdu son activité lors du

remplacement du groupe pyridine par les groupes phénol ou diméthylaniline (Tableau S2), ce qui démontre l'importance de ce groupe. Enfin, nous avons confirmé que l'analogue le plus actif identifié, ChX710, induit certains ISGs de manière similaire à ChX79 comme le montrent l'induction de l'expression d'IFI27 et d'IFI6 dans HEK-293T traités avec cette molécule (Fig. 3B et C). Le composé ChX710 étant deux fois plus actif que ChX79, il a été alors choisi pour étudier le mode d'action de cette série chimique.

Tout d'abord, nous avons déterminé si les interférons de type I (IFN- α/β) sont impliqués dans l'activation de la séquence régulatrice de l'ISRE par ChX710. Pour aborder cette question, les STING37 ont été incubées avec ChX710 en présence d'anticorps antagonistes qui bloquent l'interaction des IFN- α/β avec leur récepteur IFNAR1 / IFNAR2c. Les concentrations d'anticorps que nous avons utilisées étaient suffisantes pour bloquer jusqu'à 500 UI/ml d'IFN- α ou β . Néanmoins, aucun effet sur l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par ChX710 n'a été observé (Fig. 4A). De plus, nous avons montré par RT-qPCR que le traitement des cellules par le ChX710 n'induit pas de manière significative les ARNm codant pour l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- γ ou les IFN- λ (Fig. 7A). Ainsi, l'activation du gène rapporteur ISRE-luciférase par le ChX710 est indépendante d'une boucle paracrine/autocrine impliquant la sécrétion d'IFN de type I, II ou III. Nous avons également évalué le rôle de STAT1 et de STAT2, qui sont activés en aval du récepteur aux IFN- α/β pour induire les ISGs. Tout d'abord, nous avons éteint par siRNA l'expression de STAT1 ou de STAT2 dans les cellules STING37 avant de les stimuler avec le composé ChX710 (Fig. 4B et S2A). Comme on le voit sur la Fig. 4B, l'induction de la luciférase n'est pas affectée en l'absence de STAT1, STAT2 ou STAT1 et STAT2. En outre, nous avons également montré que le siRNA de STAT2 inhibe efficacement l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par l'IFN- β recombinant (Fig. S2B), alors que STAT1 ne joue un rôle essentiel dans cette activation en accord avec la littérature (34). Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'activation de l'élément de réponse ISRE par le ChX710 est indépendante de STAT1 et STAT2.

Ces résultats suggèrent une activation directe de l'élément de réponse ISRE par les voies intrinsèques. Les cellules STING-37 n'exprimant pas les récepteurs TLR, les adaptateurs MAVS ou STING pourraient ainsi être impliquées ainsi que les facteurs de transcription de la famille IRF situés en aval,. Ainsi, l'induction du gène

rapporteur ISRE-luciférase par le ChX710 est complètement abolie dans des cellules transfectées par le siRNA de MAVS (Fig. 5A), ce qui implique cet adaptateur dans le mode d'action de ChX710. En revanche, un siRNA spécifique de STING n'a qu'un effet modeste sur l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par le ChX710 (Fig. 5B). En outre, nous avons bien vérifié que les siRNA spécifiques de MAVS et STING inhibent l'induction de l'élément de réponse ISRE dans les cellules STING37 traitées respectivement par l'ARN 5'-triphosphate et le cGAMP (Fig. S3A et B). Nous avons ensuite déterminé le rôle d'IRF1 et IRF3, deux facteurs de transcription impliqués dans l'induction des ISGs et de l'IFN- β (1). Dans les cellules STING37, IRF1 est essentiel à l'activation du gène rapporteur ISRE-luciférase par l'ARN 5'-triphosphate (29), contrairement à IRF3 qui n'est pas impliqué (Fig. S3C). En revanche, IRF3 est nécessaire à l'induction du promoteur l'IFN- β par de l'ARN 5'-triphosphate (fig. S3D), ce qui permet de définir deux voies de signalisation différentes en aval de MAVS pour qui réguler l'expression des ISGs et de l'IFN- β (fig. S3E) (29). Comme on le voit sur la Fig. 5C, l'activation de l'élément de réponse ISRE par ChX710 a été inhibée par l'extinction de l'expression d'IRF1 par siRNA, alors que celle d'IRF3 n'entraîne aucun effet (Fig. 5D). Néanmoins, ChX710 induit la phosphorylation d'IRF3, à la fois dans des cellules HEK-293T et dans des cellules A549 (Fig. 5E), mais cela ne semble pas être suffisant à induire l'expression d'IFN- β comme indiqué précédemment. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que ChX710 induit l'élément de réponse ISRE *via* un axe MAVS/IRF1, mais qu'il induit également la phosphorylation d'IRF3 sans induire la synthèse d'IFN- β (Fig. 5F).

Bien que ChX710 induise efficacement la phosphorylation d'IRF3 et le gène rapporteur ISRE-luciférase, sa capacité à stimuler les ISGs reste plutôt limitée (Fig. 7A). Nous avons donc testé la capacité du ChX710 à amplifier la réponse cellulaire à des concentrations suboptimales d'IFN- α recombinant, à de l'ARN-5'-triphosphate ou à de l'ADN plasmidique. Comme on le voit sur la Fig. S4, ChX710 n'amplifie pas l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par l'IFN- α ou par l'ARN-5'-triphosphate, mais on observe plutôt un effet inhibiteur dans les cellules traitées par 25 μ M de ChX710, ce qui est probablement lié à la cytotoxicité associée à ce composé. Cependant, les résultats présentés dans la Fig. 6A montrent que le composé ChX710 à 6 μ M stimule fortement la réponse cellulaire à de l'ADN

plasmidique. En revanche, l'analogue inactif ne montre aucun effet sur la réponse cellulaire à l'ADN plasmidique (Fig. 6B). De plus, le même effet amplificateur a été observé pour différentes tailles et séquences différentes (Fig. 6C, D et E). Ces résultats montrent que le composé ChX710 est capable d'amplifier la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique, ce qui est particulièrement original.

Pour mieux documenter ce phénomène, nous avons étudié l'expression d'un panel d'ISGs dans des cellules HEK-293 transfectées avec de l'ADN plasmidique et stimulées avec 6 ou 25 μ M de ChX710 pendant 24 h (Fig. 7A). Tout d'abord, nous avons confirmé l'induction modeste de certains ISGs par le ChX710 seul. Dans ce système, la transfection d'ADN plasmidique est également un mauvais inducteur des ISGs, bien que nous ayons observé une induction significative de certains ISGs tels qu'IFIT1, IFIT2 ou ISG15 à des concentrations élevées de plasmide (75 ng/puits). En accord avec les résultats obtenus précédemment avec le gène rapporteur ISRE-luciférase, nous avons observé de puissants effets synergiques sur l'expression des ISGs lorsque la transfection d'ADN plasmidique est combinée à un traitement par le ChX710. Ce phénomène est toutefois limité aux ISGs de la réponse immédiate et à l'IFN- β . (Fig. 7A et B). Pour déterminer si cet effet synergique observé au niveau de l'expression des ARNm s'accompagne d'une synthèse protéique, nous avons testé la présence d'IFN- β dans les surnageants des puits cultures par ELISA (Fig. 7C) ou par test biologique en utilisant la lignée rapportrice STING-37 (Fig. 7D). Les résultats obtenus confirment un effet synergique de l'ADN plasmidique et du composé ChX710 sur la synthèse d'IFN- β par les cellules traitées, avec des taux supérieurs à 100 UI/ml d'IFN- β . Ainsi, il est possible d'affirmer que le composé ChX710 a un puissant effet stimulateur sur la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique.

Enfin, nous avons étudié le rôle de STING, un adaptateur connu pour jouer un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à l'ADN exogène, sur cet effet synergique. Pour cela, nous avons éteint l'expression de STING par siRNA dans des cellules STING-37 et après 48 heures d'incubation, puis nous les avons transfectées avec de l'ADN plasmidique et traitées pendant 24h avec le composé ChX710. Les résultats obtenus montrent que l'adaptateur STING est essentiel à l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase dans ces cellules par la combinaison ADN plasmidique + ChX710 (Fig. 8). Si la cible de Ch710 reste inconnue, ces résultats suggèrent que cette molécule agit directement ou indirectement sur les membranes mitochondriales

associées au réticulum endoplasmique (MAM) dans lesquelles STING et MAVS sont co-localisées, et qui jouent un rôle de plateformes dans l'induction des ISGs.

2 Données complémentaires

Comme je l'ai mentionné précédemment, j'ai observé que les propriétés immuno-stimulatrices de ChX710 sont associées à une toxicité cellulaire significative. En outre, j'ai pu montrer que cet effet cytoxique s'accompagne d'un programme intégré de stress cellulaire. J'ai tout d'abord montré que les cellules traitées par le ChX710 présentent un remodelage des nucléoles (Fig. 3A) et un blocage de la synthèse des ARN pré-ribosomiaux (Fig. 3B). Les nucléoles étant les structures dans lesquelles a lieu la synthèse des ARN ribosomiaux, ces données permettent de conclure à une inhibition de la néo-synthèse des ribosomes.

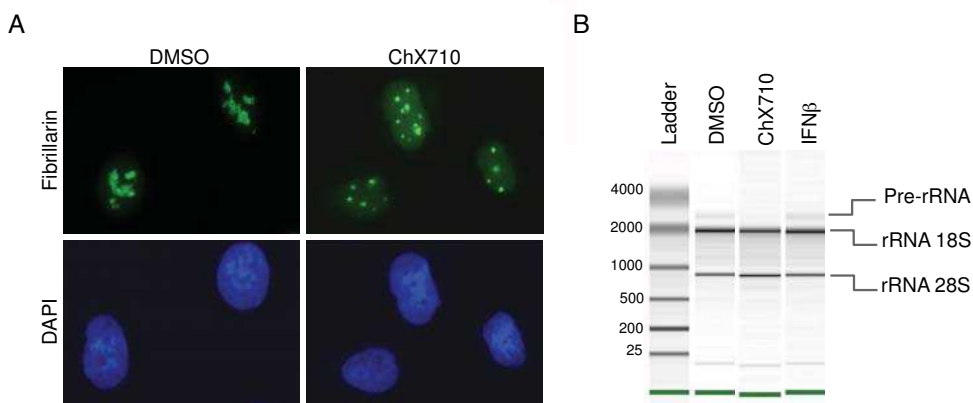


Figure 3. Inhibition de la néo-synthèse de ribosomes. (A) Des cellules A549 traitées par le ChX710 (25 μ M) ou du DMSO seul pendant 24h. **(B)** Des cellules A549 traitées par le ChX710 (25 μ M) ou du DMSO seul ou IFN- β (500 IU) pendant 24h. Les cellules sont ensuite récupérées et les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les ARN totaux sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire (Agilent).

De plus, la molécule ChX710 induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2- α (Fig. 4B), ainsi que la formation de granules de stress (Fig. 4C) et la condensation des P-bodies (Fig. 4D) qui, comme je l'ai décrit dans l'introduction, sont autant de marqueurs associés à un arrêt de la traduction et à la dégradation des ARNm.

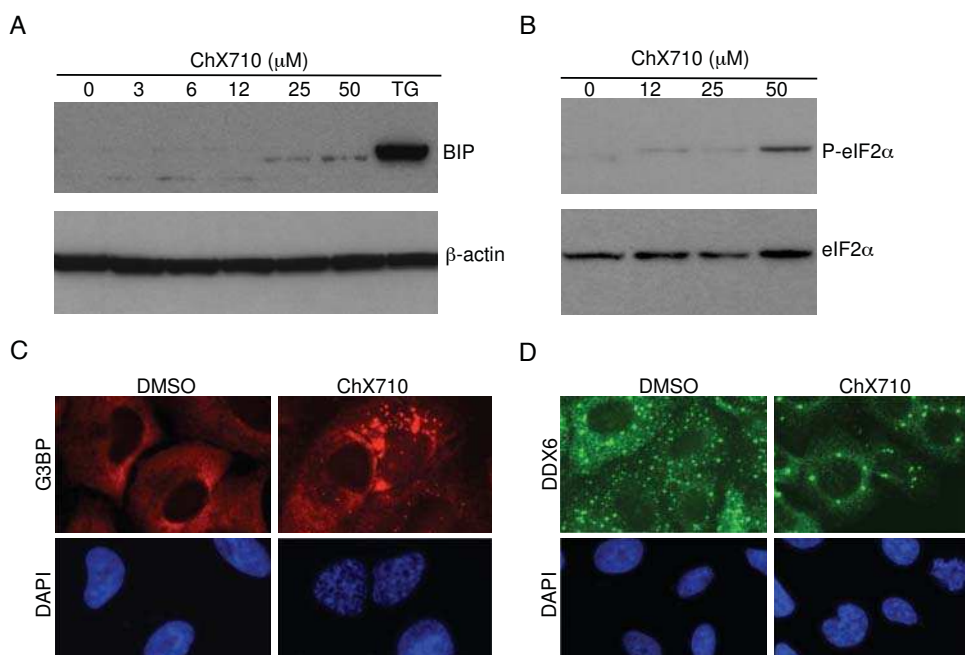


Figure 4. Détection de marqueurs associés à une perturbation de la machinerie de traduction. (A-B) Des cellules A549 ont été traitées par des doses croissantes de ChX710 ou du DMSO seul pendant 24h. L'expression de BiP et la phosphorylation d'eIF2- α ont ensuite été déterminées par western-blot (C-D) Des cellules A549 ont été incubées en présence de ChX710 (25 μ M) ou de DMSO seul pendant 24h, et l'expression de G3BP, marqueur des granules de stress, et de DDX6, marqueur des P-bodies, a été déterminée par immunofluorescence (Ibidi, BIOVALLEY S.A.).

Enfin, ces marqueurs de stress sont associés à l'induction de p53 qui s'accumule dans le noyau des cellules traitées par le ChX710 et dont le niveau global d'expression est augmenté (Fig. 5A-B).

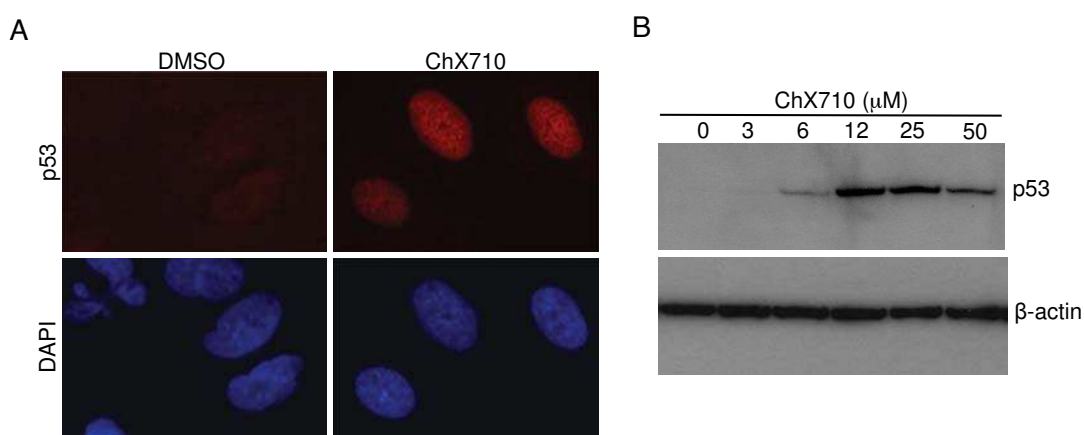


Figure 5. Induction de l'expression et de la translocation nucléaire de p53. (A) Des cellules A549 ont été incubées en présence de ChX710 (25 μ M) ou de DMSO seul pendant 24h sur les lames de culture (Ibidi, BIOVALLEY S.A.). L'expression de p53 a ensuite été déterminée par immunofluorescence (B) Des cellules A549 ont été traitées par des doses croissantes de ChX710 ou de DMSO seul pendant 24h, et l'expression de p53 a été évaluée par western-blot.

Par ailleurs, j'ai établi le rôle essentiel du stress oxydatif intracellulaire dans l'induction de l'élément de réponse ISRE et des ISG par le ChX710. En effet, la N-acétylcystéine (NAC), un agent réducteur bien connu, bloque l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase (Fig. 6A) et des ISGs (Fig. 6E-F) par le ChX710. En revanche, la NAC ne semble avoir aucun effet sur l'induction de l'élément de réponse ISRE par l'IFN- β (Fig. 6C), ce qui montre le rôle spécifique joué par le stress oxydatif dans l'activation de l'élément de réponse ISRE et des ISGs par le ChX710. En outre, ces observations ont été faites en absence de toute toxicité liée au traitement par la NAC (Fig. 6B, Fig. 6D). Ceci me permet ainsi d'établir un lien entre l'effet immunostimulateur de ChX710 et la mise en place d'un stress oxydatif dans les cellules traitées.

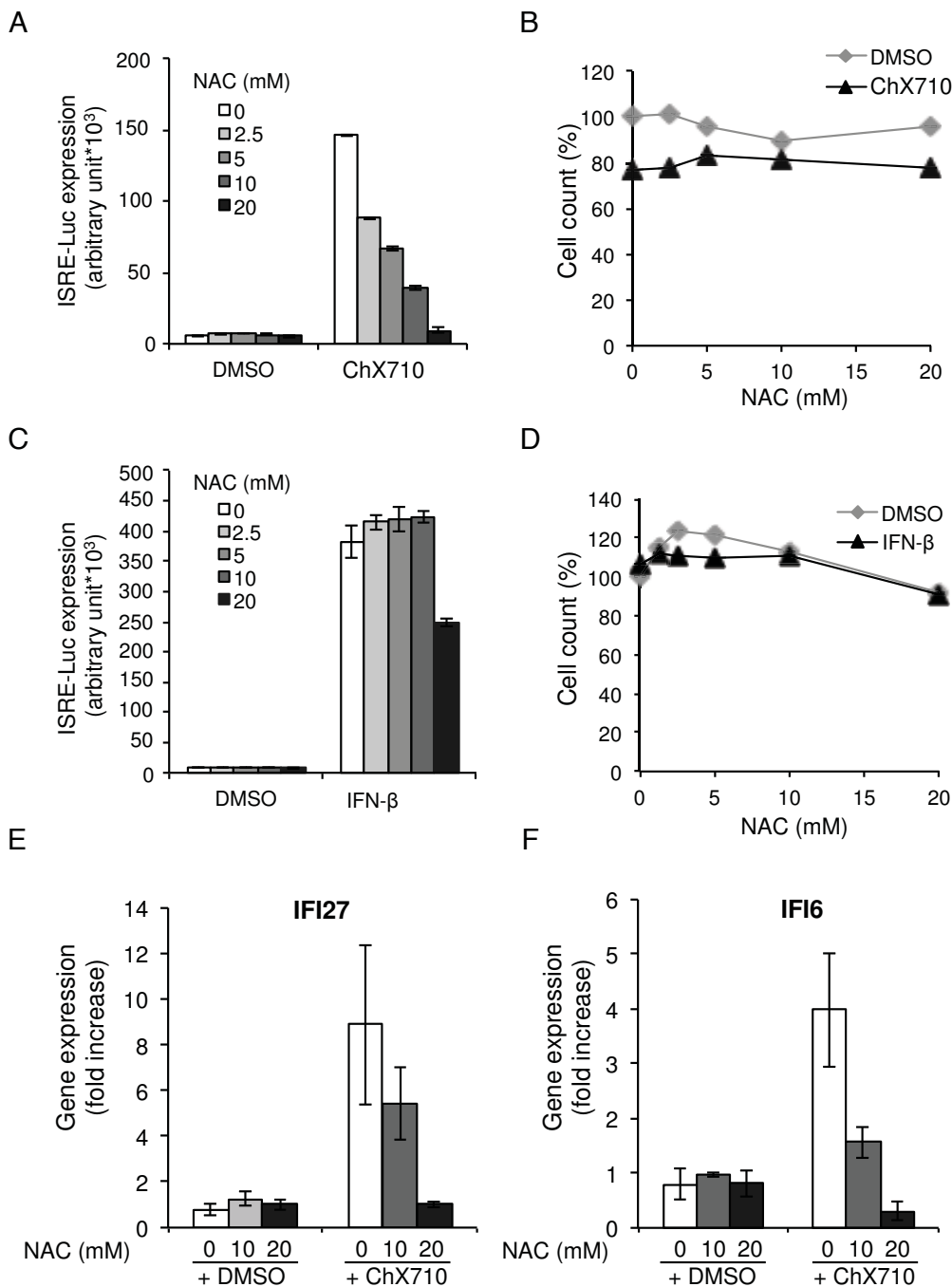


Figure 6. Le rôle du stress oxydatif intracellulaire dans l'induction de l'élément de réponse ISRE et des ISG par le ChX710. A-D. Des cellules STING37 traitées à la fois par des doses croissantes de N-acétylcystéine et par le ChX710 (25 μM), du DMSO seul ou de l'IFN-β (500 IU/ml) pendant 24h. E-F. Des cellules HEK-293T incubées à la fois avec des doses croissantes de N-acétylcystéine et avec le ChX710 (25 μM), du DMSO seul ou de l'IFN-β (500 IU/ml) sont cultivées pendant 24h. L'expression des ISG a ensuite été mesurée par qRT-PCR.

En outre, j'ai exploré l'induction d'un mécanisme activé lors d'un stress cellulaire et jouant un rôle essentiel dans l'immunité innée antivirale : l'autophagie. J'ai ainsi

montré que dans les cellules traitées par le ChX710, et plus particulièrement les cellules incubées en présence de la plus forte dose de ce composé (50 μ M), on observe une conversion de LC3BI en LC3BII, un marqueur témoignant de l'induction du processus de l'autophagie dans ces cellules (Fig. 7).

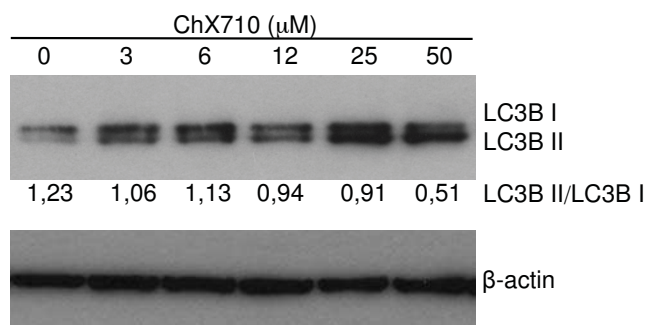


Figure 7. Conversion de LC3B-I and LC3B-II dans les cellules traitées par le ChX710. Des cellules A549 ont été traitées par des doses croissantes de ChX710 (50 mM) ou de DMSO seul pendant 24h, puis l'expression de LCB3B-I et II a été déterminée par western-blot.

Enfin, l'étude de différents analogues inactifs de ChX710 (Table S1) montrent une corrélation entre stress cellulaire et activation du promoteur ISRE, autant d'éléments qui suggèrent un lien direct entre le programme de stress cellulaire intégré mis en place et l'induction des ISGs dans les cellules traitées par ChX710.

Chapitre II : Les composés sr1057 et ChX77, des petites molécules antivirales à large spectre

1 Etude du composé sr1057

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la molécule sr1057 a été sélectionnée suite au criblage de la chimiothèque issue du Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie (CERMN, Caen) en utilisant le protocole n°1 qui a permis de l'identifier comme une molécule active sur les MeV et CHIKV. Lors du criblage de cette chimiothèque, seulement 6 molécules actives contre les deux virus et montrant une toxicité relativement limitée ont été choisies. Parmi ces composés, le sr1057, un composé de la famille des pyrroloquinoxaline (Fig. 8A), a été choisie en raison de son activité pour une étude plus approfondie de ses propriétés antivirales et de son mode d'action. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un programme collaboratif impliquant différents laboratoires (Stephan Zientara de l'ANSES de Maison-Alfort, Aymeric Hans de l'ANSES de Dozulé, Stéphane Pronost du Labéo-Frank Duncombe, Sylvain Rault et Patrick Dallemagne du CERMN à Caen et Hélène Munier-Lehmann à l'Institut Pasteur), le tout étant en soutenu par l'Institut Français du Cheval de l'Equitation (IFCE) et le pôle de compétitivité Hippolia pour des applications thérapeutiques chez le cheval. Dans un premier temps cette molécule a été retestée afin de confirmer son effet antiviral contre les virus MeV et CHIKV (Figure 8B).

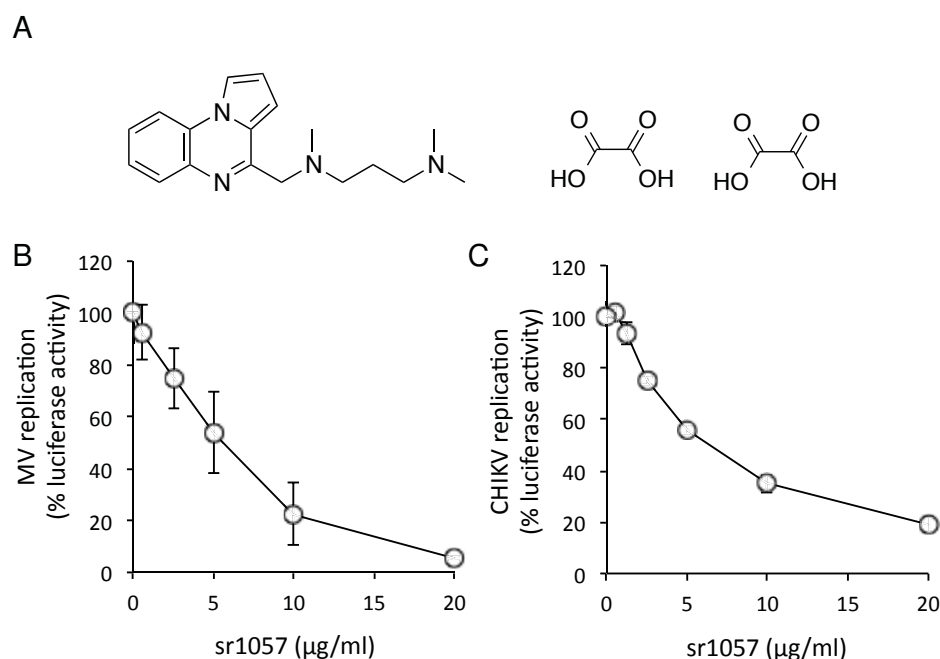


Figure 8. Effet antiviral du composé sr1057 sur la réplication des virus de la rougeole et du chikungunya. (A) Structure chimique du sr1057. (B) Cellules HEK-293T infectées avec un virus de la rougeole recombinant exprimant le luciférase firefly (rMV2/Luc) ou un virus du chikungunya exprimant la luciférase Renilla (CHIKV/Ren), et traitées avec des doses croissantes de sr1057. Après 24h de culture, l'expression de la luciférase reflétant la réplication virale a été déterminée.

Les résultats ont ainsi permis de déterminer un index de sélectivité (CC_{50}/IC_{50}) qui a été estimé à 17, ce qui reste certes relativement intéressant pour une molécule non optimisée. Afin de déterminer la structure minimale active, une cinquantaine d'analogues du sr1057 ont été synthétisés au CERMN de Caen, puis testés pour leur activité antivirale contre le virus de la rougeole. Leur cytotoxicité a également été évaluée en utilisant le test de viabilité basé sur la quantification d'ATP décrit précédemment. La Figure 9 présente les résultats obtenus sur quelques molécules sélectionnées, et démontre le rôle central joué par le noyau pyrroloquinoxaline dans l'activité antivirale de ces composés. En revanche, aucun des composés testés n'a permis pour l'instant d'augmenter significativement l'activité antivirale de cette série chimique.

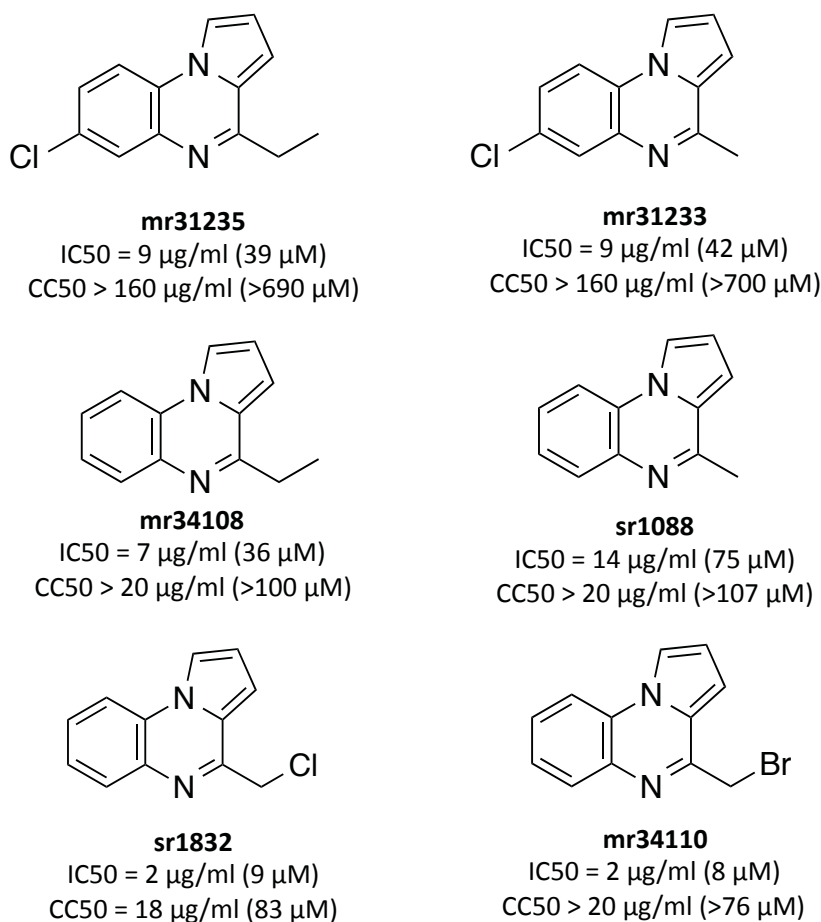


Figure 9. Cytotoxicité et effet antiviral des analogues du sr1057 sur la réplication du virus de la rougeole. Des cellules HEK-293T infectées avec le virus de la rougeole (rMV2/Luc-MOI 0,1) ont été incubées avec des doses croissantes de composé. Après 24h de culture, l'activité antivirale a été établie sur la base de l'expression de la luciférase (IC_{50}). Pour déterminer la cytotoxicité des composés (CC_{50}), des cellules HEK-293T ont été incubées avec des doses croissantes de chaque molécule pendant 24h, puis l'ATP présent dans le puits a été quantifié.

Afin de documenter le mode d'action du sr1057, nous avons vérifié que cette molécule n'interfère pas avec la biosynthèse *de novo* des pyrimidines. L'ajout d'uridine dans le milieu de culture n'a pas d'impact sur l'activité antivirale du composé sr1057, contrairement à ce qui peut être observé avec la molécule IPPA15-C08, un puissant inhibiteur de la DHODH isolé au laboratoire [301] (figure 10). Par conséquent, la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines n'est pas la cible du sr1057.

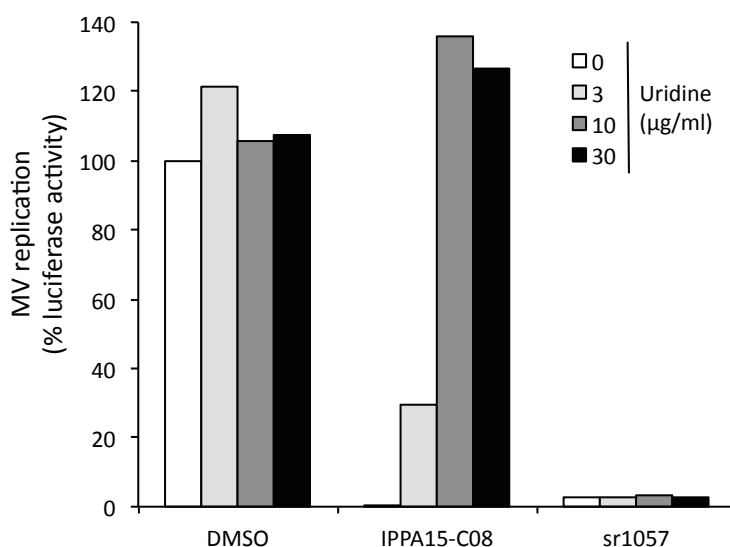
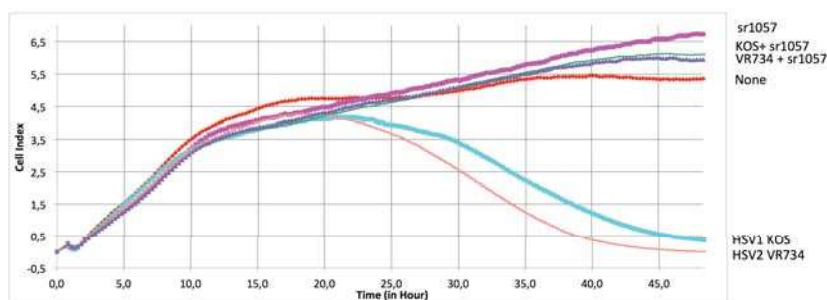


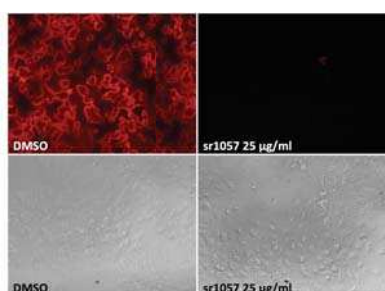
Figure 10. Effet de l'uridine sur l'activité antivirale du sr1057. Des cellules HEK-293T infectées avec le virus de la rougeole (rMV2/Luc-MOI 0,1) ont été incubées en présence de sr1057 ou d'IPPA15-C08, un inhibiteur connu de la DHODH, en présence de doses croissantes d'uridine. Après 24h de culture, la réplication virale a été établie sur la base de l'expression de la luciférase.

Par ailleurs, le travail effectué au LABEO–Frank Duncombe sur la molécule sr1057 a permis de montrer qu'elle est efficace *in vitro* sur les herpèsvirus équins de type 1 à 4 qui représentent un problème sanitaire majeur pour les équidés. Il était donc intéressant de tester l'effet de sr1057 sur la réplication des herpèsvirus humains. Les expériences réalisées au laboratoire par Marianne Lucas-Hourani ont permis de montrer que cette molécule inhibe également la réplication des herpèsvirus humains de type 1 et 2 (Figure 11).

A



B



C

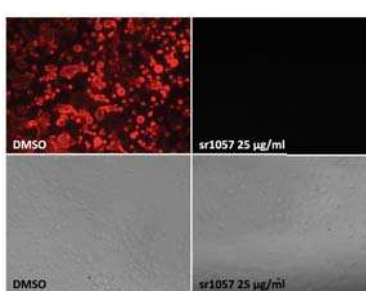


Figure 11 : Le composé sr1057 inhibe les effets cytopathiques et la réplication des herpèsvirus humains de type 1 et 2. (A) Des cellules humaines A549 non traitées (None), infectées par le HSV1 (KOS) ou le HSV2 (VR734) ont été cultivées en absence ou en présence du composé sr1057 à 25 µg/ml. La viabilité et la prolifération cellulaire ont été évaluées en cinétique sur 45 heures à l'aide d'une plateforme d'impédancemétrie. L'index cellulaire, qui correspond à une mesure de la résistance électrique entre des microélectrodes situées au fond des puits de culture, reflète à la fois l'adhésion des cellules et leur prolifération. On constate que les infections par HSV1 ou HSV2 provoquent un effondrement de cet index, ce qui reflète leur effet cytopathique. En présence du composé sr1057, l'index de prolifération est identique à celui des cellules non infectées, ce qui démontre l'action antivirale de la molécule. Un immunomarquage sur cellules infectées par le HSV1 (B) ou le HSV2 (C) confirme l'effet antiviral du sr1057.

De plus, une collaboration avec l'équipe de Sylvain Baize au P4 de Lyon nous a permis tester les effets de cette molécule sur la réplication de deux virus de classe 4 hautement pathogènes pour l'homme : les virus Ebola et Lassa. Des cellules A549 ont ainsi été infectées par le virus Ebola ou le virus de Lassa, puis traitées par des doses croissantes de sr1057 pendant 24h, 48h et 72h. Les ARN viraux présents dans les cultures ont ensuite été mesurés par RT-qPCR. Les résultats obtenus ne montrent pas d'effet significatif sur le virus Lassa. En revanche, la réplication du virus Ebola est inhibée d'un facteur 100 à 25 µg/ml de sr1057 (Figure 12).

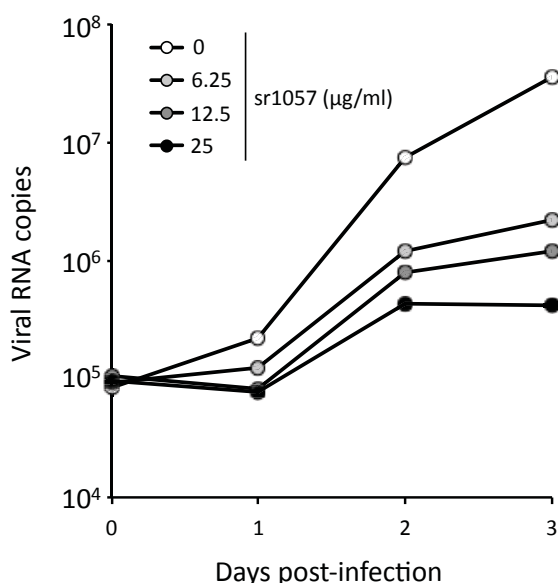


Figure 12 : sr1057 inhibe fortement la réplication du virus Ebola in vitro. Des cellules Humaines A549 ont été infectées avec le virus Ebola puis incubées avec des doses croissantes de sr1057 pendant 24h, 48h ou 72h. La réplication virale a ensuite été déterminée par RT-qPCR sur les ARN extraits des cultures cellulaires infectées.

Le composé sr1057 présente par ailleurs une excellente solubilité. En revanche, sa stabilité métabolique doit encore être améliorée avant d'envisager son évaluation *in vivo*. En effet, l'administration de sr1057 par voie intraveineuse chez la souris a montré une demi-vie de 9 min. De plus, une étude de sa stabilité métabolique sur des microsomes de foie a permis de déterminer une demi vie de 6 min, confirmant ainsi que le composé sr1057 est très rapidement métabolisé *in vivo*. Il est donc indispensable de synthétiser d'autres analogues de sr1057 afin d'améliorer sa pharmacodynamique avant d'envisager de tester ses effets antiviraux dans un modèle animal. Bien que nous ignorions encore son mode d'action, l'ensemble de ces résultats suggère que ce composé présente un potentiel de développement comme antiviral à large spectre.

2 Etude du composé ChX54 (Manuscrit N°2)

Comme le composé sr1057, la molécule ChX-77 a été isolée en utilisant le protocole de criblage n°1 à partir de la chimiothèque de 10.000 molécules développée par la société Chem-X-infinity. Parmi les 13 molécules sélectionnées lors

de ce crible [300], 2 et 7 composés sont, respectivement des dérivés triaminopyrimidine et diaminopyrimidine. Une analyse de structure a montré qu'un groupement N^4, N^6 -diphénylpyrimidine-4,6-diamine était commun à tous les composés. ChX263877, désigné sous l'abréviation ChX77, est le plus actif d'entre eux et a été choisi pour la suite des travaux sur cette famille chimique. (Fig. 1).

Le ChX-77 inhibe à la fois la réplication des virus de la rougeole et du chikungunya dans les cellules HEK-293T avec une IC₅₀ de 200 nM. De plus, la cytotoxicité cellulaire est relativement limitée, malgré des changements morphologiques importants, et j'ai montré que son indice de sélectivité (rapport CC₅₀/IC₅₀), estimé à 190, est très bon (Fig. 2B). En outre, nous observons au microscope que les cellules traitées par ChX77 changent morphologiquement, s'arrondissent et se détachent du fond du puits (Fig. 2B). Cette observation suggère que le composé ChX77 appartient à la classe des antiviraux ciblant l'hôte. Par la suite, mon travail a permis de montrer que ce composé inhibe également la réplication du coxsackievirus B3, un picornavirus proche du virus de la poliomyélite non seulement dans les cellules HEK-293T mais aussi dans les cellules A549 (Fig. 2A). Ainsi, l'efficacité *in vitro* de cette molécule contre trois virus à ARN très différents nous conforte dans l'idée d'une activité antivirale à large spectre. Si la réplication *in vitro* du virus Lassa n'est pas affectée par ce composé pour des raisons que nous cherchons encore à comprendre (collaboration avec le S. Baize, P4 de Lyon), un faible effet antiviral a été observé sur le virus Ebola. Malheureusement, l'administration de ChX77 par voie intraveineuse chez la souris a montré une demi-vie de 13 min, ce qui montre que cette molécule est rapidement éliminée *in vivo*, et qu'il faudra améliorer sa pharmacocinétique avant de pouvoir tester son effet antiviral chez la souris.

En outre, j'ai également réalisé une étude de relations structure/activité en testant 90 analogues du ChX-77, ce qui m'a permis d'identifier 40 analogues actifs dont le composé ChX-54 qui a une activité antivirale équivalente à celle de ChX77 mais il a une structure chimique plus réduite. Ceci nous a permis d'identifier la structure minimale active de la molécule. Nous avons d'abord évalué l'activité antivirale du N⁴,N⁶-diphénylpyrimidine-2,4,6-triamine qui est commun aux différents analogues du ChX77, mais ce composé n'inhibe pas la réplication du virus de la rougeole (CER0306737; Fig. 3). Un composé doté, comme le ChX77, d'un 3-

méthoxyphényle montre en revanche une bonne activité antivirale, même si celle-ci reste inférieure aux ChX77 (CER0306729; fig. 3). Nous avons également évalué l'activité antivirale de CER0306728, CER0306733 et CER0263854 qui sont tous constitués du groupe carboxamide partagé par tous les composés sélectionnés lors du criblage initial. L'activité antivirale de CER0306728 est équivalente à celle de CER0306729, ce qui suggère qu'un groupement carboxamide simple est insuffisant pour améliorer l'activité antivirale de la molécule. CER0306733 et CER0263854 sont en revanche beaucoup plus actifs et comparable au ChX77. Ces données montrent qu'un groupe carboxamide portant une amine secondaire contribue à l'activité du composé. En revanche, certains analogues chimiques avec une amine tertiaire sont significativement moins actifs (CER0306735). Enfin, l'analogue de CER0306728 sans l'amine en position 2 de la pyrimidine est inactif. Ceci est surprenant puisque plusieurs touches sélectionnées dans le crible initial étaient des diaminopyrimidines (Fig. 1). Ceci suggère qu'un groupe amino en position 2 est nécessaire pour lier la cible, sauf dans le cas où un quatrième cycle aromatique est présent dans la molécule (Fig. 1). L'ensemble de ces résultats nous ont ainsi permis de déterminer la structure active minimale pour cette série chimique.

Pour étudier le mode d'action de ces molécules, nous avons choisi CER0263854 (désigné sous le nom de ChX54 dans la suite de mon exposé) qui était équivalent à ChX77 en terme d'activité antivirale, mais présentait une structure plus simple et était disponible en grandes quantités. Tout d'abord, nous avons déterminé si ChX54 inhibe l'entrée du virus ou bien la réplication du virus dans les cellules infectées. ChX54 a été ajouté dans les puits de culture contenant des cellules HEK-293T, 3 heures avant, 3 heures après ou en même temps que l'infection par le VR et la réplication du virus a été déterminée 24 heures plus tard. Comme on le voit sur la Fig. 4, les résultats n'ont pas montré de différence significative entre les différentes conditions et démontrent ainsi que ChX54 ne bloque pas l'entrée du virus, mais plutôt interfère avec les dernières étapes du cycle de réplication du virus.

Par ailleurs, nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle ChX54 interfère avec la biosynthèse *de novo* de nucléosides dans les cellules (6, 7). Notamment l'acide mycophénolique et le bréquinar qui inhibent, respectivement, la DHODH dans la voie de biosynthèse des pyrimidines et l'IMPDH (inosine-5-monophosphate déshydrogénase), une enzyme impliquée dans la biosynthèse de GTP. Ces deux composés bloquent efficacement la réplication du virus de la rougeole dans des

cultures HEK-293T, et leur activité antivirale est inhibée lorsqu'on complémente le milieu de culture avec soit de la guanosine ou de l'uridine, respectivement (fig. 5A et B). En revanche, l'activité antivirale de ChX54 n'est pas affectée par l'addition d'uridine ou de la guanosine au milieu de culture, ce qui démontre que la DHODH ou l'IMPDH ne sont pas des cibles de ce composé. Par conséquent, le mode d'action du ChX54 est distinct de celui du brequinar et de l'acide mycophénolique, et les résultats suggèrent que la biosynthèse *de novo* des nucléosides n'est pas la cible de cette molécule.

En conclusion, nous avons ainsi caractérisé une nouvelle série de composés présentant une activité antivirale contre les virus à ARN très différents : MeV, CHIKV et virus CoxB3. À notre connaissance, cette famille chimique n'a jamais été décrite auparavant pour une activité biologique. Même si le mode d'action de ChX54 reste inconnu, et l'attribution d'une activité antivirale à large spectre à cette série chimique est originale.



Manuscrit N°1

**Identification of a small molecule that primes the type I interferon response
to cytosolic DNA**

Samira Khia¹, Marianne Lucas-Hourani¹, Sébastien Nisole², Nikaïa Smith³, Olivier Helync⁴, Maryline Bourguine⁵, Claude Ruffié¹, Jean-Philippe Herbeuval³, Hélène Munier-Lehmann⁴, Frédéric Tangy¹, Pierre-Olivier Vidalain³

¹ Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR3569, Paris, France

² Mécanismes d'action des interférons et voies bio-thérapeutiques, Université Paris Descartes, INSERM UMR-S1124, Paris, France

³ Chimie & Biologie, Modélisation et Immunologie pour la Thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR8601, Paris, France

⁴ Unité de chimie et biocatalyse, Institut Pasteur, CNRS UMR3523 Paris, France

⁵ Unité de Virologie Moléculaire et Vaccinologie, Institut Pasteur, Paris, France

Corresponding authors:

Pierre-Olivier Vidalain (pierre-olivier.vidalain@parisdescartes.fr)

Frédéric Tangy (ftangy@pasteur.fr)

ABSTRACT

The type I interferon response plays a pivotal role in host defense against infectious agents and tumors, and promising therapeutic approaches rely on small molecules designed to boost this system. To identify such compounds, we developed a high-throughput screening assay based on HEK-293 cells expressing luciferase under the control of Interferon-Stimulated Response Elements (ISRE). An original library of 10,000 synthetic compounds was screened, and we identified a series of 1H-benzimidazole-4-carboxamide compounds inducing the ISRE promoter sequence, specific cellular Interferon-Stimulated Genes (ISGs), and the phosphorylation of Interferon Regulatory Factor (IRF) 3. ISRE induction by ChX710, a prototypical member of this chemical series, was dependent on the adaptor MAVS and IRF1, but was IRF3 independent. Although it was unable to trigger type I IFN secretion *per se*, ChX710 efficiently primed cellular response to transfected plasmid DNA as assessed by potent synergistic effects on IFN- β secretion and ISG expression levels. This cellular response was dependent on STING, a key adaptor involved in the sensing of cytosolic DNA and immune activation by various pathogens, stress signals and tumorigenesis. Our results demonstrate that cellular response to cytosolic DNA can be boosted with a small molecule, and potential applications in antimicrobial and cancer therapies are discussed.

1 INTRODUCTION

2 Defense mechanisms against infectious agents and tumors critically rely on type I
3 interferon (IFN) response ¹. This system is based on the induction of both IFN- α/β cytokines
4 and Interferon-Stimulated Genes (ISGs), which both contribute to the activation of innate and
5 adaptive immunity ². Type I IFN response is triggered by the recognition of specific
6 Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) and Damage-Associated Molecular
7 Patterns (DAMPs). PAMPs correspond to a limited set of molecular structures, including
8 proteins, sugars, lipids or nucleic acids, which are specifically associated to infectious agents,
9 whereas DAMPs originate from injured or dead cells ³. Different classes of cellular receptors,
10 known as PRR for “Pattern Recognition Receptors”, are involved in the recognition of
11 PAMPs and DAMPs. Key PRRs involved in the induction of type I IFN response are toll-like
12 receptors 3, 7, 8 or 9 (TLR3/7/8/9), RIG-I like receptors (RLRs) that signal through the
13 adaptor MAVS, and cytosolic DNA sensors such as cGAS or IFI16 that signal by using
14 STING as a platform ^{4,5}. These different receptors essentially recognize nucleic acids with
15 unusual features or localization patterns such as 5'-triphosphate RNA molecules for RIG-I or
16 cytosolic DNA for the cGAS/STING signaling pathway. Once engaged by their ligands, they
17 activate Interferon Regulatory Factors (IRF3, IRF7 or IRF1) to induce the expression of type I
18 IFN cytokines (IFN- α and β) together with a first set of genes usually referred as early ISGs ¹.
19 Later on, secreted IFN- α/β bind to their membrane receptor at the surface of both IFN-
20 producing and neighboring cells to amplify the immune response. IFN- α/β binding to their
21 receptor activates STAT1 and STAT2 transcription factors and a second wave of ISGs to
22 further control the infection or eliminate tumor cells ⁶. It is estimated that human genome
23 contains hundreds of ISGs that, for example, interfere with virus replication, sensitize tumor
24 cells to apoptosis, or stimulate the adaptive immune response ^{1,2,7}. Deciphering the complex
25 mechanisms regulating the type I IFN response is essential to the development of innovative

1 therapies that stimulate the immune system against infections or tumors, without leading to
2 overactivation of this system which can be deleterious for the patient ⁸.

3 The quest for small compounds activating the type I interferon response is a field of
4 intense researches in academic laboratories and pharmaceutical companies ⁹⁻¹⁸, and some
5 molecules are already marketed or in advanced clinical trials ^{19,20}. Compounds from
6 imidazoquinoline family, such as resiquimod (R848) and imiquimod (R837), are well-known
7 inducers of the IFN response that bind TLR7, TLR8 or both ²¹. Pyrimidine and purine
8 derivatives have been also characterized as TLR7/8 ligands, and are currently in development.
9 More recently, it has been shown that 5,6-di-methylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA), 10-
10 carboxymethyl-9-acridanone (CMA), and flavone acetic acid (FAA), which have all been
11 known for many years to induce the type I IFN response in mice but not human, are specific
12 ligands of mouse STING ²²⁻²⁵. STING is a signaling protein that is activated by multiple
13 cytoplasmic proteins involved in DNA sensing, and was even proposed to bind DNA directly,
14 but is also a receptor for 2',3'-cGAMP, an endogenous cyclic dinucleotide produced by the
15 cellular enzyme cGAS in the presence of cytosolic DNA ⁴. DMXAA, CMA and FAA bind
16 specifically mouse STING in the 2',3'-cGAMP binding pocket, thus triggering IRF3
17 activation and the induction of ISGs. Based on these results, several research groups are
18 looking for small compounds capable of binding human STING ^{26,27}. Finally, compounds
19 directly binding the type I IFN receptor to induce ISGs were also reported ²⁸.

20 We previously described a high-throughput cellular assay that can be used to screen
21 chemical libraries, and identify molecules inducing ISGs ²⁹. This screening system is based on
22 a HEK-293 cell line expressing luciferase under control of five Interferon-Stimulated
23 Response Elements (ISRE). These regulatory elements are present in the promoters of all
24 ISGs to ensure gene activation upon STAT1/2 activation, but also contain binding sites for
25 IRF1/3/7, which are directly activated by PRRs. Luciferase activity is used as read-out to

1 select molecules that induce ISGs. Since HEK-293 cells do not express significant levels of
2 TLR3, 7, 8 or 9³⁰, this assay essentially selects for ligands of type I IFN receptors, activators
3 of STING or RLR pathways, or yet unidentified pathways. For example, we previously
4 identified with this assay different compound families targeting *de novo* pyrimidine
5 biosynthesis through inhibition of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), the fourth
6 enzyme of this metabolic pathway²⁹. This led us to establish for the first time a functional
7 link between the interferon response and the cellular stress induced by depleting pools of
8 pyrimidines.

9 To capture new immunostimulatory molecules with a different mode of action, we
10 screened an original chemical library of 10,000 compounds using the ISRE-luciferase reporter
11 system described above. This allowed the identification of an original molecule amplifying
12 the type I IFN response to transfected DNA along a STING-dependent pathway. Altogether,
13 these results demonstrate that type I IFN response to exogenous DNA can be boosted with a
14 small molecule, which should help the development of novel treatments based on
15 manipulations of the immune response against infections and tumors.

16 17 **RESULTS**

18 **ChX67779 is an activator of the ISRE promoter sequence.**

19 To identify compounds that stimulate the expression of ISGs, a library of 10,000
20 chemically diverse molecules was screened with a high-throughput cellular assay based on
21 HEK-293 cells expressing luciferase under control of five ISRE copies (STING-37 reporter
22 cell line; see Materials and Methods for details). Cells were cultured in the presence of tested
23 compounds at a final concentration of 20 μ M, and luciferase activity was revealed by addition
24 of a commercial luciferin-based reagent after 24 hours of stimulation. In positive control
25 wells of each screening plate, an average 77-fold induction of the luciferase signal was

1 observed in the presence of recombinant IFN- β . Of the 10,000 molecules tested, only two
2 related 1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives scored positive with >3-fold inductions
3 of the ISRE-luciferase reporter gene: ChX0275199 and ChX67779, which is more active and
4 was selected for further characterizations (Supplementary Table S1; top rows). We first
5 determined if this activity was linked to the inhibition of DHODH, since others and we
6 previously reported that compounds targeting this enzyme activate the ISRE promoter
7 sequences^{29,31-33}. When culture medium was supplemented with uridine to reverse-
8 complement for the inhibition of DHODH, ISRE-luciferase induction by ChX67779 was
9 maintained (data not shown), thus excluding that ChX67779 targets this enzyme. We then
10 decided to further characterize biological properties of ChX67779 as an original activator of
11 ISRE sequences.

12 First, ChX67779 was retested for the induction of the ISRE-luciferase reporter gene in
13 a dose-response experiment. As shown in Figure 1A, a 10-fold induction peak was observed
14 at 50 μ M, but luciferase activity declined at 100 μ M, suggesting some toxicity of the
15 molecule and the collapse of cellular functions at highest concentrations. Viability of
16 ChX67779-treated cells was determined after 24 or 48 hours of treatment by quantifying ATP
17 in culture wells, which reflects the metabolic activity of the cells (Fig. 1B). ChX67779
18 treatment decreased cellular ATP levels in culture wells in dose-dependent manner, thus
19 demonstrating the significant toxicity of this molecule. Alteration of cellular viability in
20 cultures was also confirmed by bright-field microscopy (data not shown). In a kinetic
21 experiment, we found that ISRE-luciferase induction by ChX67779 occurred at relatively late
22 time-points, between 8 and 16 hours of treatment (Fig. 1C). Most importantly, we tested if
23 ChX67779 activity was specific of the ISRE promoter sequence by transient transfection of
24 HEK-293T cells with either ISRE-luciferase or NF- κ B-luciferase reporter constructs. As
25 shown in Figure 1D, ChX67779 only induced the ISRE-luciferase reporter gene, but not the

1 NF- κ B-luciferase reporter gene, which was specifically activated by recombinant TNF- α .
2 Interestingly, ISRE-luciferase induction by ChX67779 was much more pronounced in
3 transiently transfected cells compared to stable cell line (compare Fig. 1A and 1D).
4 Altogether, our results demonstrate that ChX67779 specifically stimulates ISRE promoter
5 sequences but also exhibits some significant cellular toxicity.

6

7 **Induction of ISGs by ChX67779 in different cell lines.**

8 We then determined if ChX67779 could not only induce the ISRE-luciferase reporter
9 gene but also cellular ISGs. Different cell types, including HEK-293T (embryonic kidney
10 epithelial cells; human), A549 (lung epithelial adenocarcinoma; human), MRC5 (lung
11 fibroblasts; human) and Vero cells (kidney epithelial cells; African green monkey) were
12 treated with ChX67779 at 50 μ M for 24 hours, and expression levels of a panel of 11 well-
13 characterized ISGs were determined by RT-qPCR. As shown in Figure 2A, ChX67779
14 induced some ISGs in HEK-293T cells, in particular IFI27 and IFI6, while others were not
15 activated. Similar results were obtained in A549 cells. In contrast, the induction profile was
16 very different in Vero cells where ISG15 and Mx1 were essentially induced, whereas
17 ChX67779 treatment had no effect on tested ISGs in MRC5 cells. These results confirmed
18 ChX67779 capacity to specifically induce some ISGs with a profile that clearly depends on
19 the cell type considered. A kinetic analysis of IFI27 expression levels confirmed that
20 ChX67779 induced ISGs between 8 and 16 hours post-treatment (Fig. 2B), in agreement with
21 results obtained with the ISRE-luciferase reporter gene (Fig. 1C). We also compared
22 ChX67779 to recombinant IFN- β with respect to its capacity to stimulate ISGs. As shown in
23 Figure 2C, IFN- β induced the expression of all tested ISGs much more efficiently than
24 ChX67779, and without any detectable cytotoxicity. Altogether, these results confirm

ChX67779's capacity to induce some ISGs but by comparison with IFN- β , suggest that a signaling pathway different from the canonical JAK/STAT cascade is engaged.

Establishing structure/activity relationships with chemical analogs of ChX67779.

To demonstrate that ChX67779 biological activity is linked to its chemical structure (Fig. 3A), we analyzed a set of 50 analogs that were commercially available, and determined structure/activity relationships. We first tested numerous substitutions on the carboxamide group. A compound in which the carboxamide was replaced by a carboxylic acid was totally inactive (CID11207170, referred as CID70), supporting the key role played by this part of the molecule (Fig. 3A). Interestingly, this inactive compound showed a very limited impact on cellular viability (Supplementary Fig. S1A), further supporting a link between the induction of ISGs by ChX67779 and its cellular toxicity. Then, we tested substitutions of the aminoethylpiperidine group of ChX67779 by various amines (Supplementary Table S1). Most of them were totally inactive, except few analogs including ChX0275199 that was a hit in the initial screen. Interestingly, ChX0306710 (referred as ChX710) was significantly more active than ChX67779 with a peak of induction at 25 μ M (Fig. 3A). In contrast, the activity was lost when replacing the pyridine group by phenol or dimethylaniline groups (Supplementary Table S2), thus demonstrating the importance of this group. Finally, we confirmed that the most active analog identified (ChX710) also induced some ISGs as assessed by measuring the induction of IFI27 and IFI6 in HEK-293T treated with this molecule (Fig. 3B and C). We thus decided to further investigate the signaling pathways involved using ChX710 as a prototype of this chemical series.

ISRE induction by ChX710 depends on MAVS and IRF1.

1 First, we determined whether type I interferons (IFN- α/β) are involved in the
2 activation of the ISRE regulatory sequence by ChX710. To address this question, ISRE-
3 luciferase reporter cells were incubated with ChX710 in the presence of antagonist antibodies
4 blocking the interaction of IFN- α/β with their cognate receptor IFNAR1/IFNAR2c. Antibody
5 concentrations we used were sufficient to block up to 500 IU/ml of IFN- α or β . Nevertheless,
6 no impact on ISRE-luciferase induction by ChX710 was detected (Fig. 4A). Furthermore, we
7 showed by RT-qPCR that Chx710-treatment does not significantly induce IFN- α , IFN- β ,
8 IFN- γ or IFN- λ mRNA transcripts (see below; Fig. 7A). Thus, ISRE-luciferase activation by
9 ChX710 is independent of some autocrine/paracrine loop involving IFN- α/β . We also
10 evaluated the role of STAT1 and STAT2, which are activated downstream of IFN- α/β
11 receptor to induce ISGs. First, we suppressed STAT1 or STAT2 expression by siRNA, and
12 stimulated ISRE-luciferase reporter cells with ChX710. As shown in Figure 4B, ISRE-
13 luciferase induction was unaffected by the silencing of STAT1, STAT2 or STAT1+STAT2,
14 despite some efficient suppression of STAT1 and STAT2 expression as assessed by western-
15 blot analysis (Supplementary Fig. S2A). As a control, we showed that STAT2 silencing
16 efficiently inhibited ISRE-luciferase induction by recombinant IFN- β (Supplementary Fig.
17 S2B), whereas STAT1 was clearly facultative, in agreement with previous reports ³⁴.
18 Altogether, our results demonstrate that ISRE activation by ChX710 is independent of STAT1
19 and STAT2.

20 This suggested some direct activation of the ISRE promoter by intrinsic pathways,
21 possibly involving MAVS or STING signaling pathways together with downstream IRF
22 transcription factors. To test this, we first suppressed MAVS or STING expression by siRNA
23 and stimulated ISRE-luciferase reporter cells with ChX710. As shown in Figure 5A, ISRE-
24 luciferase induction was suppressed by MAVS silencing, thus involving this adaptor protein
25 in the signaling cascade activated by ChX710. Compared to MAVS, STING silencing only

1 had a modest, although statistically significant, effect on ISRE induction by ChX710 (Fig.
2 5B). We controlled that MAVS or STING were efficiently silenced, since ISRE-luciferase
3 inductions by short synthetic 5-triphosphate RNA molecules (ssRNA) or cGAMP, were
4 inhibited (Supplementary Fig. S3A and B). We then determined the role of IRF1 and IRF3,
5 two transcription factors involved in the induction of ISGs and interferon genes ¹. In HEK-
6 293 cells, we have previously shown that IRF1 is essential to ISRE-luciferase activation by
7 ssRNA ²⁹, but that IRF3 is dispensable (Supplementary Fig. S3C). In contrast, IRF3 is
8 necessary for the induction of IFN- β promoter by ssRNA (Supplementary Fig. S3D), thus
9 defining two different pathways downstream of MAVS that regulate ISGs and interferon
10 genes (Supplementary Fig. S3E) ²⁹. As shown in Figure 5C, IRF1 silencing impaired ISRE
11 activation by ChX710, whereas IRF3 suppression had no significant effect (Fig. 5D).
12 Nevertheless, ChX710 induced IRF3 phosphorylation in HEK-293T and A549 cells (Fig. 5E),
13 but this was insufficient to trigger IFN- β expression as previously shown. Altogether, our
14 results demonstrate that a MAVS/IRF1 signaling axis is required for ISRE induction by
15 ChX710, and that IRF3 phosphorylation is induced (Fig. 5F).

17 **ChX710 primes the interferon response to foreign DNA**

18 Although ChX710 efficiently induced IRF3 phosphorylation and the ISRE-luciferase
19 reporter gene, its capacity to stimulate ISGs is rather limited (Fig. 7A). We thus determined
20 whether ChX710 could boost the expression of ISGs upon stimulation with suboptimal
21 concentrations of recombinant IFN- α , short synthetic 5'-triphosphate RNA molecules
22 (ssRNA) or plasmid DNA transfection. As shown in Supplementary Figure S4, ChX710 had
23 very limited or no effect on ISRE-luciferase induction by recombinant IFN- α or ssRNA,
24 respectively, but rather suppressed luciferase activity when applied at 25 μ M, a phenomenon
25 that is probably linked to the stress response and cytotoxicity associated to this compound.

1 However, ChX710 at 6 μ M strongly boosted the cellular response to plasmid DNA
2 transfection as assessed by ISRE-luciferase induction (Fig. 6A). Compared to ChX710, the
3 inactive analog CID70 showed no effect on cellular response to plasmid DNA, supporting the
4 specificity of our observation (Fig. 6B). When reporter cells were transfected with low doses
5 of different plasmids exhibiting various DNA sequences, ChX710 amplified cellular response
6 in all cases (Fig. 6C, D, and E). This suggested some unique capacity of ChX710 to amplify
7 cellular response to foreign DNA.

8 To further document this observation, we studied a panel of ISGs in HEK-293 cells
9 transfected with plasmid DNA and stimulated with 6 or 25 μ M of ChX710 for 24 h (Fig. 7A).
10 First, we confirmed the modest induction of specific ISGs by ChX710 alone. DNA
11 transfection alone was also a poor inducer of ISGs, although a significant expression of
12 specific genes such as IFIT1, IFIT2 or ISG15 was detectable at highest concentrations of
13 plasmid (75 ng/well). In agreement with previous results obtained with the ISRE-luciferase
14 reporter gene, a strong synergistic effect was observed when DNA transfection was combined
15 with ChX710 treatment, a phenomenon restricted to early ISGs and IFN- β . For example, a
16 14-fold induction of IFIT2 gene was observed when cells were transfected with 75 ng/well of
17 plasmid DNA alone, but a 239-fold induction was detected when ChX710 was added at only
18 6 μ M (Fig. 7A). Quite similarly, ChX710 alone did not induce IFN- β promoter, and the
19 induction observed with 75 ng/well of plasmid DNA was barely detectable in our culture
20 conditions. In contrast, a 42-fold induction was observed when both signals were combined
21 (Fig. 7A and B).

22 We then determined if this synergism could be confirmed at a protein level by testing
23 culture supernatants for the presence of type I interferon activity. Cells were transfected with
24 plasmid DNA and stimulated with ChX710, and then incubated for 48 hours to allow IFN
25 accumulation in culture medium. Supernatants were recovered and tested for the presence of

1 IFN- β by ELISA (Fig. 7C), or diluted twice and applied to fresh ISRE-luciferase reporter
2 cells for the detection of interferon activity. As shown in Figure 7C, high levels of IFN- β
3 were detected in culture supernatants when cells were transfected with plasmid DNA and co-
4 treated with ChX710. The corresponding interferon activity was also detected in culture
5 supernatants when applied to ISRE-luciferase reporter cells (Fig. 7D). Detected interferon
6 activity was comparable to >100 IU/ml of recombinant IFN- β , thus demonstrating high levels
7 of interferon secretion. We noticed that ChX710 at 25 μ M did not perform much better than a
8 lower concentration of 6 μ M despite stronger synergistic effects on IFN- β mRNA levels (Fig.
9 7A and B). This probably relates to the significant cellular cytotoxicity and stress associated
10 to 25 μ M of ChX710.

12 **Synergistic ISRE activation by plasmid DNA and ChX710 is STING dependent.**

13 Cellular adaptor STING is known for its critical role in cytosolic DNA sensing and
14 subsequent induction of innate immunity in many systems. To investigate the role of STING
15 in the cellular response to concomitant plasmid DNA transfection and ChX710 treatment,
16 expression of this protein was inhibited by siRNA. ISRE-luciferase reporter cells were
17 transfected with STING-specific siRNA then transfected after 48 h with plasmid DNA and
18 treated or not with ChX710. As assessed by luciferase expression levels, ISRE induction by
19 DNA transfection alone was STING dependent in agreement with previous reports (Fig. 8).
20 When cells were both transfected with DNA and treated with ChX710, ISRE induction was
21 deeply inhibited by STING depletion (Fig. 8). These results demonstrated that ChX710
22 primes DNA sensing and the interferon response along a signaling cascade that relies on the
23 adaptor protein STING.

DISCUSSION

Thanks to the functional screening of a chemical library, we have identified ChX710 from a series of 1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives that boost the type I IFN response and cellular sensing of transfected DNA. This compound activates the ISRE promoter sequence through a signaling axis involving MAVS and IRF1, and its immunostimulatory properties were confirmed by showing some modest but significant induction of specific ISGs. We also observed IRF3 phosphorylation at Ser386 in ChX710-treated cells. However, levels of IRF3 phosphorylation or phosphorylated residues were probably inadequate to significantly induce IFN- β expression in a context where NF- κ B also remained inactive (Fig. 1C), thus precluding the assembly of a complete IFN- β enhanceosome. Nevertheless, ChX710 treatment was found to efficiently prime the cellular response to DNA transfection *via* STING as assessed by strong synergistic effects on IFN- β expression at both transcriptional and protein levels. This finding strongly supports the emerging idea that the type I IFN response to nucleic acids can be boosted using *ad hoc* molecules, opening new perspectives in anti-infectious and cancer therapies.

The mode of action of ChX710 remains undetermined and multiple hypotheses could explain its biological properties. Nevertheless, and to our knowledge, it is the first time that a biological activity is associated to the ISRE-inducing chemical series enlisted in Supplementary Table S1. However, some 1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives are well-characterized inhibitors of Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP), a nuclear enzyme family essentially involved in the detection and signal of single-strand DNA damages to the DNA repair machinery³⁵. Other compounds structurally related to ChX710 chemical series were also reported for their antiviral activity against enteroviruses, but their mode of action is unknown³⁶. Future investigations are required to explore potential links between these different observations. Another lead that could help decipher the mode of action of ChX710

comes from the MAVS/IRF1 signaling axis that is involved in ISRE-luciferase activation by this molecule. Indeed, the same factors have been involved in the sensing of viruses by RIG-like receptors at the membrane of peroxisomes ³⁷. Peroxisomes are cytoplasmic organelles delimited by a membrane bilayer that use O₂ to oxidize a variety of molecules, including toxic molecules for neutralization, and produce H₂O₂ that is further used by catalases for oxidation. In addition, they were recently characterized as a signaling platform critically involved in activation of the interferon response. Finally, it has been recently shown that UV light or chemical carcinogens such as benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide or N-acetyoxy-2-acetylaminofluorene prime the cellular response to cytosolic DNA ³⁸. This cellular response involves the activation of caspases as a consequence of DNA damages, and subsequent degradation of the AMBRA1/ULK1 complex. Since this complex is involved in the negative regulation of STING, its degradation enhances the interferon response to cytosolic DNA. In contrast, cellular response to 5'-triphosphate RNA is not increased, which parallels our observations. It is thus possible that ChX710 downregulates the expression of STING inhibitors such as the AMBRA1/ULK1 complex, which would account for an amplified interferon response to cytosolic DNA.

Cytosolic DNA sensing is playing an important role in the immune response to DNA viruses and intracellular bacteria, but also against tumor cells ^{4,5}. Indeed, DNA damages and rapid cellular cycling are associated to the leakage of DNA replication byproducts from the nucleus to the cytoplasm, which can then prime the STING signaling cascade ³⁹. In some cases, mitochondrial stress can also lead to STING activation by mitochondrial DNA release in the cytosol ⁴⁰. Therefore, drugs that enhance the cellular response to cytosolic DNA could be of great interest in the treatment of various infections and cancer therapy. Indeed, this could boost the immune response by increasing type I IFN secretion, and sensitizing infected or tumor cell to apoptosis. In cancer treatment, enhancers of cytosolic DNA sensing could be

1 combined with existing chemotherapies inducing DNA damages to block cellular
2 proliferation such as cisplatin or etoposide. Further investigations are needed to determine if
3 ChX710 is a potential lead molecule for these applications, although the intrinsic cytotoxicity
4 of this molecule should be taken into account. But more importantly at this point, our work is
5 supporting the idea that cytosolic DNA sensing can be chemically enhanced and in the near
6 future, we would like to use ChX710 as a molecular probe to identify the signaling pathways
7 involved.

8

METHODS

Chemical library and compounds

All compounds were purchased from CHEM-X-INFINITY (Romainville; www.chem-x-infinity.com). The initial compound collection amounts to a total of 10,000 molecules arrayed in 125 96-well microplates. Twenty-three chemical families are represented in this library, and compounds have molecular weights ranging from 250 to 550 g/mol. All compounds were stored in DMSO at -20°C at 10 mM. Following the screen of this library, selected hits and derivatives were obtained from CHEM-X-INFINITY. As assessed by the manufacturer, purity levels were >90% for all compounds, whereas ChX67779 and ChX710 were pure at 99% and 98%, respectively.

Cell lines, culture medium and luciferase assays

All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin, and streptomycin at 37°C and 5% CO₂. A549, MRC5 and Vero cells were from ATCC. The reporter cell line “STING-37” was previously described²⁹. Briefly, the ISRE-luciferase reporter gene was amplified by PCR from pISRE-luciferase plasmid (Stratagene, Ref 219089), and inserted in a vector with a G418-resistance gene. This new plasmid was transfected in HEK-293 cells from ATCC, amplified in culture medium supplemented with G418 at 500 µg/ml, and cloned by serial dilution. A total of 44 individual clones were screened, and STING-37 clone was selected for the optimal luciferase induction detected upon stimulation with recombinant IFN-β.

Cellular viability was determined by quantification of adenosine triphosphate (ATP) in culture wells using the CellTiter-Glo Assay (Promega) following manufacturer's recommendations. Luciferase induction in “STING-37” cells was determined by addition of

50 µl/well of Bright-GLO reagent (Promega) or Britelite plus reagent (PerkinElmer), and measured during 0.1 s with a luminometer (Enspire; PerkinElmer).

Screening procedure

The screening procedure was performed as following with a TECAN Freedom EVO platform. Compounds from mother plates were diluted in DMSO at 2 mM to obtain intermediate dilution plates. Then, compounds were transferred into white, flat bottom, bar-coded tissue culture 96-wells plates (Greiner Bio One): 1 µl of a DMSO solution was spiked into dry wells of daughter plates (80 compounds per plate). For each plate, columns 1 and 12 were dedicated to controls: culture wells were alternatively spiked with 1 µl of DMSO alone (negative control) or supplemented with recombinant IFN-β so that final concentration equals 1,000 IU/ml (positive control). Finally, 100 µl of a STING-37 cell suspension at $4 \cdot 10^5$ cells/ml was added to each well of the microplate already containing one chemical compound (final concentration was 20 µM). After 24 hours of incubation at 37°C in the presence of 5% CO₂, the firefly luciferase substrate (Bright-Glo, Promega) was added directly into the wells (50 µl) and luciferase activity was measured 6 minutes later on a Infinite® M1000 Pro (TECAN) using a 0.1 s integration time. For each plate, means of luminescence and corresponding standard deviations were calculated for positive and negative controls (μ^+ , σ^+ , μ^- , and σ^- , respectively) to determine the signal-to-background ratio ($S/B = \mu^+/\mu^-$) and the Z'-factor ($Z'\text{-factor} = 1 - 3 \cdot (\sigma^+ + \sigma^-) / (\mu^+ - \mu^-)$). Average Z'-factor was determined to be 0.85 ± 0.064 (no value below 0.62) and signal-to-background (S/B) ratio, which corresponds to luciferase signal in the presence of recombinant IFN-β relative to DMSO alone, was on average average 77 ± 24 for all plates, and always > 26 . Altogether, this demonstrated the robustness of our assay, which can be categorized as excellent⁴¹. For each compound, the induction factor was

1 calculated as the ratio of luminescence signal measured in the corresponding well to the mean
2 of luminescence for negative controls in the same plate.

3 4 ***Reagents and plasmids***

5 The pISRE-Luc and pNF- κ B-Luc reporter plasmids were from Stratagene (Ref
6 219089 and 219078, respectively). Recombinant IFN- β was from PBL Assay Science (Ref
7 11410-2). Recombinant TNF- α was from R&D Systems (Ref 210-TA). Short synthetic 5'-
8 triphosphate RNA molecules (ssRNA) were synthesized from pCI-neo vector digested with
9 XbaI using T7 RiboMAX Express large scale RNA production system (Promega), and then
10 purified with a filtering membrane (Millipore). Sheep polyclonal antibodies against IFN- α
11 (31100-1) and IFN- β (31400-1) were from PBL Assay Science. The VeriKine Human IFN- β
12 ELISA kit was from PBL Assay Science. DNA or RNA transfections were performed with
13 JetPrime PEI following manufacturer's recommendations (Polyplus transfection). The
14 following plasmids were transfected to activate ISRE promoter sequences: pCiNeo-3xFlag-
15 GW, pTK-Renilla (Promega), pDONR207 (ThermoFisher).

16 17 ***Quantitative RT-PCR analysis***

18 Cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well), treated the same day with
19 ChX67779 or ChX0306710 (ChX710), and transfected with plasmid DNA when specified
20 using JetPrime reagent. One day later, cells were recovered in PBS and total RNA isolated
21 with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Following elution,
22 RNA yields were evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies).
23 Samples were analyzed by capillary electrophoresis (Agilent) to verify the absence of RNA
24 degradation.

1 To measure transcription levels of the 11 ISGs presented in Figure 2A, a two-step
2 qRT-PCR (Taqman technology, Applied Biosystems) was performed using commercial
3 primers from ThermoFisher Scientific: *IFI27* (Hs00271467_m1), *IFI35* (Hs00413458_m1),
4 *IFI44* (Hs00197427_m1), *IFI6* (Hs00242571_m1), *IFIH1* (Hs01070332_m1), *IFIT1*
5 (Hs01911452_s1), *IFIT3* (Hs01922752_s1), *IFITM1* (Hs00705137_s1), *ISG15*
6 (Hs01921425_s1) and *MX1* (Hs00895608_m1). Expression levels of four housekeeping
7 genes, including *18S* (Hs99999901_s1), *GAPDH* (Hs99999905_m1), *GUSB*
8 (Hs99999908_m1), and *HPRT1* (Hs99999909_m1), were also determined and used as
9 internal reference controls. Starting from 1 µg of total RNA, cDNA synthesis was achieved in
10 20 µL using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit following manufacturer's
11 recommendations (Life Technologies). Quantitative PCR reactions were performed on 0.6 µL
12 of cDNA synthesis reaction mix using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied
13 Biosystems) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR machine (Applied Biosystems). Transcripts
14 were quantified using the following program : 20 s at 95°C followed by 40 cycles of 1 s at
15 95°C and 20 sec at 60°C. Results were normalized using expression levels of the four
16 housekeeping genes.

17 Transcription levels of type I IFN genes and ISGs presented in Figure 7 were
18 determined by RT-qPCR using the following protocol. RNA samples were converted to
19 cDNA with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).
20 Real-time PCR reactions were performed in duplicates using Takyon ROX SYBR MasterMix
21 blue dTTP (Eurogentec) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
22 Transcripts were quantified using the following program: 3 min at 95°C followed by 35
23 cycles of 15 s at 95°C, 25 s at 60°C and 25 s at 72°C. Values for each transcript were
24 normalized to expression levels of RPL13A (60S ribosomal protein L13a) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method. Primers used for quantification of transcripts by real time quantitative PCR are indicated in Supplementary Table S3.

siRNA procedure

Silencer Select siRNA were purchased from Invitrogen, and transfected in STING-37 cells following manufacturer's recommendations. Gene silencing was achieved with pools of two siRNA for STAT1 (s278/s277), STAT2 (s13530/s13529), MAVS (s33178/s33180), STING (s50646/s226307), IRF1 (s7502/s7503), IRF3 (s7507/s7509), whereas controls correspond to a pool of two siRNA directed against IRF5 (s7513 and s7515). In each well of a 96-well plate, 3 pmol of siRNA were mixed with 20 μ L of Opti-MEM (Gibco-Invitrogen) and 0.25 μ L of Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen). This mix was incubated for 10 minutes at room temperature, and supplemented with 80 μ L of DMEM + 10% FCS without penicillin and streptomycin and 15,000 STING-37 cells. Cells were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO₂, and then stimulated with ChX710 or recombinant IFN- β , or transfected with ssRNA or plasmid DNA using JetPrime reagent. After 24 hours of culture, firefly luciferase activity was determined.

Western blot analysis

Briefly, 2x10⁵ HEK-293T or A549 cells were dispensed in each well of a 24-well plate with ChX710 or DMSO alone. After 24 hours of culture, cells were washed in PBS and resuspended in RIPA lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 50 mM NaF) supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). After incubation on ice for 20 min, cell lysates were clarified by centrifugation at 14,000 $\times$ g for 10 min. Protein extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4–12% NuPAGE Bis-Tris gels

1 with MOPS running buffer (ThermoFisher), and transferred to a nitrocellulose membrane.
2 Proteins were detected using standard immunoblotting techniques using the following
3 primary antibodies: anti-IRF1 rabbit monoclonal antibody was from Cell Signaling (Clone
4 D5E4; Ref. 8478S), anti-IRF3 rabbit monoclonal antibody was from Cell Signaling (Clone
5 D6I4C; Ref. 11904), anti-P-IRF3 (Ser386) rabbit polyclonal antibody was from Millipore
6 (ABE501), anti-STAT1 mouse monoclonal antibody was from Cell Signaling (Clone 9H2;
7 Ref. 9176), anti-STAT2 rabbit polyclonal antibody was from Cell Signaling (Ref. 4594), and
8 anti- β -Actin mouse monoclonal antibody was from Sigma-Aldrich (Clone AC-15; Ref.
9 A5441). Secondary anti-mouse and anti-rabbit HRP-conjugated antibodies were from GE-
10 Healthcare. Protein detection was performed using the SuperSignal West Pico
11 Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific).

12

1 REFERENCES

- 2 1 Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a
3 complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* **32**, 513-545, doi:10.1146/annurev-
4 immunol-032713-120231 (2014).
- 5 2 Gonzalez-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions
6 of type I interferons. *Nat Rev Immunol* **12**, 125-135, doi:10.1038/nri3133 (2012).
- 7 3 Venereau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life.
8 *Front Immunol* **6**, 422, doi:10.3389/fimmu.2015.00422 (2015).
- 9 4 Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids.
10 *Annu Rev Immunol* **32**, 461-488, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120156
11 (2014).
- 12 5 Roers, A., Hiller, B. & Hornung, V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the
13 Innate Immune System. *Immunity* **44**, 739-754, doi:10.1016/j.immuni.2016.04.002
14 (2016).
- 15 6 Stark, G. R. & Darnell, J. E., Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* **36**,
16 503-514, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.013 (2012).
- 17 7 Cheon, H., Borden, E. C. & Stark, G. R. Interferons and their stimulated genes in the
18 tumor microenvironment. *Semin Oncol* **41**, 156-173,
19 doi:10.1053/j.seminoncol.2014.02.002 (2014).
- 20 8 Lee-Kirsch, M. A., Wolf, C., Kretschmer, S. & Roers, A. Type I interferonopathies--
21 an expanding disease spectrum of immunodysregulation. *Semin Immunopathol* **37**,
22 349-357, doi:10.1007/s00281-015-0500-x (2015).
- 23 9 Tai, Z. F., Zhang, G. L. & Wang, F. Identification of small molecule activators of the
24 janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway using a cell-
25 based screen. *Biol Pharm Bull* **35**, 65-71 (2012).
- 26 10 Lin, C. W. *et al.* Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity
27 against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int J Antimicrob Agents* **32**,
28 355-359, doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.04.018 (2008).
- 29 11 Harvey, R. *et al.* GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity.
30 *Antiviral Res* **82**, 1-11, doi:10.1016/j.antiviral.2008.12.015 (2009).
- 31 12 Bedard, K. M. *et al.* Isoflavone agonists of IRF-3 dependent signaling have antiviral
32 activity against RNA viruses. *J Virol* **86**, 7334-7344, doi:10.1128/JVI.06867-11
33 (2012).
- 34 13 Pattabhi, S. *et al.* Targeting Innate Immunity for Antiviral Therapy through Small
35 Molecule Agonists of the RLR Pathway. *J Virol* **90**, 2372-2387,
36 doi:10.1128/JVI.02202-15 (2015).
- 37 14 Martinez-Gil, L. *et al.* Identification of small molecules with type I interferon
38 inducing properties by high-throughput screening. *PLoS One* **7**, e49049,
39 doi:10.1371/journal.pone.0049049 (2012).
- 40 15 Patel, D. A., Patel, A. C., Nolan, W. C., Zhang, Y. & Holtzman, M. J. High
41 throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling
42 pathway to drive next-generation antiviral drug discovery. *PLoS One* **7**, e36594,
43 doi:10.1371/journal.pone.0036594 (2012).
- 44 16 Guo, F. *et al.* RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral
45 response. *PLoS One* **7**, e42583, doi:10.1371/journal.pone.0042583 (2012).
- 46 17 Yan, D. *et al.* Dual myxovirus screen identifies a small-molecule agonist of the host
47 antiviral response. *J Virol* **87**, 11076-11087, doi:10.1128/JVI.01425-13 (2013).

1 18 Sali, T. M. *et al.* Characterization of a Novel Human-Specific STING Agonist that
2 Elicits Antiviral Activity Against Emerging Alphaviruses. *PLoS Pathog* **11**,
3 e1005324, doi:10.1371/journal.ppat.1005324 (2015).

4 19 Es-Saad, S., Tremblay, N., Baril, M. & Lamarre, D. Regulators of innate immunity as
5 novel targets for panviral therapeutics. *Curr Opin Virol* **2**, 622-628,
6 doi:10.1016/j.coviro.2012.08.009 (2012).

7 20 Khiar, S., Pietrancosta, N. & Vidalain, P. O. [Stimulating Type I interferon response
8 with small molecules: revival of an old idea]. *Biol Aujourd'hui* **209**, 145-159,
9 doi:10.1051/jbio/2015015 (2015).

10 21 Horscroft, N. J., Pryde, D. C. & Bright, H. Antiviral applications of Toll-like receptor
11 agonists. *J Antimicrob Chemother* **67**, 789-801, doi:10.1093/jac/dkr588 (2012).

12 22 Prantner, D. *et al.* 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates
13 stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is
14 regulated by mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* **287**, 39776-39788,
15 doi:10.1074/jbc.M112.382986 (2012).

16 23 Cavlar, T., Deimling, T., Ablasser, A., Hopfner, K. P. & Hornung, V. Species-specific
17 detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J* **32**,
18 1440-1450, doi:10.1038/emboj.2013.86 (2013).

19 24 Kim, S. *et al.* Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists. *ACS Chem*
20 *Biol* **8**, 1396-1401, doi:10.1021/cb400264n (2013).

21 25 Conlon, J. *et al.* Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the
22 vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *J Immunol* **190**,
23 5216-5225, doi:10.4049/jimmunol.1300097 (2013).

24 26 Tijono, S. M. *et al.* Identification of human-selective analogues of the vascular-
25 disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Br J Cancer* **108**,
26 1306-1315, doi:10.1038/bjc.2013.101 (2013).

27 27 Li, L. *et al.* Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable
28 analogs. *Nat Chem Biol* **10**, 1043-1048, doi:10.1038/nchembio.1661 (2014).

29 28 Konishi, H. *et al.* An orally available, small-molecule interferon inhibits viral
30 replication. *Sci Rep* **2**, 259, doi:10.1038/srep00259 (2012).

31 29 Lucas-Hourani, M. *et al.* Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses
32 viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog* **9**, e1003678,
33 doi:10.1371/journal.ppat.1003678 (2013).

34 30 Hornung, V. *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular
35 subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG
36 oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537 (2002).

37 31 Chung, D. H. *et al.* Discovery of a broad-spectrum antiviral compound that inhibits
38 pyrimidine biosynthesis and establishes a type 1 interferon-independent antiviral state.
39 *Antimicrob Agents Chemother*, doi:10.1128/AAC.00282-16 (2016).

40 32 Yeo, K. L. *et al.* Synergistic suppression of dengue virus replication using a
41 combination of nucleoside analogs and nucleoside synthesis inhibitors. *Antimicrob*
42 *Agents Chemother* **59**, 2086-2093, doi:10.1128/AAC.04779-14 (2015).

43 33 Deans, R. M. *et al.* Parallel shRNA and CRISPR-Cas9 screens enable antiviral drug
44 target identification. *Nat Chem Biol* **12**, 361-366, doi:10.1038/nchembio.2050 (2016).

45 34 Blaszczyk, K. *et al.* STAT2/IRF9 directs a prolonged ISGF3-like transcriptional
46 response and antiviral activity in the absence of STAT1. *Biochem J* **466**, 511-524,
47 doi:10.1042/BJ20140644 (2015).

48 35 Tong, Y. *et al.* Synthesis and evaluation of a new generation of orally efficacious
49 benzimidazole-based poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors as
50 anticancer agents. *J Med Chem* **52**, 6803-6813, doi:10.1021/jm900697r (2009).

- 1 36 Xue, F., Luo, X., Ye, C., Ye, W. & Wang, Y. Inhibitory properties of 2-substituent-
2 1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives against enteroviruses. *Bioorg Med*
3 *Chem* **19**, 2641-2649, doi:10.1016/j.bmc.2011.03.007 (2011).
- 4 37 Dixit, E. *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*
5 **141**, 668-681, doi:10.1016/j.cell.2010.04.018 (2010).
- 6 38 Kemp, M. G., Lindsey-Boltz, L. A. & Sancar, A. UV Light Potentiates STING
7 (Stimulator of Interferon Genes)-dependent Innate Immune Signaling through
8 Deregulation of ULK1 (Unc51-like Kinase 1). *J Biol Chem* **290**, 12184-12194,
9 doi:10.1074/jbc.M115.649301 (2015).
- 10 39 Hartlova, A. *et al.* DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic
11 DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity* **42**, 332-
12 343, doi:10.1016/j.immuni.2015.01.012 (2015).
- 13 40 West, A. P. *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune
14 response. *Nature* **520**, 553-557, doi:10.1038/nature14156 (2015).
- 15 41 Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use
16 in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*
17 **4**, 67-73 (1999).
- 18

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence National de la Recherche (ChemInnate program to POV, SN and FT), the Institut Pasteur (www.pasteur.fr), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; www.cnrs.fr), the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM; www.inserm.fr), and the Institut Carnot – Pasteur Maladies Infectieuses (STING program to POV and HML). SK was funded by the Direction Générale de l'Armement (www.defense.gouv.fr/dga) and the Institut Pasteur.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.K., M.L.-H, S.N., N.S, M.B., J.-P.H, H.M.-L, F.T., and P.-O.V. designed research ; S.K., M.L.-H, S.N., N.S, O.H., C.R., H.M.-L, and P.-O.V. performed research; S.K., M.L.-H, S.N., N.S, M.B., J.-P.H, H.M.-L, F.T., and P.-O.V. analyzed research; S.K., M.L.-H, S.N., N.S, M.B., J.-P.H, H.M.-L, F.T., and P.-O.V. wrote the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information accompanies this paper

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ChX67779 activates the ISRE-luciferase reporter gene. (A) HEK-293 cells expressing luciferase under control of five interferon-stimulated response elements (ISRE) were incubated, at 4×10^4 cells/well in a 96-well plate, with DMSO alone or increasing concentrations of ChX67779 ranging from 3 to 100 μ M. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. (B) HEK-293 cells were incubated with increasing concentrations of ChX67779 as described above. After 0, 24 and 48 hours of culture, the number of metabolically active cells was determined by ATP quantification using the CellTiter-GLO reagent. Results are expressed as a percentage relative to the initial number of living cells at t=0 hours. (C) ISRE-luciferase reporter cells were left untreated (DMSO alone) or incubated with ChX67779 at 25 or 50 μ M. Luciferase induction was determined after 4, 8, 16 and 24 hours of culture. (D) HEK-293T cells were transfected with pNF- κ B-Luc or pISRE-Luc using 50 ng plasmid for 4×10^4 cells/well in a 96-well plate. Cells were treated with ChX67779 at 50 μ M or TNF- α at 10 ng/ml. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. Experiments were performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as calculated by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test (A and B), two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (C), or Student's t test (D).

Figure 2. Induction of IFN-inducible genes (ISGs) by ChX67779. (A) HEK-293T, A549, MRC5 and Vero cells at 2×10^5 cells/well in 24-well plates were stimulated with DMSO alone or ChX67779 at 50 μ M. After 24 h of culture, total RNAs were extracted, and expression levels of indicated genes were quantified by qRT-PCR. Data were normalized to the average expression of four housekeeping genes (18S, GAPDH, and HPRT1), and expressed as induction folds relative to DMSO-treated cells using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. (B) HEK-293T cells

were left untreated (DMSO alone) or incubated with ChX67779 for 0, 4, 16 or 24 hours. IFI27 induction was determined by RT-qPCR as described above. (C) HEK-293T cells were left untreated or stimulated with recombinant IFN- β (500 IU/ml) for 24 hours. ISG expression levels were determined by RT-qPCR as described above. Experiments were performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as calculated by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

Figure 3. Structure activity relationships and selection of ChX710. (A) Chemical structures of ChX67779 and two analogs called CID11207170 and ChX0306710. Compounds were tested for their capacity to induce the ISRE-luciferase reporter gene at three different concentrations. (B and C) HEK-293T cells were left untreated (DMSO alone) or incubated with ChX710 at indicated concentrations for 0, 4, 16 or 24 hours. IFI27 (B) and IFI6 (C) induction levels were determined by RT-qPCR as described above. Experiments were performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as calculated by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test.

Figure 4. ISRE induction by ChX710 is independent of IFN- α/β , STAT1, and STAT2. (A) ISRE-luciferase reporter cells were incubated, at 4×10^4 cells/well in a 96-well plate, with DMSO alone or increasing concentrations of ChX710 in the presence of both blocking antibodies against IFN- α/β . After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. NS indicates non-significant differences as calculated by two-way ANOVA. (B) STAT1, STAT2 or STAT1 and STAT2 were silenced by siRNA transfection in ISRE-luciferase reporter cells. After 48 hours of cultures, cells were stimulated with ChX710. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. Data represent means $\pm$ SD of three independent

experiments. NS indicates non-significant differences relative to control siRNA (CT) as calculated by two-way ANOVA.

Figure 5. ISRE induction by ChX710 is dependent on MAVS and IRF1. (A) MAVS was silenced by siRNA transfection in ISRE-luciferase reporter cells. After 48 hours of cultures, cells were stimulated with ChX710. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. (B) Same experiment as (A) using STING-specific siRNA. (C) Same experiment as (A) using IRF1-specific siRNA. IRF1 silencing was validated by western-blot. (D) Same experiment as (A) using IRF3-specific siRNA. IRF3 silencing was validated by western-blot. (E) IRF3 phosphorylation was determined by western-blot in HEK-293T (left panel) or A549 cells (right panel) treated with ChX710 for 24 hours at 25 μ M. (F) Schematic model of the signaling pathways induced by ChX710. IRF3 phosphorylation is induced, but this is insufficient to activate IFN- β expression. Data represent means $\pm$ SD of three independent experiments, except for (E) that corresponds to representative results of one experiment performed three times. ** $P < 0.01$ as calculated by Student's t test.

Figure 6. ISRE induction by plasmid DNA transfection is boosted in ChX710-treated cells. (A) ISRE-luciferase reporter cells were transfected with 75 ng/well of plasmid DNA (pCiNeo-3xFlag-GW), and cultured at 4×10^4 cells/well in 96-well plates with DMSO alone or increasing concentrations of ChX710. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. (B) Same experiment as in (A) but cells were treated with 6 μ M of ChX710 or CID70, an inactivate analog of ChX710. (C) Same experiment as in (A) but cells were transfected with 25 ng/well of pCiNeo-3xFlag-GW (Plasmid-1), pTK-Renilla (Plasmid-2) or pDONR207 (Plasmid-3), and stimulated with ChX710 at 6 μ M. Experiments were performed

in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$ as calculated by two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test (A and B) or Student's t test (C).

Figure 7. Synergistic induction of ISGs and IFN- β by DNA transfection and ChX710.

(A) ISRE-luciferase reporter cells were transfected with 25 or 75 ng/well of plasmid DNA (pCiNeo-3xFlag-GW), and cultured at 4×10^4 cells/well in 96-well plates with DMSO alone or ChX710 at 6 or 25 μ M. After 24 hours of incubation, total RNA were extracted and expression levels of specified genes were determined by RT-qPCR. Data were normalized with using RPL13A mRNA expression as reference, and expressed as induction folds relative to DMSO-treated cells using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Induction folds >3 that are statistically significant between untreated and ChX710-treated wells are framed with bold lines (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test; $P < 0.05$). (B) Data corresponding to IFN- β mRNA expression levels as in (A) are presented as 3D histograms to highlight the synergistic effect of DNA transfection and ChX710 treatment. (C) HEK-293 cells were transfected with 75 or 100 ng/well of plasmid DNA (pCiNeo-3xFlag-GW), and cultured at 4×10^4 cells/well in 96-well plates with DMSO alone or ChX710 at 6 or 25 μ M. After 48 hours of incubation, culture supernatants were recovered, tested for IFN- β concentration by ELISA. (D) Same as in (C) but culture supernatants were applied at a $\frac{1}{2}$ dilution to fresh ISRE-luciferase reporter cells to determine interferon activity. As a reference, reporter cells were stimulated with recombinant IFN- β at 40, 150 or 630 IU/ml. After 24 hours of incubation, luciferase activity was determined. Data represent means $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ correspond to statistically significant differences between untreated and ChX710-treated wells (two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test).

Figure 8. Synergistic ISRE induction by DNA transfection and ChX710 is STING dependent. STING was silenced by siRNA transfection in ISRE-luciferase reporter cells. After 48 hours of cultures, cells were transfected with plasmid DNA (pCiNeo-3xFlag-GW) and stimulated with ChX710. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. Data represent means $\pm$ SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$ corresponds to statistically significant differences as calculated by two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

Supplementary Figure S1. Cellular toxicity of ChX710 and analog compound CID70. ISRE-luciferase reporter cells were incubated with increasing concentrations of ChX710 (A) or CID70 (B). After 0, 24 and 48 hours of culture, the number of metabolically active cells was determined by ATP quantification using the CellTiter-GLO reagent. Results are expressed as a percentage relative to the initial number of living cells at t=0 hours.

Supplementary Figure S2. STAT2, but not STAT1, is essential to ISRE activation by IFN- β . (A) STAT1, STAT2 or STAT1 and STAT2 were silenced by siRNA transfection in ISRE-luciferase reporter cells. After 48 hours of cultures, STAT1 and STAT2 expression levels were determined by western-blot analysis. (B) In parallel, cells were stimulated with recombinant IFN- β . After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. Data represent means $\pm$ SD of four independent experiments. ** $P < 0.01$ corresponds to statistically significant differences as calculated by two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

Supplementary Figure S3. Functional validation of siRNA targeting MAVS, STING, IRF1 and IRF3. (A) MAVS was silenced by siRNA transfection in ISRE-luciferase reporter

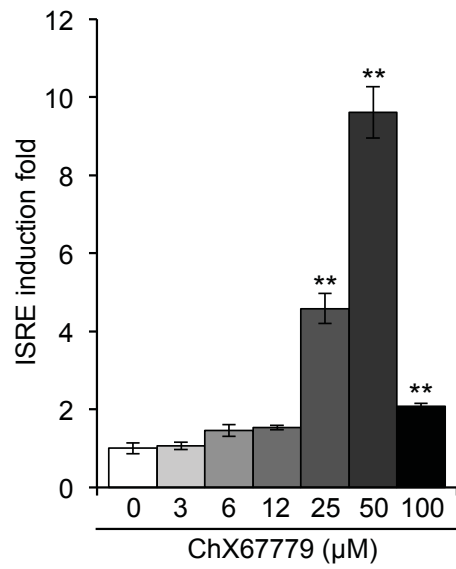
1 cells. After 48 hours of cultures, cells were left untreated or transfected with ssRNA. After 24
2 hours of incubation, luciferase induction was determined. **(B)** Same experiment as (A) using
3 STING-specific siRNA and cGAMP stimulation. **(C)** Same experiment as (A) using IRF1 or
4 IRF3-specific siRNA. **(D)** IRF3 was silenced by siRNA transfection in HEK-293T cells.
5 After 48 hours of culture, cells were transfected with pIFN- β -Luciferase reporter plasmid
6 alone or ssRNA. After 24 hours of incubation, luciferase induction was determined. **(E)**
7 Schematic model of the signaling pathways induced by ssRNA in HEK-293 cells.
8 Experiments were performed in triplicate and data represent means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$ as
9 calculated by Student's t test.

10

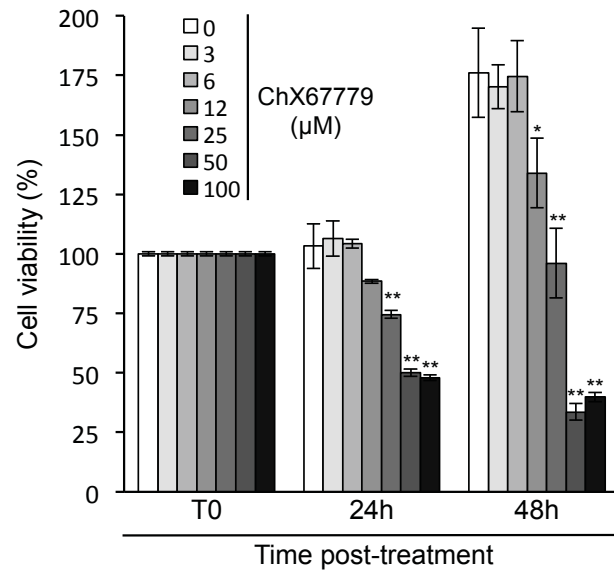
11 **Supplementary Figure S4. Impact of ChX710 on ISRE induction by recombinant IFN- α**
12 **or ssRNA.** **(A)** ISRE-luciferase reporter cells were treated with both recombinant IFN- α and
13 ChX710 at different concentrations. After 24 hours of incubation, luciferase induction was
14 determined. **(B)** Same experiment as in (A) but cells were treated with different
15 concentrations of ChX710 and transfected with ssRNA. Experiments were performed in
16 duplicate and data represent means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$ corresponds to statistically significant
17 differences as calculated by two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.

18

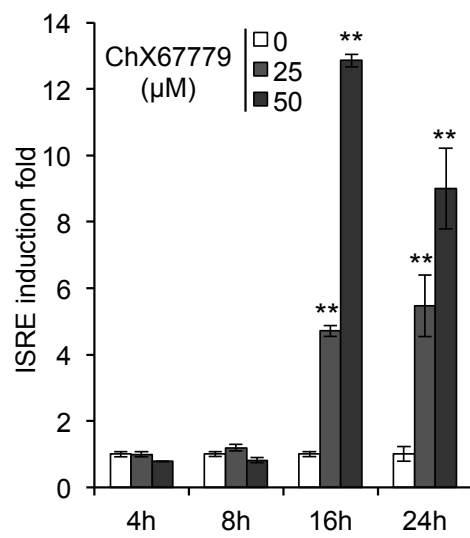
A



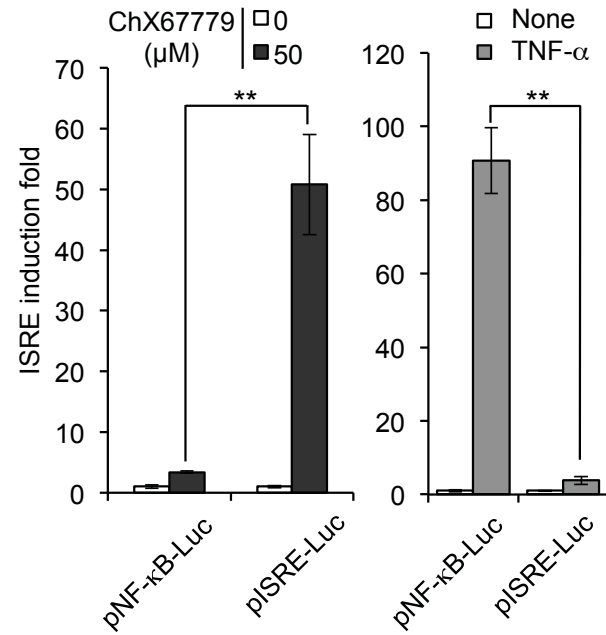
B

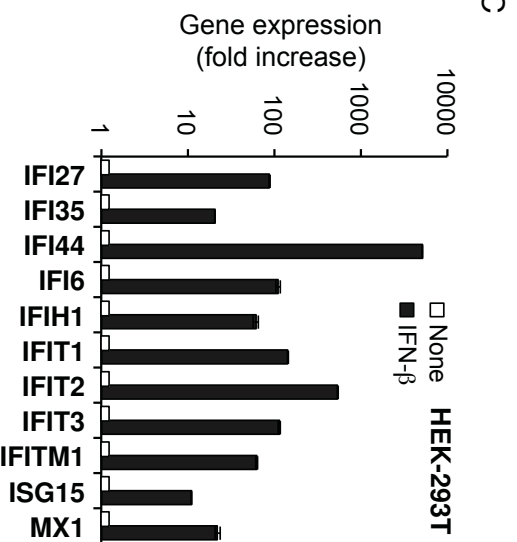
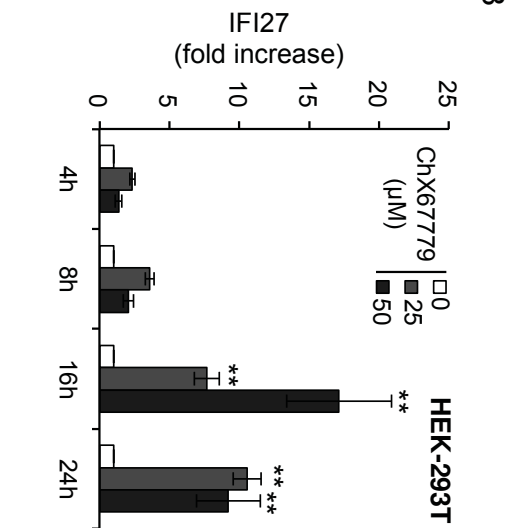
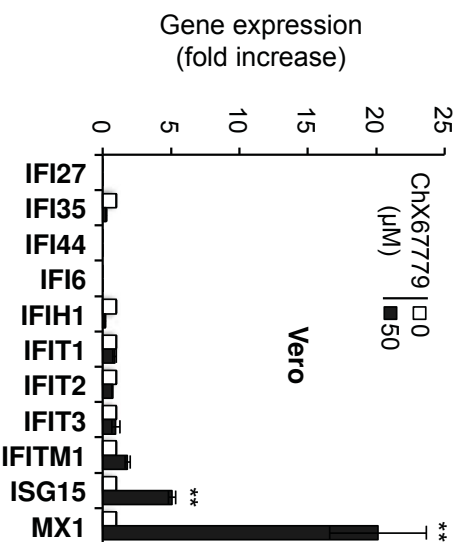
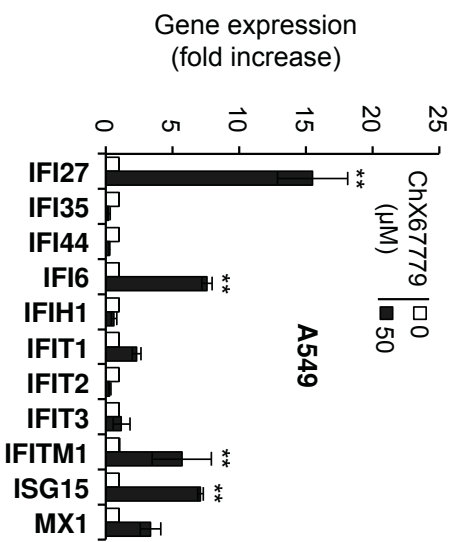
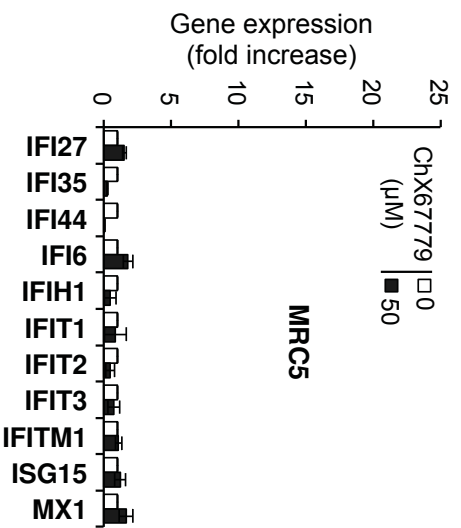
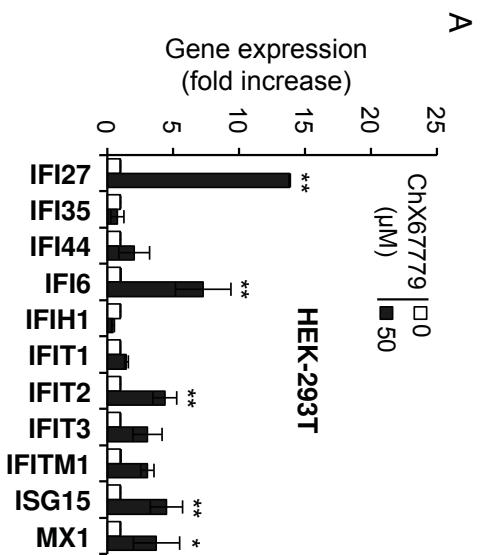


C

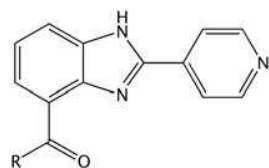


D



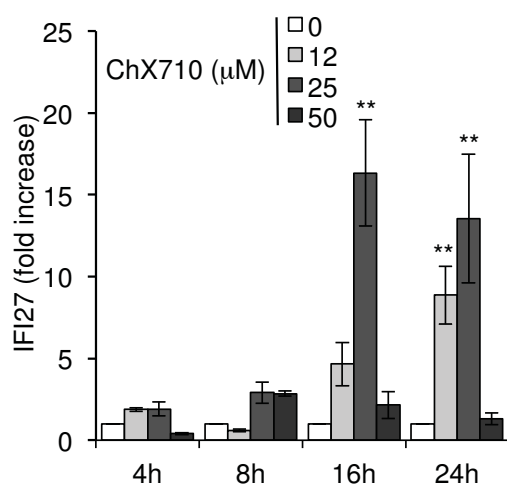


A

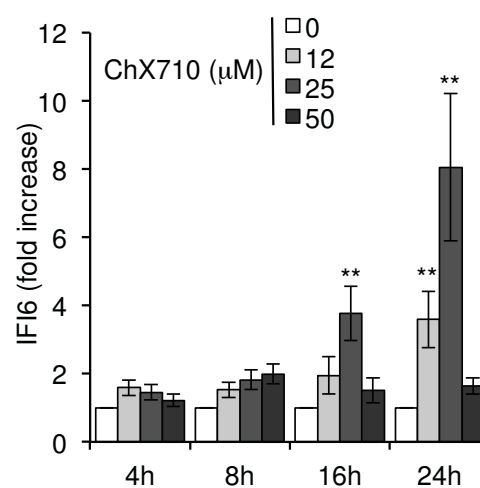


Compound ID	R	ISRE induction fold		
		12 μ M	25 μ M	50 μ M
CID11207170 (CID70)	—OH	1.0	0.9	0.8
ChX67779		1.6	5.0	9.0
ChX0306710 (ChX710)		3.8	17.0	0.5

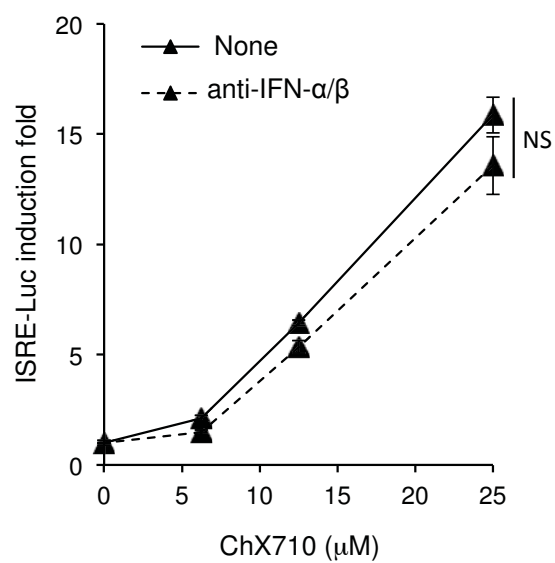
B



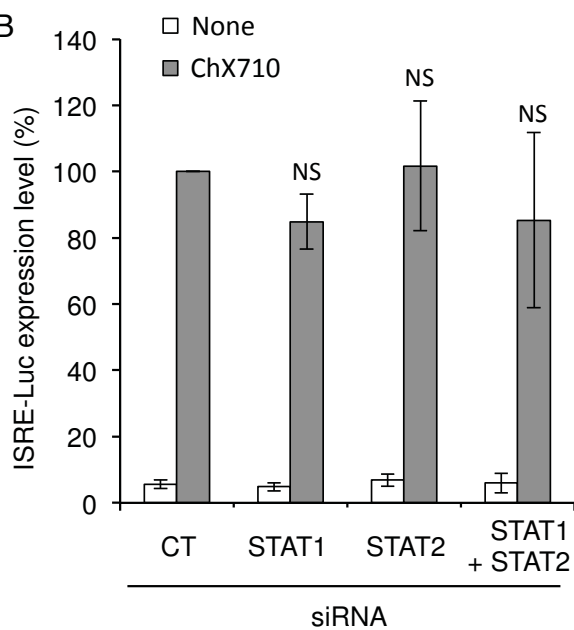
C

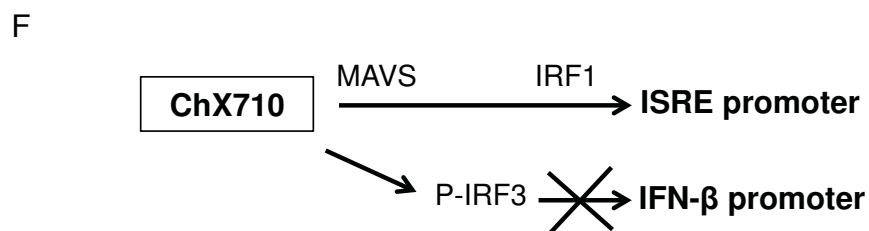
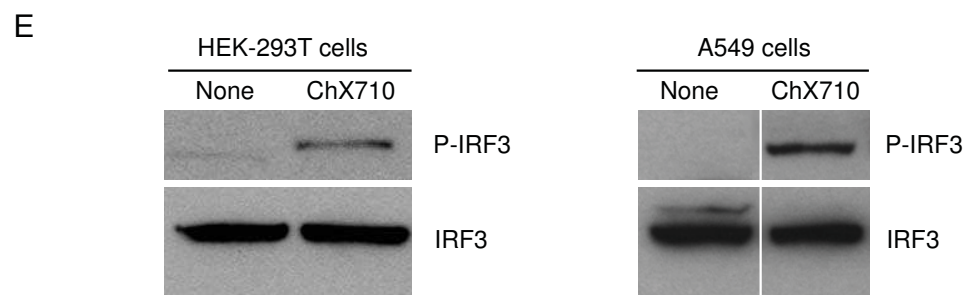
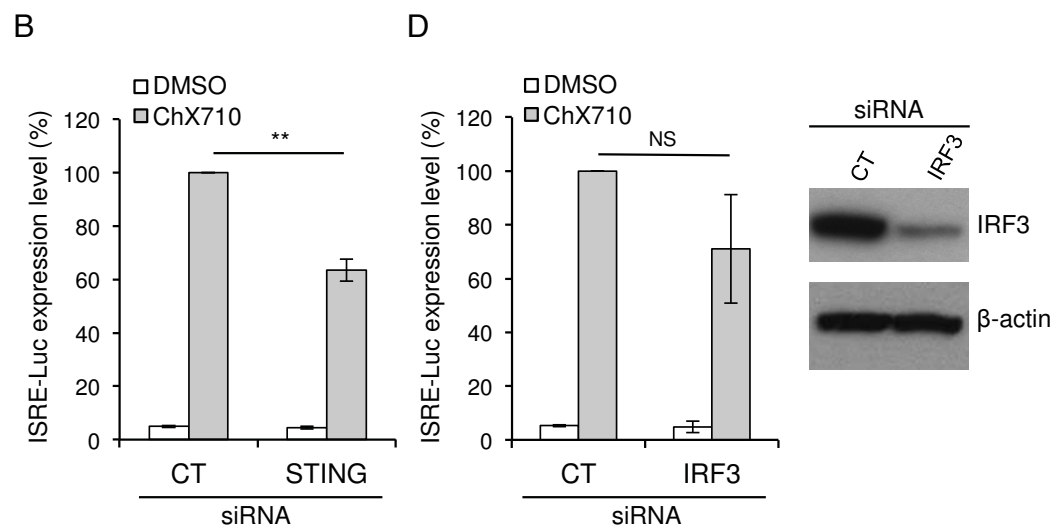
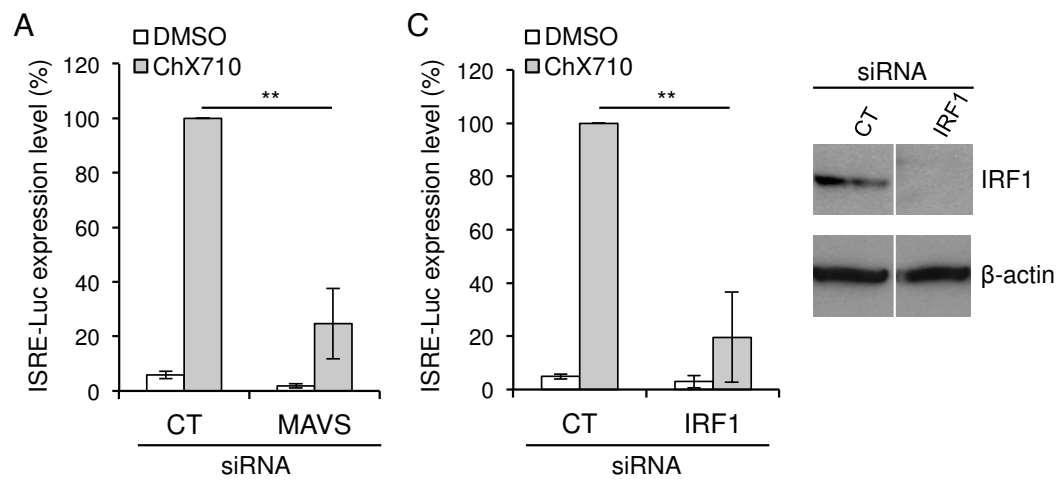


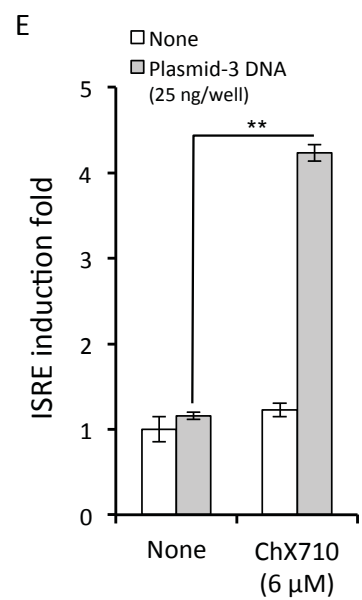
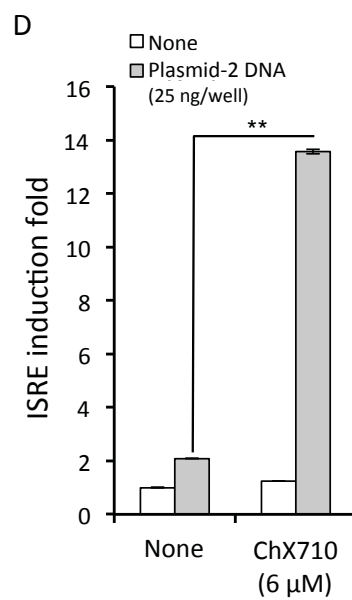
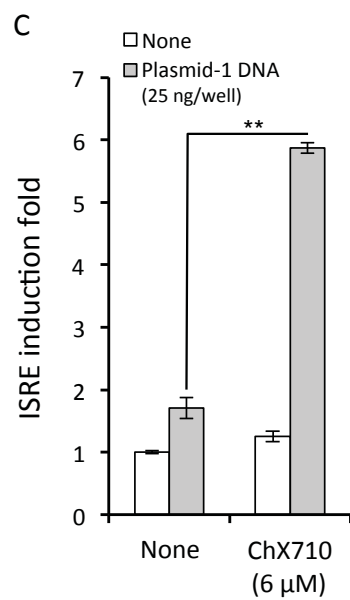
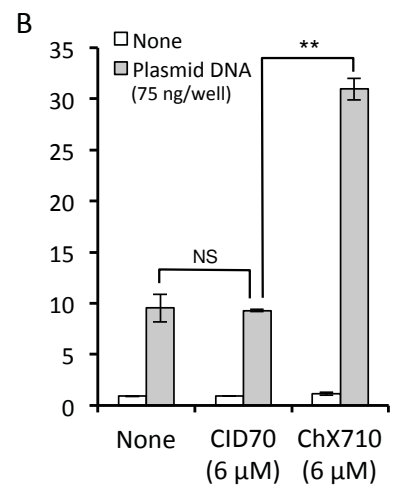
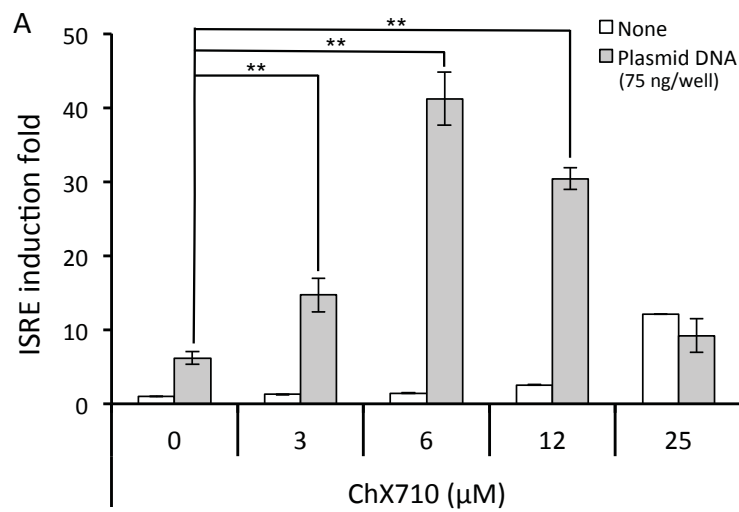
A



B



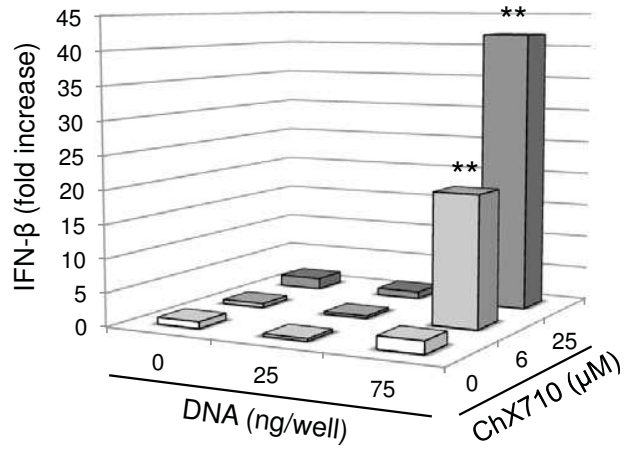




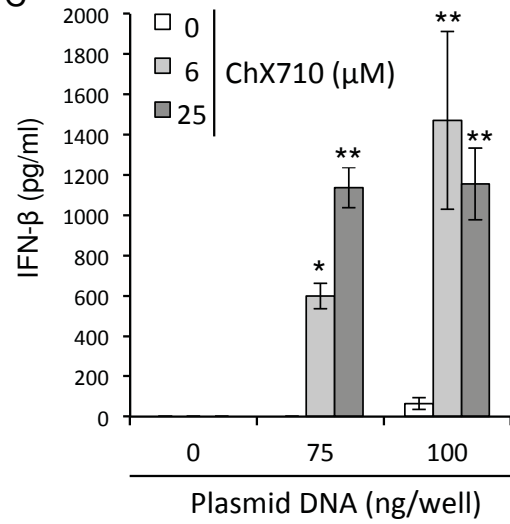
A

	ChX710	IFIT1	IFIT2	ISG15	IFI6	IFI27	IRF1	PKR	MxA	IFN- α 1	IFN- α 4	IFN- β	IFN- γ	IFN- λ 1	IFN- λ 2/3
None	0 μ M	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	6 μ M	0.8	0.6	0.7	1.5	1.4	1.1	1.0	0.6	0.9	0.3	0.6	0.4	0.6	0.8
	25 μ M	1.6	4.3	4.5	7.7	5.0	3.9	0.2	0.8	1.4	0.9	1.7	0.6	1.0	1.5
DNA (25 ng/well)	0 μ M	0.6	0.8	0.6	0.6	0.7	0.8	0.8	0.6	0.4	0.3	0.4	0.3	0.7	0.4
	6 μ M	1.1	1.4	0.6	0.8	0.7	0.8	0.7	0.4	0.6	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4
	25 μ M	33.6	117.8	5.5	7.8	4.5	3.5	0.3	0.6	1.2	0.9	1.0	0.9	0.9	1.6
DNA (75 ng/well)	0 μ M	4.8	14.0	4.0	1.8	1.6	0.8	1.0	1.1	0.3	0.1	1.9	0.3	0.8	0.4
	6 μ M	77.9	239.1	32.4	21.5	8.3	2.1	1.6	2.8	0.6	0.3	19.6	0.3	6.9	5.0
	25 μ M	81.7	739.5	29.6	11.3	4.0	4.0	0.4	2.0	1.3	1.1	41.9	1.7	6.4	7.2

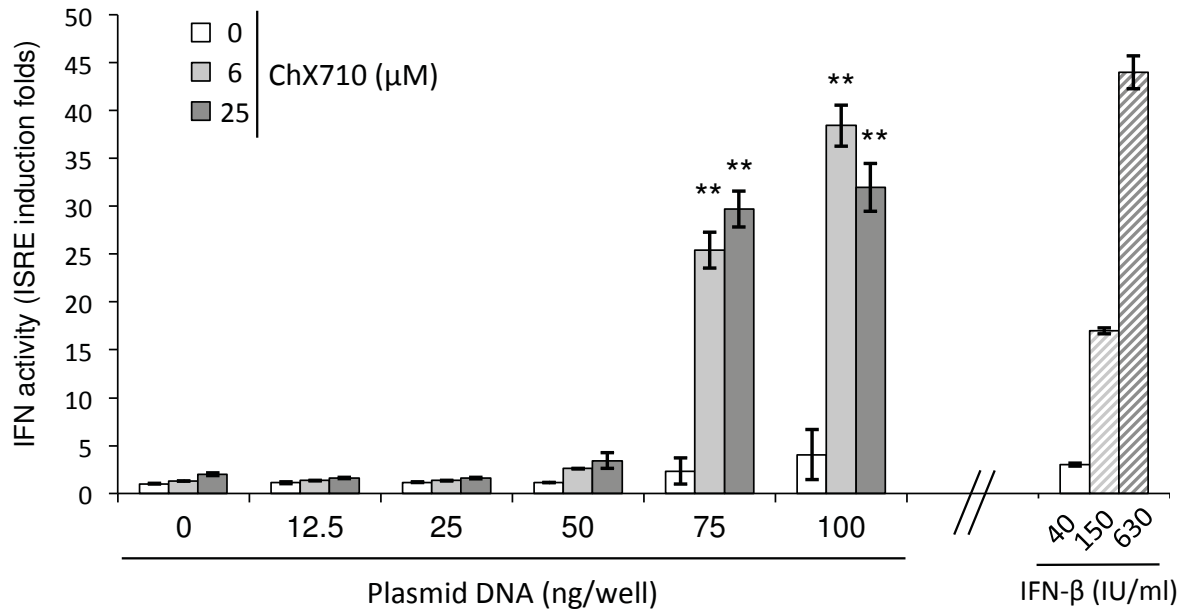
B

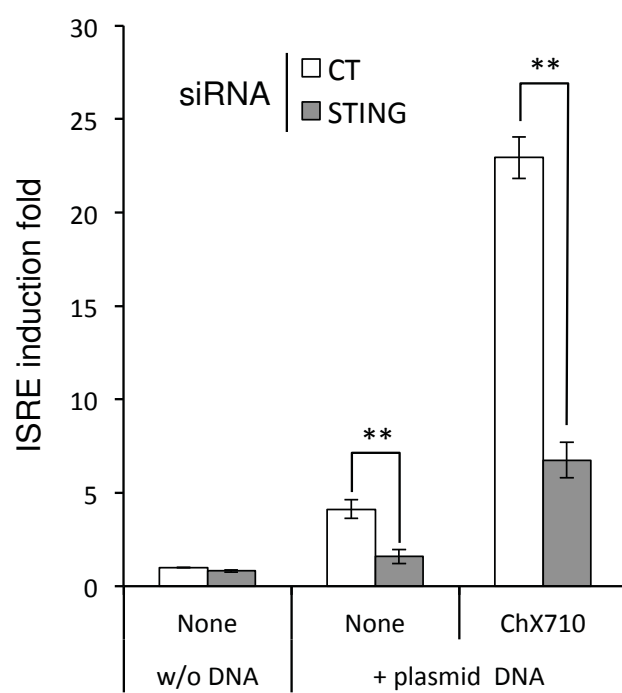


C

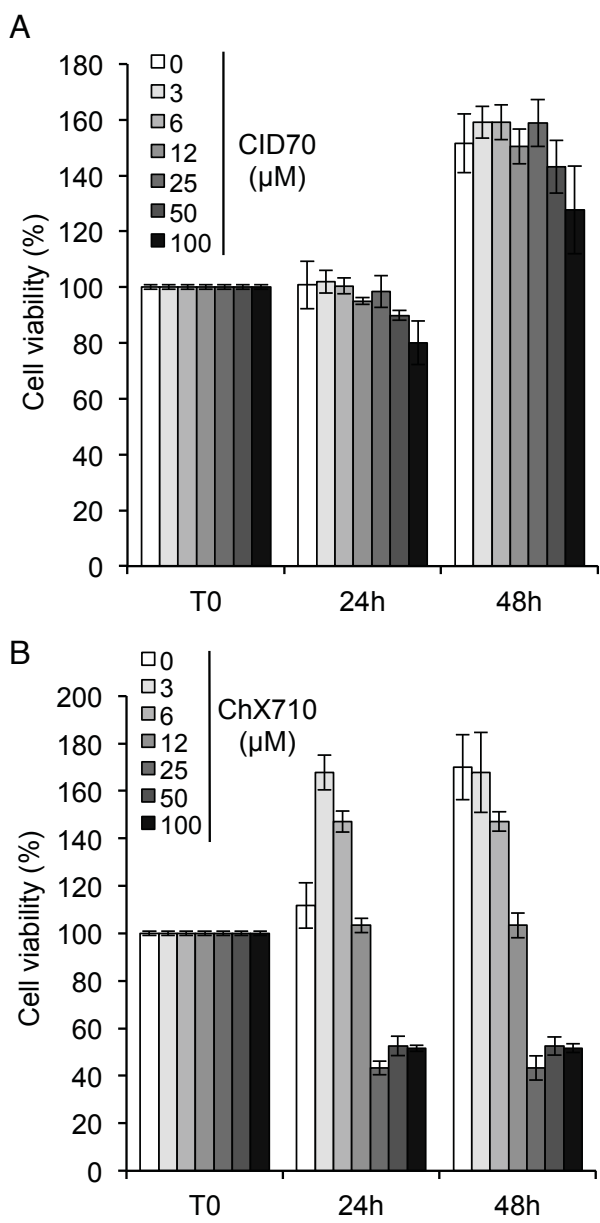


D

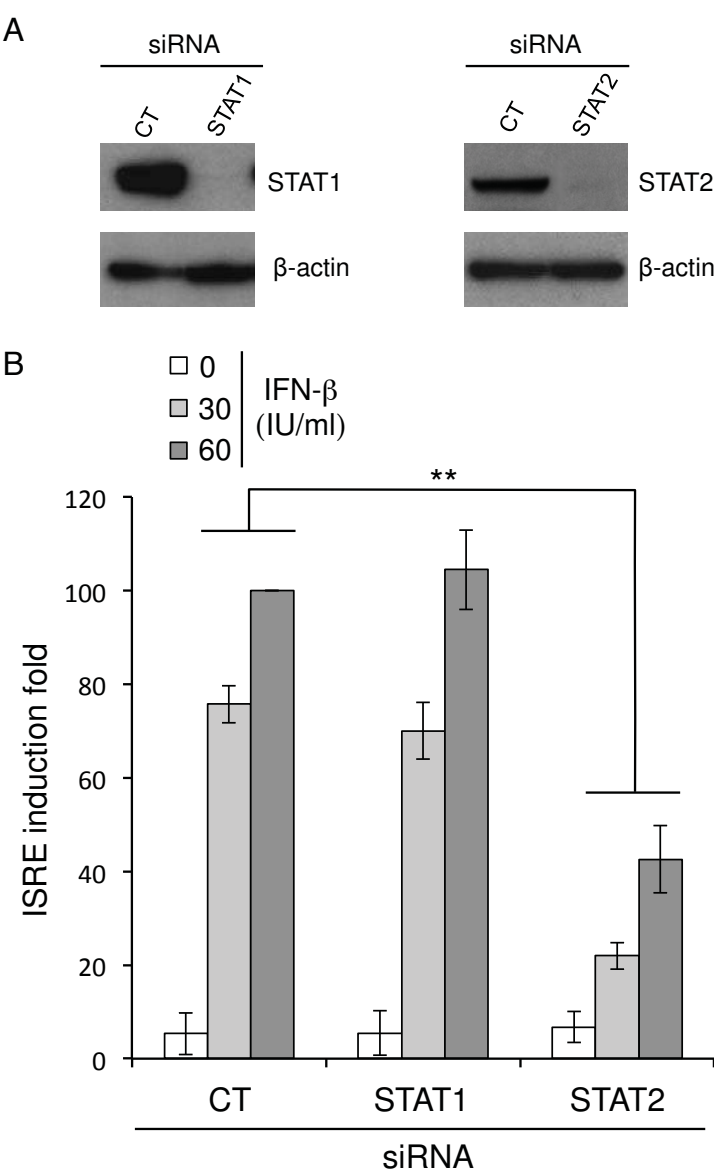




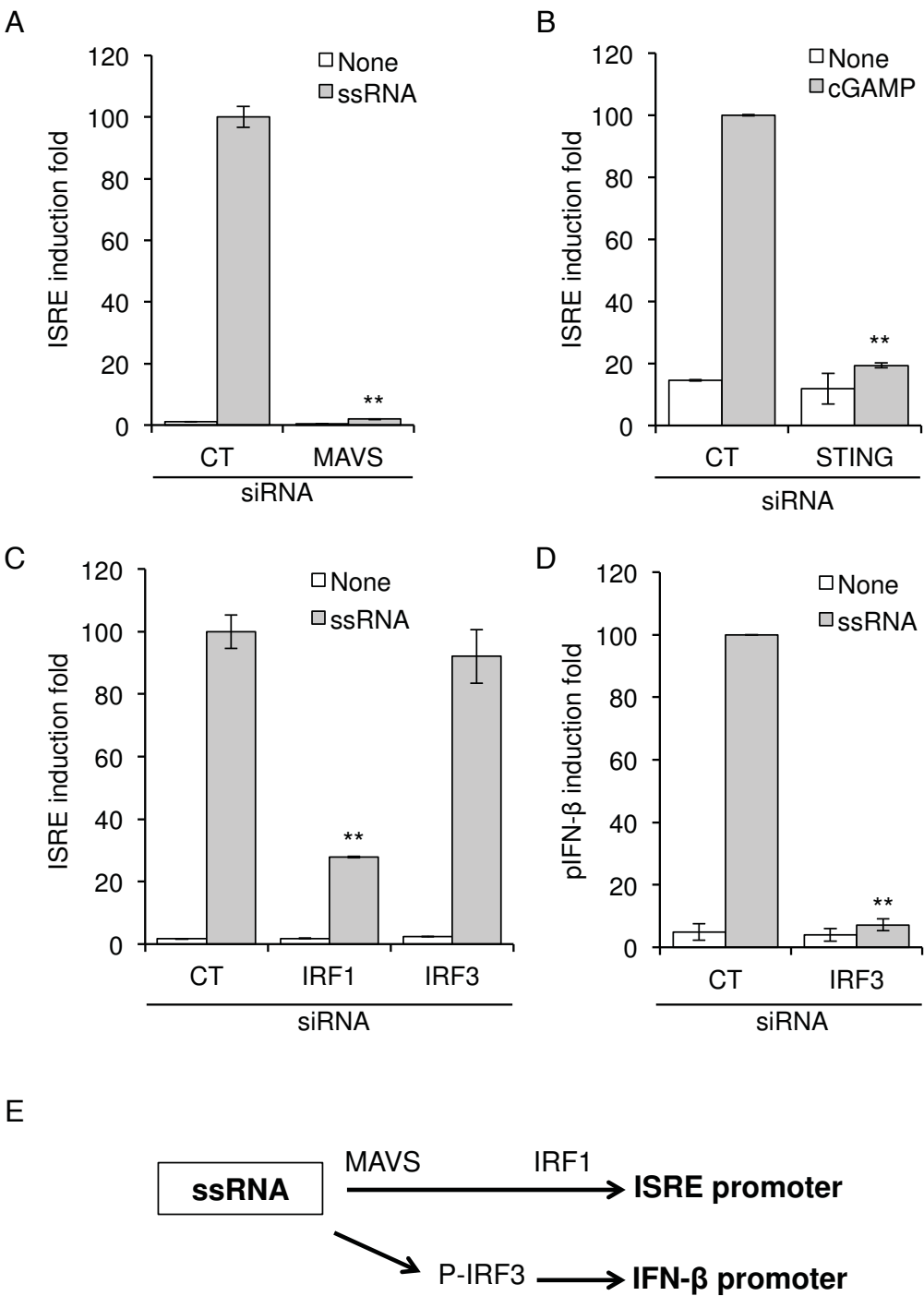
Supplementary Figure 1



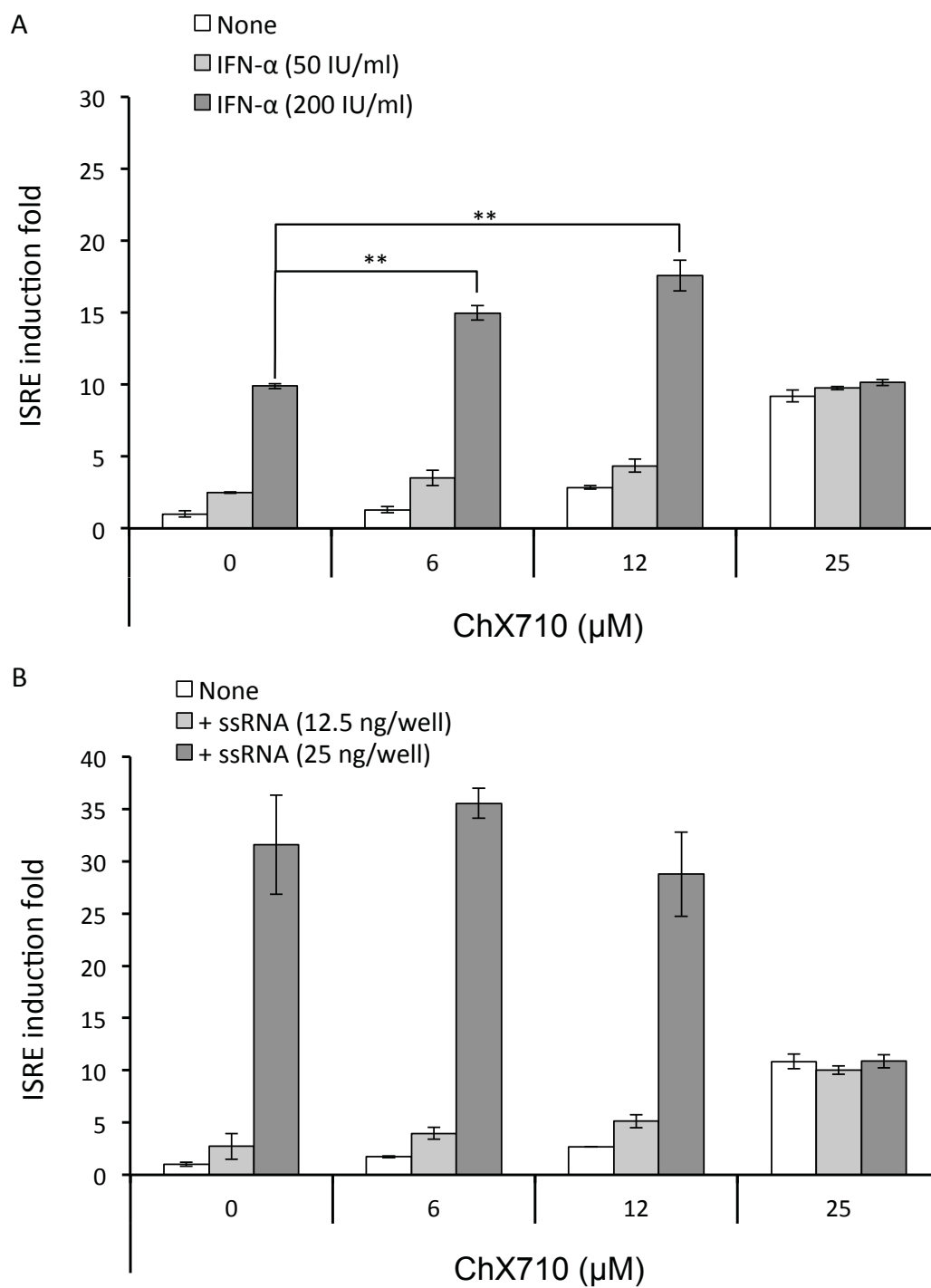
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

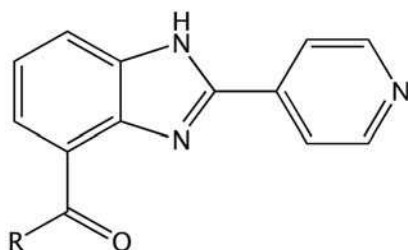


Supplementary Figure 4

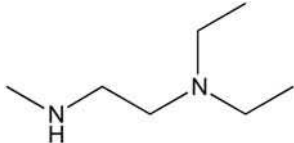
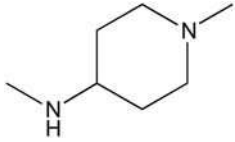
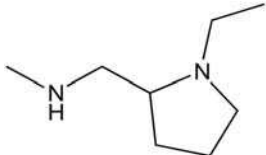
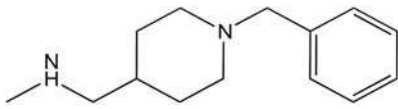
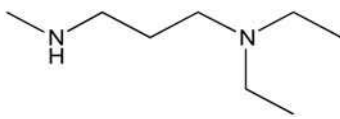
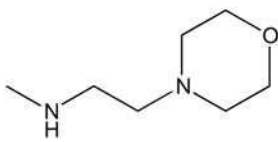
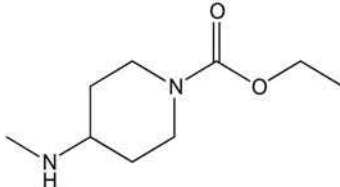
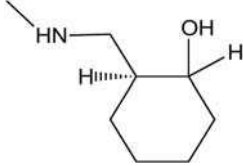


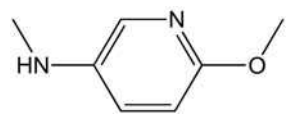
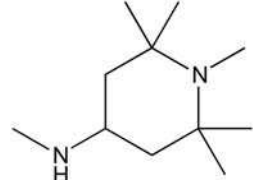
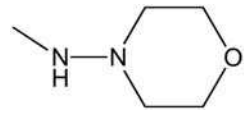
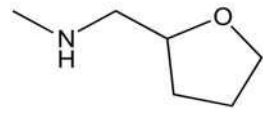
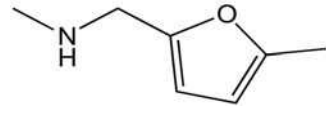
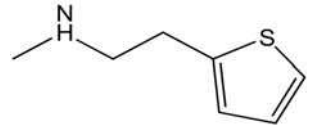
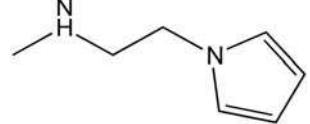
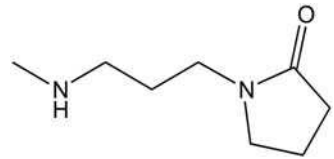
Supplementary Table S1. Chemical structures of ChX67779 analogs and corresponding ISRE-luciferase induction levels. Hits from the initial screen are highlighted in yellow color.

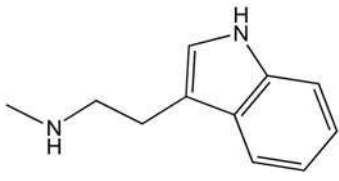
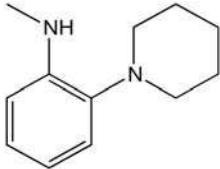
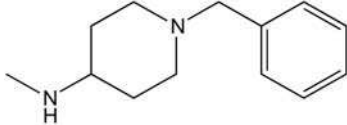
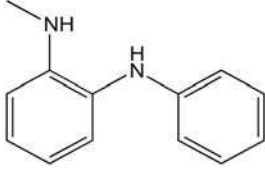
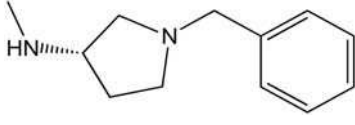
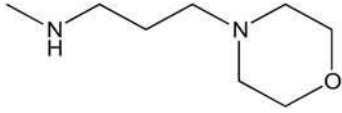
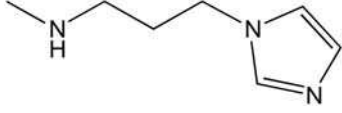
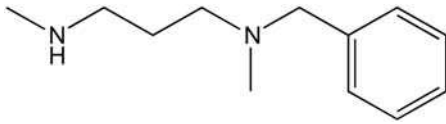
Compound concentrations inducing the ISRE-luciferase by >2-folds are in pink color.

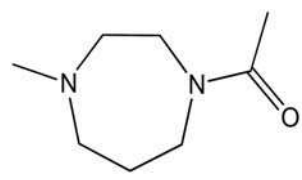
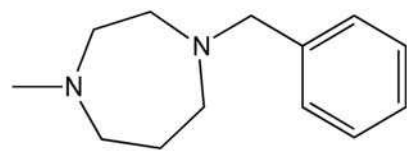
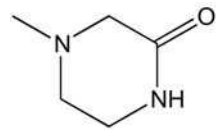
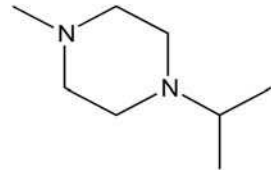
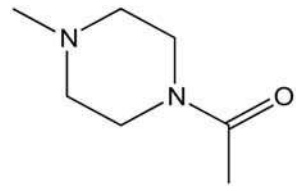
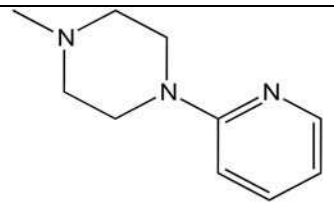
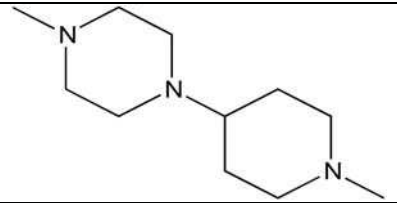


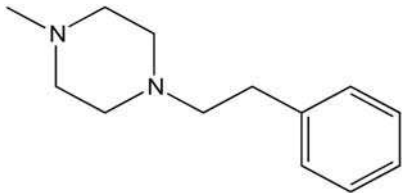
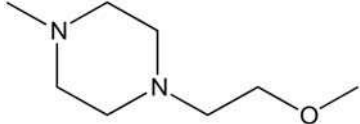
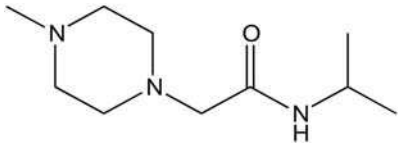
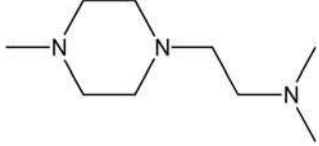
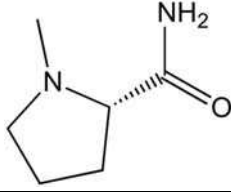
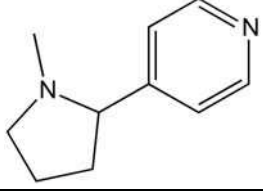
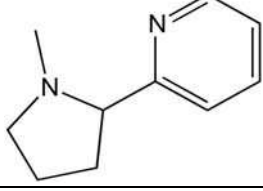
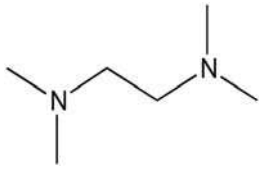
Compound ID	R	ISRE induction fold		
		12 μ M	25 μ M	50 μ M
ChX67779		1.6	5.0	9.0
ChX0275199		2.6	3.4	3.0
CID11207170 (CID70)	—OH	1.0	0.9	0.8
ChX0306710 (ChX710)		3.8	17.0	0.5
ChX0306715		4.2	9.4	1.6

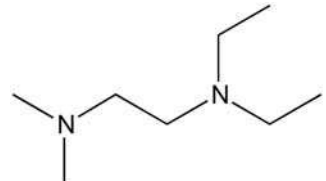
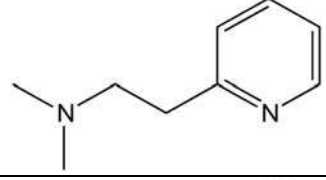
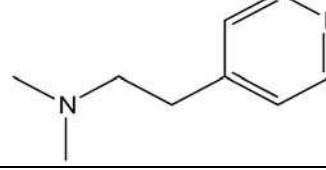
ChX0306701		1.4	2.4	10.2
ChX0306718		1.6	3.0	6.7
ChX0306689		1.8	4.6	3.2
ChX0306714		1.1	1.2	7.8
ChX0306709		1.5	1.6	4.6
ChX0306681		0.9	0.9	0.9
ChX0306675		1.0	1.0	0.9
ChX0274736		1.1	1.1	1.1

ChX0275179		1.2	1.4	1.4
ChX0306698		1.4	1.4	1.8
ChX0306688		0.8	0.9	1.0
ChX0275183		1.1	1.2	1.1
ChX0275193		1.0	0.8	0.5
ChX0275191		1.2	1.4	1.3
ChX0275204		0.9	0.7	0.6
ChX0306682		0.9	0.9	0.8

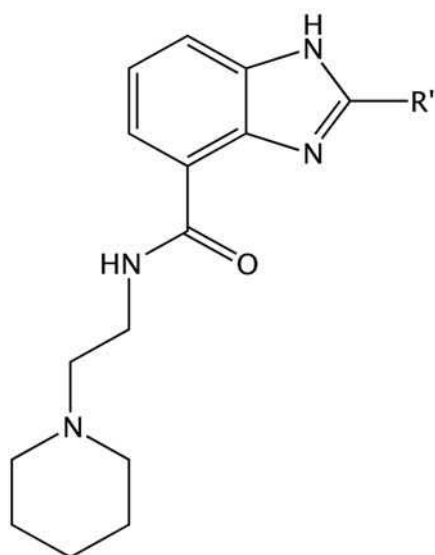
ChX0306685		0.4	0.5	0.6
ChX0276286		1.2	1.2	1.2
ChX0306700		1.1	1.3	1.1
ChX0306673		0.9	0.7	0.2
ChX0306702		0.9	0.8	0.2
ChX0306680		0.9	0.9	0.9
ChX0306712		1.0	0.8	0.8
ChX0306716		0.9	0.9	0.7

ChX0306679		1.0	0.9	0.8
ChX0306684		1.0	0.7	0.8
ChX0306694		0.7	0.9	0.9
ChX0306704		1.0	0.8	0.8
ChX0306705		0.8	1.0	0.9
ChX0306677		0.9	0.7	0.8
ChX0306686		1.0	1.0	0.8
ChX0306692		0.9	0.8	0.8

ChX0306699		1.0	1.0	0.9
ChX0306703		0.9	0.9	0.8
ChX0306697		0.8	0.8	0.8
ChX0306711		0.8	0.9	0.8
ChX0306719		0.8	0.9	0.8
ChX0306690		1.1	1.2	1.0
ChX0306695		1.0	1.0	0.8
ChX0306706		1.0	0.9	0.9

ChX0306708	 <chem>CN(C)CCCN(C)CC</chem>	1.0	1.0	0.8
ChX0306717	 <chem>CN(C)CCc1ccncc1</chem>	0.8	1.0	0.9
ChX0306676	 <chem>CN(C)CCc1ccncc1</chem>	0.9	0.8	0.8

Supplementary Table S2. Chemical structures of ChX67779 analogs and corresponding ISRE-luciferase induction levels.



Compound ID	R'	ISRE induction fold		
		12 μ M	25 μ M	50 μ M
ChX0275142		1.1	1.0	0.9
ChX0275376		0.9	0.9	0.8



Manuscrit N°2

**A series of diphenyl triamino-pyrimidines identified as broad-spectrum
antiviral molecules**

Samira Khiar¹, Marianne Lucas-Hourani¹, Audrey Page², Olivier Helynck³, Sylvain Baize²,
Philippe Desprès⁴, Hélène Munier-Lehmann³, Frédéric Tangy¹, Pierre-Olivier Vidalain⁵

¹ Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR3569, Paris, France

² Centre National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales, Unité de Biologie des
Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, Lyon, France; Centre International de
Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Institut national de la santé et de la recherche
médicale U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, Centre national de
la recherche scientifique UMR5308, 69007 Lyon, France.

³ Unité de Chimie et Biocatalyse, Institut Pasteur, CNRS UMR3523 Paris, France

⁴ Université de la Réunion, CNRS UMR9192, INSERM U1187, IRD UMR249, Unité Mixte
134 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) Plateforme Technologique
CYROI, 97490 Sainte Clotilde, France.

⁵ Equipe Chimie & Biologie, Modélisation et Immunologie pour la Thérapie (CBNIT),
Université Paris Descartes, CNRS UMR8601, Paris, France

Corresponding authors:

Pierre-Olivier Vidalain (pierre-olivier.vidalain@parisdescartes.fr)

Frédéric Tangy (ftangy@pasteur.fr)

1 **Abstract**

2 There is critical need for broad-spectrum antiviral compounds to cope with the
3 increasing frequency of emerging viral diseases that affect human and animal populations.
4 Here, we describe the antiviral activity of a new chemical series with a common N^4,N^6 -
5 diphenylpyrimidine-4,6-diamine group. These compounds efficiently inhibited distant RNA
6 viruses, including measles virus, chikungunya virus, and coxsackievirus B3. Interestingly,
7 they did not affect viral entry or key enzymes involved in *de novo* nucleoside biosynthesis as
8 previously reported for other broad-spectrum antivirals. Besides, these compounds altered cell
9 adhesion and interacted a large subset of cellular kinases as assessed in a kinome-wide
10 analysis. In conclusion, we have identified a new chemical series of broad-spectrum antiviral
11 compounds with functional characteristics suggesting a mode of action linked to the
12 inhibition of host cell functions that are essential to viral growth.

13

14

15 **1 Introduction**

16 Recent outbreaks of emerging viruses such as Ebola virus or MERS-CoV have been a
17 clear reminder that available therapies to fight such epidemic events are extremely limited. In
18 the near future, international exchanges, promiscuity in ever-growing urban centers, and
19 perturbations in ecosystems will most likely increase their frequency, thus calling for research
20 and development of innovative antivirals. The mainstream strategy for novel therapeutics
21 essentially relies on searching direct-acting antivirals (DAA) that bind viral enzymes to jam
22 the replication machinery [1]. This was proven successful with the development of potent
23 inhibitors against Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus or Influenza Virus that
24 target viral polymerases, envelope glycoproteins or proteases. However, a major limitation of
25 this approach can be the quick appearance of resistant mutants, a phenomenon greatly

1 facilitated by the low fidelity of viral replication machineries. Even though some DAA
2 exhibit a broad-spectrum antiviral activity [2], they are often specific of a single virus, making
3 these compounds relatively useless in the case of novel emerging pathogens.

4 An alternative strategy is to develop antivirals that target host cell functions in order to
5 either inhibit metabolic pathways hijacked by viruses or stimulate the host innate immune
6 response [2, 3]. Recombinant type I interferons fall in this latter category, and have been used
7 with significant benefits in the treatment of viral hepatitis. However, most viruses have
8 evolved virulence factors to block the signaling cascade downstream of type I interferon
9 receptor, and are essentially resistant to therapies based on this antiviral cytokine. Thus,
10 researches now focus on molecules that could stimulate the innate antiviral response through
11 interferon-independent pathways [4]. Compounds modulating cellular functions such as
12 autophagy or apoptosis, and antimetabolites blocking lipid or nucleoside biosynthesis, were
13 also characterized as capable of blocking multiple viruses from unrelated families [2, 3].
14 Their antiviral activity *in vivo* is currently under evaluation, holding great hopes in the field.
15 However, it is expected that many of these molecules will fail at early stages of development
16 because of their toxicity, poor pharmacological properties or limited efficacy. This highlights
17 the permanent need to feed this pipeline with new chemical entities to be tested *in vivo*.

18 To identify novel, broad-spectrum antiviral compounds, we recently developed a high-
19 throughput screening pipeline based on human HEK-293T cells infected with recombinant
20 measles (MeV) or chikungunya (CHIKV) viruses expressing luciferase as reporters of viral
21 replication [5]. In this pipeline, compound libraries are screened first to isolate inhibitors of
22 MeV, and then evaluated for their cellular toxicity and capacity to block the replication of
23 CHIKV. Given that MeV and CHIKV are negative-stranded and positive-stranded RNA
24 viruses, respectively, with fundamentally different replication machineries, compounds
25 inhibiting both viruses are expected to show a broad-spectrum antiviral activity. As a proof of

1 concept, a chemical library of 10,000 compounds from CHEM-X-INFINITY (Romainville;
2 www.chem-x-infinity.com) was screened with this assay. 13 compounds were selected for the
3 inhibition of both MeV and CHIKV replication in human HEK-293T cells with half maximal
4 inhibitory concentrations (IC₅₀) below 2 μ M, but their structure was not disclosed [5].
5 Objectives of the current report is to present and further characterize the main chemical series
6 that came out of the screening campaign (9 compounds referred as “chemical family 1” in
7 [5]).

8 9 **2 Materials and methods**

10 **2.1 Cells and culture medium and reagents**

11 HEK-293T and A549 cells were purchased from ATCC and grown at 37°C and 5%
12 CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Invitrogen) containing 10%
13 fetal calf serum (FCS), penicillin, and streptomycin. Cellular viability was determined by
14 quantification of adenosine triphosphate (ATP) in culture wells using the CellTiter-Glo
15 Luminescent Assay (Promega) following manufacturer's recommendations. Luciferase and
16 Renilla expression levels were determined by the addition of 50 μ l/well of Britelite plus
17 reagent (PerkinElmer) and Renilla-Glo reagent, respectively. Bioluminescence was measured
18 during 0.1 s with a luminometer (Enspire; PerkinElmer). All compounds from ChX77
19 chemical series were purchased from CHEM-X-INFINITY (Romainville; [www.chem-x-](http://www.chem-x-infinity.com)
20 [infinity.com](http://www.chem-x-infinity.com)). As assessed by the manufacturer, purity levels were >90% for all compounds.
21 Mycophenolic acid, brequinar sodium salt, uridine and guanosine were from Sigma-Aldrich.

22 23 **2.2 Virus stocks**

24 The recombinant strain of CHIKV (CHIKV-Ren) expressing Renilla luciferase from a
25 coding sequence inserted between nsP3 and nsP4 non-structural proteins has already been

described [6]. CHIKV stocks were produced on Vero cells, and titrated by TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) on HEK-293T cells. Recombinant MeV strain expressing firefly luciferase (rMV2/Luc) from an additional transcription unit was derived from the vaccine strain Schwarz, and has been previously described [7, 8]. Virus stocks were produced on Vero cells, and titrated by TCID₅₀ on Vero cells. Coxsackievirus B3 (CoxB3, strain Nancy) was kindly provided by Dr. M. Vignuzzi (Institut Pasteur). Virus was amplified on HeLa cells, harvested by one freeze–thaw cycle and titrated by TCID₅₀.

2.3 Interactions assay with 468 human kinases

The KINOMEScan platform (DiscoverX) was used to determine potential interactions between ChX54 (10 μ M) and a panel of 468 wild-type or mutant human kinases. In this assay, each recombinant kinase is DNA-tagged and captured by its ligand immobilized on a solid support in the absence or presence of a tested compound. Its capacity to compete, either directly (sterically) or indirectly (allosterically), with the binding of the kinase to its ligand is then determined by qPCR method. Results are expressed as a percentage of inhibition relative to control.

3 Results

3.1 Antiviral activity of related N⁴,N⁶-diphenylpyrimidine-4,6-diamine compounds

Among molecules selected in the initial screen that inhibited both MeV and CHIKV replication in HEK-293T cells (5), two and seven were diaminopyrimidine and triaminopyrimidine derivatives, respectively (Fig. 1): all these compounds shared a N⁴,N⁶-diphenylpyrimidine-4,6-diamine group. ChX263877, latter referred as ChX77, which was the most active of all hit compounds, and was selected for further investigations (Fig. 1). Aside MeV and CHIKV, ChX77 also efficiently inhibited coxsackievirus B3 (CoxB3) as assessed

1 by reduced levels of viral particles released in infected HEK-293T cells and A549 cells (Fig.
2 2A). As opposed to MeV and CHIKV, CoxB3 is a non-enveloped virus with a positive-strand
3 RNA genome, thus demonstrating that ChX77 is active against both enveloped and non-
4 enveloped RNA viruses. Furthermore, these results demonstrated that ChX77 is at least active
5 on two different human cell lines. Finally, quantification of ATP levels in culture wells,
6 which reflects cellular metabolism and viability indicates that ChX77 only induced cell death
7 at concentrations above 20 μ M (Fig. 2B). The selectivity index of the compound,
8 corresponding to the CC50/IC50 ratio, was estimated to 190 and can be considered as very
9 good. Even though no significant loss of cell viability was observed at concentrations close to
10 the IC50 of the molecule, ChX77-treated cells showed rounded shapes and detached from the
11 bottom of the wells (Fig. 2C). Such morphological changes suggest that cellular functions are
12 perturbed in response to ChX77. Altogether, data supported the broad-spectrum antiviral
13 activity of this compound, and suggested that it belongs to the class of host-directed
14 antivirals.

15 **3.2 Characterization of a minimal active structure.**

16 We then determined structure activity relationships for this chemical series (see Fig.
17 3), and attempted to define the minimal active structure. Different ChX77 analogs (CHEM-X-
18 INFINITY) were evaluated on MeV replication. *N*⁴,*N*⁶-diphenylpyrimidine-2,4,6-triamine
19 (CER0306737) did not show any antiviral potency. Introduction of a methoxy group on
20 position 3 of one phenyl ring (CER0306729) restored some antiviral potency, but to a lesser
21 extent than the parental compound ChX77. We also evaluated CER0306728, CER0306733
22 and CER0263854 that all include a carboxamide group shared by all the selected hits (see Fig.
23 1). Antiviral potency of CER0306728 was slightly better than that of CER0306729,
24 suggesting that the addition of a carboxamide group has no significant benefit on the antiviral
25 activity. Surprisingly, the diaminopyrimidine derivative of CER0306728, namely

CER0306728, is inactive even though the majority of the selected hits from the screening campaign (see Fig. 1) are diaminopyrimidine analogs. On the other hand, a single substitution of the amine moiety of the carboxamide group (CER0306733 and CER0263854) leads to a 5-fold higher potency (IC₅₀ values in the same range as the ChX77 one), whereas a double substitution (CER0306735) has no effect. Altogether, this analysis allowed us to define the minimal active structure for this chemical series, namely CER0306733.

3.3 ChX54 is inhibiting post-entry stages of the virus replication cycle.

To investigate the mode of action of these molecules, we selected CER0263854 (latter referred as ChX54) that was equivalent to ChX77 in terms of antiviral potency, but exhibited a simpler structure and was available in larger quantities. In order to determine if ChX54 targeted virus entry or impaired virus growth inside infected cells, we performed time-of-addition experiments. ChX54 was applied 3 hours prior, concomitantly, or 3 hours post infection by MeV, and virus growth was determined 24 hours later. As shown in Fig. 4, the inhibition of MeV replication was comparable when ChX54 was applied either before or after infection. This demonstrated that ChX54 is not specifically blocking virus entry, but rather interferes with latter steps of the virus replication cycle.

3.4 ChX54 is not an inhibitor of key enzymes involved in nucleoside biosynthesis

One possibility is that ChX54 might interfere with *de novo* nucleoside biosynthesis within the cells. Indeed, compounds inhibiting *de novo* purine or pyrimidine biosynthesis are a well-characterized class of host-directed, broad-spectrum antivirals [9, 10]. Enzymes that are best-documented targets from these metabolic pathways are DHODH (dihydroorotate dehydrogenase), the fourth enzyme of *de novo* pyrimidine biosynthesis, and IMPDH (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase), a key enzyme involved in GTP biosynthesis. Prototypical inhibitors of DHODH and IMPDH are brequinar and mycophenolic acid, respectively. These two compounds efficiently blocked MeV replication in infected HEK-293T cultures, and their

antiviral activity was reversed as expected by supplementing culture medium with either uridine or guanosine, respectively (Fig. 5A and B). However, the addition of uridine or guanosine did not affect ChX54 antiviral activity, thus indicating that DHODH or IMPDH are not the targets of this compound. Therefore, the mode of action of ChX54 is distinct from brequinar and mycophenolic acid, and our results indicate that *de novo* nucleoside biosynthesis is not the target of this molecule.

3.5 ChX54 interacts with large panel of cellular kinases

To our knowledge, active molecules described in this report have never been characterized before for any biological activity. However, the *N*⁴,*N*⁶-diphenylpyrimidine-4,6-diamine scaffold found in these compounds was previously reported to bind the ATP binding site of numerous kinases [11-13]. More specifically, closely related molecules were previously characterized as tyrosine kinases (TK) inhibitors, targeting in particular EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) and other receptor tyrosine kinases (RTK). Compound selectivity was mostly determined by functionalization of the phenyl groups [11-13]. We thus tested ChX54 against a panel 468 recombinant human kinases in a high-throughput assay (KINOMEscan; DiscoverX). As shown in Fig. 6, ChX54 efficiently disrupted the interaction of multiple kinases with their ligands. These results strongly suggest that its antiviral activity relies on the inhibition of one or several cellular kinases.

4 Discussion

Herein, we have characterized a novel series of compounds showing a potent antiviral activity against distant RNA viruses, including MeV, CHIKV and CoxB3. Current results strongly suggest that selected compounds are host-directed antivirals. First, three RNA viruses with unrelated replication machineries were efficiently inhibited. Besides, these compounds also disrupted cell adhesion to culture wells, further supporting interactions with cell functions. Finally, ChX54 was shown to specifically bind several cellular kinases, and

1 compete with ligand binding to their active sites. This is convergent with previous reports
2 showing the inhibition of cellular kinases, and in particular tyrosine kinases, with compounds
3 containing a N^4,N^6 -diphenylpyrimidine-4,6-diamine scaffold [11-13]. Interestingly, our results
4 showed that ChX54 inhibited not only tyrosine kinases but also members of other kinase
5 families. Added to the fact that the kinome-wide analysis performed was incomplete (as the
6 human genome encodes more than 500 kinases), it is impossible at this point to attribute the
7 antiviral activity of ChX54 to the inhibition of one specific kinase. In particular, the
8 multifunctional serine/threonine kinase WNK2, which was identified as a prime target of
9 ChX54 in the KINOMEScan assay, was knocked down by siRNA, but this had not impact on
10 MeV replication in HEK-293T cells (data not shown). In conclusion, our results strongly
11 suggest that ChX54 antiviral activity relies on the inhibition of one or several cellular kinases,
12 but further investigations are required to precise its mode of action.

13 Interestingly, specific kinase inhibitors were previously shown to inhibit the
14 replication of different viruses, including influenza virus (*Orthomyxoviridae*), Nipah and
15 Sendai viruses (*Paramyxoviridae*), herpes simplex virus type 1 (HSV-1; *Herpesviridae*),
16 mouse hepatitis virus (*Coronaviridae*), rhesus rotavirus (*Reoviridae*), dengue and West-Nile
17 viruses (*Flaviviridae*), Ebola and Marburg viruses (*Filoviridae*), and Lassa virus
18 (*Arenaviridae*). Indeed, cellular kinases have been involved in the phosphorylation of viral
19 proteins to regulate their stability, activity and interactions with viral or cellular factors [14,
20 15]. Besides, virus replication relies on cellular processes finely tuned by endogenous kinases,
21 which can be blocked with specific drugs to jam viral growth. In conclusion, the ChX54 and
22 related molecules represent an interesting lead scaffold for the development of potent broad-
23 spectrum antiviral compounds. Furthermore, deciphering its mode of action could also help
24 identify cellular kinases that are suitable targets for the development of potent antivirals with
25 acceptable side effects.

1

2 **Acknowledgments**

3 This work was supported by the Agence National de la Recherche (ChemInnate
4 program to POV and FT), the Institut Pasteur (www.pasteur.fr), the Centre National de la
5 Recherche Scientifique (CNRS; www.cnrs.fr), the Institut National de la Santé Et de la
6 Recherche Médicale (INSERM; www.inserm.fr), and the Institut Carnot – Pasteur Maladies
7 Infectieuses (STING program to POV and HML). SK was funded by the Direction Générale
8 de l’Armement (www.defense.gouv.fr/dga) and the Institut Pasteur.

9

10 **Conflict of interest**

11 The authors declare no conflict of interest.

12

13

1 **References**

- 2 [1] E. De Clercq, G. Li, Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years, *Clin Microbiol*
3 *Rev* 29(3) (2016) 695-747.
- 4 [2] Y. Debing, J. Neyts, L. Delang, The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors, *Curr*
5 *Opin Infect Dis* 28(6) (2015) 596-602.
- 6 [3] J.P. Martinez, F. Sasse, M. Bronstrup, J. Diez, A. Meyerhans, Antiviral drug discovery:
7 broad-spectrum drugs from nature, *Nat Prod Rep* 32(1) (2015) 29-48.
- 8 [4] S. Es-Saad, N. Tremblay, M. Baril, D. Lamarre, Regulators of innate immunity as novel
9 targets for panviral therapeutics, *Curr Opin Virol* 2(5) (2012) 622-8.
- 10 [5] M. Lucas-Hourani, H. Munier-Lehmann, O. Helynck, A. Komarova, P. Despres, F.
11 Tangy, P.O. Vidalain, High-throughput screening for broad-spectrum chemical inhibitors of
12 RNA viruses, *J Vis Exp* (87) (2014).
- 13 [6] H. Henrik Gad, S. Paulous, E. Belarbi, L. Diancourt, C. Drosten, B.M. Kummerer, A.E.
14 Plate, V. Caro, P. Despres, The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in
15 OAS3 expressing cells by acting on viral entry, *Virology* 434(1) (2012) 27-37.
- 16 [7] A.V. Komarova, C. Combredet, L. Meyniel-Schicklin, M. Chapelle, G. Caignard, J.M.
17 Camadro, V. Lotteau, P.O. Vidalain, F. Tangy, Proteomic analysis of virus-host interactions
18 in an infectious context using recombinant viruses, *Mol Cell Proteomics* 10(12) (2011) M110
19 007443.
- 20 [8] C. Combredet, V. Labrousse, L. Mollet, C. Lorin, F. Delebecque, B. Hurtrel, H. McClure,
21 M.B. Feinberg, M. Brahic, F. Tangy, A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus
22 vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice, *J Virol* 77(21)
23 (2003) 11546-54.
- 24 [9] H. Munier-Lehmann, P.O. Vidalain, F. Tangy, Y.L. Janin, On dihydroorotate
25 dehydrogenases and their inhibitors and uses, *J Med Chem* 56(8) (2013) 3148-67.

1 [10] C.P. Shah, P.S. Kharkar, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors as
2 antimicrobial agents: recent progress and future perspectives, *Future Med Chem* 7(11) (2015)
3 1415-29.

4 [11] Q. Zhang, Y. Liu, F. Gao, Q. Ding, C. Cho, W. Hur, Y. Jin, T. Uno, C.A. Joazeiro, N.
5 Gray, Discovery of EGFR selective 4,6-disubstituted pyrimidines from a combinatorial
6 kinase-directed heterocycle library, *J Am Chem Soc* 128(7) (2006) 2182-3.

7 [12] R. Gozalbes, L. Simon, N. Froloff, E. Sartori, C. Monteils, R. Baudelle, Development
8 and experimental validation of a docking strategy for the generation of kinase-targeted
9 libraries, *J Med Chem* 51(11) (2008) 3124-32.

10 [13] V. Gandin, A. Ferrarese, M. Dalla Via, C. Marzano, A. Chilin, G. Marzaro, Targeting
11 kinases with anilinopyrimidines: discovery of N-phenyl-N'-[4-(pyrimidin-4-
12 ylamino)phenyl]urea derivatives as selective inhibitors of class III receptor tyrosine kinase
13 subfamily, *Sci Rep* 5 (2015) 16750.

14 [14] F. Keck, P. Ataey, M. Amaya, C. Bailey, A. Narayanan, Phosphorylation of Single
15 Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies, *Viruses* 7(10)
16 (2015) 5257-73.

17 [15] J.A. Keating, R. Striker, Phosphorylation events during viral infections provide potential
18 therapeutic targets, *Rev Med Virol* 22(3) (2012) 166-81.

19
20

1 **Figure Legends**

2 **Fig. 1. Chemical series of compounds identified as MeV and CHIKV replication**
3 **inhibitors.** For each compound, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was
4 determined for MeV and CHIKV using recombinant viral strains expressing firefly luciferase
5 for MeV (rMV-Luc2) or Renilla luciferase for CHIKV (CHIKV-Ren). HEK-293T cells were
6 infected with rMV-Luc2 (MOI=0.1) or CHIKV-Ren (MOI=0.2), and cultured with increasing
7 concentrations of indicated compounds or DMSO alone. After 24 hours of culture, luciferase
8 expression was determined, and IC₅₀ was defined as compound concentrations inhibiting
9 50% of the luciferase activity when compared to DMSO-treated wells. The half maximal
10 cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by quantification of ATP in culture as a
11 marker of cellular metabolic activity using the CellTiter-Glo reagent (Promega). Uninfected
12 HEK-293T cells were treated with increasing concentrations of indicated compounds, and
13 cellular viability was determined after 24 hours of treatment. CC₅₀ was defined as compound
14 concentrations decreasing cellular viability by 50%.

15
16 **Fig. 2. Antiviral activity of ChX77 against CoxB3 and selectivity index against MeV. (A)**
17 HEK-293T or A549 cells were infected with CoxB3 (MOI=0.01), and incubated with DMSO
18 alone or ChX77 at 10 μ M. After 24 hours, cell cultures were harvested after freezing and
19 thawing of the plates. Supernatants were recovered, clarified by centrifugation and titrated by
20 TCID₅₀. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. **(B)** HEK-
21 293T cells were infected with rMV-Luc2 (MOI=0.1) and cultured with increasing
22 concentrations of ChX77 or DMSO alone. After 24 hours of culture, luciferase expression
23 was determined. In parallel, HEK-293T cells were treated with increasing concentrations of
24 ChX77 or DMSO alone. After 24 hours of culture, cellular viability was determined by ATP

1 quantification in culture wells using the CellTiter-Glo reagent. (C) Bright-field microscopy of
2 HEK-293T cells treated with ChX77 at 0,1 μ M, 1 μ M or 10 μ M or DMSO alone.

3

4 **Fig. 3. Structure activity relationships to determine the minimal active structure.**

5 Depicted chemical analogs of ChX77 were analyzed to determine their antiviral activity
6 against MeV (IC₅₀) and toxicity (CC₅₀) as described above.

7

8 **Fig. 4. Time-of-addition experiment demonstrating that ChX54 is not a specific inhibitor**

9 **of viral entry.** ChX54 (10 μ M) or DMSO alone was applied 3 hours prior, concomitantly, or
10 3 hours post infection by rMV-Luc2 (MOI=0.1), and the maintained in culture medium. Cells
11 were cultured for 24 hours, and luciferase expression was determined. Experiment was
12 performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD.

13

14 **Fig. 5. ChX54 is not an inhibitor of DHODH or IMPDH. (A)** HEK-293T cells were

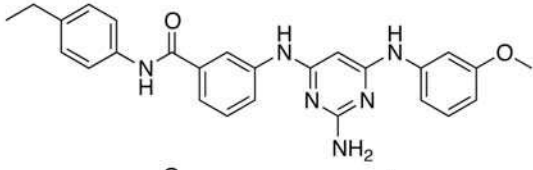
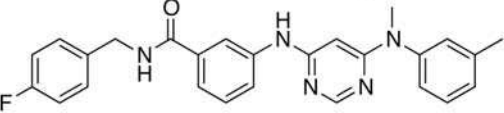
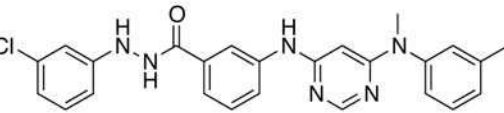
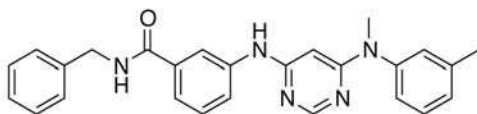
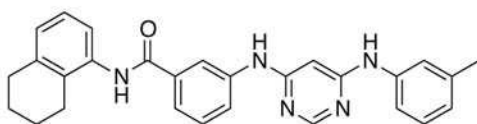
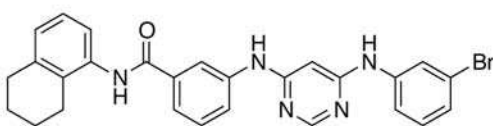
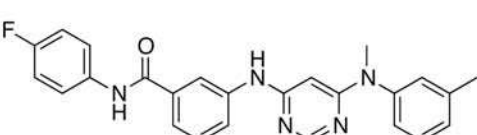
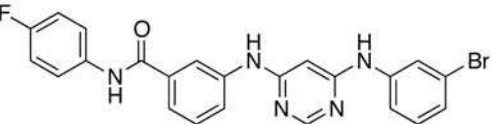
15 infected with rMV-Luc2 and treated with ChX54, mycophenolic acid or brequinar in the
16 presence or absence of uridine. Cells were cultured for 24 hours, and luciferase expression
17 was determined. **(B)** Same experiment as in (A), but cells were cultured in the absence or
18 presence of guanosine. All experiments were performed in triplicate, and data represent
19 means $\pm$ SD.

20

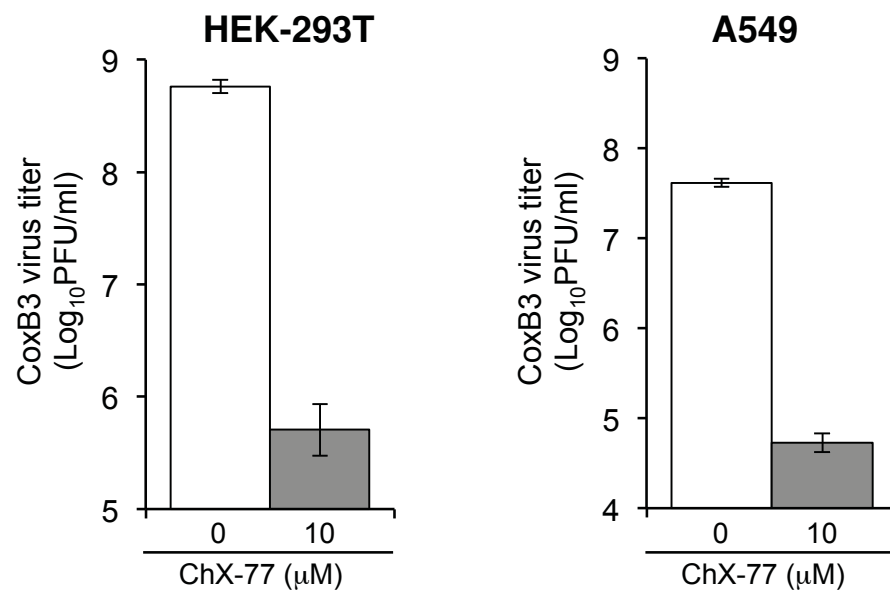
21 **Fig. 6. ChX54 is a kinase inhibitor.** ChX54 was tested for its capacity to inhibit kinase

22 interactions with their ligands using the KINOMEscan platform (DiscoverX). Human cellular
23 kinases are displayed on a phylogenetic tree where sectors correspond to different kinase
24 families, and highlighted in red when inhibited by ChX54 (<40% of control). Node size is
25 proportional to the level of inhibition, and main targets of ChX54 are also enlisted in the

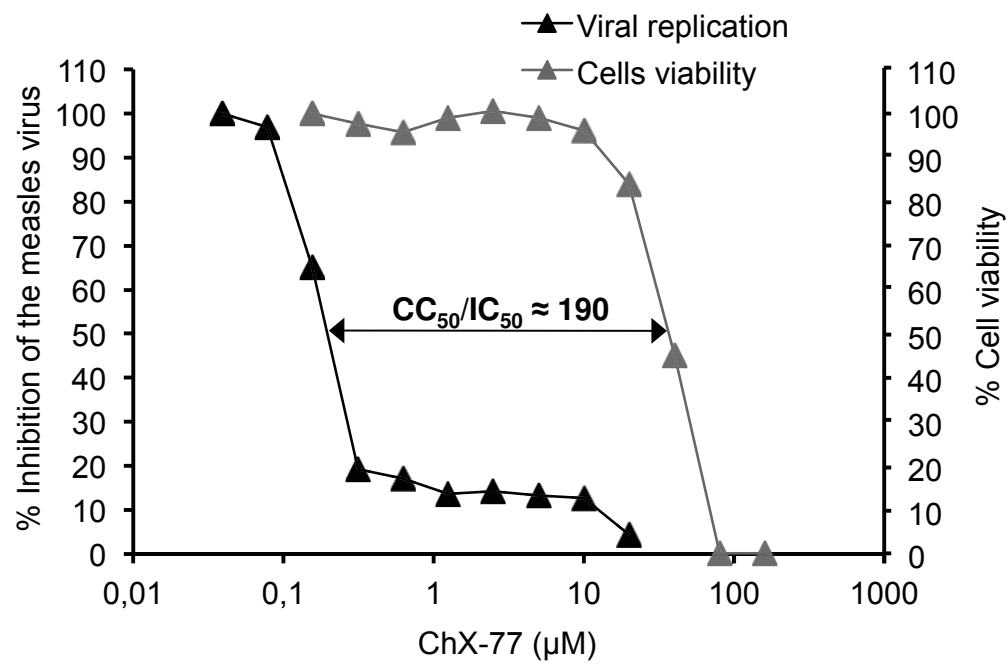
1 lower left table. The dendrogram image was generated using the TREEspotTM Software Tool
2 and reprinted with permission from KINOMEscan©, a division of DiscoveRx Corporation, ©
3 DISCOVERX CORPORATION 2010.
4

Compound ID	Structures	MeV (IC50 μ M)	CHIKV (IC50 μ M)	Toxicity (CC50 μ M)
263864		0.6	0.6	> 20
263877 (ChX77)		0.2	0.2	> 20
263957		1.2	1.2	> 20
263963		1.2	0.9	> 20
263967		1.7	1.6	> 20
272265		0.25	0.3	> 20
272350		0.4	0.5	> 20
272270		0.5	0.5	> 20
272348		0.25	0.3	> 20

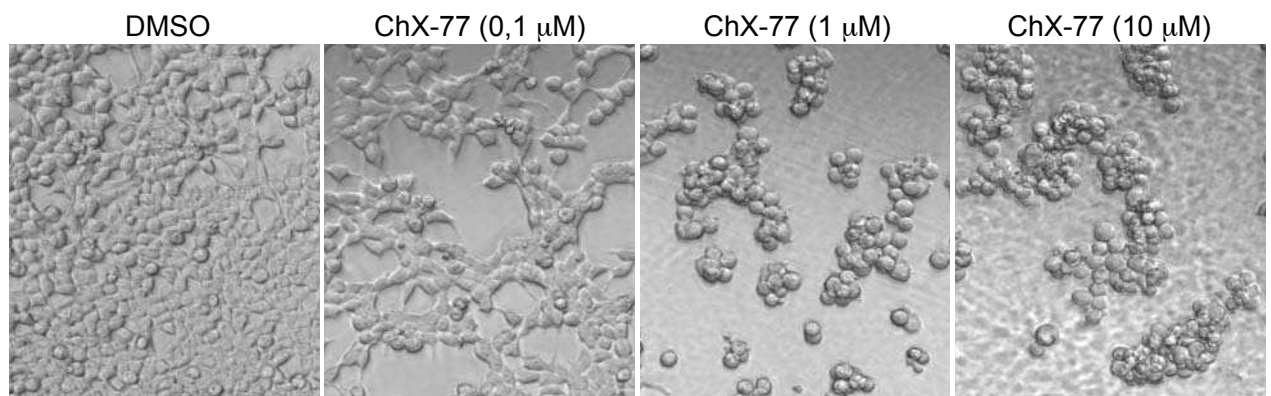
A

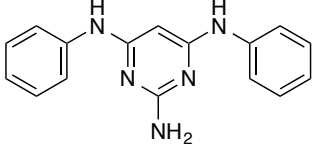
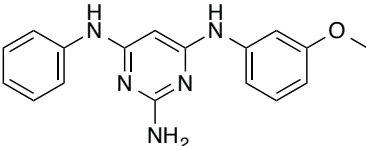
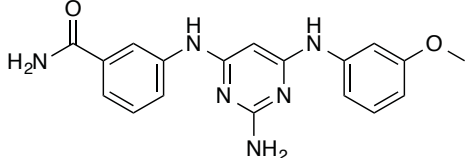
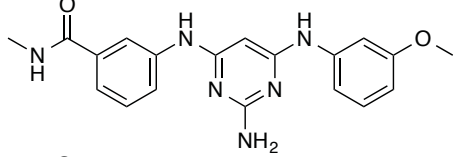
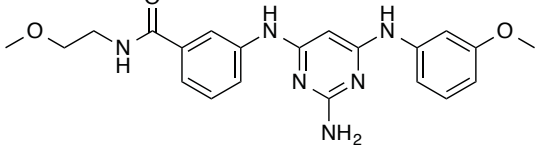
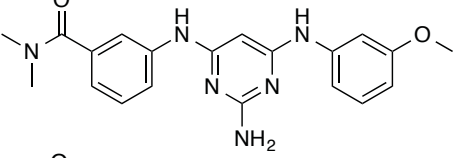
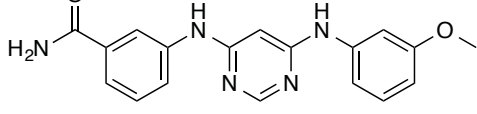


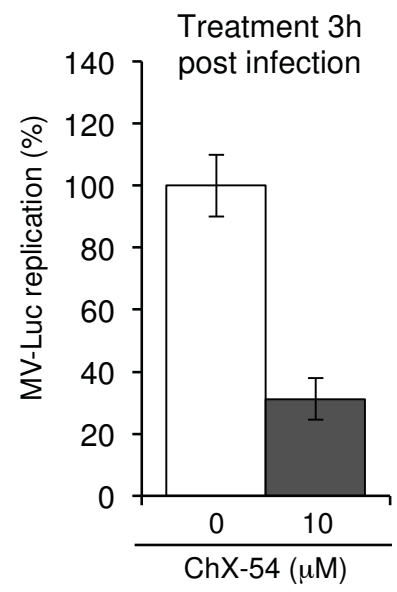
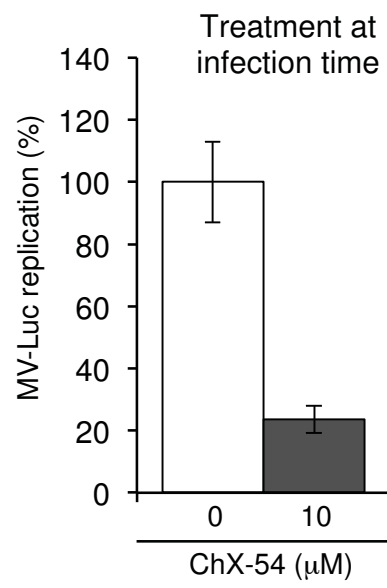
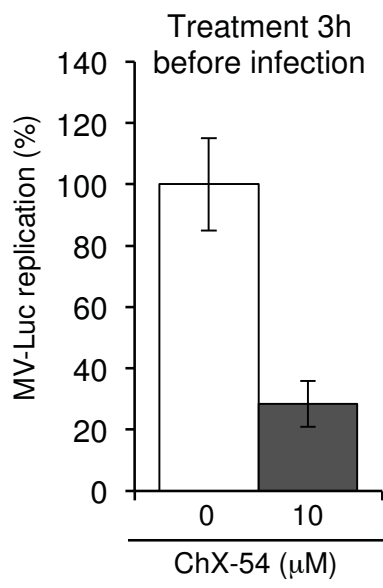
B



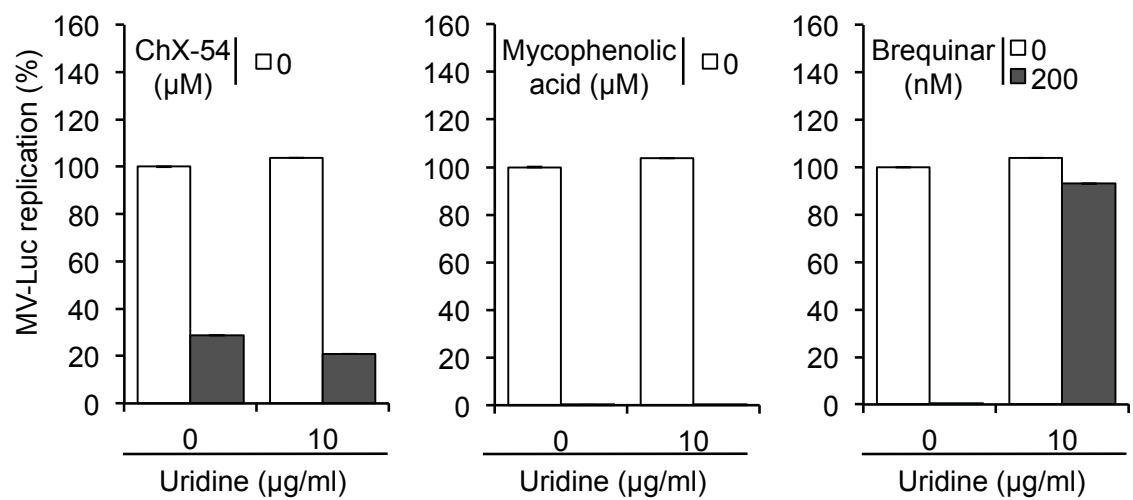
C



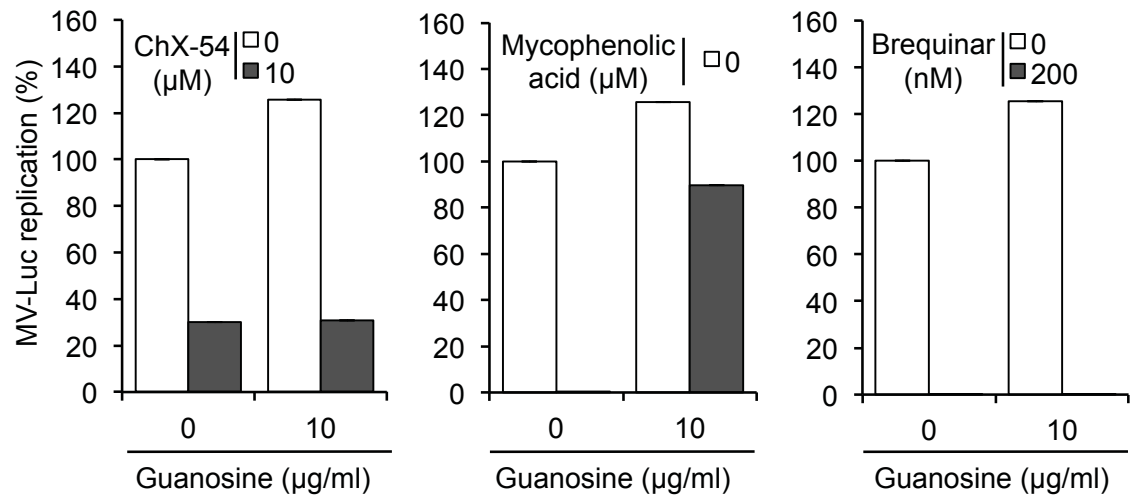
Compound ID	Structures	MV (IC50 μM)	Toxicity (CC50 μM)
CER0306737		> 20	> 20
CER0306729		4.5	> 20
CER0306728		3.5	> 20
CER0306733		0.8	> 20
CER0263854 (ChX54)		0.8	> 20
CER0306735		4.5	> 20
CER030631		> 20	> 20

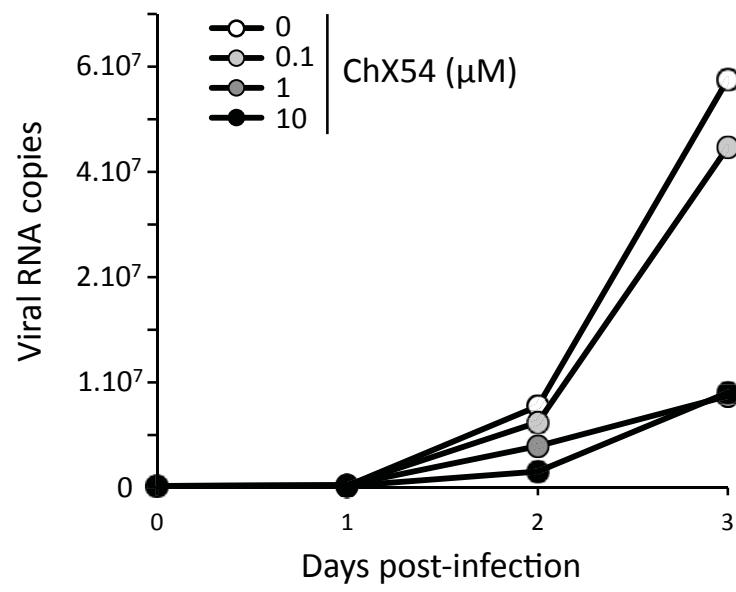


A



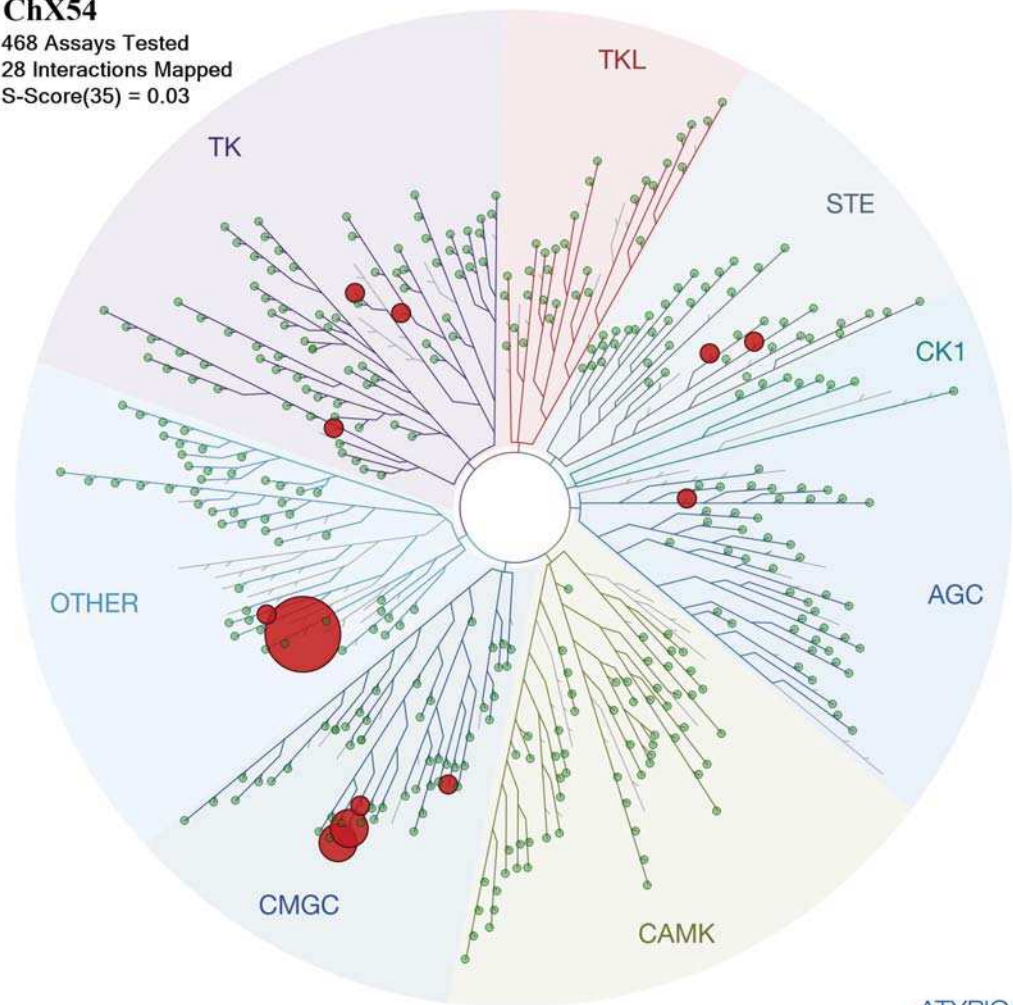
B



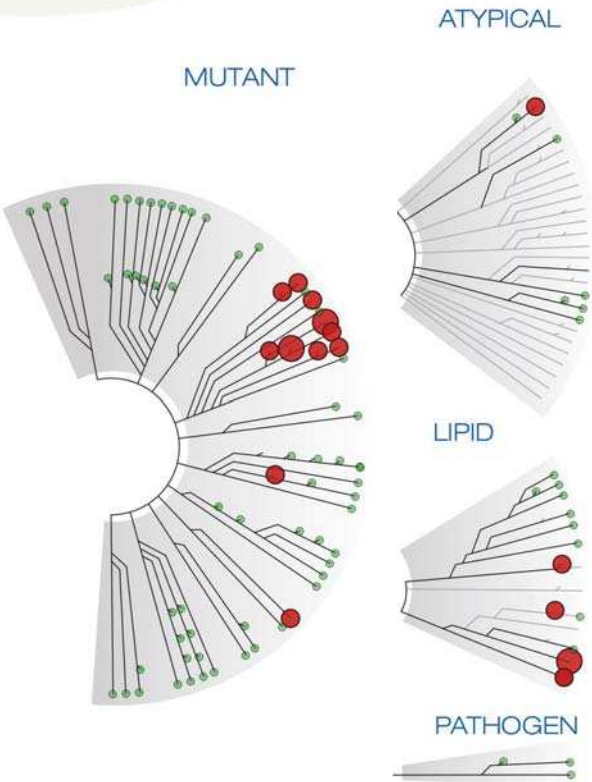


ChX54

468 Assays Tested
28 Interactions Mapped
S-Score(35) = 0.03



Tested Kinase	Inhibition (%)
WNK2	0
EGFR(G719S)	14
PIP5K1C	15
EGFR(S752-I759del)	16
PIKFYVE	16
EGFR(L747-S752del, P753S)	17
EGFR(G719C)	18
EGFR(L747-E749del, A750P)	20
JNK2	20
EPHA1	21
EGFR(L861Q)	22
TTK	22
PIK4CB	23
ERBB3	24
MEK5	25
TYK2(JH2domain)	26
EGFR(L858R)	27
CIT	29
LRRK2(G2019S)	29
ADCK3	30
CLK4	31
FLT3(ITD,D835V)	32
MEK4	35
DYRK1A	36
STK39	37
ERBB4	39
NEK10	39
PIK3CA(H1047L)	39





Discussion

Discussion

Afin de développer des antiviraux à large spectre ciblant l'hôte, deux systèmes de criblage distincts ont été mis au point au laboratoire. Le premier test visant à identifier des molécules actives contre un large panel de virus à ARN est basé sur la combinaison d'infections *in vitro* par les virus recombinants de la rougeole (rMV2/Luc) et du chikungunya (CHIK/Ren) exprimant la luciférase comme rapporteur de la réplication virale. Le deuxième test, quant à lui, a pour but d'isoler des molécules ayant des propriétés immunostimulatrices et pour cela, les composés sont incubés avec des cellules humaines transfectées par un gène rapporteur ISRE-luciférase. Ces deux tests ont été alors utilisés afin de cribler deux chimiothèques non biaisées de 10.000 et 4.640 composés obtenues respectivement auprès de la société Chem-X-Infinity et du Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie (CERMN, Caen). Les résultats ont permis d'identifier trois molécules appartenant à différentes familles chimiques : ChX77, sr1057 et ChX79. Mon travail thèse a permis de préciser la structure minimale active pour chacune de ces trois séries de molécules en testant différents analogues chimiques, de tester l'activité antivirale de ces composés sur différents virus disponibles au laboratoire et enfin, d'avancer dans la compréhension de leur mode d'action.

1 Caractérisation de deux molécules antivirales à large spectre de cible inconnue

Parmi les 14.640 composés testés, ChX77 (Chem-X-Infinity) et sr1057 (CERMN, Caen) ont été sélectionnés lors du criblage initial pour leur effet inhibiteur sur la réplication à la fois du virus de la rougeole et celui du chikungunya. Ces deux molécules appartiennent à deux familles chimiques bien distinctes. ChX77 est une triaminopyrimidine et sr1057, quant à elle, est une pyrroloquinoxaline.

ChX77

Dans un premier temps, ChX77 a été retesté afin de confirmer son activité antivirale contre le virus de la rougeole (Virus à ARN à polarité négative enveloppé)

et le virus du chikungunya (Virus à ARN à polarité positive enveloppé). Ensuite, l'indice de sélectivité de ChX77 (rapport CC_{50}/IC_{50}) a été évalué sur des cellules HEK-293T en utilisant le test d'infection par le virus de la rougeole recombinant (rMV2/Luc) et un test de viabilité cellulaire permettant de quantifier l'ATP reflétant les cellules métaboliquement actives présentes dans le puits. Ainsi, les résultats ont permis de déterminer un très bon indice de sélectivité qui a été estimé à 190. Toutefois, et même à des concentrations proches de l' IC_{50} de la molécule, les cellules traitées par ChX77 présentent des formes arrondies et se détachent du fond du puits, tandis que la viabilité cellulaire n'est pas affectée. De tels changements morphologiques observés dans les cultures de cellules traitées par ChX77 sont une preuve que les fonctions cellulaires sont affectées. De façon très intéressante, les résultats ont montré que ChX77 est également fortement actif contre un troisième virus à ARN: le virus coxsackie B3. De plus, cet effet antiviral a été montré *in vitro* sur deux lignées cellulaires distinctes : les cellules HEK-293T et les cellules A549. Le virus coxsackiev B3 étant un virus à ARN de polarité positive non enveloppé, contrairement aux virus de la rougeole et du chikungunya, nos résultats montrent que ChX77 est actif à la fois sur des virus à ARN enveloppés et non-enveloppés. En outre, lors d'une collaboration avec l'équipe de Sylvain Baize (laboratoire P4; Lyon), ChX77 n'a pas montré d'effet antiviral contre le virus de Lassa, mais il s'est révélé actif contre le virus Ebola *in vitro* dans les cellules A549. Les résultats obtenus nous confortent ainsi dans l'idée d'une activité antivirale à large spectre, et suggèrent que ChX77 appartient à la classe des antiviraux ciblant l'hôte. Toutefois, une étude de pharmacocinétique chez la souris a permis d'estimer la demi-vie de la molécule à 13 min après injection intraveineuse, ce qui constitue un facteur limitant pour l'évaluation de ses effets antiviraux *in vivo*. Il est donc indispensable d'améliorer la pharmacodynamique de cette molécule avant d'envisager de passer aux tests *in vivo* chez la souris.

Lors d'une étude de relation structure/activité, nous avons identifié un groupement commun à ChX77 et tous ses analogues actifs : le groupement N^4, N^6 -diphenylpyrimidine-4,6-diamine. De façon intéressante, plusieurs travaux ont déjà décrit des interactions entre ce groupement avec le site de liaison à l'ATP de nombreuses kinases [305-307]. Plus précisément, les composés structurellement similaires à ChX77 ont été précédemment caractérisés comme des inhibiteurs de tyrosine kinases (TK), ciblant en particulier EGFR (Epidermal Growth Factor

Receptor) et d'autres récepteurs de tyrosine kinases (RTK). Il est donc fort probable que ChX77 et ses analogues inhibent les TKs cellulaires. A l'avenir, nous souhaitons réaliser une analyse par « kinome scan » pour identifier la ou les cibles du ChX77. Cette analyse, qui sera réalisée en prestation de service (DiscoverX), permettra de tester la capacité de la molécule ChX77 à inhiber la liaison de 480 kinases humaines purifiées à leur ligand. De façon intéressante, les inhibiteurs spécifiques de TK ont été décrits comme étant des inhibiteurs de la réplication de différents virus, y compris le virus de la grippe (Orthomyxoviridae), les virus Nipah et Sendai (Paramyxoviridae), virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1; Herpesviridae), le virus de l'hépatite de la souris (coronavirus), rotavirus rhésus (Reoviridae), les virus de la dengue et du Nil occidental (Flaviviridae), les virus Ebola et Marburg (Filoviridae), et le virus Lassa (Arenaviridae). Ces observations confortent notre hypothèse selon laquelle ChX77 inhiberait la réplication de différents virus en bloquant l'activité d'une ou plusieurs kinases cellulaires. En conclusion, l'excellent indice de sélectivité du ChX77 fournit une piste intéressante pour le développement de composés antiviraux à large spectre. Cependant, une importante optimisation pharmacologique est encore nécessaire, ainsi qu'une évaluation précise de leur toxicité, en particulier si leur mode d'action repose effectivement sur l'inhibition d'un ou plusieurs kinases humaines.

Sr1057

Dans un premier temps, tout comme pour ChX77, le sr1057 a été retesté afin de confirmer son activité antivirale contre le virus de la rougeole et le virus du chikungunya. Ensuite, son index de sélectivité (CC50/IC50) a été estimé à 17 sur des cellules HEK-293T, ce qui reste relativement faible comparé à celui de ChX77. Toutefois, sr1057 s'est révélé efficace contre le virus Ebola *in vitro* dans les cellules HEK-293T (Collaboration avec l'équipe de Sylvain Baize, laboratoire P4; Lyon). Plus intéressant encore, des travaux réalisés au Labéo par l'équipe de Stéphane Pronost (Université de Caen, UNICAEN) ont montré tout d'abord l'effet inhibiteur du sr1057 sur différents herpèsvirus équin (EHV-1 à 4), puis des travaux effectués au sein de notre laboratoire par Marianne Lucas-Hourani ont révélé que sr1057 est également actif contre les herpèsvirus humains de type 1 (HSV1 ; herpès labial) et 2 (HSV2 ; herpès génital) dans des cellules A549. L'ensemble de ces résultats montre que le

sr1057 est non seulement actif contre des virus à ARN mais aussi contre des virus à ADN, ce qui en fait une molécule antivirale à large spectre qui ciblerait probablement l'hôte car elle a la capacité d'inhiber des virus de familles complètement différentes. Toutefois, le facteur limitant demeure la demi-vie de cette molécule. En effet, l'administration chez la souris en intraveineuse de sr1057 a permis de déterminer une demi-vie de 9 min. De plus, une étude de la stabilité métabolique de la molécule sur des microsomes de foie a permis d'estimer sa demi-vie à seulement 6 min, ce qui suggère que sr1057 est très rapidement dégradé *in vivo*. Il est donc essentiel d'améliorer sa pharmacodynamique avant d'envisager toute étude de son activité antivirale *in vivo* chez la souris. En revanche, son mode d'action est complètement inconnu à ce jour.

En conclusion, l'utilisation d'un test de criblage fonctionnel nous a permis d'identifier des molécules actives contre différents virus à ARN, telles que le composé ChX77, mais aussi d'isoler une molécule, le sr1057, active à la fois contre différents virus à ARN et contre des virus à ADN. Si cette approche présente de nombreux avantages (test cellulaire à haut débit, approche non biaisée), identifier la cible des molécules antivirales ainsi sélectionnées reste un véritable défi. Ainsi, l'étude de leur mode d'action implique de tester un nombre important d'hypothèses sans garanti de résultats dans un délais raisonnable. C'est en partie ce constat qui m'a amené à concentrer plus particulièrement mes efforts sur un composé identifié pour sa capacité immunostimulatrice grâce au second système de criblage mis en place au laboratoire. Dans ce test, c'est la réponse IFN et l'induction du promoteur ISRE qui sont ciblés. Dans ce cas, le nombre d'hypothèses concernant les cibles potentielles de la molécule sélectionnée est alors plus restreint, car notre connaissance des mécanismes impliqués dans la régulation de cette voie est importante.

2 ChX710 : une composé immunostimulateur inducteur de stress cellulaire.

La seconde approche développée au laboratoire pour identifier des molécules antivirales repose sur la recherche de composés capables de stimuler l'expression des ISGs et la réponse cellulaire antivirale. En criblant la Chimiothèque Nationale à

l'aide d'une lignée rapportrice exprimant la luciférase sous contrôle d'éléments de réponse ISRE, soit environ 54.000 molécules, plusieurs composés capables d'amplifier la réponse cellulaire aux ARN 5'-triphosphates et aux IFN- α/β ont été isolés. Ces molécules présentent par ailleurs une puissante activité antivirale à large spectre *in vitro*. Par la suite, l'étude de leur mode d'action a montré qu'il s'agissait d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines, ce qui a permis d'établir pour la première fois un lien entre cette voie métabolique et la réponse immunitaire innée antivirale.

En utilisant ce même test cellulaire, le criblage d'une chimiothèque originale de 10.000 molécules a permis l'identification du composé ChX79. Cette molécule n'active pas d'autres gènes rapporteurs que le ISRE-luciférase, ce qui confirme la spécificité de l'activation observée. Par ailleurs, nous avons montré par RT-qPCR que sur un panel de 11 gènes induits par les IFNs de type I (Interferon-Stimulated Genes ou ISGs), seuls certains sont significativement activés par ChX79 (IFI27, IFI6) dans des cellules HEK-293T, A549 ou Vero. Cependant, et contrairement aux interférons de type I, l'effet inducteur du ChX79 ou de son analogue ChX710 reste modeste, mais aussi variable d'un type cellulaire à l'autre. Enfin, nous avons observé la phosphorylation d'IRF3 sur la sérine 386 dans les cellules traitées par ChX710. L'ensemble de ces observations confirme l'activation d'un programme cellulaire lié à la réponse interféron et à l'immunité innée. Toutefois, les niveaux de phosphorylation d'IRF3 (ou les résidus phosphorylés) sont probablement insuffisants pour induire la synthèse d'IFN- β dans un contexte où NF- κ B reste inactif, empêchant ainsi l'assemblage d'un enhanceosome complet. Les expériences réalisées avec un gène rapporteur NF- κ B-Luciférase (Fig. 1D), mais également des expériences de localisation subcellulaire par immunofluorescence, montrent en effet que le facteur de transcription NF- κ B n'est pas activé par le composé ChX710. En revanche, cette molécule amplifie la réponse cellulaire à de l'ADN exogène en induisant la production de quantités importantes d'IFN- β en réponse à des doses suboptimales d'ADN plasmidique qui seules, sont pratiquement sans effet. Ce composé est donc capable d'amplifier la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique, et agirait sur la cascade de signalisation dépendante de STING.

Le test fonctionnel mis en place au laboratoire a ainsi permis l'identification de composés capables d'amplifier la réponse cellulaire à différents PAMPs, qu'il

s'agisse d'ARN 5'-triphosphates pour les inhibiteurs de la voie de biosynthèse des pyrimidines ou d'ADN cytosolique pour le ChX710. Ces résultats établissent une preuve de concept, démontrant ainsi qu'il est possible de stimuler la détection des PAMPs, la réponse immunitaire innée et la cascade des IFNs de type I à l'aide de petites molécules chimiques. Pour les inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines, la cible des composés isolés au laboratoire a été clairement identifiée. Il s'agit de la dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), la quatrième enzyme de cette voie métabolique. En revanche, la cible cellulaire des composés de la famille du ChX710 reste à identifier, même si son mode d'action a pu être précisé.

3 Quel mode d'action pour cette famille de composés ?

En étudiant l'activité de 50 analogues des composés ChX79 et ChX710, nous avons précisé la structure minimale active. Une recherche par homologie de structures montre que plusieurs composés proches, dérivés du 1H-benzimidazole-4-carboxamide, sont des inhibiteurs des poly (ADP-ribose) polymérases (PARPs). Ces enzymes jouent un rôle important dans la détection des cassures dans l'ADN cellulaire, et le recrutement de la machinerie de réparation [308]. Nous avons donc testé l'effet d'un inhibiteur de PARP proche du ChX710 sur le plan structural, le véliparib, sur l'expression du gène rapporteur ISRE-luciférase. Aucune induction n'a été observée, suggérant que les protéines cellulaires PARP ne sont pas la cible du composé ChX710. Par ailleurs, d'autres composés structuralement proches du ChX710 ont également été décrits pour leur effet inhibiteur sur la réplication des entérovirus [309]. Leur mode d'action est inconnu, mais nous avons néanmoins testé l'effet de la plus active de ces molécules (Composé 16) dans notre test cellulaire. Là encore, aucune induction du gène rapporteur ISRE-luciférase n'a été observée, suggérant qu'il n'existe pas de liens fonctionnels entre ces différentes observations. En conclusion, la recherche de molécules proches du composé ChX710 sur le plan structural n'a pas permis jusqu'à présent d'identifier sa cible. A l'avenir, la structure minimale active pourra encore être précisée par l'analyse de nouveaux analogues, ce qui permettrait ainsi d'interroger à nouveau les bases de données de molécules actives telles que SciFinder ou PubChem. Néanmoins, et à notre connaissance, c'est

la première fois qu'une activité immunostimulatrice est décrite pour cette famille de molécules.

4 ChX710, un facteur de stress qui altère le processus de traduction

La réponse au stress cellulaire est essentielle à la protection de la cellule et au maintien de son intégrité face aux stress de différentes origines tels que le choc thermique, les lésions de l'ADN, le stress oxydatif, la privation en nutriments ou encore l'effet délétère des toxines environnementales. Toutefois, ce processus apparaît désormais comme un élément clé dans la modulation de l'immunité innée [310]. Dans ce travail, nous avons montré que le composé ChX710 possède non seulement des propriétés immunostimulatrices, mais aussi une forte cytotoxicité associée à l'induction d'un programme de stress cellulaire intégré notamment caractérisé par plusieurs marqueurs liés à la traduction.

Dans un premier temps, nous avons observé un remodelage des nucléoles ainsi qu'un blocage de la synthèse des ARN pré-ribosomiaux. Ces résultats suggèrent que ChX710 inhibe la synthèse *de novo* des ribosomes. Dans les cellules traitées par cette molécule, nous avons également mis en évidence la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , la formation de granules de stress et la condensation des P-bodies, ce qui est associé à un blocage de la traduction des ARNm dans le cytoplasme. Plusieurs voies de signalisation peuvent conduire ainsi à la phosphorylation d'eIF2 α , ainsi qu'à l'accumulation ou la dégradation des ARNm dans les granules de stress et les P-bodies. Ces voies impliquent notamment la kinase PKR activée par les ARN bicaténaires, HRI qui est induite par le stress oxydant associé à l'arsénite, GCN2 qui est activée par un stress trophique, et enfin PERK qui est mobilisée par un stress du réticulum endoplasmique (RE) [172]. Nous devons encore déterminer lesquelles de ces kinases sont activées par le ChX710 pour phosphoryler eIF2 α . Cependant, un faisceau d'éléments nous a conduit à étudier plus spécifiquement le stress du RE. Tout d'abord, une littérature abondante montre que celui-ci est associé à l'induction ou l'amplification de la réponse immunitaire innée et la synthèse d'IFN-I. Notamment, des composés inhibiteurs de la maturation des protéines dans le RE, notamment la tunicamycine

qui bloque la N-glycosylation des protéines, induisent la phosphorylation d'IRF3, et agissent en synergie avec les PAMPs pour induire l'expression des ISGs et des IFN de type I [311]. En outre, une recherche sur PubChem nous a permis d'identifier, dans la chimiothèque du National Cancer Institute, une molécule très proche du ChX710 : le composé NSC698932. Cette molécule était annotée comme un hit identifié lors d'un crible pour des inhibiteurs de la N-glycosylation. Si on ajoute la présence de la protéine STING à la membrane du RE, ces différents éléments désignent la synthèse protéique dans le RE comme une cible potentielle pour le composé ChX710.

La lumière du RE constitue le compartiment cellulaire où a lieu la synthèse, les modifications, le repliement et la maturation des protéines sécrétées, des protéines de la membrane plasmique et des organites intracellulaires. Ainsi, les protéines nouvellement synthétisées subissent alors des contrôles de qualité stricts afin d'assurer leur bon repliement aboutissant ainsi à une protéine fonctionnelle qui sera acheminée vers sa destination finale. Les protéines mal repliées qui s'accumulent dans la lumière du RE sont prises en charge par les protéines chaperonnes, la plus connue d'entre elle étant la Binding Immunoglobulin Protein (BIP), aussi désignée sous le nom de Glucose Regulated Protein 78 (GRP78). GRP78 va alors redonner une conformation correcte à la protéine ou à défaut la réorienter vers la dégradation [312, 313]. Par ailleurs, de nombreuses protéines chaperonnes et des enzymes impliquées dans le repliement des protéines sont dépendantes du calcium. Le RE est ainsi doté de pompes calciques dépendantes de l'ATP ancrées dans sa membrane, faisant de cet organite le principal site de réserve calcique de la cellule. L'enzyme PDI (« Protein Disulfide Isomerase ») participe également au bon repliement des protéines par la création de ponts disulfures dans la lumière du RE [314]. Cependant, la perturbation de la maturation protéique, aboutissant à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, va être à l'origine du stress du RE. Plusieurs sources de stress peuvent perturber la maturation des protéines telles que :

- Une production accrue d'espèce réactive de l'oxygène ou ROS (« reactive oxygen species ») peut perturber la formation des ponts dissulfures. L'enzyme PDI a pour fonction de remanier ces liaisons S-S afin d'aboutir à un repliement correct des protéines, mais la mobilisation de cette enzyme conduit également à augmenter le stress oxydant.

- les troubles de l'homéostasie du calcium intra-réticulaire qui peuvent être induits par des inhibiteurs des ATPases calciques tels que la thapsigargine,
- la carence en glucose ou encore les anomalies de glycosylation des protéines qui peuvent être causées par la tunicamycine ou certains inhibiteurs enzymatiques qui inhibent les processus de maturation post-traductionnelle des protéines natives induisant ainsi leur accumulation.

Dans ces conditions, la fonction du RE va être alors altérée, empêchant ainsi le bon repliement des protéines et leur acheminement vers l'appareil de Golgi. Leur accumulation dans la lumière du RE déclenche alors une réponse adaptative appelée UPR pour (Unfolded Protein Response) regroupant plusieurs voies de signalisation qui, une fois activées, vont agir de concert afin de rétablir *in fine* une fonction normale du RE d'une part en réduisant la synthèse protéique globale pour éviter l'accumulation de protéines nouvellement synthétisées dans la lumière du RE. Cette réponse s'accompagne d'une part de la synthèse des protéines chaperonnes permettant le bon repliement des protéines, et d'autre part d'une augmentation de l'activité de dégradation protéosomale. Toutefois, si le stress en se dissipe pas, la cellule va mourir suite à l'activation des voies d'apoptose [315].

La réponse UPR est constituée de trois voies de signalisation impliquant trois protéines transmembranaires : IRE1 α (Inositol Requiring Enzyme 1 α), le facteur de transcription ATF6 (Activated Transcription Factor 6) et la protéine kinase PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase). Lors d'un stress du RE, BiP, un régulateur essentiel de la réponse UPR, se lie aux protéines mal repliées qui se sont accumulées dans la lumière du RE et les réorientent vers la voie ERAD (Endoplasmic-Reticulum Associated Degradation) pour être dégradées par le protéasome. BiP libère ainsi les facteurs impliqués dans la réponse UPR : ATF6, IRE1 α et PERK [316] (Figure 1).

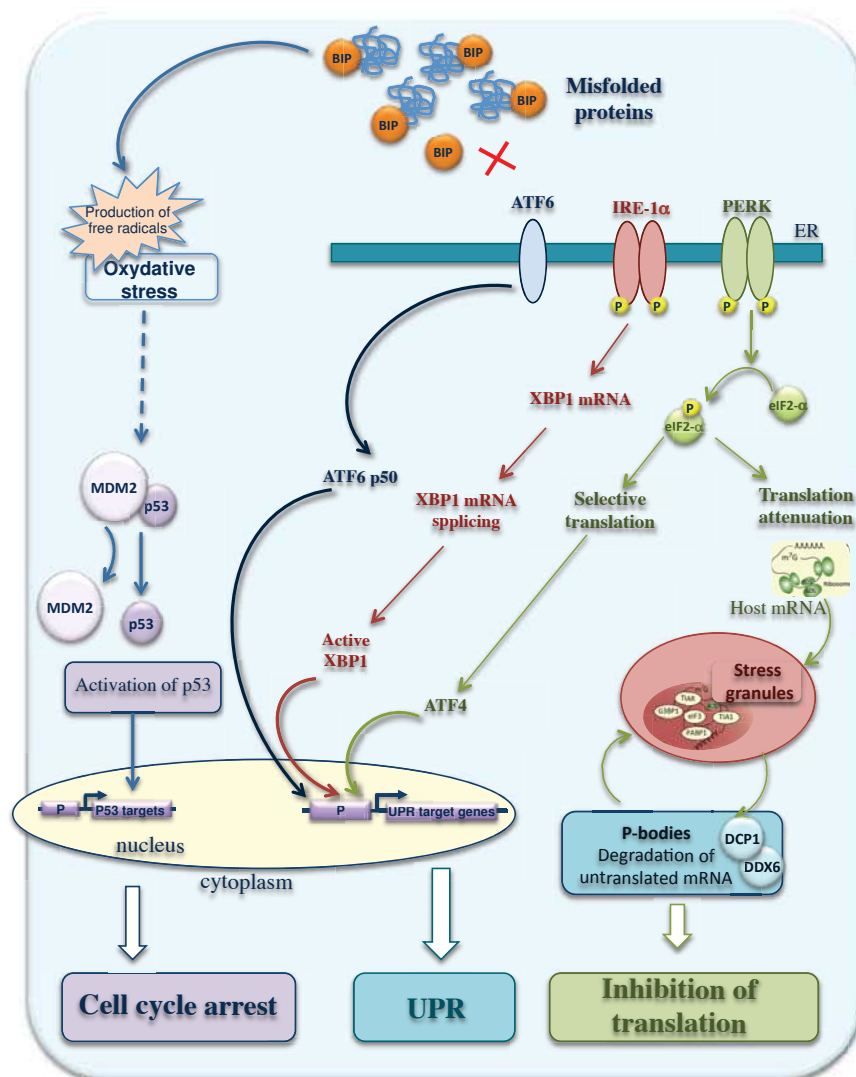


Figure 1 : les voies activées lors de la réponse UPR.

Au laboratoire, nous avons étudié l'effet du ChX710 sur deux marqueurs de la réponse UPR : l'induction de BiP/GRP78 et l'épissage de XBP1 par IRE-1 α . Les résultats obtenus montrent que le ChX710 n'induit ni l'expression de BiP/GRP78, ni l'épissage de XBP1, suggérant que ce composé n'active pas une réponse UPR. Nous avons également testé sur notre lignée rapportrice deux inducteurs de stress du RE, la tunicamycine qui bloque la N-glycosylation (Figure 2) et la thapsigargine qui induit un relargage du calcium contenu dans le RE. Aucun de ces composés n'induit le gène rapporteur ISRE-luciférase, suggérant là encore que le composé ChX710 n'a pas pour cible la synthèse protéique dans le RE. Ainsi, la phosphorylation d'eIF2 α et les remaniements observés au niveau des P-bodies et

des granules de stress dans les cellules traitées par le ChX710 semblent induits par d'autres mécanismes que la réponse UPR.

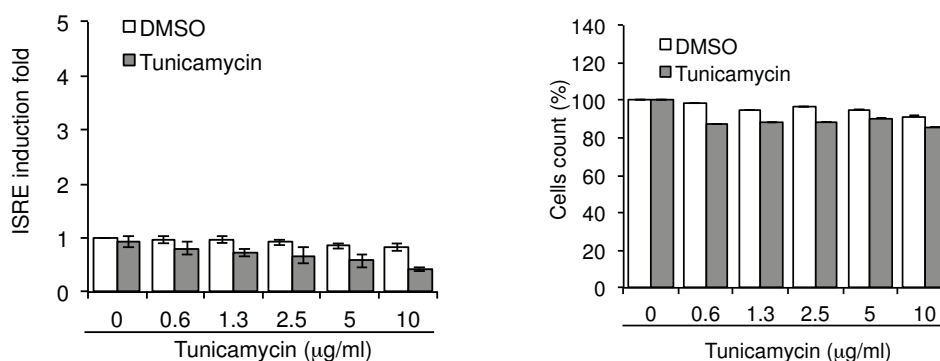


Figure 2 : la tunicamycine n'induit pas le gène rapporteur ISRE-luciférase. (A) Des cellules HEK-293 (STING37) exprimant stablement la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse ISRE sont incubées avec des doses croissantes de tunicamycine. Après 24h d'incubation, l'activité luciférase est mesurée dans les puits de culture. (B) Mesure de la viabilité cellulaire par la quantification de l'ATP présent dans le puits de culture contenant des cellules STING37 qui sont incubées avec des doses croissantes de tunicamycine.

5 Le ChX710, un agent intercalant qui induit des dommages à l'ADN?

Plusieurs équipes ont montré que des agents intercalants de l'ADN et des inhibiteurs de la topoisomérase II, tels que les anthracyclines (doxorubicine) ou l'étoposide, activent l'expression de certains ISGs et parfois la synthèse d'interféron de type I [292, 293]. Enfin, des travaux ont montré qu'un composé de la famille des bis-benzimidazoles (une classe de molécules connues pour se lier au petit sillon de l'ADN) est doté de la capacité à amplifier la réponse cellulaire à l'ARN bicaténaire [294].

Nous avons donc testé l'effet de la doxorubicine sur l'élément de réponse ISRE dans notre système afin d'explorer l'hypothèse selon laquelle ChX710 se lierait à l'ADN cellulaire et induirait des cassures double brin dans le génome. Nous avons montré que la doxorubicine est bien capable d'induire le gène rapporteur ISRE-luciférase, mais ses effets restent modérés par rapport au ChX710 (Figure 3). Surtout, la doxorubicine n'a aucun effet sur la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique. Contrairement au ChX710, cet agent intercalant est en effet incapable d'augmenter

l'activation du gène rapporteur ISRE-luciférase lorsque les cellules sont transfectées avec de l'ADN plasmidique. A cela s'ajoute le fait que le composé ChX710 s'accumule dans des structures cellulaires cytosoliques (*cf. infra*), mais pas dans le noyau contrairement à la doxorubicine qui marque fortement l'ADN nucléaire. Pour ces différentes raisons, il semble peu probable que le mode d'action du composé ChX710 repose sur une liaison directe à l'ADN cellulaire.

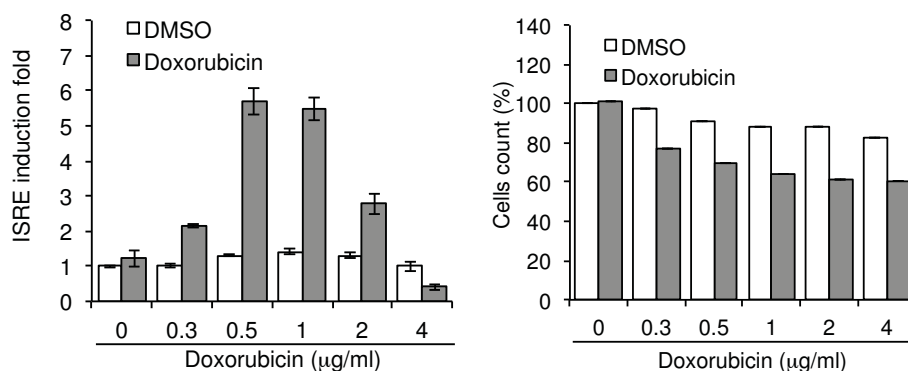


Figure 3 : la doxorubicine induit modestement le gène rapporteur ISRE-luciférase. (A) Des cellules HEK-293 (STING37) exprimant stablement la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse ISRE sont incubées avec des doses croissantes de doxorubicine. (B) Mesure de la viabilité cellulaire par la quantification de l'ATP présent dans le puits de culture contenant des cellules STING37 qui sont incubées avec des doses croissantes de doxorubicine.

6 Les peroxysomes, cibles potentielles du ChX710 ?

De façon intéressante, les résultats obtenus au laboratoire montrent que ChX710 emprunte une voie dépendante de la protéine adaptatrice MAVS et du facteur de transcription IRF1 pour induire le gène rapporteur ISRE-luciférase. IRF1 est un facteur de transcription décrit à la fin des années 1980 pour induire l'IFN- β , avant d'être négligé suite à la découverte d'IRF3 et d'IRF7. Cependant, plusieurs travaux récents ont montré son rôle central dans l'expression des ISGs et la mise en place d'un état antiviral, notamment une étude de 2011 réalisée par l'équipe de Charlie Rice [133]. L'implication de MAVS et IRF1 dans l'activation du promoteur ISRE par le composé ChX710 suggère un rôle des peroxysomes dans ce système. En effet, il a été montré récemment que les peroxysomes sont des plates-formes de signalisation qui, lors d'une infection virale, induisent l'expression de ISGs par une

voie de signalisation originale impliquant MAVS et IRF1, soit les mêmes facteurs que ceux impliqués dans l'activation du gène rapporteur ISRE-Luciférase par le ChX710 (Figure 4) [317]. Cette cascade diffère de la voie classique MAVS/IRF3 généralement décrite pour être activée à la surface des mitochondries.

A l'avenir, nous envisageons donc de marquer les peroxysomes à l'aide d'anticorps spécifiques, et cela afin d'observer d'éventuels changements morphologiques (taille, nombre, répartition, etc.) consécutifs au traitement par le ChX710. Le profil ainsi obtenu pourrait être comparé à la localisation subcellulaire du ChX710. En effet, nous avons constaté que ce composé est fluorescent, ce qui permet de suivre sa localisation subcellulaire dans des cellules vivantes (Figure 5). De façon intéressante, on constate que le composé ChX710 s'accumule progressivement, entre 0 et 24h, dans des structures cytoplasmiques punctiformes de nature indéterminée. Des expériences de co-localisation par marquage des mitochondries à l'aide d'un « mitotracker » ont permis de montrer que ChX710 ne s'accumulait pas au niveau de ces organites. Il faudra donc explorer d'autres hypothèses, et notamment une éventuelle accumulation dans les peroxysomes. Malheureusement, la fluorescence du composé ChX710 disparaît lors de la fixation des cellules, et il faudra tout d'abord lever cet obstacle technique.

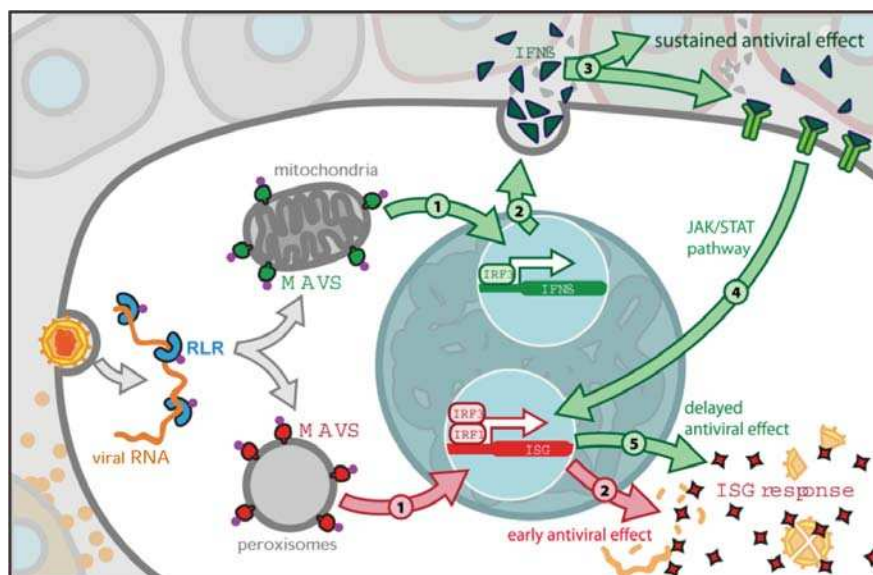


Figure 4 : Les facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation médiée par MAVS dans les peroxysomes. (Evelyn Dixit *et al.*, Cell. 2010).

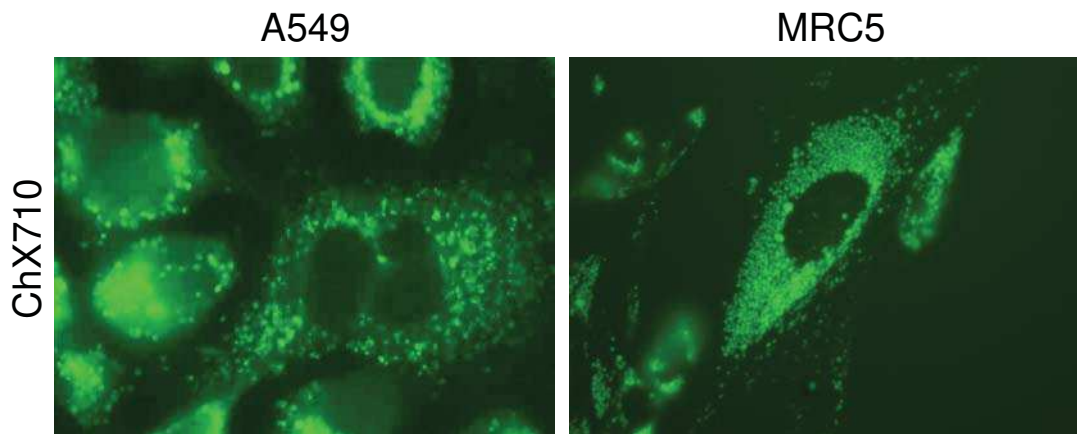


Figure 5 : Localisation cellulaire de ChX710 dans les cellules A549 et MRC5.

7 Quel rôle pour le stress oxydatif ?

Les peroxysomes sont des organites essentiels à l'élimination des radicaux libres dans la cellule grâce notamment à une expression massive de catalase. S'il interagit avec ces organites, ce qui est notre hypothèse de travail actuelle, le composé ChX710 pourrait inhiber leur fonction et induire ainsi un stress oxydatif. Ce dernier joue un rôle essentiel dans l'induction de la réponse immunitaire innée et la synthèse d'IFN-I. En effet, des agents réducteurs tels que la N-acétyl-cystéine (NAC) inhibent la signalisation par les voies MAVS ou STING [275]. Par ailleurs, il a été montré qu'une surproduction de radicaux libres potentialise la réponse à différents PAMPs par divers mécanismes [318]. Par exemple, l'oxydation de l'ADN cytosolique permet sa stabilisation, ce qui augmente l'activation de la cascade de signalisation STING [319]. Un autre mécanisme décrit passe par l'oxydation des lipides mitochondriaux, ce qui favorise l'oligomérisation de MAVS [320]. Enfin, il a été montré qu'un stress oxydatif présent à des niveaux élevés au sein de la cellule peut induire l'activation de p53 et l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'activation de voies pro-apoptotiques et la stimulation de la réponse immunitaire (Figure 6) [321].

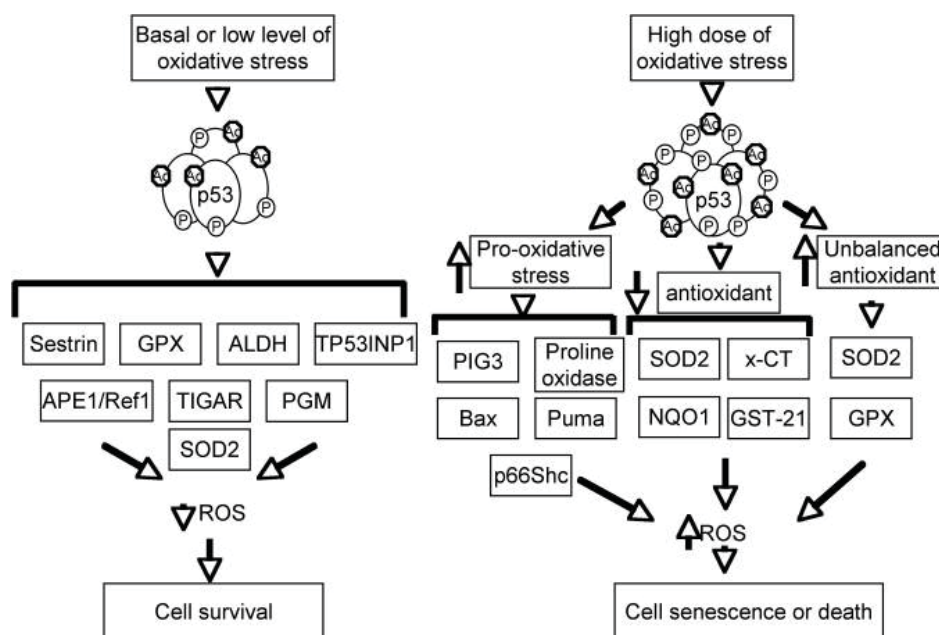


Figure 6: Rôle de p53 dans les réponses cellulaires au stress oxydatif. (Dongping Liu and Yang Xu, 2011)

Nous avons pu établir le rôle essentiel du stress oxydatif intracellulaire dans l'induction de l'élément de réponse ISRE et des ISG par ChX710. En effet, lorsqu'on traite les cellules par la NAC, le ChX710 n'est plus capable d'induire le gène rapporteur ISRE-luciférase et les ISGs. La production de radicaux libres est donc nécessaire à l'action immunostimulatrice du composé ChX710. Enfin, nous avons montré que le composé ChX710 induit également l'expression et la translocation nucléaire de p53, ce qui pourrait également être la conséquence d'un stress oxydatif.

Les radicaux libres sont produits dans la cellule par divers mécanismes [322]. Les réactions d'oxydo-réductions enzymatiques le long de la chaîne de transfert d'électrons, au sein des mitochondries, sont une source importante de ROS. La NAD(P)H oxydase, une enzyme localisée au niveau de la membrane cytoplasmique, mais également dans la membrane du phagosome chez les phagocytes, utilise le NADH ou le NADPH intracellulaire comme donneur d'électrons pour catalyser la production d'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Les NAD(P)H oxydases des cellules non phagocytaires ont une activité de 10 à 100 fois moins élevée que celle des cellules phagocytaires, et les ROS qu'elles produisent jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire. Enfin, comme je l'ai déjà mentionné, la mobilisation des enzymes PDI dans le RE pour assurer le bon repliement des protéines membranaires et extracellulaires est également une source importante de radicaux libres. Le composé

ChX710 pourrait donc agir sur l'un ou l'autre de ces mécanismes pour augmenter la production de radicaux libres dans les cellules, ce qui expliquerait l'induction de certains ISGs par la molécule seule et l'amplification de la réponse immunitaire à l'ADN cytosolique. A l'avenir, il sera essentiel d'évaluer l'effet du composé ChX710 sur le niveau de radicaux libres dans les cellules traitées afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

8 Dommages à l'ADN et amplification de la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique

Une conséquence majeure du stress oxydatif est l'accumulation de dommages à l'ADN, incluant cassures double brin et altération chimique des bases. Récemment, nous avons montré la présence de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX), qui est un marqueur des sites de cassures double brin de l'ADN, dans le noyau des cellules traitées par ChX710 (Figure 7). Cependant, nous ne disposons pas encore d'éléments suffisants pour affirmer qu'un stress oxydatif induit par le ChX710 est responsable de ces dommages à l'ADN. En effet, ces cassures double brin pourraient être également une conséquence d'un programme apoptotique induit par ce composé, et la résultante de l'activation des CAD (« Caspase Activated DNAses »).

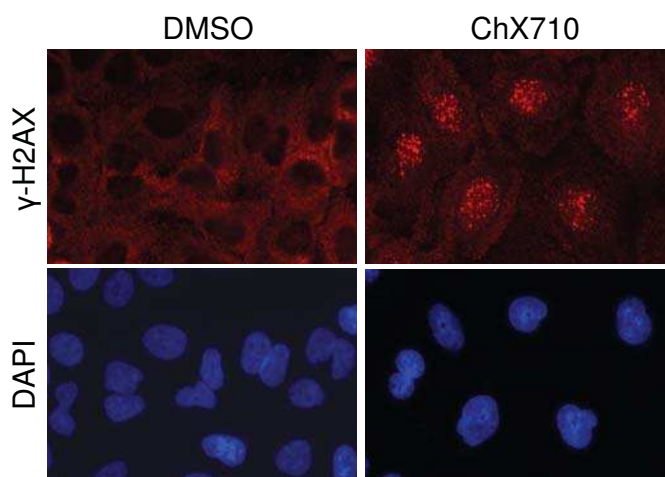


Figure 7 : Expression de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX) dans les cellules traitées par ChX710. Des cellules A549 ont été incubées avec ChX710 (25 μ M) ou DMSO.

Quelle qu'en soit l'origine, ces dommages à l'ADN pourraient expliquer la capacité du composé ChX710 à amplifier la réponse cellulaire à l'ADN plasmidique. En effet, des travaux avaient déjà décrits l'effet activateur des dommages à l'ADN sur les IRFs et l'expression des ISGs [295, 323-325]. Toutefois, l'impact de ces lésions à l'ADN sur la voie de signalisation STING n'a été découvert que récemment [326]. En effet, les dommages de l'ADN induits par des inhibiteurs de la topoisomérase II tels que l'étoposide, les rayonnements ou des mutations dans des enzymes de réparation d'ADN telles que ATM, induisent une réponse interféron *via* STING. Les dommages à l'ADN seraient en effet associés à des fuites d'ADN simple brin du noyau vers le cytoplasme. La présence d'ADN dans le cytosol activerait la voie de signalisation dépendante de STING, ce qui augmente le niveau d'expression des PRRs et sensibiliserait les cellules à différents PAMPs. Ce mécanisme est particulièrement intéressant, car il démontre que des dommages à l'ADN cellulaire régulent la réponse au pathogènes.

Le mode d'action du composé ChX710 pourrait être lié à ce phénomène, mais présente cependant des différences importantes. En effet, l'induction du gène rapporteur ISRE-luciférase par ce composé seul est indépendante de la voie STING, mais il amplifie en revanche spécifiquement la réponse interféron à l'ADN cytosolique, mais pas à un autre PAMP tel que l'ARN 5'-triphosphate. Un travail publié par M.G. Kemp *et al.* en 2015 décrit un mécanisme qui pourrait expliquer l'action du composé ChX710 sur la réponse à l'ADN plasmidique. Dans cette étude, il a été montré que la lumière UV ou des agents cancérigènes chimiques tels que le benzo[a]pyrène-7,8-dihydrodiol-9-10-époxyde ou N-acétyoxy-2-acétylaminofluorene, qui induisent des dommages directs à l'ADN par la formation de liaison inter-bases ou d'adduits, amplifient la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique exactement comme le composé ChX710 [223]. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que l'accumulation de dommages à l'ADN conduit à l'activation des caspases, lesquelles dégradent le complexe AMBRA1/ULK1. Or ce complexe est un régulateur négatif de STING. Sa dégradation permettrait de lever l'inhibition que ce complexe impose sur l'adaptateur STING, permettant ainsi une amplification de la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique et une action synergique sur la synthèse d'IFN-I (Figure 8). En revanche, ils montrent que la réponse cellulaire à de l'ARN 5'-triphosphate n'est pas augmenté, ce qui rejoint les résultats obtenus dans le cadre de l'étude du mode d'action de ChX710. Prochainement, il nous faudra explorer l'hypothèse selon

laquelle le complexe AMBRA1/ULK1 est une cible directe ou indirecte du composé ChX710.

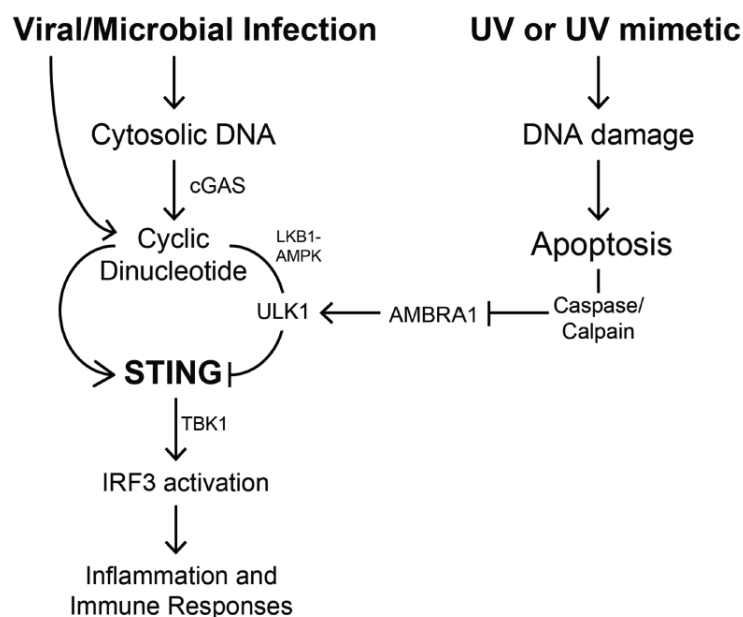


Figure 8 : Modèle pour le rôle des rayonnements UV dans la modulation de l'activation IRF3 STING-dépendante. (Michael G. Kemp et *al.*, 2015).

En conclusion, l'originalité du ChX710 réside dans sa capacité à amplifier la réponse IFN à de l'ADN exogène. Cette molécule a été isolée dans un crible d'une chimiothèque de 10.000 molécules, ce qui montre d'une part la relative rareté de ce type de molécule, et d'autre part la nécessité de mettre en place un test à haut débit pour isoler ces composés. Cette approche permet ainsi d'obtenir, à travers la caractérisation de molécules actives, des outils permettant l'étude de voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la réponse immune, mais aussi d'explorer de nouvelles stratégies afin de développer des thérapies innovantes. Ainsi, mes travaux éclairent les mécanismes susceptibles de moduler la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique, un PAMP associé aux infections par des virus ou des bactéries, mais également à des stress génotoxiques liés à des radiations ou des agents carcinogènes. A terme, le développement de nouveaux médicaments dotés de la capacité de potentialiser la réponse cellulaire à l'ADN pourrait être d'un grand intérêt pour le traitement non seulement de certaines infections mais aussi pour les thérapies anticancéreuses. De telles molécules pourraient notamment être utilisées pour stimuler localement la réponse immunitaire et la sécrétion d'IFN de

type I, et sensibiliser ainsi des cellules infectées ou tumorales à l'apoptose. Dans le traitement du cancer, des molécules amplifiant la réponse cellulaire lors de la détection cytosolique d'ADN peuvent être combinés avec des chimiothérapies existantes qui induisent des dommages d'ADN afin de bloquer la prolifération cellulaire tels que le cisplatine ou l'étoposide. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si ChX710 peut être utilisée pour ces applications, même si la cytotoxicité intrinsèque de cette molécule doit être prise en compte. A ce stade, il est clair que le composé ChX710 n'est encore qu'un outil pour étudier les mécanismes permettant de stimuler la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique, mais ce travail pourrait déboucher sur l'identification de nouvelles cibles cellulaires et la mise au point de composés utilisables *in vivo*.

Enfin, ces travaux nous permettent d'émettre une hypothèse originale sur l'origine de certaines maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes (lupus, psoriasis, etc.). Certaines de ces pathologies semblent en effet liées à une suractivation de la réponse interféron de type I. Nos résultats montrent qu'un composé chimique peut amplifier la réponse interféron à l'ADN cytosolique. Sur cette base, on peut faire l'hypothèse que des polluants chimiques environnementaux, agissant comme le ChX710, pourraient exacerber la réponse de l'organisme à l'ADN de pathogènes ou à des stress génotoxiques, et contribuer ainsi au développement de ces pathologies autoimmunes ou inflammatoires. A l'avenir, l'étude du mode d'action du composé ChX710 pourra nous éclairer sur les mécanismes conduisant à une hyperactivation de la réponse cellulaire à l'ADN cytosolique et le développement de telles pathologies.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Martinez, J.P., et al., *Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature*. Nat Prod Rep, 2015. **32**(1): p. 29-48.
2. Baccam, P., et al., *Kinetics of influenza A virus infection in humans*. J Virol, 2006. **80**(15): p. 7590-9.
3. 2014.
4. Hall, C.B., et al., *The burden of respiratory syncytial virus infection in young children*. N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 588-98.
5. Gubler, D.J., *Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century*. Trends Microbiol, 2002. **10**(2): p. 100-3.
6. Stadler, K., et al., *SARS--beginning to understand a new virus*. Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(3): p. 209-18.
7. Raj, V.S., et al., *MERS: emergence of a novel human coronavirus*. Curr Opin Virol, 2014. **5**: p. 58-62.
8. Baize, S., et al., *Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea*. N Engl J Med, 2014. **371**(15): p. 1418-25.
9. Koplow, D.A., *Smallpox: The Fight to Eradicate a Global Scourge*. University of California Press, 2004.
10. Breman, J.G. and I. Arita, *The confirmation and maintenance of smallpox eradication*. N Engl J Med, 1980. **303**(22): p. 1263-73.
11. Imai, M., et al., *Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 420-8.
12. Merler, S., et al., *Containing the accidental laboratory escape of potential pandemic influenza viruses*. BMC Med, 2013. **11**: p. 252.
13. Morse, S.S., *Factors in the emergence of infectious diseases*. Emerg Infect Dis, 1995. **1**(1): p. 7-15.
14. Harrus, S. and G. Baneth, *Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases*. Int J Parasitol, 2005. **35**(11-12): p. 1309-18.
15. Schar, C., et al., *The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 332-6.
16. Semenza, J.C. and B. Menne, *Climate change and infectious diseases in Europe*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(6): p. 365-75.
17. Semenza, J.C., et al., *Mapping climate change vulnerabilities to infectious diseases in Europe*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(3): p. 385-92.
18. Évelyne Schvoerer, J.-P.G., Françoise Stoll-Keller, *Effets des changements climatiques sur les maladies virales : quels sont les risques potentiels ?* Virologie, 2009. **13** (5): p. 243-8.
19. Debing, Y., J. Neyts, and L. Delang, *The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors*. Curr Opin Infect Dis, 2015. **28**(6): p. 596-602.
20. Rueckert, C. and C.A. Guzman, *Vaccines: from empirical development to rational design*. PLoS Pathog, 2012. **8**(11): p. e1003001.
21. Lauwereys, M., et al., *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. EMBO J, 1998. **17**(13): p. 3512-20.

22. Jittavisutthikul, S., et al., *Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication*. Viruses, 2015. **7**(4): p. 2030-56.
23. Goldman, E.R., et al., *Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library*. Anal Chem, 2006. **78**(24): p. 8245-55.
24. Zhu, J.D., et al., *Broad-spectrum antiviral agents*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 517.
25. Baltimore, D., *Expression of animal virus genomes*. Bacteriol Rev, 1971. **35**(3): p. 235-41.
26. Prusoff, W.H., *Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine*. Biochim Biophys Acta, 1959. **32**(1): p. 295-6.
27. Prusoff, W.H., *Further studies on the inhibition of nucleic acid biosynthesis by azathymidine and by deoxyadenosine*. Biochem Pharmacol, 1959. **2**: p. 221-5.
28. Jaffe, J.J. and W.H. Prusoff, *The effect of 5-iododeoxyuridine upon the growth of some transplantable rodent tumors*. Cancer Res, 1960. **20**: p. 1383-8.
29. Herrmann, E.C.J., *Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 1961. **107**: p. 142-145.
30. Kaufman, H., E.L. Martola, and C. Dohlman, *Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis*. Arch Ophthalmol, 1962. **68**: p. 235-9.
31. Kaufman, H.E. and E.D. Maloney, *IDU and hydrocortisone in experimental herpes simplex keratitis*. Arch Ophthalmol, 1962. **68**: p. 396-8.
32. Kaufman, H.E., A.B. Nesburn, and E.D. Maloney, *IDU therapy of herpes simplex*. Arch Ophthalmol, 1962. **67**: p. 583-91.
33. De Clercq, E., *Antivirals: past, present and future*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(6): p. 727-44.
34. De Clercq, E. and A. Holy, *Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(11): p. 928-40.
35. C. Deback, J.-M.H., *Antiviraux, à l'exclusion des antirétroviraux*. AKOS (Traité de Médecine), 2007.
36. D., O., *Pour l'infection VIH, le premier nucléotide inhibiteur de la transcriptase inverse*. La Presse Médicale, 2002. **31**: p. p. 1532.
37. Gallant, J.E. and S. Deresinski, *Tenofovir disoproxil fumarate*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(7): p. 944-50.
38. Ruprecht, R.M., et al., *Suppression of mouse viraemia and retroviral disease by 3'-azido-3'-deoxythymidine*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 467-9.
39. Fischl, M.A., et al., *The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial*. N Engl J Med, 1987. **317**(4): p. 185-91.
40. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
41. Sidwell, R.W., et al., *Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide*. Science, 1972. **177**(4050): p. 705-6.
42. Sidwell, R.W., et al., *Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **3**(2): p. 242-6.

43. Huffman, J.H., et al., *In vitro effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **3**(2): p. 235-41.
44. Manns, M.P., et al., *The way forward in HCV treatment--finding the right path*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 991-1000.
45. Paeshuyse, J., K. Dallmeier, and J. Neyts, *Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 590-8.
46. Kamar, N., et al., *Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients*. N Engl J Med, 2014. **370**(12): p. 1111-20.
47. De Clercq, E., *Perspectives for the chemotherapy of respiratory syncytial virus (RSV) infections*. Int J Antimicrob Agents, 1996. **7**(3): p. 193-202.
48. Ventre, K. and A.G. Randolph, *Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. CD000181.
49. Haas, W.H., et al., *Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(10): p. 1254-8.
50. Koren, G., et al., *Ribavirin in the treatment of SARS: A new trick for an old drug?* CMAJ, 2003. **168**(10): p. 1289-92.
51. H. Jeulin, F.K., N. Grancher, V. Venard, *Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C ?* Virologie, 2009. **13** (2): p. 83-92.
52. Brochot, E., et al., *Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) and its correlation with interferon sensitivity*. Antivir Ther, 2007. **12**(5): p. 805-13.
53. Crotty, S. and R. Andino, *Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin*. Microbes Infect, 2002. **4**(13): p. 1301-7.
54. Crotty S, M.D., Arnold JJ, et al., *The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen*. Nat Med, 2000. **6**: p. 1375-9.
55. Graci, J.D. and C.E. Cameron, *Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses*. Rev Med Virol, 2006. **16**(1): p. 37-48.
56. Tam, R.C., J.Y. Lau, and Z. Hong, *Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies*. Antivir Chem Chemother, 2001. **12**(5): p. 261-72.
57. Lawitz, E., et al., *Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection*. N Engl J Med, 2013. **368**(20): p. 1878-87.
58. Dao Thi, V.L., et al., *Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin*. Gastroenterology, 2016. **150**(1): p. 82-85 e4.
59. Lee, J.C., et al., *Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication*. Antiviral Res, 2015. **116**: p. 1-9.
60. Rocha-Pereira, J., et al., *The viral polymerase inhibitor 2'-C-methylcytidine inhibits Norwalk virus replication and protects against norovirus-induced diarrhea and mortality in a mouse model*. J Virol, 2013. **87**(21): p. 11798-805.
61. Furuta, Y., et al., *Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor*. Antiviral Res, 2013. **100**(2): p. 446-54.
62. Warren, T.K., et al., *Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430*. Nature, 2014. **508**(7496): p. 402-5.
63. Poordad F, L.E., Gitlin N, et al., *Efficacy and safety of valopicitabine in combination with pegylated interferon-alpha (pegIFN) and ribavirin (RBV) in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology Hepatology 2007. **46**:866A.

64. Russmann, S., et al., *Ribavirin-induced anemia: mechanisms, risk factors and related targets for future research*. Curr Med Chem, 2006. **13**(27): p. 3351-7.
65. Turner, T.L., et al., *Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options*. Clinicoecon Outcomes Res, 2014. **6**: p. 217-25.
66. E., D.C., *La Chimiothérapie du SIDA*. La Recherche, 1992. **23**: p. 288-295.
67. Malcolm, B.A., et al., *SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 1013-20.
68. Lin, C., et al., *In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17508-14.
69. Venkatraman, S., et al., *Discovery of (1R,5S)-N-[3-amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (SCH 503034), a selective, potent, orally bioavailable hepatitis C virus NS3 protease inhibitor: a potential therapeutic agent for the treatment of hepatitis C infection*. J Med Chem, 2006. **49**(20): p. 6074-86.
70. Patick, A.K., et al., *In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(10): p. 2444-50.
71. Kim, Y., et al., *Broad-spectrum antivirals against 3C or 3C-like proteases of picornaviruses, noroviruses, and coronaviruses*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11754-62.
72. Rocha-Pereira, J., et al., *The enterovirus protease inhibitor rupintrivir exerts cross-genotypic anti-norovirus activity and clears cells from the norovirus replicon*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(8): p. 4675-81.
73. Kim, Y., et al., *Broad-spectrum inhibitors against 3C-like proteases of feline coronaviruses and feline caliciviruses*. J Virol, 2015. **89**(9): p. 4942-50.
74. Clercq, E.D., *Outlook of the Antiviral Drug Era, Now More Than 50 Years After Description of the First Antiviral Drug*. Antiviral Drug Strategies, 2011.
75. Mazzon, M. and J. Mercer, *Lipid interactions during virus entry and infection*. Cell Microbiol, 2014. **16**(10): p. 1493-502.
76. Giguère J, T.M., *Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replica*. J Virol, 2004. **78**: p. 1–5.
77. Liu S, R.A., Tosteson MT, *Role of simvastatin and methyl- β -cyclodextrin on inhibition of poliovirus infection*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**: p. 51–59.
78. Potena L, F.G., Grigioni F, et al., *Hydroxymethyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells*. Circulation, 2004. **109**: p. 532–536.
79. Martinez-Gutierrez, M., J.E. Castellanos, and J.C. Gallego-Gomez, *Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly*. Intervirology, 2011. **54**(4): p. 202-16.
80. Gower, T.L. and B.S. Graham, *Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1231-7.

81. Zhu, Q., et al., *Statin therapy improves response to interferon alfa and ribavirin in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis*. Antiviral Res, 2013. **98**(3): p. 373-9.
82. Butt, A.A., et al., *Effect of addition of statins to antiviral therapy in hepatitis C virus-infected persons: Results from ERCHIVES*. Hepatology, 2015. **62**(2): p. 365-74.
83. Blaising, J., S.J. Polyak, and E.I. Pecheur, *Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update*. Antiviral Res, 2014. **107**: p. 84-94.
84. Teissier, E., et al., *Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15874.
85. Liu, M.Y., et al., *Pharmacokinetic properties and bioequivalence of two formulations of arbidol: an open-label, single-dose, randomized-sequence, two-period crossover study in healthy Chinese male volunteers*. Clin Ther, 2009. **31**(4): p. 784-92.
86. Wolf, M.C., et al., *A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3157-62.
87. Vigant, F., et al., *A mechanistic paradigm for broad-spectrum antivirals that target virus-cell fusion*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003297.
88. Zasloff, M., et al., *Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 15978-83.
89. Bhargava, P., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, a novel antiangiogenic agent, in patients with advanced cancers*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 3912-9.
90. Hay, A.J., et al., *The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine*. EMBO J, 1985. **4**(11): p. 3021-4.
91. Prevention, C.f.D.C.a., *CDC weekly Influenza report- week 35*. 2009.
92. Tsai, W.P., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1990. **6**(4): p. 481-9.
93. Ooi, E.E., et al., *In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine*. Virol J, 2006. **3**: p. 39.
94. Farias, K.J., P.R. Machado, and B.A. da Fonseca, *Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 282734.
95. Zhu, Y.Z., et al., *Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13407-22.
96. Boonyasuppayakorn, S., et al., *Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity*. Antiviral Res, 2014. **106**: p. 125-34.
97. al., R.D.e., *Chloroquine inhibits Zika Virus infection in different cellular models*. BioRxiv, 2016.
98. De Lamballerie, X., et al., *On chikungunya acute infection and chloroquine treatment*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008. **8**(6): p. 837-9.
99. Rossignol, J.F., A. Ayoub, and M.S. Ayers, *Treatment of diarrhea caused by Cryptosporidium parvum: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide*. J Infect Dis, 2001. **184**(1): p. 103-6.
100. Rossignol, J.F., *Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent*. Antiviral Res, 2014. **110**: p. 94-103.

101. Rossignol, J.F., et al., *Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29798-808.
102. Elazar, M., et al., *The anti-hepatitis C agent nitazoxanide induces phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha via protein kinase activated by double-stranded RNA activation*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1827-35.
103. Haffizulla, J., et al., *Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial*. Lancet Infect Dis, 2014. **14**(7): p. 609-18.
104. Rossignol, J.F. and Y.M. El-Gohary, *Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **24**(10): p. 1423-30.
105. Rossignol, J.F., et al., *Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nitazoxanide, peginterferon, and ribavirin*. Gastroenterology, 2009. **136**(3): p. 856-62.
106. Durantel, D., *Celgosivir, an alpha-glucosidase I inhibitor for the potential treatment of HCV infection*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(8): p. 860-70.
107. Kanda, T., F. Imazeki, and O. Yokosuka, *New antiviral therapies for chronic hepatitis C*. Hepatol Int, 2010. **4**(3): p. 548-61.
108. Gothel, S.F. and M.A. Marahiel, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(3): p. 423-36.
109. Frausto, S.D., E. Lee, and H. Tang, *Cyclophilins as modulators of viral replication*. Viruses, 2013. **5**(7): p. 1684-701.
110. Davis, T.L., et al., *Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases*. PLoS Biol, 2010. **8**(7): p. e1000439.
111. Hopkins, S., et al., *The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection*. J Hepatol, 2012. **57**(1): p. 47-54.
112. Flisiak, R., et al., *The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients*. Hepatology, 2009. **49**(5): p. 1460-8.
113. Kaul, A., et al., *Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000546.
114. Coelmont, L., et al., *DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13687.
115. Delang, L., et al., *Comparative study of the genetic barriers and pathways towards resistance of selective inhibitors of hepatitis C virus replication*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4103-13.
116. Gamble, T.R., et al., *Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1285-94.
117. Chatterji, U., et al., *Naturally occurring capsid substitutions render HIV-1 cyclophilin A independent in human cells and TRIM-cyclophilin-resistant in Owl monkey cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40293-300.

118. Gallay, P.A., et al., *Correlation of naturally occurring HIV-1 resistance to DEB025 with capsid amino acid polymorphisms*. *Viruses*, 2013. **5**(3): p. 981-97.
119. Colgan, J., et al., *Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 189-201.
120. Braaten, D. and J. Luban, *Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells*. *EMBO J*, 2001. **20**(6): p. 1300-9.
121. Nagy, P.D. and J. Pogany, *The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(2): p. 137-49.
122. Openshaw, P.J. and J.S. Tregoning, *Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2005. **18**(3): p. 541-55.
123. Field, A.K., et al., *Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. **58**(3): p. 1004-10.
124. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
125. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(12): p. 826-37.
126. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 279-89.
127. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957. **147**(927): p. 258-67.
128. Isaacs, A., R.A. Cox, and Z. Rotem, *Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon*. *Lancet*, 1963. **2**(7299): p. 113-6.
129. Wheelock, E.F., *Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin*. *Science*, 1965. **149**(3681): p. 310-1.
130. Pestka, S., *Purification and cloning of interferon alpha*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 23-37.
131. Schlee, M., et al., *Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 207-30.
132. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
133. Schoggins, J.W., et al., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. *Nature*, 2011. **472**(7344): p. 481-5.
134. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
135. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(5): p. 491-6.
136. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. *Science*, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
137. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
138. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. *Mol Cell*, 2005. **19**(6): p. 727-40.
139. Jade Louber, D.G., *Motifs d'ARN viraux et récepteurs de type RIG-I déclencheurs de l'interféron*. *Virologie*, 2010. **14**(3): p. 203-16.

140. Dempsey, A. and A.G. Bowie, *Innate immune recognition of DNA: A recent history*. Virology, 2015. **479-480C**: p. 146-152.
141. Schoggins, J.W. and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 519-25.
142. Schmid, S., et al., *Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 42013-22.
143. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
144. Bauman, D.R., et al., *25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(39): p. 16764-9.
145. Diczfalusy, U., et al., *Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide*. J Lipid Res, 2009. **50**(11): p. 2258-64.
146. Park, K. and A.L. Scott, *Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1081-7.
147. Liu, S.Y., et al., *Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 92-105.
148. Blanc, M., et al., *The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 106-18.
149. Friedman, R.L., et al., *Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells*. Cell, 1984. **38**(3): p. 745-55.
150. Brass, A.L., et al., *The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1243-54.
151. Anne Billet, A.A.C., Olivier Schwartz, *La famille des protéines IFITM : effets antiviraux et fonctions cellulaires*. Virologie, 2015. **19**(6): p. 251-60.
152. Huang, I.C., et al., *Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001258.
153. Wilkins, C., et al., *IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 461-9.
154. Lu, J., et al., *The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection*. J Virol, 2011. **85**(5): p. 2126-37.
155. Anafu, A.A., et al., *Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry*. J Biol Chem, 2013. **288**(24): p. 17261-71.
156. Gao, S., et al., *Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA*. Nature, 2010. **465**(7297): p. 502-6.
157. Kane, M., et al., *MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 563-6.
158. Goujon, C., et al., *Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 559-62.
159. Liu, Z., et al., *The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(4): p. 398-410.
160. Ozato, K., et al., *TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11): p. 849-60.

161. Chu, Y. and X. Yang, *SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins*. *Oncogene*, 2011. **30**(9): p. 1108-16.
162. Zou, W. and D.E. Zhang, *The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 3989-94.
163. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
164. Campbell, E.M., et al., *Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(3): p. 549-61.
165. Versteeg, G.A., et al., *The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 384-98.
166. Barr, S.D., J.R. Smiley, and F.D. Bushman, *The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(2): p. e1000007.
167. Singh, R., et al., *Association of TRIM22 with the type 1 interferon response and viral control during primary HIV-1 infection*. *J Virol*, 2011. **85**(1): p. 208-16.
168. Hattlmann, C.J., J.N. Kelly, and S.D. Barr, *TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein*. *Mol Biol Int*, 2012. **2012**: p. 153415.
169. Gao, B., et al., *Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain*. *Hepatology*, 2009. **50**(2): p. 424-33.
170. Di Pietro, A., et al., *TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation*. *J Virol*, 2013. **87**(8): p. 4523-33.
171. Geoffroy, M.C. and M.K. Chelbi-Alix, *Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense*. *J Interferon Cytokine Res*, 2011. **31**(1): p. 145-58.
172. Onomoto, K., et al., *Antiviral innate immunity and stress granule responses*. *Trends Immunol*, 2014. **35**(9): p. 420-8.
173. Meurs, E.F., et al., *Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth*. *J Virol*, 1992. **66**(10): p. 5805-14.
174. Chinsangaram, J., M. Koster, and M.J. Grubman, *Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase*. *J Virol*, 2001. **75**(12): p. 5498-503.
175. Rivas-Estilla, A.M., et al., *PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone*. *J Virol*, 2002. **76**(21): p. 10637-53.
176. Khabar, K.S., et al., *Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes*. *J Interferon Cytokine Res*, 2000. **20**(7): p. 653-9.
177. Muto, N.F., et al., *Inhibition of replication of reactivated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in latently infected U1 cells transduced with an HIV-1 long terminal repeat-driven PKR cDNA construct*. *J Virol*, 1999. **73**(11): p. 9021-8.
178. Stojdl, D.F., et al., *The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus*. *J Virol*, 2000. **74**(20): p. 9580-5.

179. Talloczy, Z., et al., *Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 190-5.
180. Talloczy, Z., H.W.t. Virgin, and B. Levine, *PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1*. Autophagy, 2006. **2**(1): p. 24-9.
181. Meurs, E., et al., *The 2-5A system in control and interferon-treated K/BALB cells infected with encephalomyocarditis virus*. Prog Clin Biol Res, 1985. **202**: p. 307-15.
182. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
183. Guo, J., et al., *A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3*. EMBO J, 2000. **19**(24): p. 6891-9.
184. Hui, D.J., et al., *Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39477-82.
185. Diamond, M.S. and M. Farzan, *The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 46-57.
186. Sarasin-Filipowicz, M., et al., *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7034-9.
187. Stirnweiss, A., et al., *IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5179-85.
188. DeFilippis, V.R., et al., *Interferon regulatory factor 3 is necessary for induction of antiviral genes during human cytomegalovirus infection*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 1032-7.
189. Szretter, K.J., et al., *The interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis*. J Virol, 2011. **85**(22): p. 11557-66.
190. Wang, X., E.R. Hinson, and P. Cresswell, *The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(2): p. 96-105.
191. Nasr, N., et al., *HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production*. Blood, 2012. **120**(4): p. 778-88.
192. Perez-Caballero, D., et al., *Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells*. Cell, 2009. **139**(3): p. 499-511.
193. Swiecki, M., N.S. Omattage, and T.J. Brett, *BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor*. Mol Immunol, 2013. **54**(2): p. 132-9.
194. Le Tortorec, A. and S.J. Neil, *Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11966-78.
195. Jia, B., et al., *Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000429.
196. Zhang, F., et al., *Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(1): p. 54-67.
197. Mangeat, B., et al., *Influenza virus partially counteracts restriction imposed by tetherin/BST-2*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 22015-29.
198. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34320-7.
199. Ning, S., J.S. Pagano, and G.N. Barber, *IRF7: activation, regulation, modification and function*. Genes Immun, 2011. **12**(6): p. 399-414.

200. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
201. Oshiumi, H., et al., *The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(6): p. 496-509.
202. Korant, B.D., et al., *Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon*. J Biol Chem, 1984. **259**(23): p. 14835-9.
203. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 559-68.
204. Kunzi, M.S. and P.M. Pitha, *Role of interferon-stimulated gene ISG-15 in the interferon-omega-mediated inhibition of human immunodeficiency virus replication*. J Interferon Cytokine Res, 1996. **16**(11): p. 919-27.
205. Malakhova, O.A. and D.E. Zhang, *ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 8783-7.
206. Hsiang, T.Y., C. Zhao, and R.M. Krug, *Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells*. J Virol, 2009. **83**(12): p. 5971-7.
207. Malakhov, M.P., et al., *UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9976-81.
208. Lee, B.L., et al., *UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs*. Elife, 2013. **2**: p. e00291.
209. Coccia, E.M., G. Uze, and S. Pellegrini, *Negative regulation of type I interferon signaling: facts and mechanisms*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006. **52**(1): p. 77-87.
210. ten Hoeve, J., et al., *Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5662-8.
211. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 349-54.
212. Liu, B., et al., *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10626-31.
213. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 593-605.
214. Rogers, R.S., C.M. Horvath, and M.J. Matunis, *SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30091-7.
215. Ungureanu, D., et al., *SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses*. Blood, 2005. **106**(1): p. 224-6.
216. Kile, B.T. and W.S. Alexander, *The suppressors of cytokine signalling (SOCS)*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(11): p. 1627-35.
217. Frantsve, J., et al., *Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3547-57.
218. Ritchie, K.J., et al., *Dysregulation of protein modification by ISG15 results in brain cell injury*. Genes Dev, 2002. **16**(17): p. 2207-12.
219. Malakhova, O.A., et al., *Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 455-60.
220. Ritchie, K.J., et al., *Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1374-8.

221. Malakhova, O.A., et al., *UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2358-67.
222. Saleiro, D. and L.C. Platanias, *ULK1 in type I interferon response*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24586-7.
223. Kemp, M.G., L.A. Lindsey-Boltz, and A. Sancar, *UV Light Potentiates STING (Stimulator of Interferon Genes)-dependent Innate Immune Signaling through Deregulation of ULK1 (Unc51-like Kinase 1)*. J Biol Chem, 2015. **290**(19): p. 12184-94.
224. Jolly, C. and R.I. Morimoto, *Stress and the cell nucleus: dynamics of gene expression and structural reorganization*. Gene Expr, 1999. **7**(4-6): p. 261-70.
225. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
226. Kedersha, N., et al., *Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1257-68.
227. Tourriere, H., et al., *The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules*. J Cell Biol, 2003. **160**(6): p. 823-31.
228. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
229. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(4): p. 445-544.
230. Lee, H.K., et al., *Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1398-401.
231. Zhou, D., K.H. Kang, and S.A. Spector, *Production of interferon alpha by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy*. J Infect Dis, 2012. **205**(8): p. 1258-67.
232. Severa, M., et al., *EBV stimulates TLR- and autophagy-dependent pathways and impairs maturation in plasmacytoid dendritic cells: implications for viral immune escape*. Eur J Immunol, 2013. **43**(1): p. 147-58.
233. Jounai, N., et al., *The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14050-5.
234. Ke, P.Y. and S.S. Chen, *Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 37-56.
235. Sedger, L.M., et al., *IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 920-6.
236. Sato, K., et al., *Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3138-46.
237. Brincks, E.L., et al., *CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4918-25.
238. Paiva, C.N. and M.T. Bozza, *Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(6): p. 1000-37.
239. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Induced innate responses to infection*. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition., 2001.
240. Herbeuval, N.S.a.J.-P., *Les cellules dendritiques plasmacytoïdes : nouvel Eldorado de la thérapie antivirale ?* Biologie Aujourd'hui, 2015. **209**(2): p. 135 - 144.

241. Hardy, A.W., et al., *HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17453-8.
242. Grossberg, S.E., *Nonviral interferon inducers: natural and synthetic products*. Tex Rep Biol Med, 1977. **35**: p. 111-6.
243. Krueger, R.E. and G.D. Mayer, *Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent*. Science, 1970. **169**(3951): p. 1213-4.
244. Mayer, G.D. and R.F. Krueger, *Tilorone hydrochloride: mode of action*. Science, 1970. **169**(3951): p. 1214-5.
245. Glaz, E.T., et al., *Antiviral activity and induction of interferon-like substance by quinacrine and acranil*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **3**(5): p. 537-41.
246. Kramer, M.J., J.L. Taylor, and S.E. Grossberg, *Induction of interferon in mice by 10-carboxymethyl-9-acridanone*. Methods Enzymol, 1981. **78**(Pt A): p. 284-7.
247. Taylor, J.L., C.K. Schoenherr, and S.E. Grossberg, *High-yield interferon induction by 10-carboxymethyl-9-acridanone in mice and hamsters*. Antimicrob Agents Chemother, 1980. **18**(1): p. 20-6.
248. Stringfellow, D.A., S.D. Weed, and G.E. Underwood, *Antiviral and interferon-inducing properties of 1,5-diamino anthraquinones*. Antimicrob Agents Chemother, 1979. **15**(1): p. 111-8.
249. Siminoff, P., et al., *BL-20803, a new, low-molecular-weight interferon inducer*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **3**(6): p. 742-3.
250. Stringfellow, D.A., H.C. Vanderberg, and S.D. Weed, *Interferon induction by 5-halo-6-phenyl pyrimidinones*. J Interferon Res, 1980. **1**(1): p. 1-14.
251. Hoffman, W.W., et al., *N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl) propanediamine: antiviral activity and interferon stimulation in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **3**(4): p. 498-502.
252. Hornung, R.L., et al., *Immunomodulation of natural killer cell activity by flavone acetic acid: occurrence via induction of interferon alpha/beta*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(15): p. 1226-31.
253. Kramer, M.J., R. Cleeland, and E. Grunberg, *Antiviral activity of 10-carboxymethyl-9-acridanone*. Antimicrob Agents Chemother, 1976. **9**(2): p. 233-8.
254. Taylor, J.L., C. Schoenherr, and S.E. Grossberg, *Protection against Japanese encephalitis virus in mice and hamsters by treatment with carboxymethylacridanone, a potent interferon inducer*. J Infect Dis, 1980. **142**(3): p. 394-9.
255. Kern, E.R., et al., *Antiviral activity of BL-3849A, a low-molecular-weight oral interferon inducer*. Antimicrob Agents Chemother, 1976. **10**(4): p. 691-6.
256. Kaufman, H.E., et al., *Tilorone hydrochloride: human toxicity and interferon stimulation*. Proc Soc Exp Biol Med, 1971. **137**(1): p. 357-60.
257. Silin, D.S., et al., *Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(11): p. 1238-47.
258. Es-Saad, S., et al., *Regulators of innate immunity as novel targets for panviral therapeutics*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(5): p. 622-8.
259. Horscroft, N.J., D.C. Pryde, and H. Bright, *Antiviral applications of Toll-like receptor agonists*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 789-801.
260. Miller, R.L., et al., *Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug*. Int J Immunopharmacol, 1999. **21**(1): p. 1-14.

261. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
262. Meyer, T., et al., *Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(1): p. 149-59.
263. Gorden, K.B., et al., *Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1259-68.
264. Lee, J., et al., *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
265. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family*. Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 85-95.
266. Hirota, K., et al., *Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer*. J Med Chem, 2002. **45**(25): p. 5419-22.
267. Pryde, D.C., et al., *The discovery of a novel prototype small molecule TLR7 agonist for the treatment of hepatitis C virus infection*. Medchemcomm, 2011. **2**(3): p. 185-189.
268. Isobe, Y., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel 9-substituted-8-hydroxyadenine derivatives as potent interferon inducers*. J Med Chem, 2006. **49**(6): p. 2088-95.
269. Lee, J., et al., *Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1828-33.
270. Lanford, R.E., et al., *GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees*. Gastroenterology, 2013. **144**(7): p. 1508-17, 1517 e1-10.
271. Zhao, J., et al., *Intranasal treatment with poly(I*C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11416-24.
272. Sariol, C.A., et al., *Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19323.
273. Hammerbeck, D.M., et al., *Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats*. Antiviral Res, 2007. **73**(1): p. 1-11.
274. Wong, J.P., et al., *Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection*. Vaccine, 2009. **27**(25-26): p. 3481-3.
275. Prantner, D., et al., *5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 39776-88.
276. Conlon, J., et al., *Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5216-25.
277. Kim, S., et al., *Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(7): p. 1396-401.
278. Cavlar, T., et al., *Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING*. EMBO J, 2013. **32**(10): p. 1440-50.
279. Gao, P., et al., *Binding-pocket and lid-region substitutions render human STING sensitive to the species-specific drug DMXAA*. Cell Rep, 2014. **8**(6): p. 1668-76.

280. Tijono, S.M., et al., *Identification of human-selective analogues of the vascular-disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA)*. Br J Cancer, 2013. **108**(6): p. 1306-15.
281. Li, L., et al., *Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(12): p. 1043-8.
282. Pan, Q., et al., *Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1673-83.
283. Stevenson, N.J., et al., *Ribavirin enhances IFN-alpha signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27866.
284. Thomas, E., et al., *Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 32-41.
285. Vilcek, J., *Interferon research BC (before cloning)*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **316**: p. 9-22.
286. Raj, N.B. and P.M. Pitha, *65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3' UTR*. FASEB J, 1993. **7**(8): p. 702-10.
287. Tai, Z.F., G.L. Zhang, and F. Wang, *Identification of small molecule activators of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway using a cell-based screen*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(1): p. 65-71.
288. Lin, C.W., et al., *Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32**(4): p. 355-9.
289. Sali, T.M., et al., *Characterization of a Novel Human-Specific STING Agonist that Elicits Antiviral Activity Against Emerging Alphaviruses*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005324.
290. Bedard, K.M., et al., *Isoflavone agonists of IRF-3 dependent signaling have antiviral activity against RNA viruses*. J Virol, 2012. **86**(13): p. 7334-44.
291. Pattabhi, S., et al., *Targeting Innate Immunity for Antiviral Therapy through Small Molecule Agonists of the RLR Pathway*. J Virol, 2016. **90**(5): p. 2372-87.
292. Martinez-Gil, L., et al., *Identification of small molecules with type I interferon inducing properties by high-throughput screening*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49049.
293. Patel, D.A., et al., *High throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling pathway to drive next-generation antiviral drug discovery*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36594.
294. Guo, F., et al., *RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e42583.
295. Kim, T., et al., *Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30686-9.
296. Yan, D., et al., *Dual myxovirus screen identifies a small-molecule agonist of the host antiviral response*. J Virol, 2013. **87**(20): p. 11076-87.
297. Harvey, R., et al., *GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity*. Antiviral Res, 2009. **82**(1): p. 1-11.
298. Deans, R.M., et al., *Parallel shRNA and CRISPR-Cas9 screens enable antiviral drug target identification*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(5): p. 361-6.
299. Konishi, H., et al., *An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 259.

300. Lucas-Hourani, M., et al., *High-throughput screening for broad-spectrum chemical inhibitors of RNA viruses*. J Vis Exp, 2014(87).
301. Lucas-Hourani, M., et al., *Original 2-(3-Alkoxy-1H-pyrazol-1-yl)azines Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH)*. J Med Chem, 2015. **58**(14): p. 5579-98.
302. Bonavia, A., et al., *Identification of broad-spectrum antiviral compounds and assessment of the druggability of their target for efficacy against respiratory syncytial virus (RSV)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(17): p. 6739-44.
303. Wang, Q.Y., et al., *Inhibition of dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis*. J Virol, 2011. **85**(13): p. 6548-56.
304. Hoffmann, H.H., et al., *Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5777-82.
305. Zhang, Q., et al., *Discovery of EGFR selective 4,6-disubstituted pyrimidines from a combinatorial kinase-directed heterocycle library*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(7): p. 2182-3.
306. Gozalbes, R., et al., *Development and experimental validation of a docking strategy for the generation of kinase-targeted libraries*. J Med Chem, 2008. **51**(11): p. 3124-32.
307. Gandin, V., et al., *Targeting kinases with anilinopyrimidines: discovery of N-phenyl-N'-[4-(pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea derivatives as selective inhibitors of class III receptor tyrosine kinase subfamily*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16750.
308. Tong, Y., et al., *Synthesis and evaluation of a new generation of orally efficacious benzimidazole-based poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors as anticancer agents*. J Med Chem, 2009. **52**(21): p. 6803-13.
309. Xue, F., et al., *Inhibitory properties of 2-substituent-1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives against enteroviruses*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(8): p. 2641-9.
310. Collins, S.E. and K.L. Mossman, *Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(5): p. 525-31.
311. Liu, Y.P., et al., *Endoplasmic reticulum stress regulates the innate immunity critical transcription factor IRF3*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4630-9.
312. Little, E., et al., *The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1994. **4**(1): p. 1-18.
313. Coe, H. and M. Michalak, *Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum*. Gen Physiol Biophys, 2009. **28 Spec No Focus**: p. F96-F103.
314. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, *Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2807-50.
315. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
316. Grootjans, J., et al., *The unfolded protein response in immunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2016.
317. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. Cell, 2010. **141**(4): p. 668-81.
318. Muralidharan, S. and P. Mandrekar, *Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(6): p. 1167-84.

319. Gehrke, N., et al., *Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 482-95.
320. Nobre, L., et al., *Modulation of Innate Immune Signalling by Lipid-Mediated MAVS Transmembrane Domain Oligomerization*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136883.
321. Liu, D. and Y. Xu, *p53, oxidative stress, and aging*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1669-78.
322. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Oxidative stress*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. **25**(3): p. 287-99.
323. Servant, M.J., et al., *Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 355-63.
324. Karpova, A.Y., et al., *Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2818-23.
325. Brzostek-Racine, S., et al., *The DNA damage response induces IFN*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5336-45.
326. Hartlova, A., et al., *DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity*. Immunity, 2015. **42**(2): p. 332-43.



Annexes

Annexe N°1
Travail de master 2012-2013

Inhibition of Pyrimidine Biosynthesis Pathway Suppresses Viral Growth through Innate Immunity

Marianne Lucas-Hourani^{1,2}, Daniel Dauzonne^{3,4}, Pierre Jorda^{3,4}, Gaëlle Cousin^{3,4}, Alexandru Lupan^{5,6a}, Olivier Helynck^{5,6}, Grégory Caignard^{1,2ab}, Geneviève Janvier^{1,2}, Gwénaëlle André-Leroux^{7,8ac}, Samira Khia^{1,2}, Nicolas Escriou^{1,2}, Philippe Desprès⁹, Yves Jacob^{2,10,11}, Hélène Munier-Lehmann^{5,6a*}, Frédéric Tangy^{1,2a*}, Pierre-Olivier Vidalain^{1,2*}

1 Institut Pasteur, Unité de Génomique Virale et Vaccination, Paris, France, **2** CNRS, UMR3569, Paris, France, **3** Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France, **4** CNRS, UMR176, Paris, France, **5** Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, Paris, France, **6** CNRS, UMR3523, Paris, France, **7** Institut Pasteur, Unité de Biochimie Structurale, Paris, France, **8** CNRS, UMR 3528, Paris, France, **9** Institut Pasteur, Unité Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes, Paris, France, **10** Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Paris, France, **11** Dana-Farber Cancer Institute, Center for Cancer Systems Biology (CCSB) and Department of Cancer Biology, Boston, Massachusetts, United States of America

Abstract

Searching for stimulators of the innate antiviral response is an appealing approach to develop novel therapeutics against viral infections. Here, we established a cell-based reporter assay to identify compounds stimulating expression of interferon-inducible antiviral genes. DD264 was selected out of 41,353 compounds for both its immuno-stimulatory and antiviral properties. While searching for its mode of action, we identified DD264 as an inhibitor of pyrimidine biosynthesis pathway. This metabolic pathway was recently identified as a prime target of broad-spectrum antiviral molecules, but our data unraveled a yet unsuspected link with innate immunity. Indeed, we showed that DD264 or brequinar, a well-known inhibitor of pyrimidine biosynthesis pathway, both enhanced the expression of antiviral genes in human cells. Furthermore, antiviral activity of DD264 or brequinar was found strictly dependent on cellular gene transcription, nuclear export machinery, and required IRF1 transcription factor. In conclusion, the antiviral property of pyrimidine biosynthesis inhibitors is not a direct consequence of pyrimidine deprivation on the virus machinery, but rather involves the induction of cellular immune response.

Citation: Lucas-Hourani M, Dauzonne D, Jorda P, Cousin G, Lupan A, et al. (2013) Inhibition of Pyrimidine Biosynthesis Pathway Suppresses Viral Growth through Innate Immunity. *PLoS Pathog* 9(10): e1003678. doi:10.1371/journal.ppat.1003678

Editor: Ganes C. Sen, Cleveland Clinic, United States of America

Received: April 22, 2013; **Accepted:** August 16, 2013; **Published:** October 3, 2013

Copyright: © 2013 Lucas-Hourani et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut Pasteur (www.pasteur.fr), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; www.cnrs.fr), the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM; www.inserm.fr), the Institut Carnot – Pasteur Maladies Infectieuses (Programme STING to POV and HML), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-RPIB, Programme STING 2.0 to POV), and the “Conseil Régional d’Ile-de-France” (Chemical Library Project, grants n° I 06-222/R and I 09-1739/R to HML). The work on CHIKV/Ren was supported by the project ArboAS (ANR grant 2010-INTB-1601-02). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: helene.munier-lehmann@pasteur.fr (HML); frederic.tangy@pasteur.fr (FT); pierre-olivier.vidalain@pasteur.fr (POV)

† These authors contributed equally to this work.

^a Current address: Babes-Bolyai University, Department of Chemistry, Cluj-Napoca, Romania.

^b Current address: McGill University, Department of Human Genetics, Centre for the Study of Host Resistance, Montreal, Quebec, Canada.

^c Current address: INRA, Unité Mathématique, Informatique et Génome, Jouy-en-Josas, France.

Introduction

Infections by RNA viruses represent a major burden for public health. It includes major human pathogens such as influenza virus, measles virus, dengue virus or respiratory syncytial virus that are responsible for hundreds of thousands of human death every year. Although efficient prophylactic treatments, and in particular vaccines, can be used to protect individuals from some of these pathogens, our therapeutic arsenal is extremely limited [1]. Clinically used treatments are essentially based on ribavirin or recombinant type I interferons (IFN- α/β) that are of highly variable efficacy depending on targeted virus [1,2]. Inhibitors of influenza virus or human respiratory syncytial virus have been developed, but such virus-specific treatments are useless against other RNA viruses [1]. Furthermore, RNA viruses are extremely

diverse in terms of replication machinery, and this greatly complicates the design of broad-spectrum antiviral molecules. They also tend to escape drugs that target viral proteins through mutations, thus calling for innovative therapeutic approaches. Among possible strategies, chemical modulators of host pathways [3,4,5,6], and in particular stimulators of innate immune response that boost cellular defenses to eliminate viral pathogens are of growing interest [7,8,9,10]. In principle, such molecules would be efficient against a large panel of viral pathogens since the host immune response relies on a multiplicity of antiviral effectors that block viruses at several steps of their replication, and cover the variety of replication strategies they use.

The innate immune response is initiated by the recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) by different classes of Pattern Recognition Receptors (PRRs). Along their

Author Summary

Our therapeutic arsenal to treat viral diseases is extremely limited, and there is a critical need for molecules that could be used against multiple viruses. Among possible strategies, there is a growing interest for molecules stimulating cellular defense mechanisms. We recently developed a functional assay to identify stimulators of antiviral genes, and selected compound DD264 from a chemical library using this approach. While searching for its mode of action, we identified this molecule as an inhibitor of pyrimidine biosynthesis, a metabolic pathway that fuels the cell with pyrimidine nucleobases for both DNA and RNA synthesis. Interestingly, it was recently shown that inhibitors of this metabolic pathway prevent the replication of RNA viruses. Here, we established a functional link between pyrimidine biosynthesis pathway and the induction of antiviral genes, and demonstrated that pyrimidine biosynthesis inhibitors like DD264 or brequinar critically rely on cellular immune response to inhibit virus growth. Thus, pyrimidine deprivation is not directly responsible for the antiviral activity of pyrimidine biosynthesis inhibitors, which rather involves the induction of a metabolic stress and subsequent triggering of cellular defense mechanisms.

replication cycle, RNA viruses produce several well-characterized PAMPs, such as double-stranded RNA, uncapped 5'-triphosphate RNA or single-stranded RNA molecules [11,12]. PRRs that recognize such virus-associated molecular motifs essentially belong to two protein families: toll-like receptors (TLRs) and RIG-I like receptors (RLRs). TLRs are transmembrane receptors, and only three members of this family have been reported to detect RNA molecules with their extracellular domain: TLR3 that binds double-stranded RNA and TLR7/8 that are activated by G/U rich single-stranded RNA [13]. RIG-I and IFIH1/MDA5 are best-characterized members of the RLR family. These cytosolic sensors are expressed by virtually all cell types to detect short 5'-triphosphate and long double-stranded RNA molecules, respectively [14]. Upon activation by their ligands, TLRs and RLRs initiate signaling cascades that converge on three families of transcription factors (NF- κ B, IRF3/7, and ATF-2/Jun) to induce genes encoding antiviral effectors and type I IFN (IFN- α / β) secretion. Secreted IFN- α / β subsequently amplify the antiviral response through binding to their membrane receptor at the surface of both infected cells and neighboring cells [11,15]. This activates a Jak/STAT signaling cascade that further stimulates the expression of antiviral genes in the infected organ. Human genome contains hundreds of IFN-inducible genes, and a large fraction encode for restriction factors to target viruses at multiple steps of their replication cycle [16,17].

To identify chemical compounds stimulating this pathway, several strategies have been developed. Molecules that engage TLRs or IFN- α / β receptors have been identified using various combinations of functional screens, *in silico* molecular docking and binding assays [18,19]. Phenotypic screens have also been used to identify stimulators of the antiviral gene cluster [9,20,21,22,23,24,25]. Several groups have recently described similar assays based on cells transfected with a reporter gene under control of IFN-stimulated response elements (ISRE) [21,22,23]. This led to the identification of small molecules showing some antiviral activity *in vitro*. In the current report, we used a similar strategy to screen a compound collection of 41,353 molecules, and identified compound DD264 as a molecule stimulating the expression of antiviral genes in treated cells and exhibiting a

potent antiviral activity *in vitro*. While searching for its mode of action, we found that compound DD264 targets the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway. This allowed us to establish for the first time a link between inhibition of pyrimidine biosynthesis, amplification of antiviral gene expression, and inhibition of RNA virus infections.

Results

High-throughput screening for stimulators of ISRE-regulated genes

To identify chemical compounds that stimulate expression of IFN-inducible genes, we have developed a high-throughput screening assay based on human HEK-293T cells transiently transfected with a luciferase reporter gene under control of five IFN-stimulated response elements (ISRE). A total of 41,353 chemical compounds, with final concentrations ranging from 30 to 130 μ M depending on the library, were screened with this assay for their capacity to stimulate ISRE-luciferase expression in human cells (see Materials and Methods and Figure S1 for details). For each screening plate, the amplification of luciferase signal in control wells was found >45 when recombinant IFN- β was added. Although most tested molecules were not inducers of reporter gene expression, five compounds showed a reproducible although modest >4 -fold amplification of luciferase activity (data not shown). Three of them showed a strong toxicity in culture and were discarded. Two compounds from the chemical library of Institut Curie were finally selected for further studies including DD264 (Figure 1A and 1B) and DD363, which will be described elsewhere.

To further investigate DD264 biological activity, we established HEK-293 cells stably transfected with the ISRE-luciferase reporter gene. In agreement with screening data, DD264 induced some significant expression of the ISRE-luciferase reporter gene in this system (Figure 1C), but was much less efficient than recombinant IFN- β to stimulate the ISRE promoter (Figure 1D). Interestingly, ISRE stimulation by DD264 was independent of IFN- α , β , or γ induction as assessed by qRT-PCR and ELISA (Table S1 and S2). A cocktail of blocking antibodies against IFN- α / β also had no effect on ISRE-luciferase induction by DD264 (data not shown). Altogether, this demonstrated that a different pathway is involved.

Visual examination of treated cultures suggested that DD264 inhibited cellular proliferation. This was confirmed by quantifying over several days the number of living cells in cultures treated or not with increasing amounts of DD264 (Figure S2A). Cells proliferated in control wells and did not when treated with DD264, but the number of living cells remained stable (did not collapse). Inhibition of cellular proliferation was also shown by propidium iodide labeling and flow cytometry analysis of cellular DNA content (Figure S2B). We finally determined that DD264 did not induce cell death even at the highest concentration tested (80 μ M) as assessed by quantifying DNA fragmentation (Figure S2B).

DD264 has a broad-spectrum antiviral activity

DD264 was tested for its inhibitory effect on the replication of several human viruses of clinical importance and from different families. DD264 was first tested on measles virus (MV), a *Paramyxoviridae* that can be considered as a prototype of negative-strand RNA viruses. Human HEK-293T cells were infected with a recombinant MV strain expressing either EGFP (MV-EGFP) or luciferase (MV-Luc) from an additional transcription unit, and then treated with DD264. As shown in Figure 2A and 2B, DD264 suppressed MV replication as assessed by inhibition of EGFP or

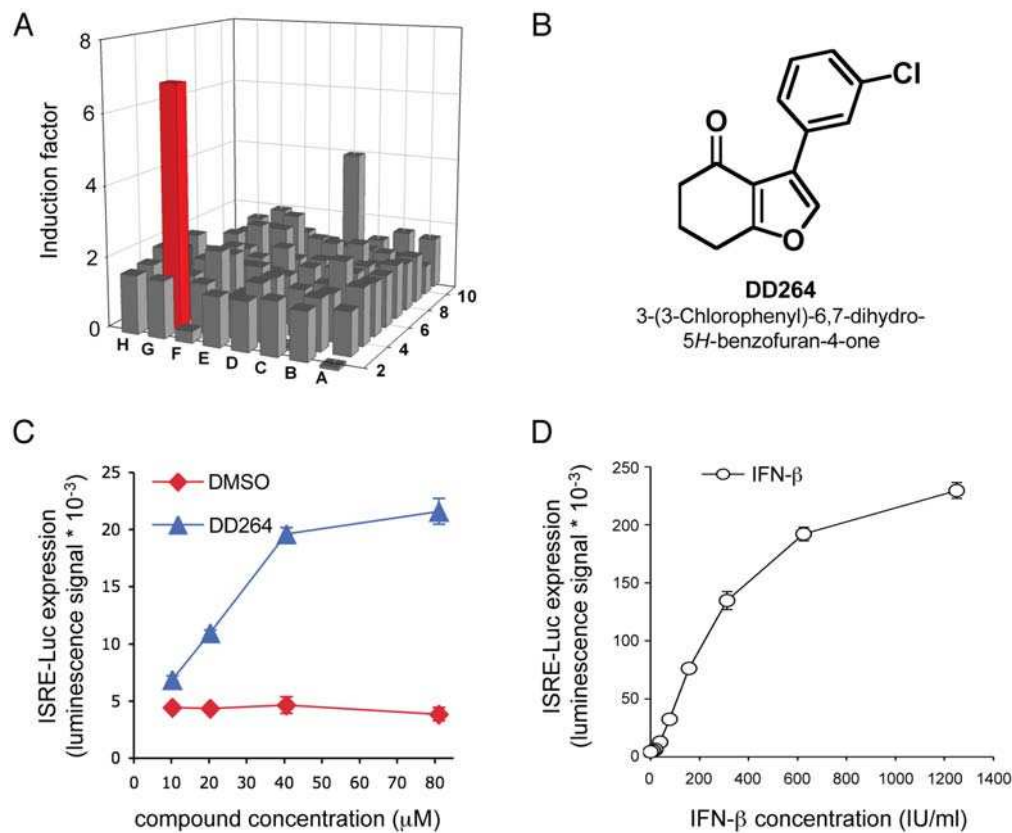


Figure 1. DD264 activates the ISRE-luciferase reporter gene. (A) Bar chart showing results for one 96-well screening plate. ISRE-luciferase reporter gene induction is expressed as a fold change compared to control wells treated with DMSO alone. Each bar represents one compound and the red bar corresponds to DD264 (induction factor=6.9). Compounds from this representative plate were from Institut Curie library and were screened at 20 μ M/ml, thus corresponding to a final concentration of 81.1 μ M for DD264. (B) Chemical structure of DD264. (C) HEK-293 cells that express luciferase under control of five interferon-stimulated response elements (ISRE) were incubated with increasing doses of DD264 or DMSO alone. After 24 hours, luciferase expression was determined. (D) Same experiment as in (C), but cells were stimulated with increasing doses of recombinant IFN- β . Except for (A) that corresponds to one representative experiment, all experiments were performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD.

doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g001

luciferase expression. As shown in Figure 2B, IC_{50} of DD264 was about 15 μ M in this assay. DD264 also inhibited the production of infectious viral particles (Figure S3A). Finally, we also established that DD264 antiviral activity was not restricted to HEK-293T cells, and could be observed on other cell lines like HeLa and MRC5 cells (Figure S3B and S3C).

We then tested DD264 activity on the growth of a positive-strand RNA virus, chikungunya virus (CHIKV), an emerging mosquito-transmitted *Alphavirus* (*Togaviridae* family) responsible for arthralgia in human. HEK-293T cells were infected with wild-type CHIKV or a recombinant variant expressing *Renilla* luciferase as a reporter [26,27,28], and viral infection was determined by immunostaining with anti-E2 mAb or measuring luciferase activity. DD264 efficiently suppressed CHIKV growth in infected cell cultures (Figure 2C and 2D). Similar results were obtained on West Nile virus, an emerging mosquito-transmitted *Flavivirus* (*Flaviviridae* family) associated to acute encephalitis (Figure 2E). DD264 also inhibited the production of infectious WNV particles in a dose-dependent manner (Figure 2F). Antiviral activity of

DD264 was also tested on a non-enveloped positive-strand RNA virus, coxsackievirus B3 (CVB3), which is a prototype of *Picornaviridae* family. Following DD264 treatment, CVB3 viral production in cell cultures was strongly impaired (Figure S3D). Therefore, DD264 has a potent antiviral activity against various unrelated RNA viruses in cell cultures.

Structure/activity analysis of DD264 analogs

To identify chemical features of DD264 accounting for its antiviral activity, a broad set of about 70 structural analogs were synthesized from appropriate β -chloro- β -nitrostyrenes according to known procedures ([29,30,31,32] and Protocol S1), and then tested for their antiviral activity on MV. All 2,3-dihydro-2-nitro derivatives (Table S3, formula A) were almost inactive. Regarding compounds with general formula B, a larger halogen (DD700, GAC25), a vinyl (GAC50) or an alkyne group (JP4, JP6) could replace the chlorine atom at position R⁸ of DD264. Other substituents led to a significant or total loss of antiviral activity. In addition, the meta position of the chlorine atom was found to be

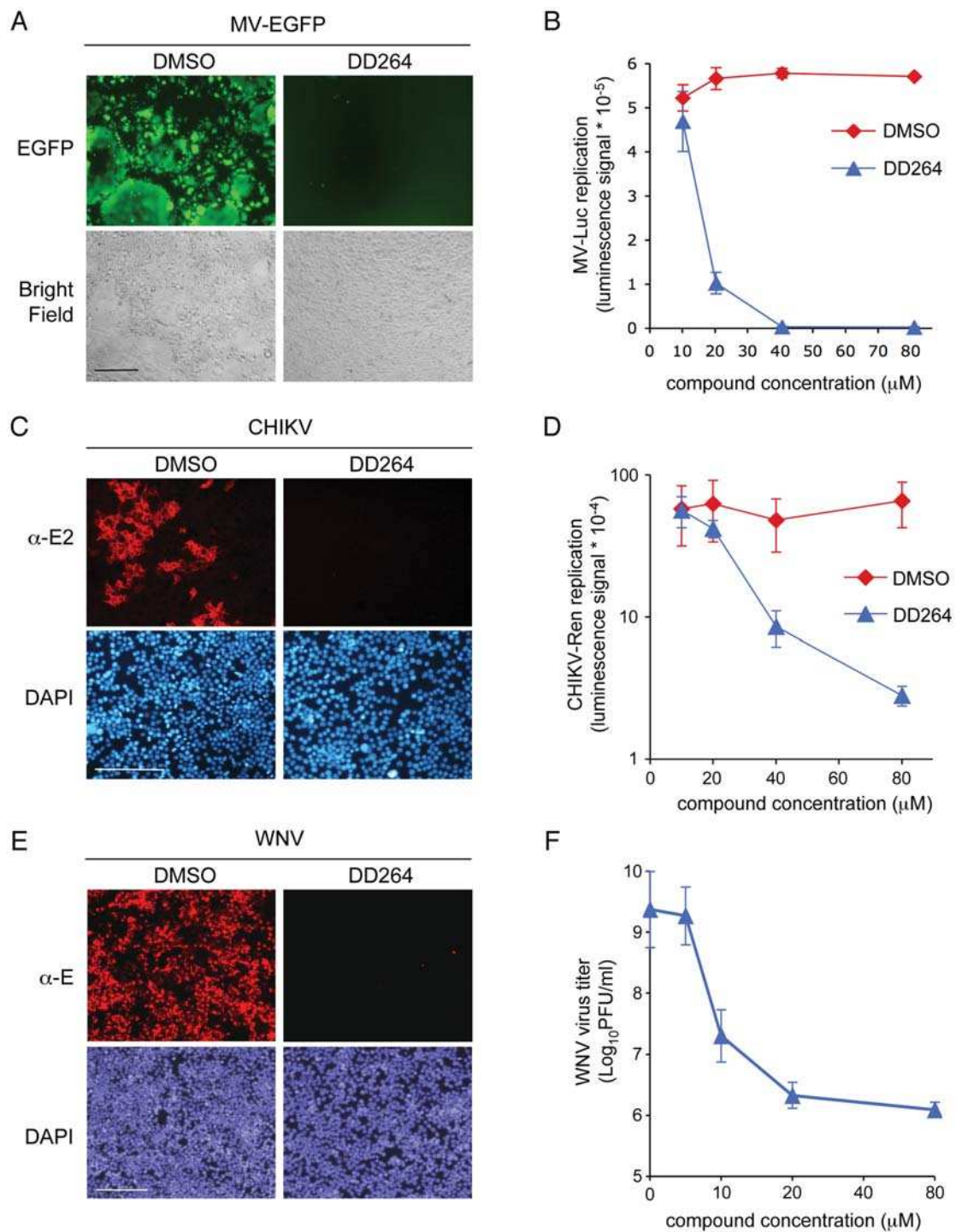


Figure 2. DD264 is a broad-spectrum antiviral molecule. (A) HEK-293T cells were infected with a recombinant strain of MV expressing EGFP (MOI=0.1), and incubated for 48 hours in the presence of DD264 at 40 μM or DMSO alone. Scale bar=200 μm. (B) HEK-293T cells were infected with a recombinant strain of MV expressing luciferase (MOI=0.1), and incubated with increasing doses of DD264 or DMSO alone. After 24 hours, luciferase

expression was determined. (C) HEK-293T cells were infected with CHIKV (MOI=0.1), and incubated with DMSO alone or DD264 at 40 μ M. After 24 hours, cells were fixed, and CHIKV E2 glycoprotein was detected by immunostaining. Cell nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 200 μ m. (D) HEK-293T cells were infected with a recombinant strain of CHIKV expressing *Renilla* luciferase (MOI=0.2), and incubated with increasing doses of DD264 or DMSO alone. After 24 hours, *Renilla* luciferase expression was determined. Experiments in (B) and (D) were performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. (E) HEK-293T cells were infected with WNV (MOI=1), and incubated with DMSO alone or DD264 at 40 μ M. After 24 hours, cells were fixed and WNV E glycoprotein was detected by immunostaining. Cell nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 200 μ m. (F) HEK-293T cells were infected with WNV (MOI=10), washed, and incubated with increasing doses of DD264 or matching volumes of DMSO alone. After 24 hours, supernatants were recovered, clarified by centrifugation and titrated. Results are expressed as log₁₀ PFU (plaque-forming units) per ml. Experiment was performed twice, and data represent means $\pm$ SD. (A–F) In all experiments, DD264 (or control DMSO) was added to cell cultures at the time or few minutes after infection.

doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g002

optimal, as compounds bearing a chloro substituent in ortho (DD706) or para (DD703) were much less active. Interestingly, the chlorine atom at position R⁸ could be replaced by a much larger group such as 3-chlorophenyl (JP13) or 3-bromophenyl (JP33) without any loss of activity. It was also possible to add a halogen at position R¹ (e.g. a bromine atom) and this even increased the compound potency. Unfortunately, the synthesis of this bromo derivative (JP61f2) only proceeded in a poor yield, and further functional analyses were thus performed on DD264. Finally, we found that the carbonyl function can be moved from position 4 to position 7 of the tetrahydrobenzofuran skeleton without any significant loss of potency (DD829). All other tested structural modifications, substitutions or additions performed on the cyclohexanone nucleus induced a decrease or a complete loss of activity. Altogether, this established a clear structure/activity relationship for this series, and provides a chemical framework to further improve activity and pharmacological properties of DD264.

DD264 amplifies cellular innate immune response

Despite a poor capacity to induce the ISRE-luciferase reporter gene by itself, DD264 has a broad-spectrum antiviral activity. This led us to hypothesize that DD264 rather amplifies the cellular response to viral PAMPs and/or IFN signaling, which would account for its potent antiviral activity. To test this hypothesis, cells stably transfected with the ISRE-luciferase reporter gene were transfected with increasing doses of short synthetic 5'-triphosphate RNA molecules (ssRNA) or treated with recombinant IFN- β , then incubated in the presence of DD264 or DMSO alone. Because ssRNA molecules mimic a viral PAMP, they activated the host antiviral response and induced expression of the ISRE-luciferase reporter gene (Figure 3A). Cellular response to suboptimal doses of ssRNA or IFN- β was strongly amplified in the presence of DD264 (Figure 3A and 3B). Interestingly, ISRE-luciferase induction by ssRNA transfection was partially dependent on the IFN- α/β secretion loop, as assessed by the addition of blocking antibodies against these cytokines (Figure S4A). However, amplification of cellular response by DD264 was still observed when blocking antibodies were added, establishing that DD264 activity is essentially independent of the IFN- α/β loop (Figure S4A). Accordingly, DD264 antiviral activity was not affected by the same cocktail of antibodies directed against IFN- α/β (Figure S4B). We also tested a subset of DD264 analogs ranging from strong antiviral to inactive molecules for their capacity to amplify cellular response to ssRNA. A clear correlation was found between their antiviral activity and their capacity to amplify cellular response to ssRNA (Figure 3C), thus supporting a functional link between these two activities.

To further support this observation, we determined by quantitative RT-PCR the transcriptional level of twelve interferon-stimulated genes (ISGs) when activating cells with ssRNA (Figure 4). We observed a significant 2 to 3-fold increase in expression levels of most tested ISGs when ssRNA-transfected cells were cultured in the presence of DD264. In contrast, control genes

like *18S*, *GAPDH* or *HPRT1* were not affected. Altogether, this demonstrated that DD264 amplified cellular response to ssRNA and expression levels of antiviral genes, and this correlated with its antiviral activity.

DD264 is an inhibitor of pyrimidine biosynthesis

Several recent reports have shown that inhibitors of pyrimidine biosynthesis pathway are potent broad-spectrum antiviral molecules [33,34,35,36]. Although DD264 is structurally unrelated to these molecules, we tested if DD264 could interfere with this particular metabolic pathway. We first determined intracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides by HPLC and spectrophotometry analysis. As shown in Figure 5A, DD264 treatment decreased intracellular concentrations of uridine and cytidine, whereas purines were either unchanged (adenosine) or slightly increased (guanosine) likely as a consequence of the control loops connecting purine and pyrimidine metabolic pathways. Similar changes in nucleosides profile were previously reported in RKO cells treated with leflunomide, which is a clinically used inhibitor of pyrimidine biosynthesis pathway [37].

To determine whether inhibition of pyrimidine biosynthesis by DD264 is actually linked to viral growth inhibition, cells infected with MV-luciferase were treated or not with DD264 and the culture medium was either supplemented or not with increasing doses of pyrimidine (uridine) or purine (guanosine) nucleosides. Adding uridine fully restored viral replication in DD264-treated cells as assessed by luciferase expression (Figure 5B), whereas guanosine had no effect (Figure 5C). Conversely, guanosine but not uridine abolished the antiviral activity of mycophenolic acid, a molecule that was previously reported to block viral replication by inhibiting purine biosynthesis [38,39,40]. Altogether, this demonstrated that a lowered level of pyrimidine nucleosides is responsible for the antiviral activity of DD264.

Different intermediates of the pyrimidine nucleosides *de novo* biosynthesis pathway were added to the culture medium to seek for those able to counteract the inhibition of viral growth by DD264. It turned out that in DD264-treated cells, MV replication was restored in the presence of orotate but not dihydroorotate (Figure 5D and 5E). Along pyrimidine biosynthesis, dihydroorotate is oxidized into orotate by dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), the fourth enzyme of this metabolic pathway. Although this is not a formal demonstration because we could not control for equal entry and stability of orotate and dihydroorotate in HEK-293T cells, these data strongly suggested that within pyrimidine biosynthesis pathway, DHODH is the target of DD264. This enzyme has also been described recently as the cellular target for several newly identified compounds with a broad-spectrum antiviral activity [33,34,35,36].

Inhibition of pyrimidine synthesis induces the amplification of cellular response to ssRNA

We have shown that the antiviral activity of DD264 relies on some imbalance in the pool of pyrimidines, which is mediated by

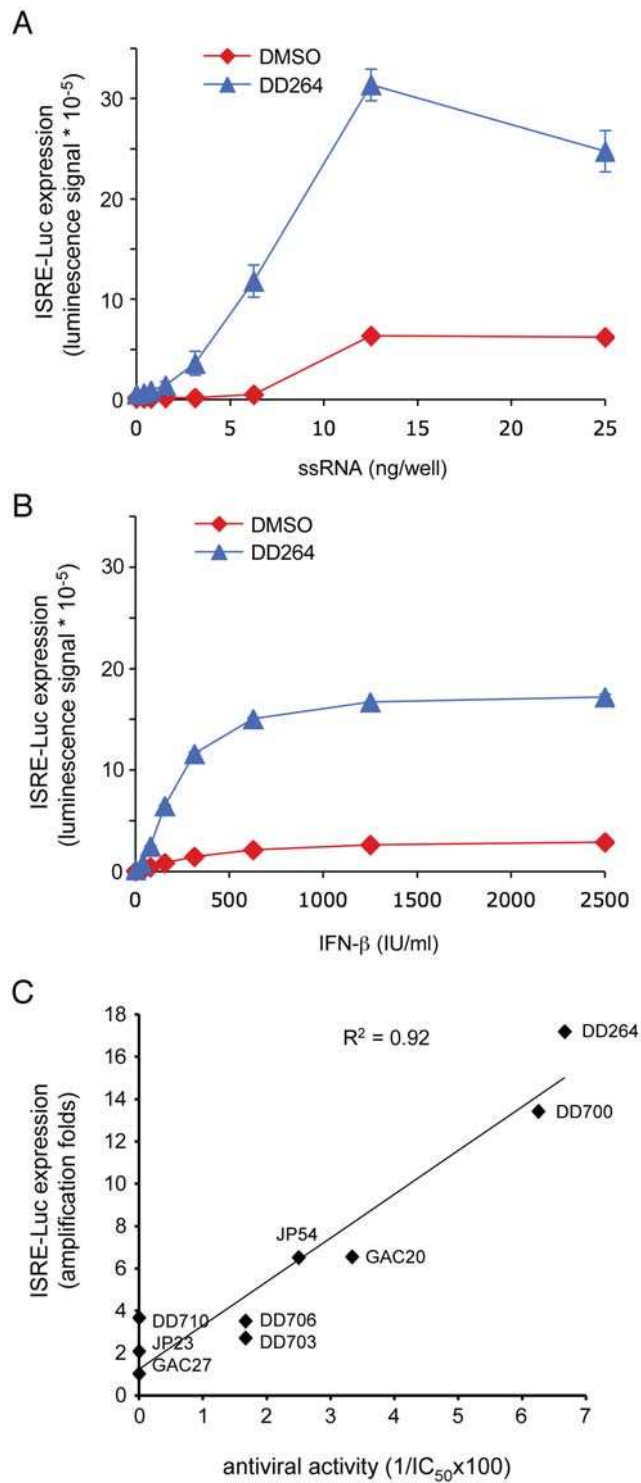


Figure 3. DD264 amplifies cellular response to transfection of PAMP-like ssRNA molecules or IFN- β stimulation, and this correlates with its antiviral activity. (A) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with increasing doses of synthetic 5'-triphosphate RNA molecules (ssRNA), and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone in 96-well culture plates. After 24 hours, luciferase expression was determined. (B) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with increasing doses of recombinant IFN- β , and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone in 96-well culture plates. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiments (A) and (B) were performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (C) Eight molecules were randomly picked among analogs of DD264 (see Table S2) to build a set of compounds with a range of antiviral activities from null to high as determined by their potency to inhibit MV-Luc replication. Then, the selected molecules were tested for the amplification ISRE-luciferase expression when stimulating cells with suboptimal doses of ssRNA (6 ng/well) as described in (A). Finally, for DD264 and selected analogs, the capacity to amplify cellular response to ssRNA was plotted as a function of the antiviral activity by means of the experimental IC₅₀ values (antiviral activity = 1/IC₅₀*100).
doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g003

the inhibition of the pyrimidine biosynthesis pathway probably *via* DHODH. However, DD264 was originally identified for its capacity to amplify expression of ISRE-regulated genes. We thus sought for a functional relationship existing between these two mechanisms. We first determined the ISRE-luciferase expression when culture medium was supplemented with uridine. As shown in Figure 6A, DD264-mediated amplification of cellular response to ssRNA was impaired in the presence of uridine. Similarly, uridine abolished the amplification effect of DD264 on the expression of ISGs in cells treated with low doses of ssRNA (Figure 6B). Finally, we determined if DHODH overexpression could compensate for DD264 treatment, and prevent the amplification of ISRE-luciferase expression in ssRNA-transfected

cells. As shown in Figure 6C, the effect of DD264 on ISRE-luciferase expression was abolished when DHODH was overexpressed. This established a functional link between the lack of pyrimidine nucleosides in cells treated with DD264 and the amplification of cellular response to ssRNA. To further demonstrate that DHODH inhibition could amplify cellular response to ssRNA, we tested in our functional assay a well-known inhibitor of this enzyme: brequinar [41]. Cells were transfected with increasing doses of ssRNA and culture medium was supplemented with brequinar or DMSO alone. As shown in Figure 6D, brequinar amplified cellular response to ssRNA in a similar manner to DD264. Accordingly, brequinar also increased the expression of ISGs when stimulating cells with ssRNA (Figure 4). Altogether,

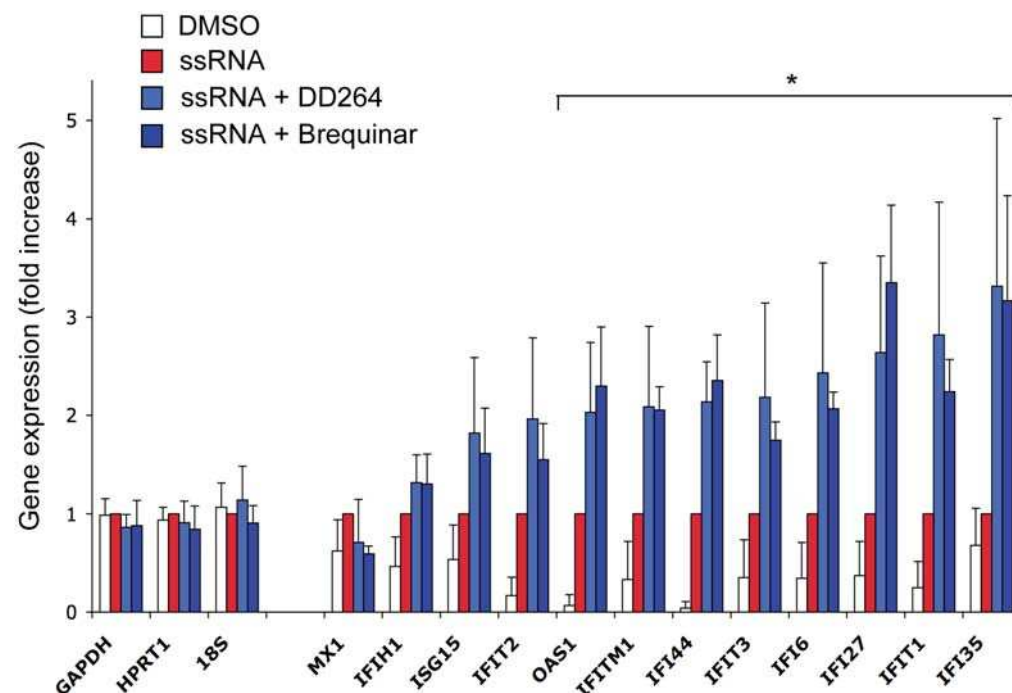
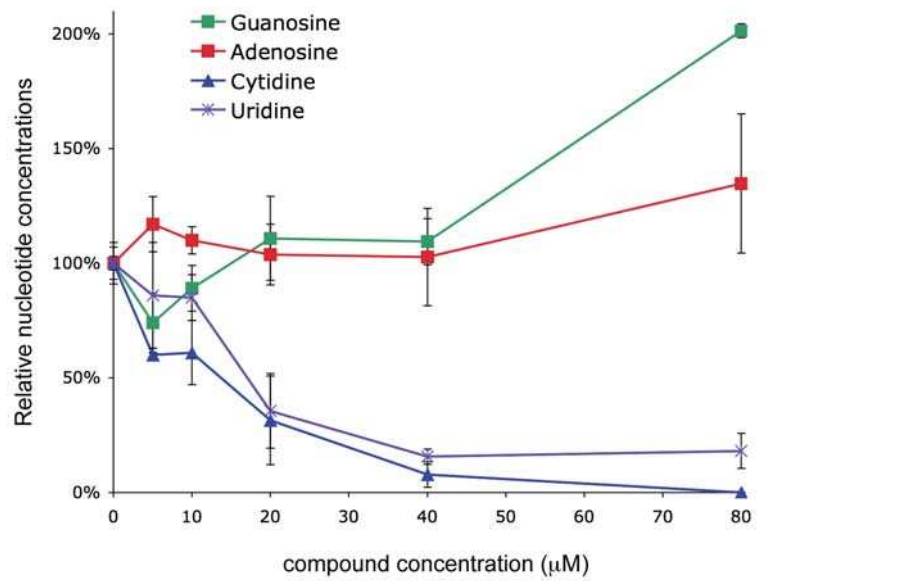
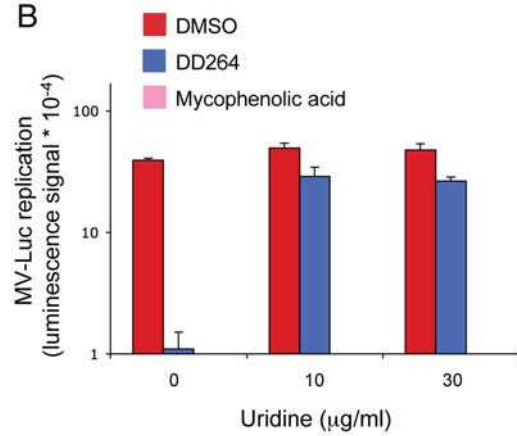


Figure 4. Expression of IFN-inducible genes (ISGs) is amplified by DD264 and brequinar. HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with suboptimal doses of ssRNA (50 ng/well) in 24-well culture plates, and incubated in the presence of DD264 (40 μ M), brequinar (100 nM) or DMSO alone. After 24 h of culture, total RNAs were extracted, and expression levels of indicated genes were quantified by qRT-PCR. *GAPDH*, *HPRT1* and *18S* correspond to control housekeeping genes, whereas others are well-known ISGs. Experiment was performed four times and for each gene, data were normalized using cells stimulated with ssRNA alone as a reference (red bars).
doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g004

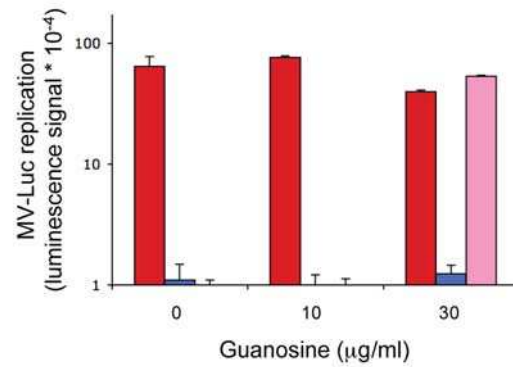
A



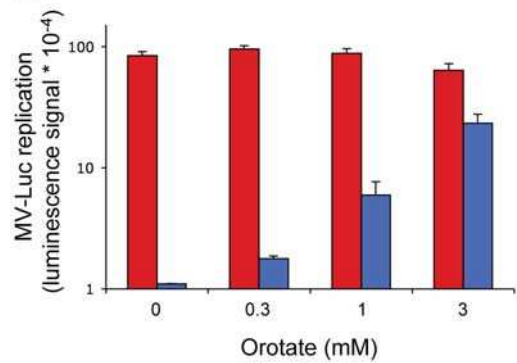
B



C



D



E

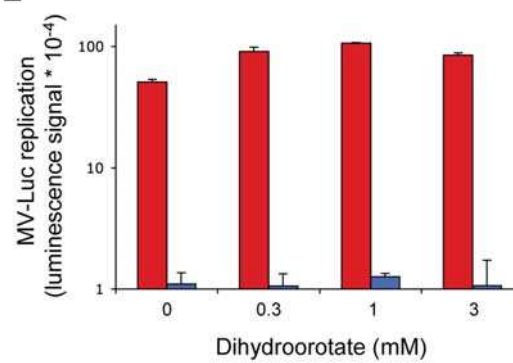


Figure 5. DD264 is an inhibitor of pyrimidine biosynthesis pathway. (A) Inhibition of uridine and cytidine in DD264-treated cells. HEK-293T cells were treated with DMSO alone or increasing concentrations of DD264. After 24 hours, cells were harvested and nucleoside concentrations were determined by HPLC. Concentration is expressed as a percentage relative to DMSO-treated cells. (B–E) HEK-293T cells were infected with recombinant MV strain expressing luciferase (MOI = 0.1), and incubated with DD264 (40 μ M), mycophenolic acid (15 μ M) or DMSO alone, and culture medium was supplemented with uridine (B), guanosine (C), orotate (D) or dihydroorotate (E). After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g005

these results demonstrated that inhibition of pyrimidine biosynthesis directly amplified cellular response to ssRNA and expression of ISGs.

Antiviral potency of DD264 relies on cellular gene expression, nuclear export machinery and IRF1 transcription factor

We have established a link between pyrimidine biosynthesis pathway and innate immune response. This opened the possibility that antiviral activity of DD264 is not a direct consequence of pyrimidine nucleoside deprivation that prevents viral transcription or replication, but rather relies on the amplification of the host antiviral response. To test this hypothesis, we treated HEK-293T cells with α -amanitin, a molecule that inhibits human RNA polymerase II and blocks transcription of cellular genes. As expected, α -amanitin showed some toxicity but did not impair MV replication. Most interestingly, MV inhibition by DD264 was abrogated in the presence of α -amanitin (Figure 7A and 7B), thus demonstrating that the antiviral activity of DD264 required the transcription of cellular genes. Similarly, α -amanitin blocked the antiviral activity of brequinar (Figure 7A and 7B). This argued against a direct impact of pyrimidine deprivation on viral replication, and rather involved the host response as assessed by the need for cellular gene expression.

This conclusion was further supported by experiments performed with leptomycin B (LMB), a potent inhibitor of Crm1-dependent nuclear export. Since cellular gene transcription is required for DD264 or brequinar to block viral growth, we reasoned that inhibiting mRNA export out of the nucleus should have similar effects. Thus, HEK-293T cells were infected with MV strain expressing luciferase, and cultured with DD264 or brequinar in the presence of LMB. As shown in Figure 7C, LMB efficiently restored viral replication in DD264 or brequinar-treated cells. Together with experiments performed with α -amanitin, this clearly involved both cellular gene transcription and nuclear export in the antiviral activity of DD264 and brequinar.

Expression of ISGs is essentially controlled by members of the interferon regulatory transcription factor (IRF) family that bind IRE (IRF regulatory elements) or ISRE in promoter sequences of antiviral genes. In particular, expression of IRF1 was shown to drive the expression of many ISGs and confer resistance to various viruses [16,42], thus demonstrating a key role in host resistance to viral infections. Therefore, we investigated the role of IRF1 in ISRE-luciferase and ISG expression, and in the antiviral state induced by DD264. First, *IRF1* gene silencing by siRNA transfection was found to abolish ISRE-luciferase expression in ssRNA-treated cells, whether DD264 was added or not (Figure 8A). It should be noticed that when compared to Figure 3A, lower amounts of ssRNA were required to stimulate the ISRE-luciferase, suggesting that siRNA transfection had somehow sensitized cells to ssRNA in line with a recent report [43]. Furthermore, IRF1 silencing also suppressed the induction of various ISGs in ssRNA-treated cells, whether DD264 was added or not, whereas housekeeping genes were not affected (Figure 8B). Similarly, IRF1 silencing suppressed the induction of ISGs by MV infection

(Figure S5A–L). Altogether, this demonstrated that IRF1 is essential for the expression of ISGs in these cells. If the antiviral activity of DD264 relied on the amplification of ISG expression as we hypothesized, knocking-down IRF1 was expected to suppress its antiviral activity. As shown in Figure 9A and 9B, IRF1 silencing partially restored MV and CHIKV replication in DD264-treated HEK-293T cells. IRF1 knockdown also restored viral growth in brequinar-treated cells (Figure 9C and 9D). Similar results were obtained when performing this experiment with HeLa cells, establishing that DD264 or brequinar antiviral activity required IRF1 expression in both cell types (Figure S6A–D). As a control, IRF1 expression levels in siRNA-treated HEK-293T or HeLa cells are presented in Figure S7A–B. This demonstrated the critical role of IRF1 in the antiviral state induced by DD264 or brequinar. Most importantly, this established that pyrimidine synthesis inhibitors, and in particular DHODH inhibitors, prevent viral replication by promoting antiviral gene expression, thus delineating a novel link between this metabolic pathway and innate immunity.

Discussion

Here, we describe DD264, a molecule that was selected from a high-throughput functional screen for its capacity to stimulate expression of interferon-inducible antiviral genes. This compound demonstrated a strong and broad antiviral activity that correlated with its capacity to amplify cellular response to ssRNA and expression levels of antiviral genes. We further showed that DD264 immuno-stimulatory activity depends on the inhibition of pyrimidine biosynthesis, similarly to brequinar, a well-characterized inhibitor of this metabolic pathway. Altogether, this allowed us to establish a yet unsuspected link between inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway and stimulation of innate immunity.

It is surprising that several groups, who recently performed functional screenings for inhibitors of viral growth in infected cells, all independently identified molecules targeting pyrimidine biosynthesis pathway and in particular DHODH [33,34,35,36]. This suggests a strong bias for inhibitors of this enzyme when looking for antiviral molecules with such functional assays. Altogether, our results support the idea that the antiviral activity of pyrimidine synthesis inhibitors, including aforementioned compounds [33,34,35,36], does not simply rely on depriving viral polymerases of nucleosides, but is mediated through amplification of innate immune response. Conversely, other research groups have isolated broad-spectrum antiviral molecules while searching for stimulators of innate antiviral genes much like we did, using cell-based assays with reporter genes [9,21,22,23,24,25]. With our results in mind, it should be determined if the antiviral molecules they identified based on their capacity to stimulate interferon-inducible antiviral genes are in fact pyrimidine synthesis inhibitors, or if they stimulate innate immunity through alternative pathway.

Our data show that antiviral activity of pyrimidine synthesis inhibitors such as DD264 or brequinar, although independent on IFN- α/β secretion (Table S1 and S2; Figure S4), critically relies on the expression of cellular genes as assessed by experiments performed with α -amanitin, leptomycin B and siRNA targeting

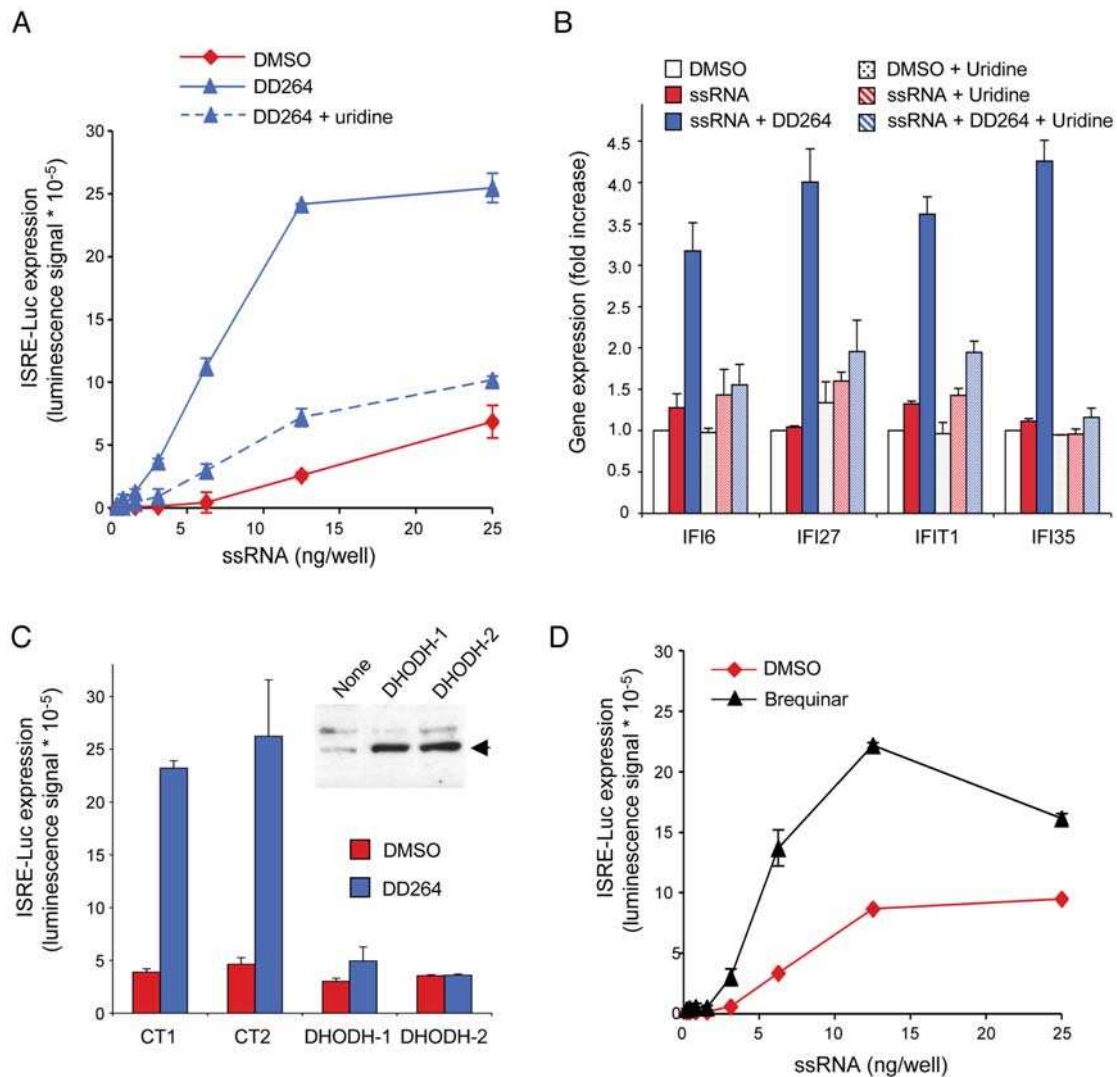


Figure 6. Inhibition of pyrimidine biosynthesis accounts for the amplified cellular response to ssRNA. (A) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with increasing doses of ssRNA, and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone in 96-well cultures plates. Culture medium was supplemented or not with uridine. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. (B) Cells were transfected with 20 ng/well of ssRNA in 12-well plates, and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone. Culture medium was supplemented or not with uridine. After 24 hours, expression levels of IFI6, IFI27, IFIT1 and IFI35 were determined by qRT-PCR. Data were normalized relative to control housekeeping genes (GAPDH, HPRT1, and 18S). Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (C) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected in 96-well plates with 50 ng of an expression vector encoding for DHODH (using two independent plasmid preparations of the same construct, #1 and #2). DHODH overexpression was assessed by western-blot analysis (upper right panel). Alternatively, cells were transfected with expression vectors encoding for control proteins (CT1 and CT2, see Materials and Methods for details). After 48 hours, cells were transfected with 6 ng/well of ssRNA, and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (D) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with increasing doses of ssRNA, and incubated in the presence of brequinar (200 nM) or DMSO alone in 96-well cultures plates. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g006

IRF1. IRFs are transcription factors that bind ISRE and closely related IRE elements in the promoter region of target genes. Most IRFs are critically involved in the regulation of immune response [44,45,46,47,48,49,50]. Since IRF1 is a master regulator of

antiviral gene expression, as supported by literature [16,42] and confirmed by our own data, its implication in virus inhibition by DD264 and brequinar is consistent. But how inhibition of pyrimidine synthesis stimulates innate immune response remains

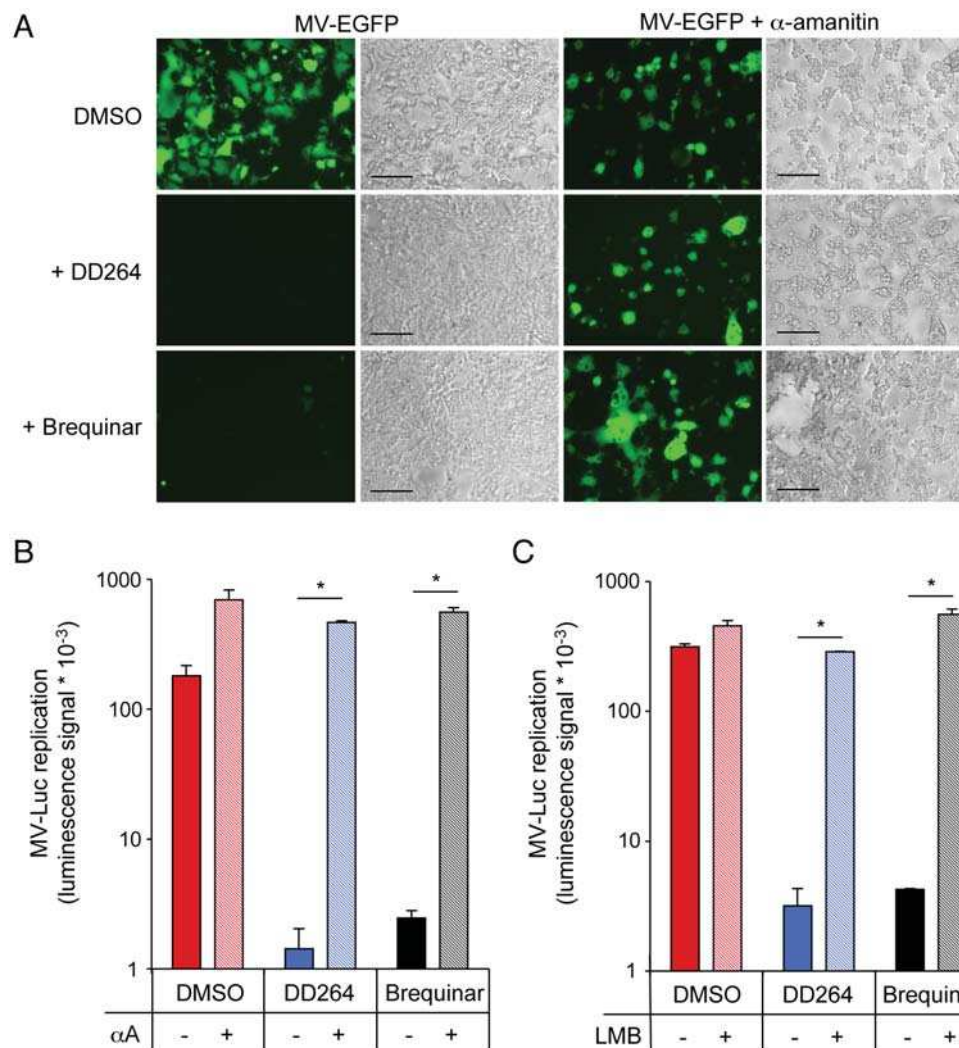


Figure 7. Antiviral activity of DD264 and brequinar is abrogated by α -amanitin and leptomycin B. (A) HEK-293T cells were infected with a recombinant strain of MV expressing EGFP (MOI=0.1), and incubated with DD264 (40 μ M), brequinar (200 nM) or DMSO alone (None), and culture medium was supplemented or not with α -amanitin (5 μ g/ml). After 48 hours, EGFP expression in cell cultures was determined using fluorescence (left panels) and bright-field (right panels) microscopy. Scale bar=200 μ m. (B) HEK-293T cells were infected with recombinant MV strain expressing luciferase (MOI=0.1), and incubated with DD264 (80 μ M), brequinar (200 nM) or DMSO alone, and culture medium was supplemented or not with α -amanitin at 5 μ g/ml (+/- α A). After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (C) HEK-293T cells were infected with recombinant MV strain expressing luciferase (MOI=0.1), and incubated with DD264 (80 μ M), brequinar (200 nM) or DMSO alone, and culture medium was supplemented or not with leptomycin B at 2.5 ng/ml (+/- LMB). After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. * corresponds to p-values<0.05. doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g007

a pending question. Interestingly, our data parallel a previous work showing that inhibition of pyrimidine synthesis induces a cellular stress that translates into p53 up-regulation and nuclear accumulation [37]. In this system, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) induced p53 upregulation by preventing its degradation in the 20S proteasome. We did not detect any upregulation of IRF1, as assessed by qRT-PCR and western-blot (Table S1 and Figure S8A) or modification of its nuclear localization pattern in DD264

or brequinar-treated cells (Figure S8B), which could account for the increased activity of the ISRE promoter. However, IRF1 binds numerous cellular proteins, and these interactions can regulate the transcriptional activity of both IRF1 and associated transcription factors like p53 or NF- κ B [51,52,53,54,55]. Besides, post-translational modifications of IRF1, like ubiquitination, SUMOylation, and acetylation, have been reported to modulate its activity [53,56,57]. Associations with cofactors or post-translational modifications could increase IRF1 transcriptional activity in

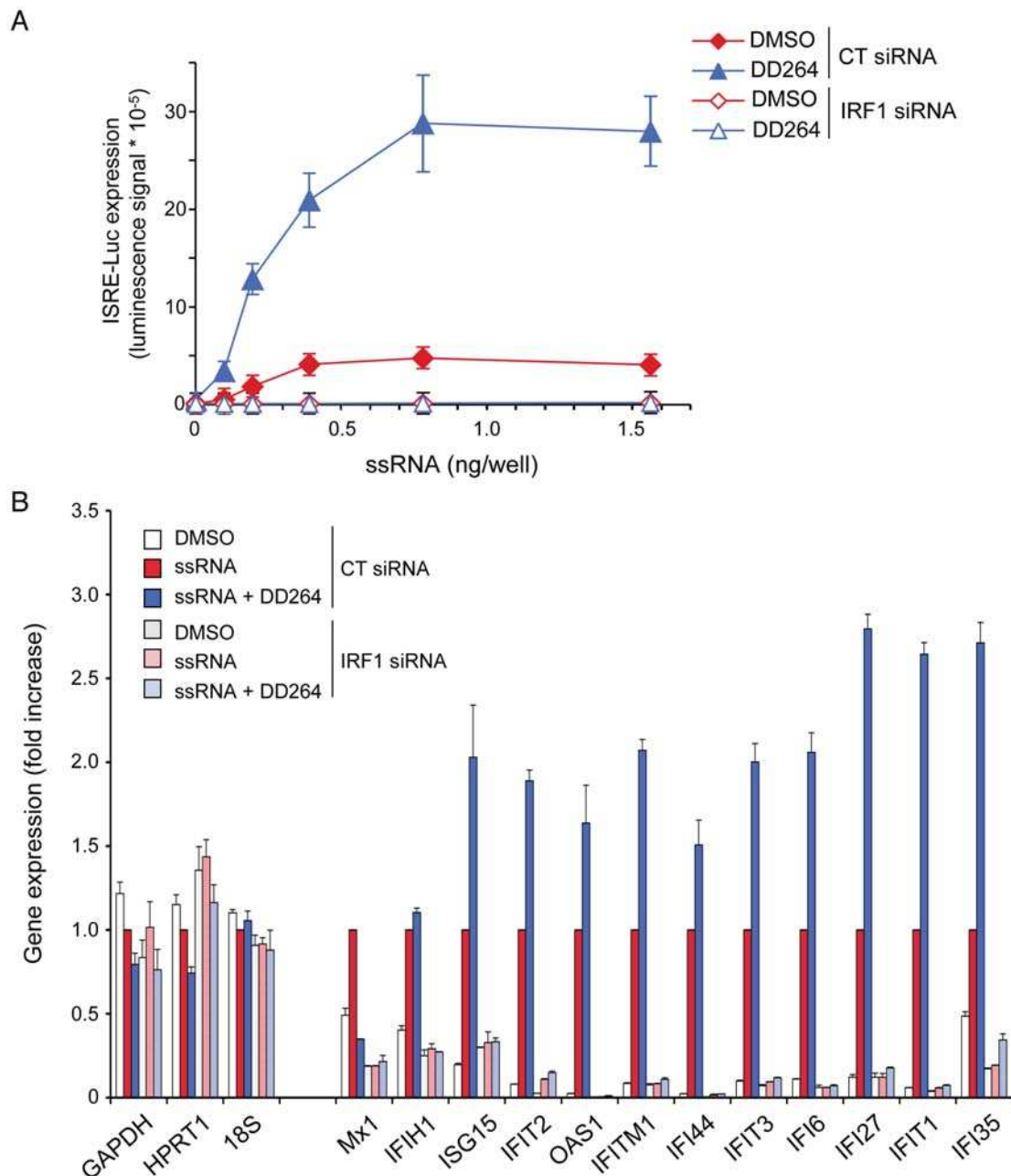


Figure 8. IRF1 is required for the expression of ISGs. (A) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with control siRNA (CT) or siRNA directed against *IRF1* and cultured for 48 hours in 96-well culture plates. Then, cells were transfected with increasing doses of ssRNA, and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. (B) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with control siRNA (CT) or siRNA directed against *IRF1* and cultured for 48 hours in 12-well culture plates. Cells were transfected with ssRNA (20 ng/well), and incubated in the presence of DD264 (40 μ M) or DMSO alone. After 24 h of culture, total RNAs were extracted, and expression levels of indicated genes were quantified by qRT-PCR. *GAPDH*, *HPRT1* and *18S* correspond to control housekeeping genes, whereas others are well-known ISGs. Data were normalized using cells stimulated with ssRNA alone as a reference (red bars). doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g008

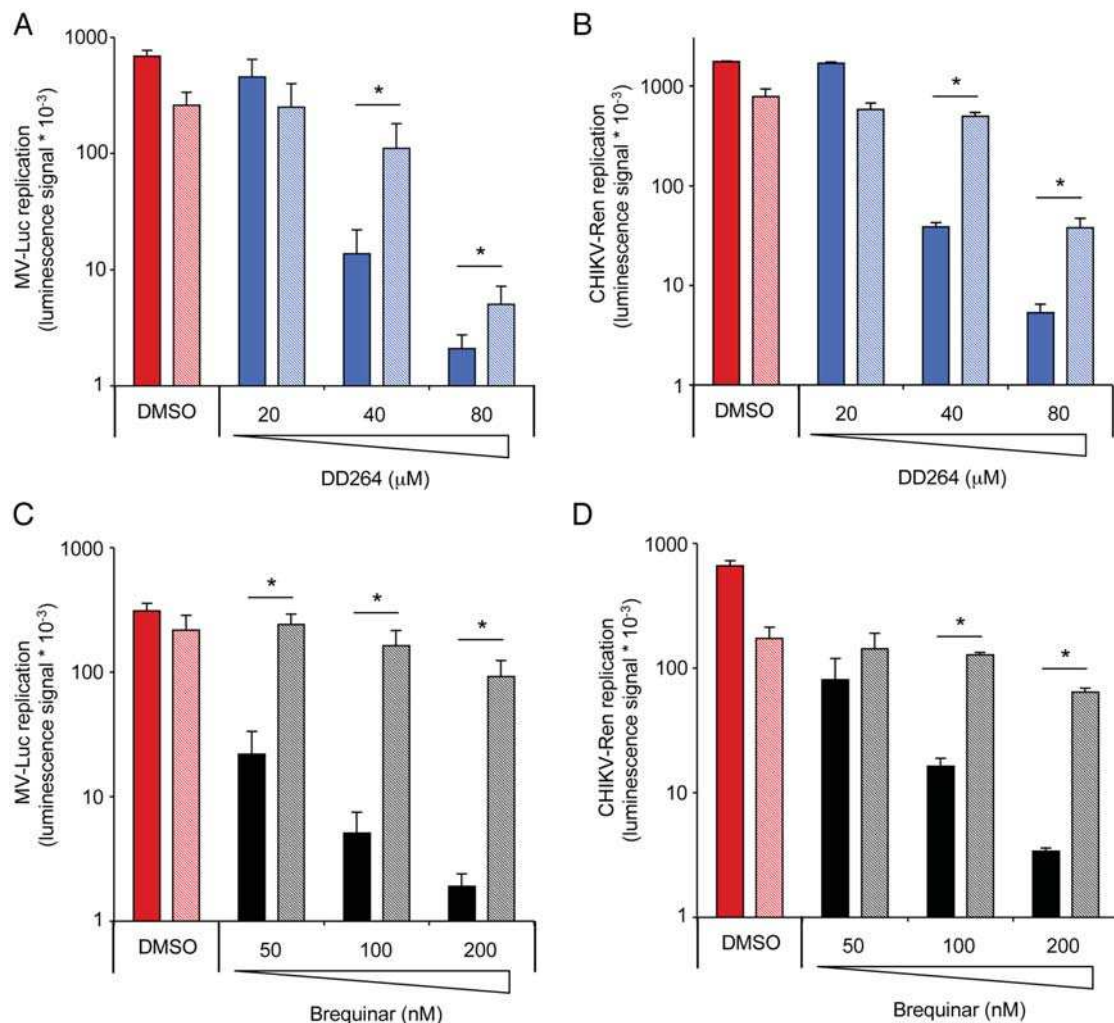


Figure 9. Antiviral activity of DD264 and brequinar is abrogated when silencing IRF1 expression in HEK-293T cells. (A–B) HEK-293T cells were transfected with control siRNA (solid colors) or siRNA directed against *IRF1* (shaded colors) and cultured for 48 hours. Then, cells were infected with recombinant MV strain expressing luciferase (MOI = 0.1) or CHIKV strain expressing luciferase (MOI = 0.2), and incubated with increasing concentrations of DD264 or DMSO alone. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. (C–D) Same experiment was performed but cells were treated with increasing concentrations of brequinar instead of DD264. * corresponds to p-values < 0.05.

doi:10.1371/journal.ppat.1003678.g009

DD264 or brequinar-treated cells, and this could explain the enhanced expression of ISGs when blocking pyrimidine biosynthesis.

Another interesting observation came from the analysis of other nucleoside synthesis inhibitors, in particular mycophenolic acid. This potent inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) blocks the *de novo* synthesis of purine nucleosides, and is also known for its broad-spectrum antiviral activity since the 60's [38]. In a recent report by van der Laan and colleagues, mycophenolic acid was shown to increase expression of various ISGs, including IRF1, when stimulating cells with low doses of IFN- α [58]. Furthermore, inhibition of hepatitis C virus replication by mycophenolic acid was shown partially mediated by IRF1.

These data clearly match our observations on pyrimidine synthesis inhibitors. Altogether, this suggests that inhibition of either purine or pyrimidine synthesis mediates a cellular stress that promotes expression of ISGs and induces a resistance state to infections by RNA viruses. Interestingly, inhibition of pyrimidine synthesis was recently found to reverse the inhibition of mRNA nuclear export by different virulence factors such as influenza virus NS1 or the matrix protein of vesicular stomatitis virus [59]. How this relates to our findings will have to be addressed in the future.

Finally, although DD264 was found to inhibit the replication of various RNA viruses, this compound was inefficient to prevent cellular infection by two related DNA viruses: Herpes simplex virus type 1 (HSV1) and type 2 (HSV2) (Figure S9). This is

surprising as pyrimidine biosynthesis inhibition was previously reported to block the replication of other DNA viruses like human adenovirus 5 or vaccinia virus [35]. This suggested that DNA viruses in general are sensitive to inhibitors of pyrimidine biosynthesis pathway, but HSV1 and 2 have apparently evolved some strategy to escape the cellular response induced by this type of drug. Indeed, herpes simplex viruses are well known for their large arsenal of virulence factors that block the antiviral response through different mechanisms [60]. Screening collections of HSV1 or 2 proteins to identify which ones are susceptible to alleviate the antiviral state induced by pyrimidine biosynthesis inhibitors should be relatively straightforward. This is probably a specific feature of *Alphaherpesvirinae* since human Cytomegalovirus (CMV), which belongs to *Betaherpesvirinae*, was found sensitive to the inhibition of pyrimidine biosynthesis [61]. Interestingly, it was also reported that CMV and HSV1 have divergent effects on cellular metabolism. Although CMV enhances lipid biosynthesis, HSV1 rather promotes the synthesis of pyrimidine nucleosides [62]. This could also account for a different sensitivity to pyrimidine biosynthesis inhibitors. Importantly, although pyrimidine biosynthesis inhibitor leflunomide was reported to block HSV1 replication, some off-target effect of this drug on kinases is most likely responsible for this activity [63].

Our data also strongly suggest that DD264 directly inhibits DHODH, the fourth enzyme of pyrimidine biosynthesis metabolic pathway. This mitochondrial enzyme catalyzes dihydroorotate oxidation to orotate via a two-step mechanism that requires FMN and ubiquinone as prosthetic groups [64,65]. Best-known inhibitors of DHODH such as brequinar or A77-1726, the active form of leflunomide, are inserted within a hydrophobic tunnel of the enzyme where they probably compete with ubiquinone [41]. Interestingly, DD264 exhibits two hydrophobic rings and a planar structure that matches chemical features of DHODH inhibitors targeting the ubiquinone-binding pocket, and this was confirmed by *in silico* docking experiments (Figure S10A–C). This will require confirmation using enzymatic assays and structure analysis.

Whether DHODH represents a viable target for antiviral treatments *in vivo* will need to be determined. Several attempts to use pyrimidine synthesis inhibitors in the treatment of systemic viral infections have failed [33,34,36]. This is probably because the high uridine concentration in peripheral blood (about 3–8 μ M) compensates for the inhibition of the *de novo* pyrimidine synthesis pathway. However, it has been shown that A77-1726, which blocks both kinase activity and *de novo* pyrimidine synthesis, could be useful in the treatment of airways when infected by respiratory viruses such as human respiratory syncytial virus [66,67]. This suggests that DHODH inhibitors should be further evaluated *in vivo* in the local treatment of respiratory tract infections.

In conclusion, our data demonstrate that inhibition of pyrimidine synthesis increases expression of antiviral genes, which finally confers resistance to viral infections. In the future, physiological or pathological circumstances activating this transduction pathway will have to be determined.

Materials and Methods

Compound libraries and reagents

The compound collection amounts to a total of 41,353 molecules arrayed in 520 96-well microplates. About one third of the collection comprises commercial chemical libraries acquired through Prestwick Chemical (1,120 compounds; www.prestwickchemical.com) and ChemDiv (eu.chemdiv.com), which provided 9,360 compounds from a kinase inhibitor subset library (CDI) and 4,624 compounds from a nucleobase analog subset

library (NECAN). The rest of the collection is from the French “Chimiothèque Nationale” [68]. All compounds were stored in DMSO at -20°C . Compounds from Prestwick Chemical and ChemDiv were at 2 mg/ml, which corresponds to 6.32 ± 2.8 mM (Prestwick Chemical), 5.57 ± 0.89 (CDI) and 5.35 ± 1.11 mM (NECAN), respectively. Compounds from the “Chimiothèque Nationale” were at the following concentrations for the different subsets: Université de Lyon at 10 mM, Faculté de Pharmacie de Strasbourg at 2 mg/ml (7.43 ± 2.48 mM), Centre d’Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) at 3.3 mg/ml (10.5 ± 3.35 mM), Institut de Chimie des Substances Naturelles at 1 mg/ml (3.02 ± 1.28 mM), Institut Curie at 2 mg/ml (7.34 ± 2.76 mM), Institut Pasteur-A at 3.3 mg/ml (12.8 ± 3.71 mM), Institut Pasteur-B at 2 mg/ml (6.81 ± 2.13 mM), Mutabilis at 5 mM, and Novexel at 5 mg/ml (11.08 ± 2.31 mM).

Brequinar sodium salt hydrate was from Sigma (SML0113). α -amanitin was from Sigma (A2263). Leptomycin B from Sigma (L2913) was kindly provided by Dr. Agata Budkowska (Institut Pasteur). Short synthetic 5'-triphosphate RNA molecules (ssRNA) were synthesized from pCI-neo vector digested with XbaI using T7 RiboMAX Express large scale RNA production system (Promega), and then purified with a filtering membrane (Millipore). ELISA kits to determine IFN- α and IFN- β levels in culture supernatants were from PBL Biomedical Laboratories. ELISA kit to determine IFN- γ level in culture supernatants was from eBioscience. Sheep polyclonal antibodies against IFN- α (31100-1) and IFN- β (31400-1) were from PBL Biomedical Laboratories.

Cell lines, primary cells and viruses

HEK-293T, HeLa and MRC5 cells (ATCC) were maintained in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Gibco-Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin, and streptomycin at 37°C and 5% CO_2 . Cellular viability was determined by quantification of adenosine triphosphate (ATP) in culture wells using the CellTiter-Glo Assay (Promega) following manufacturer’s recommendations. Apoptosis was detected by TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling) using the APO-Direct assay kit from BD. Cell cycling was determined by propidium iodide staining and flow cytometry analysis.

Chikungunya virus (CHIKV) infections were performed with wild-type strain 05115 from La Réunion Island. The recombinant CHIKV strain expressing Renilla luciferase from a coding sequence inserted between nsP3 and nsP4 non-structural proteins has already been described [28]. All CHIKV stocks were produced on VERO cells, and titrated by TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) on HEK-293T cells. Recombinant measles virus strain expressing firefly luciferase (rMV2/Luc) or EGFP (rMV2/EGFP) from an additional transcription unit were derived from vaccine strain Schwarz, and have been previously described [69,70]. Virus stocks were produced on VERO cells, and titrated by TCID₅₀ on VERO cells. The highly neurovirulent West Nile virus (WNV) strain IS-98-ST1 was propagated in mosquito AP61 cells and virus titer was determined on primate VERO cells by virus plaque-forming assays. The titer of IS-98-ST1 virus stock was about 10^{+10} plaque-forming units (PFU) per millimeter. Cy3-conjugated antibody against CHIKV E2 protein was previously reported (Clone 3E4) [71]. Cy3-conjugated antibody against WNV E protein (Clone E24) was kindly provided by Dr. MS. Diamond. Coxsackievirus B3 (CVB3, strain Nancy) was kindly provided by Dr. M. Vignuzzi (Institut Pasteur). Virus was amplified on HeLa cells, harvested by one freeze–thaw cycle and titrated by TCID₅₀. Herpes simplex virus type 1 (HSV1, strain KOS) and 2 (HSV2, strain VR734) were kindly provided by

Dr. T. Mourez (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris). Virus stock were produced on VERO cells, and titrated by TCID₅₀. Anti-herpesvirus antibody was from Argene (Ref 11-090).

Screening procedure

All robotic steps were performed on a TECAN Freedom EVO platform. All compounds were screened at a 1:100 dilution of the original stock. Compounds were transferred from mother plates into white, flat bottom, bar-coded tissue culture 96-wells plates (Greiner Bio One); 1 μ l of a DMSO solution was spiked into dry wells of daughter plates (80 compounds per plate). For each plate, columns 1 and 12 were dedicated to controls: culture wells were alternatively spiked with 1 μ l of DMSO alone (negative control) or supplemented with recombinant IFN- β so that final concentration equals 1,000 IU/ml (positive control). Human HEK-293T cells were transfected in bulk with pISRE-luciferase reporter plasmid (Stratagene, Ref 219089). Cell transfection was performed with a 1 mg/ml poly-ethylenimine (PEI “Max”; Polyscience) solution adjusted at pH = 7. For one 96-well culture plate, 17 μ g of plasmid were diluted in 500 μ l of DMEM (Gibco-Invitrogen). In parallel, 53 μ g of poly(ethyleneimine) from Sigma-Aldrich (PEI) were diluted in 500 μ l of DMEM (Gibco-BRL). PEI and plasmids were mixed together and incubated for 30 min at room temperature. This mix was added to 2×10^5 cells in a final volume of 10 ml of DMEM containing 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. Finally, 100 μ l of this cell suspension were added to each well of the microplate already containing one chemical compound. After 24 hours of incubation at 37°C in the presence of 5% CO₂, the firefly luciferase substrate (Bright-Glo, Promega) was added directly into the wells (50 μ l) and luciferase activity was measured 6 minutes later on a Safire2 (TECAN) using a 100 ms integration time. For each plate, means of luminescence and corresponding standard deviations were calculated for positive and negative controls (μ^+ , σ^+ , μ^- , and σ^- , respectively) to determine the signal-to-background ratio ($S/B = \mu^+/\mu^-$) and the Z'-factor ($Z' \text{-factor} = 1 - 3(\sigma^+ + \sigma^-)/(\mu^+ - \mu^-)$). Average Z'-factor was determined to be 0.806 ± 0.1 (no value below 0.5; Figure S1) and signal-to-background (S/B) ratio, which corresponds to luciferase signal in the presence of recombinant IFN- β relative to DMSO alone, was >45 for all plates. Altogether, this demonstrated the robustness of our assay, which can be categorized as excellent [72]. For each compound, the induction factor was calculated as the ratio of luminescence signal measured in the corresponding well to the mean of luminescence for negative controls in the same plate.

Establishment of STING-37 stable cell line

We generated a reporter plasmid carrying both the ISRE-luciferase gene and *neo* as a G418-resistance selection marker. First, pCi-neo plasmid (Promega) was digested with BglII and XbaI enzyme to remove the entire CMV promoter sequence. Plasmid extremities were filled using Pfu polymerase, and Gateway cassette C1 (Invitrogen) was cloned between the two blunt ends to produce a Gateway-compatible destination vector called pCi-neo Δ CMV-GW. In parallel, the ISRE-luciferase sequence was amplified by PCR from pISRE-luciferase reporter plasmid (Stratagene, Ref 219089) using Gateway (Invitrogen) primers AttB1-AACGTTATTTTTCACCTGCATTCTAG and AttB2-AGATCTCACTGCTCCCATTCATCAG. Corresponding DNA fragment was cloned by *in vitro* recombination (BP reaction) into pDONR207 entry vector. ISRE-luciferase gene was finally recombined from pDONR207 into pCi-neo Δ CMV-GW by *in vitro* recombination (LR reaction). This new plasmid was transfected in HEK-293 cells (ATCC) using JetPrime reagent

(Polyplus Transfection). Two days later, culture medium was removed and replaced by fresh medium containing G418 at 500 μ g/ml. Transfected cells were amplified and subsequently cloned by serial limit dilution. A total of 44 clones were screened for luciferase activity, and STING-37 clone was selected for its optimal signal to background ratio when stimulated or not with recombinant IFN- β .

DHODH expression vector

DHODH sequence was amplified by PCR (Ex-Taq; Takara) from an IMAGE full-length cDNA clone (IMAGE ID: 6064723), and cloned into pDONR207 using an *in vitro* recombination-based cloning system (Gateway technology; Invitrogen). DHODH encoding sequence was subsequently transferred from pDONR207 into a modified pCI-neo vector (Promega) compatible with the Gateway system. Identical plasmids encoding for either cellular protein UBA3 or nsP4 of chikungunya virus were used as transfection controls (CT1 and CT2, respectively). Transfection was performed with jetPRIME reagent (Polyplus Transfection) following manufacturer's recommendations. Anti-DHODH monoclonal antibody was from Abnova (Clone 6E1).

IRF1 siRNA procedure

Silencer Select siRNA were purchased from Invitrogen, and transfected in STING-37 cells following manufacturer's recommendations. IRF1 silencing was achieved with a pool of two siRNA (s7502 and s7503), whereas controls correspond to a pool of two siRNA directed against IRF5 (s7513 and s7515). In each well of a 96-well plate, 2 pmol of siRNA were mixed with 20 μ L of Opti-MEM (Gibco-Invitrogen) and 0.25 μ L of Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen). This mix was incubated for 10 minutes at room temperature, and supplemented with 80 μ L of DMEM +10% FCS without penicillin and streptomycin and 15,000 STING-37 cells. Cells were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO₂, and then stimulated with DD264 and recombinant IFN- β at 500 IU/ml or transfected with ssRNA molecules with JetPrime. After 24 hours of culture, firefly luciferase activity was determined using the Bright-Glo reagent following manufacturer's recommendations (Promega). Anti-IRF1 antibody was from Cell Signaling (D5E4).

Quantitative RT-PCR analysis

HEK-293T cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well). One day later, cells were transfected with 50 ng/well of ssRNA molecules. Transfections were performed with JetPrime PEI (Polyplus transfection), and stimulated or not in the presence of DD264. 24 hours later, cells were recovered in PBS and total RNA isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Following elution, RNA yields were evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies).

A two-step qRT-PCR (Taqman technology, Applied Biosystems) was performed to measure transcription levels for 11 genes of interest (primer references are indicated): *IFI27* (Hs00271467_m1), *IFI35* (Hs00413458_m1), *IFI44* (Hs00197427_m1), *IFI6* (Hs00242571_m1), *IFIH1* (Hs01070332_m1), *IFIT1* (Hs01911452_s1), *IFIT3* (Hs01922752_s1), *IFITM1* (Hs00705137_s1), *ISG15* (Hs01921425_s1), *MX1* (Hs00895608_m1) and *OAS1* (Hs00973637_m1). Expression levels of four housekeeping genes, including *18S* (Hs99999901_s1), *GAPDH* (Hs99999905_m1), and *HPRT1* (Hs99999909_m1), were also determined and used as internal reference controls. Starting from 1 μ g of total RNA, cDNA synthesis was achieved in 20 μ L using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit following manufacturer's recommendations (Life Technologies). Quantitative

PCR reactions were performed on 0.6 μ L of cDNA synthesis reaction mix using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) on a StepOnePlus Real-Time PCR machine (Applied Biosystems). Results were normalized using expression levels of the four housekeeping genes.

Transcription levels of IRF1 and IFN genes presented in Table S1 were determined with a two-step qRT-PCR (SYBR green technology, SABiosciences) using RT² Profiler PCR Array System. Starting from 5 μ g of total RNA, cDNA synthesis was achieved using RT² First-Strand cDNA Synthesis Kit following manufacturer's recommendations (SABiosciences). Quantitative PCR reactions were performed using RT² qPCR SYBR Green Master Mix (SABiosciences).

Metabolite analyses

HEK-293T cells were plated in 6-well plates (1×10^6 cells per well). One day later, culture medium was supplemented with increasing doses of DD264 or DMSO alone. After an additional 24 hours of culture, cells were harvested, carefully counted and monitored for viability by trypan blue exclusion, and washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). All the extraction steps were performed on ice. Cellular pellets were deproteinized with an equal volume of 6% trichloroacetic acid (TCA), vortex-mixed for 20 seconds, ice-bathed for 10 min, and vortex-mixed again for 20 seconds. Acid cell extracts were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were supplemented with an equal volume of bi-distilled water, vortex-mixed for 60 seconds, and neutralized by the addition of 5M K₂CO₃. Cells extracts were subjected to an optimised SPE procedure as previously described [73]. All fractions were injected into the HPLC system separately and the results pooled to calculate the total amount of nucleotides and nucleosides present in the original samples. HPLC analysis was performed with a Shimadzu HPLC system interfaced to the LabSolution software. Samples were injected onto an ABZ Supelco 5 μ m (150 $\times$ 4.6 mm) column (Sigma). The HPLC columns were kept at 40°C in a column oven. The mobile phase was delivered at a flow-rate of 1 ml/min during the analysis using a stepwise isocratic elution with a buffer containing 10 mM acetate ammonium adjusted to pH 6.9. Detection was done with the diode array detector (PDA). The LC Solution workstation chromatography manager was used to pilot the HPLC instrument and to process the data. The products were monitored spectrophotometrically at 254 nm and quantified by integration of the peak absorbance area, employing a calibration curve established with various known concentrations of nucleosides. Finally, a correction coefficient was applied to correct raw data for minor differences in the total number of cells determined in each culture condition.

Supporting Information

Figure S1 Evaluation of the screen using the Z'-factor value plotted for each plate. (PDF)

Figure S2 DD264 inhibits the proliferation of HEK-293T cells. (A) HEK-293T cells were incubated with increasing doses of DD264 (10, 20, 40 or 80 μ M) or matching volumes of DMSO alone. After 0, 24, 48 and 72 hours of culture, the number of living cells was determined using CellTiter-GLO reagent (Promega). This luciferase-based assay evaluates by ATP quantification the number of metabolically active cells in culture wells. The number of living cells is expressed as a percentage relative to the initial number of living cells at t = 0 hours. (B) HEK-293T cells were incubated with DD264 at 80 μ M or DMSO alone. After 24 h, cells were stained for

DNA fragmentation by TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Alternatively, cells were stained with propidium iodide for cell cycle analysis by flow cytometry, and percentage of cells in G2/M phase is indicated. (PDF)

Figure S3 DD264 inhibits MV and CVB3 growth. (A) HEK-293T cells were infected with MV (MOI = 0.2) and then cultured for 48 hours with DMSO or DD264 at 80 μ M. Cell cultures were harvested by scraping, and then frozen and thawed to release viral particles. Supernatants were recovered, clarified by centrifugation and titrated by TCID50. (B) HeLa cells were infected with a recombinant strain of MV expressing EGFP (MOI = 2), and incubated for 48 hours in the presence of DD264 at 40 μ M or DMSO alone. (C) Same experiment was performed with MRC5 cells. Scale bar = 200 μ m. (D) HEK-293T cells were infected with CVB3 (MOI = 0.1), and incubated with DMSO alone or DD264 at 40 μ M. After 24 hours, cell cultures were harvested after freezing and thawing of the plates. Supernatants were recovered, clarified by centrifugation and titrated by TCID50. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (PDF)

Figure S4 Effects of blocking antibodies against IFN- α / β on DD264-mediated amplification of cellular response to ssRNA and antiviral activity. (A) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with increasing doses of synthetic 5'-triphosphate RNA molecules (ssRNA), and incubated in the presence of DD264 (80 μ M) or DMSO alone in 96-well cultures plates. Culture medium was supplemented or not with a cocktail of sheep polyclonal antibodies against IFN- α and β at 2000 and 500 IU/ml, respectively. Such concentrations were sufficient to totally block ISRE-luciferase induction by 1000 IU/ml of recombinant IFN- α or β (data not shown). After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed in duplicate, and data represent means $\pm$ SD. (B) HEK-293T cells were infected with a recombinant strain of MV expressing EGFP (MOI = 0.1), and incubated for 48 hours in the presence of DD264 at 80 μ M or DMSO alone. Culture medium was supplemented or not with anti-IFN- α / β antibodies as described above. Upper panel is showing EGFP expression by fluorescence microscopy whereas lower panels correspond to bright fields. Scale bar = 200 μ m. (PDF)

Figure S5 IRF1 is required for ISG expression in MV-infected cells. (A–L) HEK-293 cells with the ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 cells) were transfected with control siRNA (CT) or siRNA directed against IRF1 and cultured for 48 hours. Cells were infected with MV (MOI = 0.1) and cultured for 24 hours. Total RNAs were extracted, and expression levels of indicated genes were quantified by qRT-PCR. Data were normalized relative to control housekeeping genes (GAPDH, HPRT1, and 18S). (PDF)

Figure S6 Antiviral activity of DD264 and brequinar is abrogated when silencing IRF1 expression HeLa cells. (A–B) HeLa cells were transfected with control siRNA (solid colors) or siRNA directed against IRF1 (shaded colors) and cultured for 48 hours. Then, cells were infected with recombinant MV strain expressing luciferase (MOI = 0.1) or CHIKV strain expressing luciferase (MOI = 0.2), and incubated with increasing concentrations of DD264 or DMSO alone. After 24 hours, luciferase expression was determined. Experiment was performed

in triplicate, and data represent means $\pm$ SD. **(C–D)** Same experiment was performed but cells were treated with increasing concentrations of brequinar instead of DD264. * corresponds to p -values < 0.05 . (PDF)

Figure S7 Validation of IRF1 silencing. **(A)** HEK-293T or **(B)** HeLa cells were transfected with control siRNA (CT) or siRNA directed against *IRF1* and cultured for 48 hours. *IRF1* silencing was confirmed by western-blot analysis of IRF1 expression levels. (PDF)

Figure S8 IRF1 expression level and localization pattern. **(A)** HEK-293T cells were cultured for 8 or 24 hours with DMSO alone, increasing doses of DD264 or Brequinar, or IFN- γ (100 ng/ml). IRF1 expression levels were determined by western-blot. IRF1 is induced by IFN- γ at 8 hours but expression level is back to normal at 24 hours. **(B)** HeLa cells were cultured for 24 hours with DMSO, DD264 or Brequinar. Subcellular localization of IRF1 was determined by immunostaining and fluorescence microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 40 μ m. (PDF)

Figure S9 DD264 does not inhibit herpesvirus replication. MRC5 cells were infected with HSV1 or HSV2 (MOI = 1), and then cultured with DD264 at 80 μ M or DMSO alone (None). After 24 h, herpesvirus antigens were detected by immunostaining and fluorescence microscopy. Scale bar = 200 μ m. (PDF)

Figure S10 Best conformational docking of DD264 in the hydrophobic tunnel of DHODH where brequinar, A77-1726 and probably ubiquinone bind (pdb id:1D3G). **(A)** DHODH is shown as a grey ribbon and DD264 is represented as sticks. **(B)** Higher magnification of the tunnel with amino-acid residues involved in DD264 binding. Structural images were generated using PyMOL (www.pymol.org). **(C)** Data table of energy binding parameters for brequinar, A77-1726 and DD264. (PDF)

References

- Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2008) Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res* 78: 9–25.
- Wang BX, Fish EN (2012) The yin and yang of viruses and interferons. *Trends Immunol* 33: 190–197.
- Tan SL, Ganji G, Paepfer B, Proll S, Katze MG (2007) Systems biology and the host response to viral infection. *Nat Biotechnol* 25: 1383–1389.
- Krumm SA, Ndungu JM, Yoon JJ, Dochow M, Sun A, et al. (2011) Potent host-directed small-molecule inhibitors of myxovirus RNA-dependent RNA-polymerases. *PLoS One* 6: e20069.
- Mata MA, Satterly N, Versteeg GA, Frantz D, Wei S, et al. (2011) Chemical inhibition of RNA viruses reveals REDD1 as a host defense factor. *Nat Chem Biol* 7: 712–719.
- Prussia A, Thepachatri P, Snyder JP, Plemper RK (2011) Systematic Approaches towards the Development of Host-Directed Antiviral Therapeutics. *Int J Mol Sci* 12: 4027–4052.
- Cheng G, Wang LC, Fridlender ZG, Cheng GS, Chen B, et al. (2011) Pharmacologic activation of the innate immune system to prevent respiratory viral infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 480–488.
- Shirey KA, Nhu QM, Yim KC, Roberts ZJ, Teijaro JR, et al. (2011) The anti-tumor agent, 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA), induces IFN- β -mediated antiviral activity in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 89: 351–357.
- Guo F, Mead J, Aliya N, Wang L, Cuconati A, et al. (2012) RO 90-7501 Enhances TLR3 and RLR Agonist Induced Antiviral Response. *PLoS One* 7: e42583.
- Es-Saad S, Tremblay N, Baril M, Lamarre D (2012) Regulators of innate immunity as novel targets for panviral therapeutics. *Curr Opin Virol* 2: 622–628.
- Stetson DB, Medzhitov R (2006) Type I interferons in host defense. *Immunity* 25: 373–381.
- Baum A, Garcia-Sastre A (2010) Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* 38: 1283–1299.
- Arpaia N, Barton GM (2011) Toll-like receptors: key players in antiviral immunity. *Curr Opin Virol* 1: 447–454.
- Loo YM, Gale M, Jr. (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34: 680–692.
- van Boxel-Dezaire AHH, Rani MRS, Stark GR (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I Interferons. *Immunity* 25: 361–372.
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, et al. (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481–485.
- MacMicking JD (2012) Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12: 367–382.
- Connolly DJ, O'Neill LA (2012) New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*.
- Konishi H, Okamoto K, Ohmori Y, Yoshino H, Ohmori H, et al. (2012) An orally available, small-molecule interferon inhibitor viral replication. *Sci Rep* 2: 259.
- Lin CW, Wu CF, Hsiao NW, Chang CY, Li SW, et al. (2008) Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int J Antimicrob Agents* 32: 355–359.
- Bedard KM, Wang ML, Proll SC, Loo YM, Katze MG, et al. (2012) Isoflavone Agonists of IRF-3 Dependent Signaling Have Antiviral Activity against RNA Viruses. *J Virol* 86: 7334–7344.
- Tai ZF, Zhang GL, Wang F (2012) Identification of small molecule activators of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway using a cell-based screen. *Biol Pharm Bull* 35: 65–71.
- Patel DA, Patel AC, Nolan WC, Zhang Y, Holtzman MJ (2012) High throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling pathway to drive next-generation antiviral drug discovery. *PLoS One* 7: e36594.

Table S1 Induction of IFN- α , β , γ and IRF-1 genes in DD264-stimulated cells. HEK-293T cells were incubated with DMSO or DD264 (80 μ M) for 24 hours. Total RNA were extracted and gene expression was determined by qRT-PCR. Experiment was performed three times and data represent mean values. (PDF)

Table S2 Expression of IFN- α , β , and γ in DD264-stimulated cells. HEK-293T cells were incubated with DMSO or DD264 (80 μ M) for 24 hours. Cytokine expression levels were determined by ELISA. (PDF)

Table S3 Chemical structures of DD264 analogs and corresponding potency to inhibit MV replication as described in Figure 2B. Antiviral activity was scored as followed: “–” (IC₅₀ > 80 μ M), “+/-” (IC₅₀ = 40–80 μ M), “+” (IC₅₀ = 20–40 μ M), “++” (IC₅₀ = 10–20 μ M), and “+++” (IC₅₀ = 2–10 μ M). (PDF)

Protocol S1 Synthetic Experimental Procedures and Characterization. (DOC)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Yves L. Janin, Laure Vidalain, and Dr. Olivier Schwartz for their comments and fruitful discussions. We thank Marie-Pascale Frenkiel from the Unité Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes (Institut Pasteur) for her technical support. We thank Dr. Julien Dairou and the technical platform “BioProfiler-UFLC” (Université Paris-Diderot) for metabolite analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MLH DD GCa NE HML FT POV. Performed the experiments: MLH DD GCo PJ AL OH GCa GJ SK GA HML POV. Analyzed the data: MLH DD GCa NE GA HML FT POV. Contributed reagents/materials/analysis tools: YJ PD. Wrote the paper: DD HML FT POV.

24. Martinez-Gil L, Ayllon J, Ortigoza MB, Garcia-Sastre A, Shaw ML, et al. (2012) Identification of small molecules with type I interferon inducing properties by high-throughput screening. *PLoS One* 7: e49049.
25. Ortigoza MB, Dibben O, Maamary J, Martinez-Gil L, Leyva-Grado VH, et al. (2012) A novel small molecule inhibitor of influenza A viruses that targets polymerase function and indirectly induces interferon. *PLoS Pathog* 8: e1002668.
26. Kummerer BM, Grywna K, Glasker S, Wieseler J, Drosten C (2012) Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *J Gen Virol* 93: 1991–1995.
27. Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, et al. (2012) Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J Virol* 86: 3121–3134.
28. Henrik Gad H, Paulous S, Belarbi E, Diancourt L, Drosten C, et al. (2012) The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in OAS3 expressing cells by acting on viral entry. *Virology*.
29. Dauzonne D, Demerseman P (1990) Potassium Fluoride-Promoted Reaction of (2-Chloro-2-nitroethenyl)benzenes with 1,3-Dicarbonyl Compounds - A General Synthesis of 6,6-Dimethyl-2-nitro-3-phenyl-3,5,6,7-tetrahydro-4(2H)benzofuranones and some Analogs. *J Heterocyclic Chem* 27: 1581–1584.
30. Dauzonne D, Josien H, Demerseman P (1990) (2-Chloro-2-nitroethenyl)benzenes as Synthons - a General-Method for the Preparation of 2,3-Dihydro-2-nitro-3-phenyl-4H-furo[3,2-c][1]benzopyran-4-ones and 3-Phenyl-4H-furo[3,2-c][1]benzopyran-4-ones. *Tetrahedron* 46: 7359–7371.
31. Dauzonne D, Adam-Launay A (1992) A Convenient Procedure for the Preparation of 5,6-Dihydro-6-nitro-5-phenylfuro[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones and 5-Phenylfuro[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones. *Tetrahedron* 48: 3069–3080.
32. Raimondi W, Dauzonne D, Constantieux T, Bonne D, Rodriguez J (2012) Expeditions, Metal-Free, Domino, Regioselective Synthesis of Highly Substituted 2-Carbonyl- and 2-Phosphorylfurans by Formal [3+2] Cycloaddition. *Eur J Org Chem*: 6119–6123.
33. Bonavia A, Franti M, Pusateri Keaney E, Kuhen K, Seepersaud M, et al. (2011) Identification of broad-spectrum antiviral compounds and assessment of the druggability of their target for efficacy against respiratory syncytial virus (RSV). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 6739–6744.
34. Wang QY, Bushell S, Qing M, Xu HY, Bonavia A, et al. (2011) Inhibition of dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis. *J Virol* 85: 6548–6556.
35. Hoffmann HH, Kunz A, Simon VA, Palese P, Shaw ML (2011) Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5777–5782.
36. Smece DF, Hurst BL, Day CW (2012) D282, a non-nucleoside inhibitor of influenza virus infection that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. *Antivir Chem Chemother* 22: 263–272.
37. Khutorenko AA, Roudko VV, Chernyak BV, Vartapetian AB, Chumakov PM, et al. (2010) Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12828–12833.
38. Planterose DN (1969) Antiviral and cytotoxic effects of mycophenolic acid. *J Gen Virol* 4: 629–630.
39. Padalko E, Verbeken E, Matthys P, Aerts JL, De Clercq E, et al. (2003) Mycophenolate mofetil inhibits the development of Coxsackie B3-virus-induced myocarditis in mice. *BMC Microbiol* 3: 25.
40. Khan M, Dhanwani R, Patro IK, Rao PV, Parida MM (2011) Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. *Antiviral Res* 89: 1–8.
41. Liu S, Neidhardt EA, Grossman TH, Ocain T, Clardy J (2000) Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure* 8: 25–33.
42. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, et al. (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141: 668–681.
43. Meng Z, Zhang X, Wu J, Pei R, Xu Y, et al. (2013) RNAi Induces Innate Immunity through Multiple Cellular Signaling Pathways. *PLoS One* 8: e64708.
44. Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M, Pfeiffer K, Kawakami T, et al. (1993) Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75: 83–97.
45. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, et al. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* 13: 539–548.
46. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, et al. (1997) Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275: 540–543.
47. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, et al. (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243–249.
48. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, et al. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772–777.
49. Holtschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, et al. (1996) Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSPB gene. *Cell* 87: 307–317.
50. Kimura T, Kadokawa Y, Harada H, Matsumoto M, Sato M, et al. (1996) Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells* 1: 115–124.
51. Masumi A, Wang IM, Lefebvre B, Yang XJ, Nakatani Y, et al. (1999) The histone acetylase PCAF is a phorbol-ester-inducible coactivator of the IRF family that confers enhanced interferon responsiveness. *Mol Cell Biol* 19: 1810–1820.
52. Dorman D, Eckert M, Wallace M, Shimizu H, Ramsay E, et al. (2004) Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* 24: 10083–10098.
53. Narayan V, Pion E, Landre V, Muller P, Ball KL (2011) Docking-dependent ubiquitination of the interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by the ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 286: 607–619.
54. Narayan V, Halada P, Hernychova L, Chong YP, Zakova J, et al. (2011) A multiprotein binding interface in an intrinsically disordered region of the tumor suppressor protein interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem* 286: 14291–14303.
55. Sgarbanti M, Remoli AL, Marsili G, Ridolfi B, Borsetti A, et al. (2008) IRF-1 is required for full NF-kappaB transcriptional activity at the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhancer. *J Virol* 82: 3632–3641.
56. Park J, Kim K, Lee EJ, Seo YJ, Lim SN, et al. (2007) Elevated level of SUMOylated IRF-1 in tumor cells interferes with IRF-1-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17028–17033.
57. Masumi A, Ozato K (2001) Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J Biol Chem* 276: 20973–20980.
58. Pan Q, de Ruiter PE, Metselaar HJ, Kwekkeboom J, de Jonge J, et al. (2012) Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* 55: 1673–1683.
59. Zhang L, Das P, Schmolke M, Manicassamy B, Wang Y, et al. (2012) Inhibition of pyrimidine synthesis reverses viral virulence factor-mediated block of mRNA nuclear export. *J Cell Biol* 196: 315–326.
60. Paladino P, Mossman KL (2009) Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 29: 599–607.
61. Evers DL, Wang X, Huang SM, Andreoni KA, Huang ES (2005) Inhibition of human cytomegalovirus signaling and replication by the immunosuppressant FK778. *Antiviral Res* 65: 1–12.
62. Vastag L, Koyuncu E, Grady SL, Shenk TE, Rabinowitz JD (2011) Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog* 7: e1002124.
63. Knight DA, Hejmanowski AQ, Dierksheide JE, Williams JW, Chong AS, et al. (2001) Inhibition of herpes simplex virus type 1 by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* 71: 170–174.
64. Vyas VK, Ghatge M (2011) Recent developments in the medicinal chemistry and therapeutic potential of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 11: 1039–1055.
65. Munier-Lehmann H, Vidalain PO, Tangy F, Janin YL (2013) On Dihydroorotate Dehydrogenases and Their Inhibitors and Uses. *J Med Chem*.
66. Davis IC, Lazarowski ER, Chen FP, Hickman-Davis JM, Sullender WM, et al. (2007) Post-infection A77-1726 blocks pathophysiologic sequelae of respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 379–386.
67. Dunn MC, Knight DA, Waldman WJ (2011) Inhibition of respiratory syncytial virus in vitro and in vivo by the immunosuppressive agent leflunomide. *Antivir Ther* 16: 309–317.
68. Hibert MF (2009) French/European academic compound library initiative. *Drug Discov Today* 14: 723–725.
69. Komarova AV, Combredet C, Meyniel-Schicklin L, Chapelle M, Caignard G, et al. (2011) Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Mol Cell Proteomics* 10: M110 007443.
70. Combredet C, Labrousse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, et al. (2003) A molecularly cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in macaques and transgenic mice. *J Virol* 77: 11546–11554.
71. Brehin AC, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Marechal V, Frenkel MP, et al. (2008) Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology* 371: 185–195.
72. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4: 67–73.
73. Contreras-Sanz A, Scott-Ward TS, Gill HS, Jacoby JC, Birch RE, et al. (2012) Simultaneous quantification of 12 different nucleotides and nucleosides released from renal epithelium and in human urine samples using ion-pair reversed-phase HPLC. *Purine Signal* 8: 741–751.

Annexe N°2

Stimuler la réponse interféron de type I avec des petites molécules : le renouveau d'une vieille idée

Samira Khiar^{1,2}, Nicolas Pietrancosta^{3,5} et Pierre-Olivier Vidalain^{4,5}

¹ Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

² CNRS UMR3569, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

³ Plateau 2MI, CNRS UMR8601, Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, CICB-Paris (FR 3567), Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

⁴ Équipe Chimie et Biologie, Nucléo(s)tides & Immunologie pour la Thérapie, CNRS UMR8601, Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, CICB-Paris (FR 3567), Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

⁵ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

Auteur correspondant : Pierre-Olivier Vidalain, pierre-olivier.vidalain@parisdescartes.fr

Reçu le 11 juillet 2015

Résumé – Les interférons de type I jouent un rôle central dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée contre les infections virales et les cellules tumorales. Peu après leur découverte en 1957, plusieurs équipes ont recherché des petites molécules capables d'induire l'expression de ces cytokines à des fins thérapeutiques. Un ensemble de composés actifs chez la souris ont ainsi été identifiés, mais en raison de leur relative inefficacité chez l'homme pour des raisons comprises à l'époque, ces travaux ont été abandonnés et sont tombés dans l'oubli. Ces dernières années, la caractérisation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, des voies de signalisation qu'ils activent, ainsi que la découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes ont révolutionné notre compréhension de l'immunité innée. Ces découvertes et les nouvelles technologies de criblages à haut débit ont ravivé l'intérêt pour les petites molécules capables d'induire les interférons de type I. Les preuves de leur efficacité thérapeutique chez l'homme sont attendues très prochainement.

Mots clés : Immunité innée / interférons de type I / composés immunostimulateurs / immunothérapie / antiviraux

Abstract – Stimulating Type I interferon response with small molecules: revival of an old idea.

Type I interferons play a central role in the establishment of an innate immune response against viral infections and tumor cells. Shortly after their discovery in 1957, several groups have looked for small molecules capable of inducing the expression of these cytokines with therapeutic applications in mind. A set of active compounds in mice were identified, but because of their relative inefficiency in humans for reasons not understood at the time, these studies fell into oblivion. In recent years, the characterization of pathogen recognition receptors and the signaling pathways they activate, together with the discovery of plasmacytoid dendritic cells, have revolutionized our understanding of innate immunity. These discoveries and the popularization of high-throughput screening technologies have renewed the interest for small molecules that can induce type I interferons. Proofs about their therapeutic potency in humans are expected very soon.

Key words: Innate immunity / type I interferons / immunostimulatory compounds / immunotherapy / antivirals

Abréviations

cDC	cellules dendritiques conventionnelles du sang périphérique
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CMA	10-carboxyméthyl-9-acridanone
DMXAA	<i>5,6-di-methylxanthenone-4-acetic acid</i>
HTS	<i>high-throughput screenings</i>
IFN	Interféron
IRF-E	<i>IRF binding Elements</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>Interferon-Stimulated Genes</i>
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Elements</i>
MAMP	<i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>
ODN	OligoDésoxyNucléotides
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RLR	<i>RIG-like receptors</i>
STING	<i>Stimulator of IFN genes</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>

Introduction

En 1957, Alick Isaacs et Jean Lindenmann étudient le phénomène d'interférence virale, c'est-à-dire la capacité d'une cellule à résister à l'infection par un virus lorsque celle-ci a préalablement été exposée à une préparation de virus inactivé. Ils montrent alors que ce phénomène de résistance repose sur la sécrétion d'un facteur soluble par les cellules traitées et le baptisent « interféron » (Isaacs & Lindenmann, 1957). Par la suite, Isaacs et son équipe montrent que les acides nucléiques isolés à partir de préparations de virus purifiés sont capables d'induire l'interféron (Isaacs *et al.*, 1963), ou plus exactement les interférons de type I, qu'il faut distinguer de l'interféron de type II, ou IFN- γ , qui sera découvert en 1965 et qui est produit notamment par les cellules NK et les lymphocytes T activés (Wheelock, 1965). En recherchant le type d'acide nucléique qui pourrait induire le plus efficacement la production des interférons de type I, un mime artificiel d'ARN bicaténaire, l'acide polyinosinique-polycytidylique (ou poly I:C), est identifié comme un très puissant inducteur de ces cytokines (Field *et al.*, 1967). Au début des années 1970, l'idée de petites molécules capables d'induire les interférons, et plus généralement un état antiviral dans les cellules traitées, fait son chemin (Grossberg, 1977) (figure 1). Ces travaux conduisent à l'identification du 2,7-bis(2-diéthylaminoéthoxy)fluoren-9-one ou tilorone, un composé capable de stimuler la sécrétion d'interférons et qui présente une activité antivirale à large spectre (Krueger & Mayer, 1970; Mayer & Krueger, 1970). Par la suite, plusieurs composés hétérocycliques inducteurs des

interférons de type I sont isolés, notamment le CMA (10-carboxyméthyl-9-acridanone) et différents dérivés de l'acridine (Acranil[®], mépacrine) (Glaz *et al.*, 1973; Taylor *et al.*, 1980b; Kramer *et al.*, 1981), des 1,5-diamino anthraquinones (Stringfellow *et al.*, 1979), des quinolines comme le BL-20803 (Siminoff *et al.*, 1973), des dérivés des pyrimidines comme la bropiramine (Stringfellow *et al.*, 1980), des dérivés diaminés tels que le CP-20,961 (Hoffman *et al.*, 1973), et enfin l'acide flavone acétique (Hornung *et al.*, 1988). Plusieurs de ces molécules présentent une puissante activité antivirale chez la souris en corrélation avec leur capacité à induire les interférons de type I (Krueger & Mayer, 1970; Hoffman *et al.*, 1973; Kern *et al.*, 1976; Kramer *et al.*, 1976; Stringfellow *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1980a), mais les tests réalisés chez l'homme ont été très décevants sans que l'on en comprenne véritablement les raisons (Kaufman *et al.*, 1971). À la fin des années 80, les travaux sur ces composés se marginalisent, sauf en Russie où le tilorone hydrochloride et le CMA sont toujours prescrits comme antiviraux (Silin *et al.*, 2009). À la suite de l'étude des récepteurs Toll par Bruce Beutler, Charles Janeway et Jules Hoffmann, et de la caractérisation des cellules dendritiques par Ralph Steinman au début des années 90, notre compréhension de la réponse immunitaire innée antivirale a progressé de façon fulgurante. Depuis peu, nous commençons à comprendre les raisons des échecs des années 70–80. Avec ce nouveau cadre conceptuel et la démocratisation des technologies de criblage à haut débit, les petites molécules capables d'induire les interférons focalisent à nouveau l'attention de nombreuses équipes (Es-Saad *et al.*, 2012).

Les récepteurs cellulaires qui stimulent la production d'interférons de type I

Les interférons de type I se répartissent en cinq classes chez l'homme : IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω (Pestka, 2007). Chacun de ces interférons de type I est le produit d'un seul gène, à l'exception des IFN- α qui sont codés par treize gènes différents. Les IFN- α/β sont les mieux caractérisés, et jouent un rôle prépondérant dans la réponse innée antivirale. Les acides nucléiques présents dans les particules infectieuses et ceux produits au cours du cycle viral sont les principaux inducteurs des interférons de type I (Schlee *et al.*, 2007). Ils appartiennent à un ensemble plus vaste de molécules, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou MAMP (*Microbe-Associated Molecular Patterns*), qui sont pour le système immunitaire une signature moléculaire des microorganismes. Les acides nucléiques reconnus par les cellules comme des signaux de danger sont les ARN bicaténaires, les ARN 5'-triphosphates et l'ADN, notamment lorsque

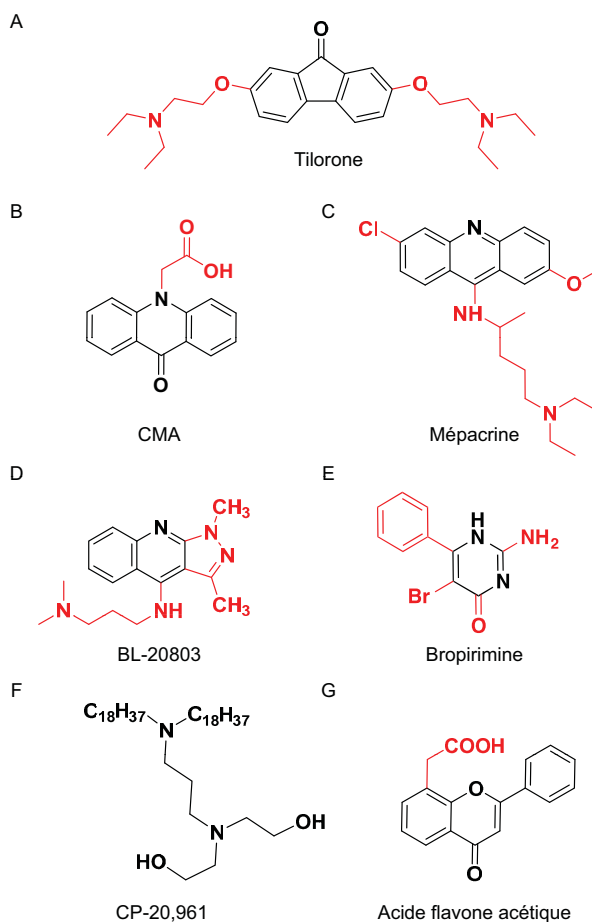


Fig. 1. Molécules identifiées dans les années 1970-1980 comme inducteurs des interférons de type I. (A) Structure du tilorone, un dérivé de la fluorénone. (B) Structure du CMA, un dérivé de l'acridanone. (C) Structure de la mépacrine, un dérivé de l'acridine. (D) Structure de la molécule BL-20803, un dérivé de la famille des quinolines. (E) Structure de la bropiramine, un dérivé de la pyrimidine. (F) Structure de la molécule CP-20,961 (G) Structure de l'acide flavone acétique qui appartient aux flavones. Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir.

celui-ci contient des motifs nucléotidiques CpG. La localisation de ces acides nucléiques joue également un rôle fondamental, de sorte qu'un même acide nucléique n'entraînera pas la même réponse cellulaire s'il se concentre à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule, que ce soit dans le cytoplasme ou le noyau. Les principaux récepteurs capables de reconnaître ces acides nucléiques pour activer la production d'interférons de type I appartiennent à deux catégories (figure 2) : les « *Toll-like receptors* » (TLR) et les « *RIG-like receptors* » (RLR). Ces récepteurs cellulaires sont des PRR (*Pattern Recognition Receptors*), c'est à dire

des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des PAMP. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires et, parmi les 10 membres de cette famille présents chez l'homme, les TLR3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux et l'induction des interférons de type I. TLR3, qui se trouve en surface ou dans les endosomes en fonction du type cellulaire et de l'état d'activation des cellules, reconnaît par son domaine extracellulaire les ARN bicaténaux. Il est exprimé par les cellules épithéliales, en particulier dans les voies respiratoires, et par les cellules dendritiques conventionnelles du

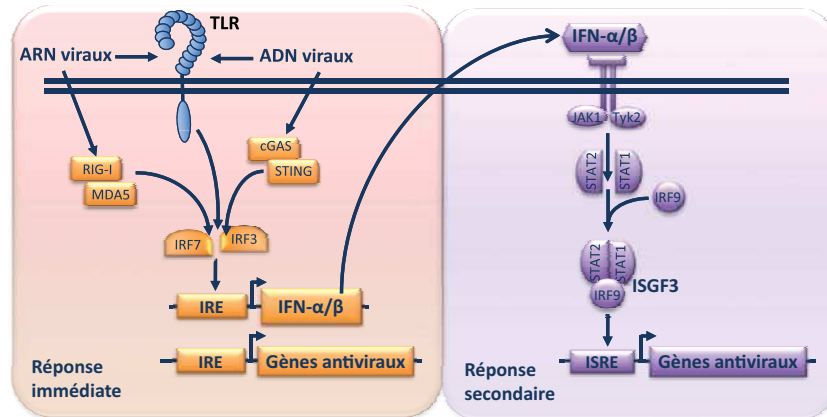


Fig. 2. Induction des interférons de type I et leurs gènes cibles.

sang périphérique (cDC). TLR7 et 8, qui sont principalement localisés dans les endosomes, reconnaissent quant à eux les ARN monocaténaux. Enfin, TLR9 est un récepteur spécifique des ADN riches en motifs CpG non méthylés. Alors que TLR8 est fortement exprimé par les monocytes, TLR7 et 9 sont exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules représentent moins de 1 % des leucocytes du sang périphérique mais elles produisent 1000 à 10 000 fois plus d'IFN- α que les autres types cellulaires. À ce titre, les pDC jouent un rôle majeur dans la réponse antivirale innée aux infections virales. Enfin, il est important de noter que TLR4, dont les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont le principal ligand, serait également impliqué dans la reconnaissance de certaines glycoprotéines d'enveloppes virales. Son rôle dans la réponse immunitaire innée antivirale, et notamment dans l'induction des interférons de type I, reste cependant moins bien défini.

Contrairement aux TLR, les membres de la famille des RLR sont cytoplasmiques (Schlee *et al.*, 2007). Deux membres de cette famille sont bien caractérisés : RIG-I qui reconnaît les ARN 5'-triphosphates bicaténaux, et MDA5 qui lie les ARN bicaténaux de grande taille. Un troisième membre de la famille RLR, la protéine LGP2, jouerait un rôle de régulateur en s'associant à RIG-I. Ainsi, les TLR assurent la détection des virus présents dans le milieu extracellulaire, lesquels sont tout d'abord internalisés dans les vésicules endosomiales puis partiellement digérés pour exposer les acides nucléiques présents dans les particules virales, alors que les RLR sont nécessaires à la détection des ARN viraux présents dans le cytoplasme des cellules infectées.

Les récepteurs cytoplasmiques qui induisent les interférons de type I en réponse aux ADN viraux n'ont

été caractérisés que très récemment, et forment un ensemble hétérogène (Dempsey & Bowie, 2015). Le récepteur le mieux caractérisé à ce jour est cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), une nucléotidyltransférase qui reconnaît l'ADN cytoplasmique, et synthétise en réponse un médiateur intracellulaire, le 2'3'-cGAMP. Cette molécule se lie alors au récepteur STING (*Stimulator of IFN genes*), une protéine à plusieurs domaines transmembranaires ancrée au réticulum endoplasmique, ce qui déclenche une cascade de signalisation conduisant à la synthèse des interférons de type I (figure 2). Une dizaine d'autres récepteurs à ADN ont également été identifiés, parmi lesquels on trouve IFI16, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DDX41, Ku70, DNA-PK et MRE11. Pour plusieurs de ces récepteurs, il a été montré que l'induction des interférons de type I dépendait de STING, ce qui fait de cette protéine un acteur central dans la réponse cellulaire aux virus à ADN.

Induction des interférons de type I et de leurs gènes cibles

Les cascades de signalisation activées par l'engagement de ces différents récepteurs convergent vers les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*), NF- κ B et AP-1. Les protéines IRF3 et IRF7 se lient aux éléments de réponse aux IRF (*IRF binding Elements* ou IRF-E), dont la séquence consensus est AANNGAAA (avec N = A, G, T ou C), et qui se retrouvent dans le promoteur des gènes induits par ces facteurs de transcription, et notamment des gènes IFNA et IFNB. Cependant, les variations observées autour de cette séquence consensus confèrent, d'un gène à l'autre, une sensibilité plus ou moins stricte vis à vis d'IRF3 ou d'IRF7. Enfin, il est à noter que

le promoteur du gène *IFNB* présente également des éléments de réponse aux facteurs NF- κ B et AP-1, ce qui permet d'augmenter la transcription et la synthèse d'IFN- β .

Une fois sécrétés, les IFN- α/β induisent de façon autocrine et paracrine un ensemble de gènes acteurs de la réponse antivirale : les ISG (*Interferon-Stimulated Genes*) (Schoggins & Rice, 2011). Les IFN- α/β ont pour récepteur un dimère composé de deux protéines membranaires, IFNAR1 et IFNAR2c (figure 2). Ces protéines sont associées par leur domaine cytoplasmique aux kinases TYK2 et JAK1 qui phosphorylent les facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces derniers s'associent alors à IRF9 pour former le complexe ISGF3. Une fois dans le noyau, ISGF3 se fixe aux éléments de réponse ISRE (*Interferon-Stimulated Response Elements*) présents dans le promoteur des ISG. Les IFN- α/β activent ainsi la transcription d'environ 200 à 500 gènes en fonction du type cellulaire considéré et de la concentration locale d'interférons. La séquence consensus pour l'élément de réponse ISRE est A/GNGAAANNGAAACT, de sorte que des sites de liaison à IRF3 ou IRF7 peuvent se superposer à ce motif. Il en découle que de nombreux ISG sont à la fois induits par IRF3/7 et par une boucle autocrine/paracrine faisant intervenir la sécrétion d'IFN- α/β et l'activation d'ISGF3 (Schmid *et al.*, 2010). Les ISG codent pour un large éventail de facteurs antiviraux qui assurent l'inhibition du cycle viral à différentes étapes, depuis l'entrée du virus jusqu'à la libération des particules virales néoformées (Schoggins & Rice, 2011). À titre d'exemple, on peut citer la tétherine (ou BST2) qui piège les particules virales néoformées à la surface des cellules infectées. C'est l'ensemble de cette réponse, multifactorielle et à large spectre, que de nombreuses équipes cherchent à stimuler avec des composés chimiques dans le but de développer de nouvelles thérapies antivirales.

Les petites molécules ligands des TLR qui induisent les interférons de type I

La caractérisation des TLR a conduit de nombreux laboratoires à rechercher des petites molécules agonistes de ces récepteurs comme antiviraux, mais a également permis de comprendre le mode d'action de certaines molécules immunostimulatrices préalablement identifiées (Horscroft *et al.*, 2012). Ainsi, l'activité antivirale des imidazoquinolines a été découverte au début des années 80 par la société 3M dans le cadre d'un crible visant à identifier des composés anti-herpétiques (Miller *et al.*, 1999). Les travaux réalisés sur cette série chimique ont ensuite permis la mise au point de l'imiquimod (ou R837; figure 3A) utilisé

dans le traitement local des verrues génitales et périanales externes à papillomavirus (condylomes acuminés). En 2002, l'équipe de Shizuo Akira identifie TLR7 comme le récepteur de ce composé immuno-stimulateur et inducteur des interférons de type I (Hemmi *et al.*, 2002). Le résiquimod (ou R848) est une autre imidazoquinoline développée pour le traitement de l'herpès génital et de l'hépatite C, mais dont le développement pour ces applications a été arrêté par manque d'efficacité et/ou en raison d'effets inflammatoires indésirables (Meyer *et al.*, 2013). Cette molécule active la réponse immunitaire innée en liant à la fois TLR7 dans les pDC et TLR8 à la surface des monocytes et des cellules dendritiques myéloïdes (figure 4). La liaison à TLR8 conduirait, en plus d'induire la synthèse d'interféron de type I, à l'induction de cytokines inflammatoires comme le TNF- α (Gorden *et al.*, 2005). De ce fait, de nombreux laboratoires cherchent à mettre au point des ligands plus spécifiques de TLR7. Des dérivés de la guanosine, notamment l'isatoribine, la 7-déazaguanosine et la loxoribine (figure 3B), ainsi que la broprimine (figure 1E), un dérivé de la pyrimidine, sont des ligands de TLR7 actuellement en développement (Akira & Hemmi, 2003; Lee *et al.*, 2003). Différents dérivés de la 8-hydroxyadénine (ex : SM-276001) et de la 8-oxo-déazapurine (ex : PF-4171455) ont également été identifiés comme de puissants ligands de TLR7 et sont évalués pour leurs propriétés antivirales et anticancéreuses (Hirota *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Pryde *et al.*, 2011). Récemment, l'optimisation de ces composés a permis le développement du GS-9620. Cette molécule permet de réduire très efficacement la charge virale chez des chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite B (Lanford *et al.*, 2013). Enfin, plusieurs équipes développent des ligands artificiels de TLR9 à partir d'oligodésoxynucléotides (ODN) de synthèse riches en motifs CpG (Horscroft *et al.*, 2012). De même, le poly I:C et son dérivé moins toxique le rintatolimod sont utilisés comme ligands artificiels de TLR3, et le développement de ces ARN bicaténaux artificiels se poursuit. Cependant, ces oligonucléotides de synthèse sont des molécules imposantes, de 20 bases minimum pour les ODN à plusieurs centaines de bases pour le poly I:C, et il n'existe à ce jour aucune petite molécule ligand de TLR9 ou TLR3.

Les propriétés antivirales des ligands artificiels de TLR3, notamment du poly I:C, ont clairement été démontrées dans de nombreux modèles animaux, et cela pour un large éventail de virus (Sariol *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Il en est de même des ODN riches en CpG qui se lient à TLR9 et des petites molécules identifiées comme ligands de TLR7 (Hammerbeck *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2012). Deux obstacles majeurs subsistent cependant. Le premier est la toxicité des activateurs de TLR3, 7 ou 8,

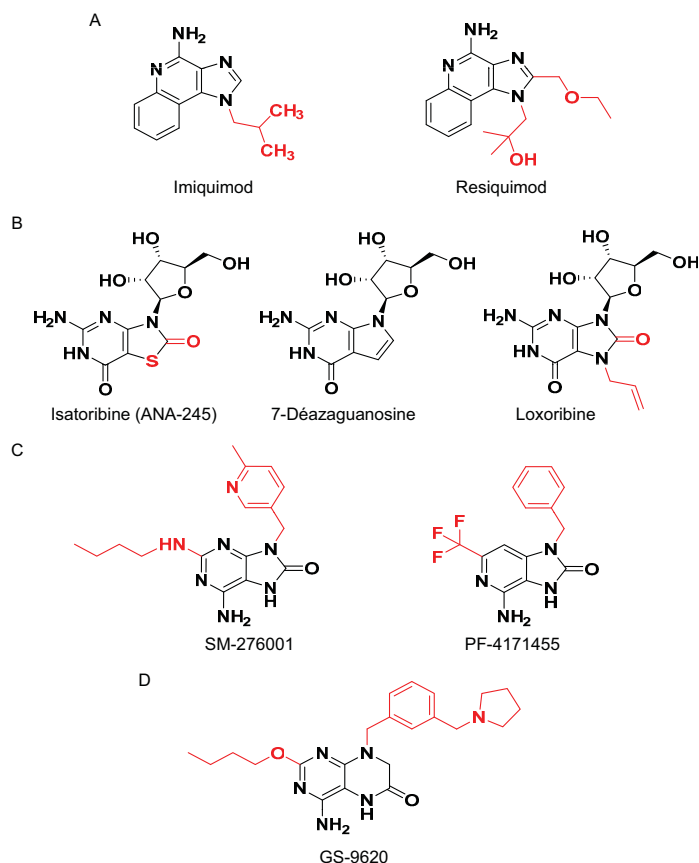


Fig. 3. Ligands de TLRs. (A) Structure de l'imiquimod et du résiquimod, deux membres de la famille des imidazoquinolines. (B) Structure de l'isatoribine (ANA-245), de la 7-déazaguanosine et de la loxoribine, trois analogues de la guanosine. (C) Structure du SM-276001, un dérivé de la famille des 8-oxoadénines, et du PF-4171455, un dérivé de la famille des 8-oxo-déazapurines. (D) Structure du GS-9620, une molécule dont le groupe principal est proche d'une oxoadénine. Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir.

en particulier lorsqu'ils sont administrés par la voie générale (Horscroft *et al.*, 2012). Outre une toxicité aiguë, caractérisée par le déclenchement d'un syndrome grippal, la stimulation répétée de ces récepteurs peut conduire au développement d'immunopathologies chroniques sévères (lymphopénie, arthrites rhumatoïdes, diabète, *etc.*). Le second problème est l'inefficacité de ces traitements lorsqu'ils sont administrés après l'infection dans un but thérapeutique. Il est probable qu'une fois l'infection virale établie, les virus échappent à l'action antivirale des interférons et des ISG induits par ces ligands de TLR3, 7, ou 9 grâce aux facteurs de virulence qu'ils produisent. Aussi, les approches actuelles visent à formuler ces ligands de façon à réduire leur toxicité et à obtenir une libération prolongée dans le temps. Par exemple, l'encapsulation

du poly I:C dans des liposomes permet d'en réduire la toxicité. L'administration de ce ligand de TLR3 encapsulé protège des animaux contre une infection virale pendant plus de quinze jours, ce qui présenterait un intérêt certain en cas d'épidémie (Wong *et al.*, 2009).

Les composés activateurs de STING

Ces dernières années, la caractérisation de la protéine cellulaire STING et la compréhension de son mécanisme d'activation en réponse à l'ADN cytoplasmique ont permis des ouvertures majeures (Dempsey & Bowie, 2015). La protéine STING possède un domaine transmembranaire qui assure son ancrage au réticulum endoplasmique, et un domaine globulaire

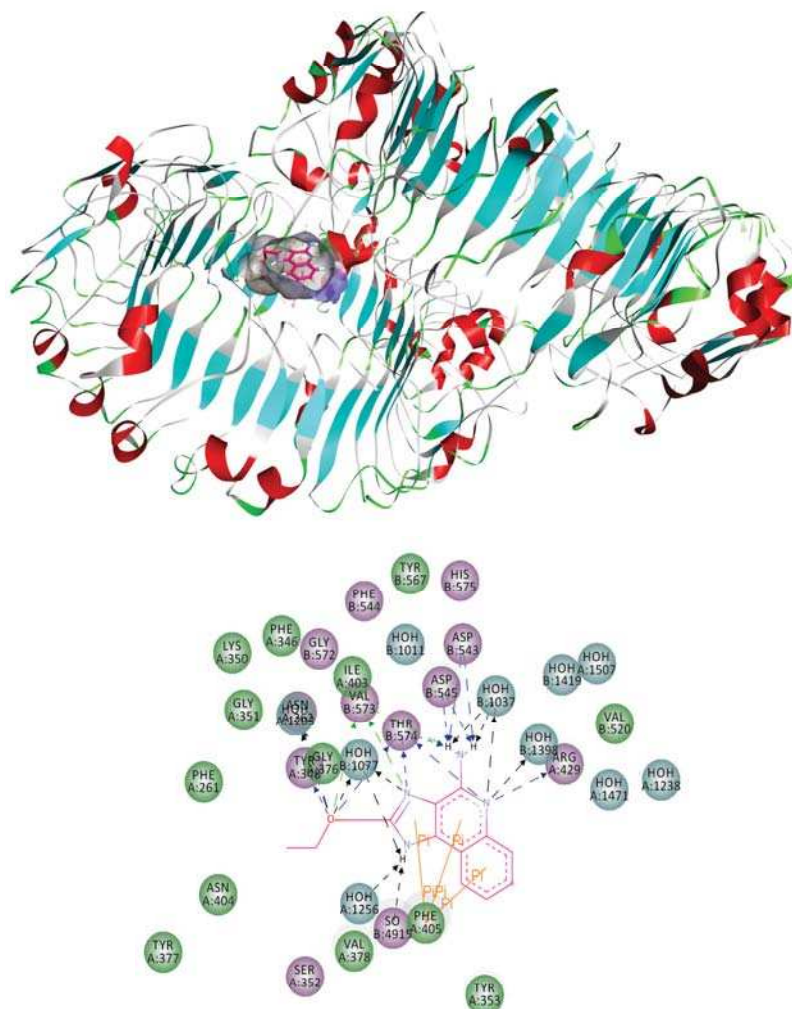


Fig. 4. Structure cristallographique de TLR8 humain complexé avec le composé CL097, un analogue de l'imiquimod et du resiquimod. Le panneau du haut représente un dimère des domaines extracellulaires de TLR8 (PDB 3W3J) (Tanji *et al.*, 2013). Le composé CL097 est situé à l'interface entre ces deux domaines, et les acides aminés impliqués dans cette interaction sont présentés dans le panneau du bas (vert pour les interactions hydrophobes et violet pour les interactions électrostatiques).

cytoplasmique qui permet le recrutement de la kinase TBK1. En réponse à différents stimuli, STING recrute TBK1 pour activer IRF3 et NF- κ B, ce qui induit ainsi les interférons de type I et la réponse immunitaire innée antivirale. Plusieurs protéines impliquées dans la détection de l'ADN cytoplasmique comme IFI16 ou DDX41 utilisent STING comme adaptateur pour induire l'expression des IFN- α/β , mais les détails mécanistiques sont encore mal caractérisés. Le domaine cytoplasmique de STING est également un récepteur pour des dinucléotides cycliques, no-

tamment le 3'3'-cGMP qui est utilisé par de nombreuses bactéries comme messenger secondaire, et le 2'3'-cGAMP qui est synthétisé par l'enzyme cGAS en réponse à l'ADN cytoplasmique (figures 5A et 6A). Cette voie de signalisation cGAS/cGAMP/STING jouerait un rôle majeur dans la réponse cellulaire aux virus à ADN.

STING forme un dimère qui passe d'une conformation « ouverte » à une conformation « fermée » en se liant à un dinucléotide cyclique (figure 6A). C'est cette transition qui permet l'activation de STING et le

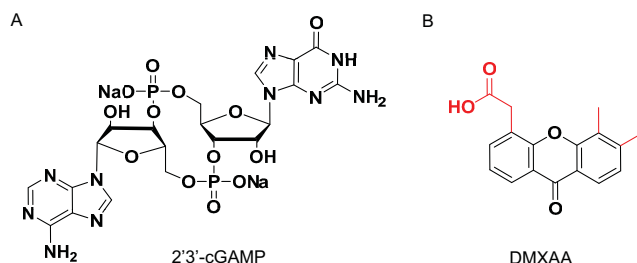


Fig. 5. Ligands de STING. (A) Structure de la molécule 2',3'-cGAMP, une dinucléotide cyclique. (B) Structure de la molécule DMXAA, un dérivé de la xanthone qui est représentée en noir.

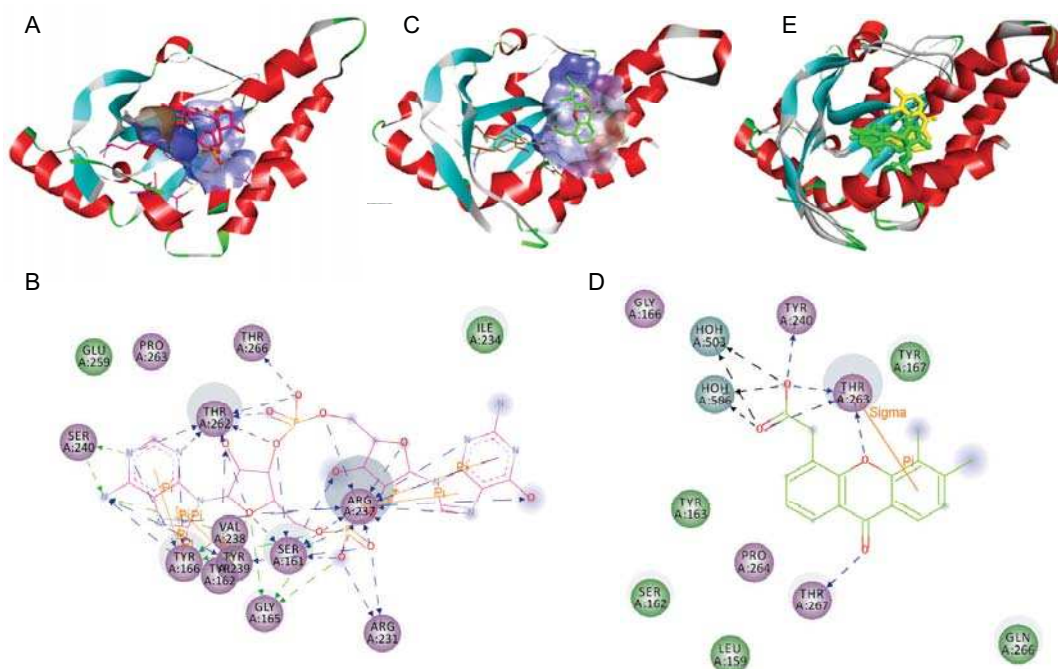


Fig. 6. (A) Structure de la protéine STING murine complexée au 2',3'-cGAMP (PDB 4LOJ) (Gao *et al.*, 2013). (B) Les acides aminés impliqués dans cette interaction sont présentés en vert pour les interactions hydrophobes et violet pour les interactions électrostatiques. (C) Structure de la protéine STING humaine mutée (G230I) pour lier le DMXAA (PDB 4QXO) (Gao *et al.*, 2014). Les acides aminés impliqués dans cette interaction sont présentés en (D). (E) Superposition du 2',3'-cGAMP et du DMXAA liés au STING murin.

recrutement de TBK1. Récemment, il a été montré que STING est également le récepteur du DMXAA (5,6-di-methylxanthenone-4-acetic acid), du CMA et de l'acide flavone acétique, trois molécules identifiées comme anticancéreuses et inducteurs des interférons de type I chez la souris (Prantner *et al.*, 2012; Cavlar *et al.*, 2013; Conlon *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013)

(figures 5B, 1B et 1G). Ces composés se lient à STING globalement au même site que les dinucléotides cycliques et induisent de la même façon son activation, même si les résidus impliqués sont très différents (figures 6B et 6C). Cependant, ces interactions sont spécifiques de la protéine STING de souris et les composés cités ci-dessus sont incapables d'activer la

protéine STING humaine malgré une homologie de séquence de 81 % (Prantner *et al.*, 2012; Cavlar *et al.*, 2013; Conlon *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). Ainsi, une protéine STING humaine dans laquelle la glycine 230 est remplacée par une isoleucine comme chez la souris (G230I) lie le DMXAA (figure 6B) (Gao *et al.*, 2014). Ces résultats pourraient expliquer la puissante activité antivirale et anticancéreuse du DMXAA, du CMA et de l'acide flavone acétique chez la souris et l'absence d'efficacité chez l'homme. Ils suggèrent également que d'autres petites molécules identifiées dans les années 70–80 comme inducteurs des IFN- α/β (tilorone ou dérivés de l'acridine), sont également des ligands spécifiques de la protéine STING de souris. Corollaire de ces conclusions, plusieurs équipes cherchent désormais à développer des composés capables d'activer la protéine STING humaine, qu'il s'agisse d'analogues métaboliquement stables du 2'3'-cGAMP ou de dérivés du DMXAA (Tijono *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Interactions entre les voies de biosynthèse des nucléosides et la réponse interféron

Afin d'identifier des composés activant l'expression des interférons et des ISG, nous avons développé un test fonctionnel basé sur une lignée de cellules humaines HEK-293 exprimant le gène rapporteur luciférase sous contrôle d'un promoteur ISRE (Lucas-Hourani *et al.*, 2013). Grâce à ce système, nous avons criblé une chimiothèque d'environ 50 000 molécules et identifié ainsi une série de composés capables d'amplifier l'expression des ISG en réponse à de l'ARN 5'-triphosphate ou aux IFN- α/β et qui par ailleurs sont dotés d'une puissante activité antivirale *in vitro*. Nous avons ensuite montré que ces composés étaient de puissants inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines, ce qui nous a permis d'établir un lien entre cette voie métabolique et la réponse immunitaire innée antivirale. Lorsque des cellules se divisent, leurs besoins en nucléosides sont importants et la voie de biosynthèse *de novo* fournit la machinerie cellulaire en pyrimidines. L'inhibition de cette dernière par des drogues entraîne un effondrement du pool de pyrimidines, ce qui conduit à un stress cellulaire dont l'une des conséquences est l'amplification de la réponse immunitaire innée (Lucas-Hourani *et al.*, 2013; Yeo *et al.*, 2015). Ce mécanisme en cascade expliquerait l'activité antivirale de cette classe d'antimétabolites. De façon remarquable, il a été montré que la ribavirine et l'acide mycophénolique, deux inhibiteurs de la voie de biosynthèse *de novo* des purines, induisent également les ISG et/ou amplifient leur expression en réponse aux IFN- α/β (Stevenson *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012).

Cependant, les récepteurs cellulaires qui réagissent à des déséquilibres dans les pools de nucléosides restent à identifier, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes doivent encore être caractérisés.

Il est tentant de rapprocher ces observations relativement récentes du phénomène de « superinduction » des interférons de type I décrit il y a plus de cinquante ans et tombé pratiquement dans l'oubli depuis (Vilcek, 2007). Plusieurs équipes avaient alors montré que des composés inhibant la transcription (actinomycine D) ou la traduction (cycloheximide ou puromycine) augmentaient la production d'IFN- α/β . Lorsque ces inhibiteurs sont ajoutés au bon moment dans les heures qui suivent la stimulation par des ARN viraux ou du poly I:C, il est possible de multiplier par 100 la quantité d'IFN- α/β sécrété par des cellules en culture. Ce phénomène de « superinduction » est tellement efficace qu'il a été utilisé pendant des années pour produire l'IFN- β utilisé en clinique à partir de surnageants de fibroblastes. Comment expliquer l'effet paradoxal de ces inhibiteurs de la synthèse protéique sur la production d'interférons? Il a été montré que l'ARNm codant pour l'IFN- β contient des séquences ARE (*AU-Rich Element*) et CRID (*Coding Region Instability Determinant*) dans sa partie 3' non traduite. Ces séquences favorisent la dégradation de l'ARNm codant pour l'IFN- β en recrutant notamment un facteur non identifié de 65 kDa (Raj & Pitha, 1993). La demi-vie de cette protéine dans la cellule étant courte, l'inhibition de la synthèse protéique par l'actinomycine, la cycloheximide ou la puromycine empêcherait son renouvellement, ce qui aboutirait à sa disparition progressive. Il en résulterait une stabilisation des ARNm codants pour l'IFN- β , et ainsi une augmentation de la synthèse d'IFN- β . De la même façon, les antimétabolites qui bloquent la biosynthèse *de novo* des nucléosides pourraient, en réduisant la synthèse protéique, favoriser la stabilisation de l'ARNm codant pour l'IFN- β .

Des composés orphelins identifiés par criblage à haut débit

Depuis quelques années, les outils permettant la mise en œuvre de cribles à haut débit (*high-throughput screenings*, HTS) se sont largement démocratisés. Les grands instituts de recherche académique se sont ainsi dotés de plates-formes équipées de chimiothèques de plusieurs milliers de molécules, d'automates de pipetage, de lecteurs de plaques multimodes et de logiciels adaptés au stockage et à l'analyse des données HTS. Plusieurs groupes ont ainsi réalisé des cribles phénotypiques utilisant des tests cellulaires pour identifier des composés capables d'induire les interférons de type I et/ou l'expression des ISG.

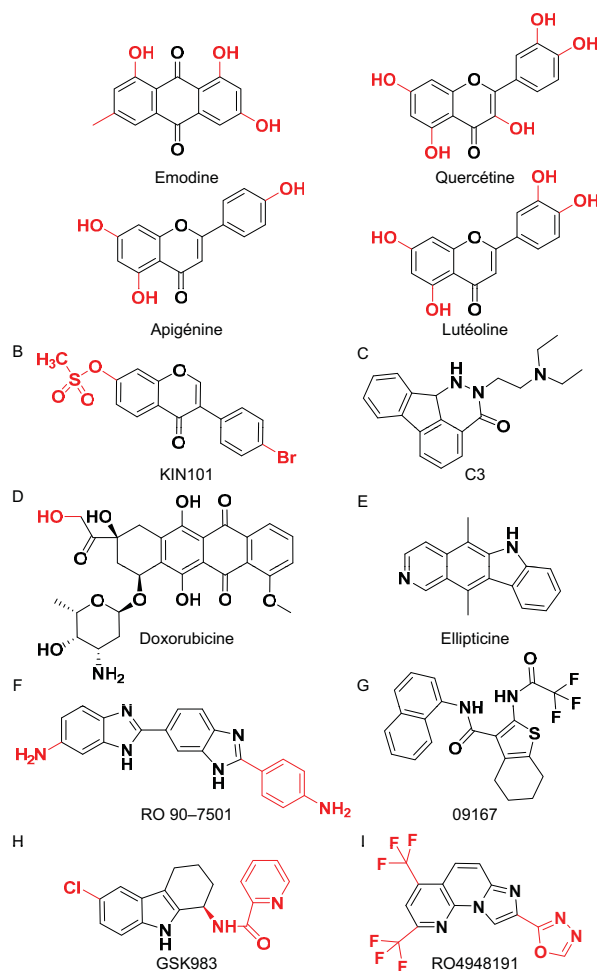


Fig. 7. Composés identifiés par criblage à haut débit. (A) Structures de l'émodine, un membre de la famille des anthraquinones, et de la quercétine, de l'apigénine et de la lutéoline, trois membres de la famille des flavones. (B) Structure de la molécule KIN101, un membre de la famille des isoflavones. (C) Structure de la molécule C3. (D) Structure de la doxorubicine, un membre de la famille des anthracyclines. (E) Structure de l'ellipticine. (F) Structure de la molécule RO 90-7501, un dérivé de la famille des benzimidazoles. (G) Structure de la molécule 09167. (H) Structure de la molécule GSK983, un dérivé de la famille des tétrahydrocarbazoles. (I) Structure de la molécule RO4948191, un dérivé de la famille des imidazonaphthyridines. Pour chaque structure, le groupe qui détermine l'appartenance à une famille chimique est représenté en noir.

La plupart de ces tests utilisent des lignées de cellules humaines exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur du gène de l'IFN- β ou d'éléments de réponse ISRE inductibles par les interférons de type I. Ces cribles ont permis l'identification d'une dizaine de composés ayant des propriétés immunostimulatrices (figure 7). En utilisant une lignée de carcinome hépatocellulaire HepG2 exprimant la luciférase sous

contrôle de cinq éléments de réponse ISRE, l'équipe de Fei Wang a criblé une chimiothèque de 1431 produits naturels (Tai *et al.*, 2012). Quatre substances naturelles, l'émodine, la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, ont montré des propriétés immunostimulatrices (figure 7A). Les analogies de structure entre l'émodine, le DMXAA et le CMA d'une part, et la quercétine, l'apigénine, la lutéoline et l'acide fla-

vone acétique d'autre part sont frappantes, suggérant que ces composés naturels lient la protéine STING pour induire l'expression des ISG. Une autre étude a également montré l'effet de l'aloé-émodine, un analogue de l'émodine appartenant également à la famille des anthraquinones, sur l'expression des interférons de type I ainsi que son activité antivirale *in vitro* (Lin *et al.*, 2008). Un autre crible, réalisé par la société Kineta et utilisant une lignée de carcinome hépatocellulaire Huh7 exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur ISG54, a permis d'isoler les composés KIN100 et KIN101 à partir d'une chimiothèque de 20 000 composés (Bedard *et al.*, 2012). Ces composés sont des isoflavones qui activent IRF3 (figure 7B), induisent certains ISG et inhibent efficacement la réplication des virus de la grippe et de l'hépatite C *in vitro*. Leur mode d'action et le rôle éventuel de STING dans l'activité de ces molécules restent à déterminer.

À la Mount Sinai School of Medicine, l'équipe de Peter Palese et Megan Shaw a utilisé une stratégie comparable pour identifier des composés inducteurs d'interférons de type I. Une lignée « rapportrice » dérivée de cellules HEK-293T exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur de l'IFN- β a été développée, puis utilisée pour cribler une chimiothèque de 94 000 molécules (Martinez-Gil *et al.*, 2012). Trois composés ont finalement été étudiés à l'issue de ce crible pour leurs propriétés immunostimulatrices, notamment la molécule C3 (figure 7C). Là encore, le mode d'action de ce composé reste à déterminer. D'autres molécules identifiées comme des activateurs du promoteur IFN- β dans le cadre de ce crible sont des agents intercalants de l'ADN et des inhibiteurs de la topoisomérase II comme des anthracyclines (doxorubicine, figure 7D), des dérivés de l'acridine (aminacrine) et l'ellipticine (figure 7E). La figure 8 montre la structure de la topoisomérase 2 β humaine liée à l'ADN et à la mitoxantrone, une molécule de la famille des anthraquinones apparentée aux anthracyclines. L'équipe de Michael J. Holtzman a isolé la même classe de molécules en recherchant des composés capables d'amplifier la réponse cellulaire aux interférons de type I (Patel *et al.*, 2012). Pour cela, cette équipe a criblé, en présence de doses suboptimales d'IFN- β (5 IU/ml), une chimiothèque de 2240 composés à l'aide de cellules humaines 2fTGH exprimant la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse ISRE. La molécule la plus active isolée dans ce crible, l'idarubicine, est un agent intercalant de la famille des anthracyclines comme la doxorubicine. Enfin, en cherchant à isoler des composés qui amplifient la réponse cellulaire au poly I:C, l'équipe de Jinhong Chang a isolé le composé RO 90-7501 qui appartient à la famille des bis-benzimidazoles (figure 7F), une classe de molécules connues pour se lier au petit sillon de l'ADN (Guo *et al.*, 2012). Ces

résultats corroborent ainsi des travaux plus anciens montrant qu'un stress génotoxique peut induire l'activation d'IRF3, la synthèse d'IFN- α/β et l'expression des ISG (Kim *et al.*, 1999).

Des composés qui stimulent la réponse interféron de type I ont également été isolés par le biais de cribles à haut débit visant à identifier des antiviraux à large spectre. Ainsi, à partir d'un test de réplication virale *in vitro*, l'équipe de Richard K. Plemper a isolé la molécule 09167 (figure 7G) (Yan *et al.*, 2013). Ce composé antiviral à large spectre induit l'expression de certains ISG, mais pas l'expression de l'IFN- β . De même, le composé GSK983 (figure 7H), lui aussi identifié au départ pour son activité antivirale à large spectre, induit certains ISG dans différentes lignées de cellules humaines (Harvey *et al.*, 2009). Le mode d'action de ces deux molécules n'a pas encore été identifié. Enfin, en utilisant un test cellulaire pour la réplication du virus de l'hépatite C, l'équipe de Masayuki Sudoh a identifié une molécule, RO4948191 (figure 7I), capable de lier directement le récepteur aux interférons de type I (Konishi *et al.*, 2012). Ce composé se lie en effet directement à IFNAR2c, ce qui active JAK1 et stimule l'expression des ISG.

Conclusions et perspectives

Notre meilleure compréhension de la réponse immunitaire innée antivirale a entraîné un regain d'intérêt pour les petites molécules capables d'induire l'expression des interférons de type I. Parmi tous les composés présentés dans cette revue, seul l'imiquimod est actuellement prescrit pour le traitement cutané des verrues génitales à papillomavirus et du carcinome basocellulaire. Les effets secondaires associés à ces molécules (syndrome grippal, lymphopénie, pathologies auto-immunes, *etc.*), qu'ils soient avérés ou simplement redoutés, compliquent leur développement et représentent un premier obstacle à surmonter (Engel *et al.*, 2011). Néanmoins, certaines molécules vont très certainement réussir leur passage en clinique dans les années qui viennent et cela pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'éventail des cibles cellulaires permettant de moduler l'expression des interférons s'élargit chaque année, offrant la possibilité de contrôler toujours plus finement la réponse immunitaire innée. Par ailleurs, les effets secondaires associés à ces molécules immunostimulatrices dépendent non seulement du ou des récepteurs qu'elles engagent, mais également de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'administration (Engel *et al.*, 2011). Ainsi, certains nouveaux ligands de TLR7 comme le GS-9620, dont les effets secondaires sont moindres que les imidazoquinolines, ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques (Lanford *et al.*, 2013). Il apparaît aussi que des traitements de courte durée, limités à

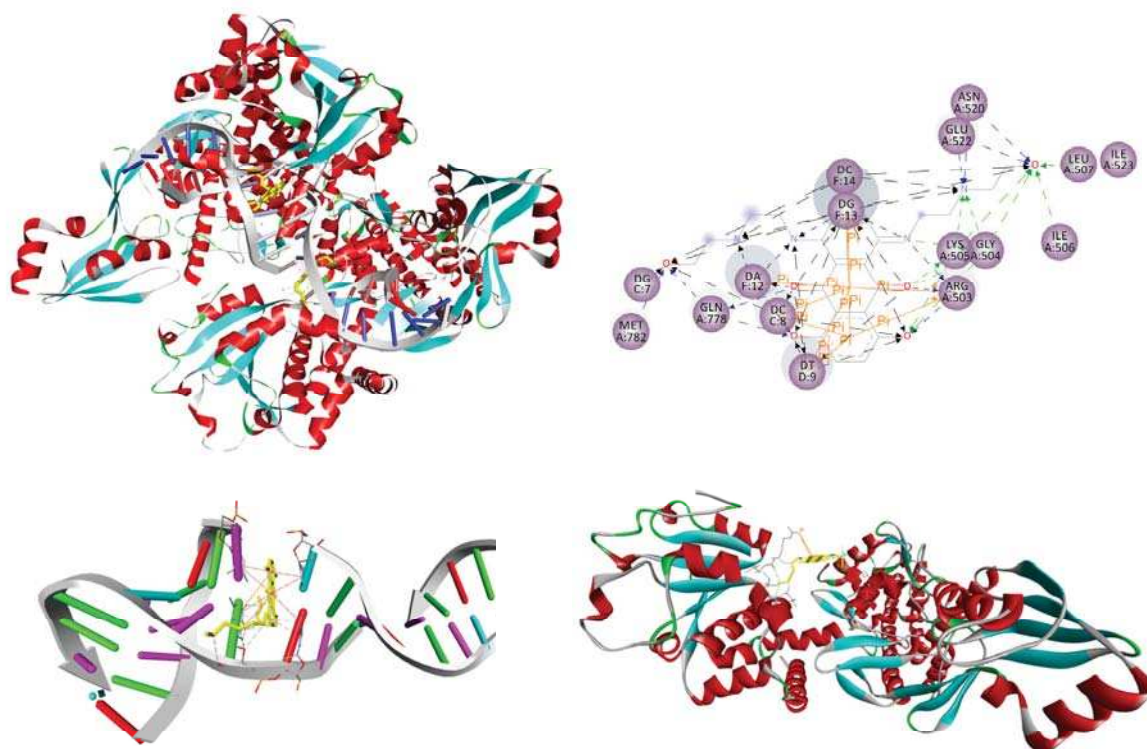


Fig. 8. Topoisomérase 2 β humaine liée à l'ADN et la mitoxantrone (PDB 4G0V) (Wu *et al.*, 2013). Les acides aminés impliqués dans ces interactions sont présentés dans les panneaux de droite (vert pour les interactions hydrophobes et violet pour les interactions électrostatiques).

quelques injections, permettront d'obtenir les effets thérapeutiques recherchés tout en limitant les effets secondaires observés lors de traitements s'étalant sur plusieurs semaines. Enfin, le mode d'administration fait l'objet d'intenses recherches, et cela afin d'amener *in situ* la molécule active. Des résultats très encourageants ont par exemple été obtenus avec des ligands de TLR administrés par la voie intranasale qui protègent efficacement les rongeurs d'infections létales par le virus de la grippe (Hammerbeck *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012). Les effets secondaires étant très limités, cette approche ouvre des possibilités intéressantes pour le traitement des infections respiratoires.

Un second obstacle conceptuel à l'utilisation de ces molécules dans le traitement des infections virales réside dans la capacité des virus à bloquer la voie interféron *via* l'expression des facteurs de virulence codés par leur génome. De fait, si de nombreux composés inducteurs des interférons de type I protègent de l'infection dans les modèles *in vivo*, leurs propriétés thérapeutiques sont souvent limitées. Cependant, il

s'agit souvent d'un faux problème. La plupart des infections virales sont aiguës et une fois les symptômes déclarés, réduire la charge virale à l'aide d'antiviraux, qu'ils soient à action directe ou indirecte, n'a que peu d'intérêt. L'exemple de l'oseltamivir dans le cas de la grippe, qui doit être administré dans les 48 heures suivant l'apparition des symptômes, est caractéristique. Ce constat a conduit de nombreuses équipes travaillant dans le domaine des antiviraux à changer de stratégie pour s'orienter vers le développement de traitements prophylactiques qui seraient administrés avant l'apparition des symptômes pour prévenir la propagation d'un virus au sein d'une communauté (maisons de retraite, crèches, habitations, *etc.*). Dans ce type d'approche, les composés stimulateurs des interférons auraient toute leur place, et ont déjà prouvé leur efficacité dans des modèles *in vivo*.

Enfin, les molécules inductrices des interférons de type I s'intègrent dans le champ plus vaste des immunothérapies, un domaine en plein essor qui vise à contrôler la réponse immunitaire, innée et/ou adaptative. Au delà des infections virales, cette nou-

velle classe de molécules pourrait avoir de nombreuses applications dans le domaine du cancer, des pathologies auto-immunes ou des maladies inflammatoires chroniques. Dans les dix ans à venir, on peut s'attendre à une révolution dans la prise en charge des malades avec le développement des immunothérapies, et les composés inducteurs des interférons de type I devraient y prendre une place significative.

Remerciements. Samira Khiar est financée pour sa thèse par la Direction Générale de l'Armement (Ministère de la Défense) et l'Institut Pasteur. Nous remercions le Professeur Mélanie Ethève-Quelquejeu, le Professeur Serge Fermandjian, le Docteur Rodolphe Alves de Sousa et le Docteur Marianne Lucas-Hourani pour leur relecture attentive du manuscrit.

Références

- Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*, 85, 85-95.
- Bedard, K.M., Wang, M.L., Proll, S.C., Loo, Y.M., Katze, M.G., Gale, M., Jr., and Iadonato, S.P. (2012). Isoflavone agonists of IRF-3 dependent signaling have antiviral activity against RNA viruses. *J Virol*, 86, 7334-7344.
- Cavlar, T., Deimling, T., Ablasser, A., Hopfner, K.P., and Hornung, V. (2013). Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J*, 32, 1440-1450.
- Conlon, J., Burdette, D.L., Sharma, S., Bhat, N., Thompson, M., Jiang, Z., Rathinam, V.A., Monks, B., Jin, T., Xiao, T.S., Vogel, S.N., Vance, R.E., and Fitzgerald, K.A. (2013). Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid. *J Immunol*, 190, 5216-5225.
- Dempsey, A., and Bowie, A.G. (2015). Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*, 479-480C, 146-152.
- Engel, A.L., Holt, G.E., and Lu, H. (2011). The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 4, 275-289.
- Es-Saad, S., Tremblay, N., Baril, M., and Lamarre, D. (2012). Regulators of innate immunity as novel targets for antiviral therapeutics. *Curr Opin Virol*, 2, 622-628.
- Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.P., and Hilleman, M.R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58, 1004-1010.
- Gao, P., Ascano, M., Zillinger, T., Wang, W., Dai, P., Serganov, A.A., Gaffney, B.L., Shuman, S., Jones, R.A., Deng, L., Hartmann, G., Barchet, W., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2013). Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell*, 154, 748-762.
- Gao, P., Zillinger, T., Wang, W., Ascano, M., Dai, P., Hartmann, G., Tuschl, T., Deng, L., Barchet, W., and Patel, D.J. (2014). Binding-pocket and lid-region substitutions render human STING sensitive to the species-specific drug DMXAA. *Cell Rep*, 8, 1668-1676.
- Glaz, E.T., Szolgay, E., Stoger, I., and Talas, M. (1973). Antiviral activity and induction of interferon-like substance by quinacrine and acranil. *Antimicrob Agents Chemother*, 3, 537-541.
- Gorden, K.B., Gorski, K.S., Gibson, S.J., Kedl, R.M., Kieper, W.C., Qiu, X., Tomai, M.A., Alkan, S.S., and Vasilakos, J.P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol*, 174, 1259-1268.
- Grossberg, S.E. (1977). Nonviral interferon inducers: natural and synthetic products. *Tex Rep Biol Med*, 35, 111-116.
- Guo, F., Mead, J., Aliya, N., Wang, L., Cuconati, A., Wei, L., Li, K., Block, T.M., Guo, J.T., and Chang, J. (2012). RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response. *PLoS One*, 7, e42583.
- Hammerbeck, D.M., Burleson, G.R., Schuller, C.J., Vasilakos, J.P., Tomai, M., Egging, E., Cochran, F.R., Woulfe, S., and Miller, R.L. (2007). Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Res*, 73, 1-11.
- Harvey, R., Brown, K., Zhang, Q., Gartland, M., Walton, L., Talarico, C., Lawrence, W., Selleseth, D., Coffield, N., Leary, J., Moniri, K., Singer, S., Strum, J., Gudmundsson, K., Biron, K., Romines, K.R., and Sethna, P. (2009). GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res*, 82, 1-11.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, 3, 196-200.
- Hirota, K., Kazaoka, K., Niimoto, I., Kumihara, H., Sajiki, H., Isobe, Y., Takaku, H., Tobe, M., Ogita, H., Ogino, T., Ichii, S., Kurimoto, A., and Kawakami, H. (2002). Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer. *J Med Chem*, 45, 5419-5422.
- Hoffman, W.W., Korst, J.J., Niblack, J.F., and Cronin, T.H. (1973). N,N-di-octadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl) propanediamine: antiviral activity and interferon stimulation in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 3, 498-502.
- Hornung, R.L., Young, H.A., Urba, W.J., and Wiltout, R.H. (1988). Immunomodulation of natural killer cell activity by flavone acetic acid: occurrence via induction of interferon alpha/beta. *J Natl Cancer Inst*, 80, 1226-1231.
- Horscroft, N.J., Pryde, D.C., and Bright, H. (2012). Antiviral applications of Toll-like receptor agonists. *J Antimicrob Chemother*, 67, 789-801.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147, 258-267.

- Isaacs, A., Cox, R.A., and Rotem, Z. (1963). Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet*, 2, 113-116.
- Isobe, Y., Kurimoto, A., Tobe, M., Hashimoto, K., Nakamura, T., Norimura, K., Ogita, H., and Takaku, H. (2006). Synthesis and biological evaluation of novel 9-substituted-8-hydroxyadenine derivatives as potent interferon inducers. *J Med Chem*, 49, 2088-2095.
- Kaufman, H.E., Centifanto, Y.M., Ellison, E.D., and Brown, D.C. (1971). Tilorone hydrochloride: human toxicity and interferon stimulation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 137, 357-360.
- Kern, E.R., Hamilton, J.R., Overall, J.C., and Glasgow, L.A. (1976). Antiviral activity of BL-3849A, a low-molecular-weight oral interferon inducer. *Antimicrob Agents Chemother*, 10, 691-696.
- Kim, T., Kim, T.Y., Song, Y.H., Min, I.M., Yim, J., and Kim, T.K. (1999). Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem*, 274, 30686-30689.
- Kim, S., Li, L., Maliga, Z., Yin, Q., Wu, H., and Mitchison, T.J. (2013). Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists. *ACS Chem Biol*, 8, 1396-1401.
- Konishi, H., Okamoto, K., Ohmori, Y., Yoshino, H., Ohmori, H., Ashihara, M., Hirata, Y., Ohta, A., Sakamoto, H., Hada, N., Katsume, A., Kohara, M., Morikawa, K., Tsukuda, T., Shimma, N., Foster, G.R., Alazawi, W., Aoki, Y., Arisawa, M., and Sudoh, M. (2012). An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. *Sci Rep*, 2, 259.
- Kramer, M.J., Cleeland, R., and Grunberg, E. (1976). Antiviral activity of 10-carboxymethyl-9-acridanone. *Antimicrob Agents Chemother*, 9, 233-238.
- Kramer, M.J., Taylor, J.L., and Grossberg, S.E. (1981). Induction of interferon in mice by 10-carboxymethyl-9-acridanone. *Methods Enzymol*, 78, 284-287.
- Krueger, R.E., and Mayer, G.D. (1970). Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent. *Science*, 169, 1213-1214.
- Lanford, R.E., Guerra, B., Chavez, D., Giavedoni, L., Hodara, V.L., Brasky, K.M., Fosdick, A., Frey, C.R., Zheng, J., Wolfgang, G., Halcomb, R.L., and Tumas, D.B. (2013). GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology*, 144, 1508-1517, 1517 e1501-1510.
- Lee, J., Chuang, T.H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E., and Cottam, H.B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 6646-6651.
- Lee, J., Wu, C.C., Lee, K.J., Chuang, T.H., Katakura, K., Liu, Y.T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., Cottam, H.B., Lai, M.M., Raz, E., and Carson, D.A. (2006). Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 1828-1833.
- Li, L., Yin, Q., Kuss, P., Maliga, Z., Millan, J.L., Wu, H., and Mitchison, T.J. (2014). Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol*, 10, 1043-1048.
- Lin, C.W., Wu, C.F., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Li, S.W., Wan, L., Lin, Y.J., and Lin, W.Y. (2008). Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int J Antimicrob Agents*, 32, 355-359.
- Lucas-Hourani, M., Dauzonne, D., Jorda, P., Cousin, G., Lupan, A., Helynck, O., Caignard, G., Janvier, G., André-Leroux, G., Khiar, S., Escriou, N., Després, P., Jacob, Y., Munier-Lehmann, H., Tangy, F., and Vidalain, P.O. (2013). Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog*, 9, e1003678.
- Martinez-Gil, L., Ayllon, J., Ortigoza, M.B., Garcia-Sastre, A., Shaw, M.L., and Palese, P. (2012). Identification of small molecules with type I interferon inducing properties by high-throughput screening. *PLoS One*, 7, e49049.
- Mayer, G.D., and Krueger, R.F. (1970). Tilorone hydrochloride: mode of action. *Science*, 169, 1214-1215.
- Meyer, T., Surber, C., French, L.E., and Stockfleth, E. (2013). Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 22, 149-159.
- Miller, R.L., Gerster, J.F., Owens, M.L., Slade, H.B., and Tomai, M.A. (1999). Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol*, 21, 1-14.
- Pan, Q., de Ruiter, P.E., Metselaar, H.J., Kwekkeboom, J., de Jonge, J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L., and van der Laan, L.J. (2012). Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, 55, 1673-1683.
- Patel, D.A., Patel, A.C., Nolan, W.C., Zhang, Y., and Holtzman, M.J. (2012). High throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling pathway to drive next-generation antiviral drug discovery. *PLoS One*, 7, e36594.
- Pestka, S. (2007). Purification and cloning of interferon alpha. *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 23-37.
- Prantner, D., Perkins, D.J., Lai, W., Williams, M.S., Sharma, S., Fitzgerald, K.A., and Vogel, S.N. (2012). 5,6-Dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*, 287, 39776-39788.
- Pryde, D.C., Tran, T.D., Jones, P., Parsons, G.C., Bish, G., Adam, F.M., Smith, M.C., Middleton, D.S., Smith, N.N., Calo, F., Hay, D., Paradowski, M., Proctor, K.J.W., Parkinson, T., Laxton, C., Fox, D.N.A., Horscroft, N.J., Ciaramella, G., Jones, H.M., Duckworth, J., Benson, N., Harrison, A., and Webster, R. (2011). The discovery of a novel prototype small molecule TLR7 agonist for the treatment of hepatitis C virus infection. *Med Chem Comm*, 2, 185-189.

- Raj, N.B., and Pitha, P.M. (1993). 65-kDa protein binds to destabilizing sequences in the IFN-beta mRNA coding and 3' UTR. *FASEB J*, 7, 702-710.
- Sariol, C.A., Martinez, M.I., Rivera, F., Rodriguez, I.V., Pantoja, P., Abel, K., Arana, T., Giavedoni, L., Hodara, V., White, L.J., Anglero, Y.I., Montaner, L.J., and Kraiselburd, E.N. (2011). Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. *PLoS One*, 6, e19323.
- Schlee, M., Barchet, W., Hornung, V., and Hartmann, G. (2007). Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids. *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 207-230.
- Schmid, S., Mordstein, M., Kochs, G., Garcia-Sastre, A., and Tenover, B.R. (2010). Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state. *J Biol Chem*, 285, 42013-42022.
- Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*, 1, 519-525.
- Silin, D.S., Lyubomska, O.V., Ershov, F.I., Frolov, V.M., and Kutsyna, G.A. (2009). Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers. *Curr Pharm Des*, 15, 1238-1247.
- Siminoff, P., Bernard, A.M., Hursky, V.S., and Price, K.E. (1973). BL-20803, a new, low-molecular-weight interferon inducer. *Antimicrob Agents Chemother*, 3, 742-743.
- Stevenson, N.J., Murphy, A.G., Bourke, N.M., Keogh, C.A., Hegarty, J.E., and O'Farrelly, C. (2011). Ribavirin enhances IFN-alpha signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV. *PLoS One*, 6, e27866.
- Stringfellow, D.A., Vanderberg, H.C., and Weed, S.D. (1980). Interferon induction by 5-halo-6-phenyl pyrimidinones. *J Interferon Res*, 1, 1-14.
- Stringfellow, D.A., Weed, S.D., and Underwood, G.E. (1979). Antiviral and interferon-inducing properties of 1,5-diamino anthraquinones. *Antimicrob Agents Chemother*, 15, 111-118.
- Tai, Z.F., Zhang, G.L., and Wang, F. (2012). Identification of small molecule activators of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway using a cell-based screen. *Biol Pharm Bull*, 35, 65-71.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*, 339, 1426-1429.
- Taylor, J.L., Schoenherr, C., and Grossberg, S.E. (1980a). Protection against Japanese encephalitis virus in mice and hamsters by treatment with carboxymethyl-acridanone, a potent interferon inducer. *J Infect Dis*, 142, 394-399.
- Taylor, J.L., Schoenherr, C.K., and Grossberg, S.E. (1980b). High-yield interferon induction by 10-carboxymethyl-9-acridanone in mice and hamsters. *Antimicrob Agents Chemother*, 18, 20-26.
- Thomas, E., Feld, J.J., Li, Q., Hu, Z., Fried, M.W., and Liang, T.J. (2011). Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology*, 53, 32-41.
- Tijono, S.M., Guo, K., Henare, K., Palmer, B.D., Wang, L.C., Albelda, S.M., and Ching, L.M. (2013). Identification of human-selective analogues of the vascular-disrupting agent 5,6-dimethylxanthene-4-acetic acid (DMXAA). *Br J Cancer*, 108, 1306-1315.
- Vilcek, J. (2007). Interferon research BC (before cloning). *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 9-22.
- Wheelock, E.F. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 149, 310-311.
- Wong, J.P., Christopher, M.E., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L.Q., Wang, M., and Salazar, A.M. (2009). Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine*, 27, 3481-3483.
- Wu, C.C., Li, Y.C., Wang, Y.R., Li, T.K., and Chan, N.L. (2013). On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs. *Nucleic Acids Res*, 41, 10630-10640.
- Yan, D., Krumm, S.A., Sun, A., Steinhauer, D.A., Luo, M., Moore, M.L., and Plemper, R.K. (2013). Dual myxovirus screen identifies a small-molecule agonist of the host antiviral response. *J Virol*, 87, 11076-11087.
- Yeo, K.L., Chen, Y.L., Xu, H.Y., Dong, H., Wang, Q.Y., Yokokawa, F., and Shi, P.Y. (2015). Synergistic suppression of dengue virus replication using a combination of nucleoside analogs and nucleoside synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 2086-2093.
- Zhao, J., Wohlford-Lenane, C., Zhao, J., Fleming, E., Lane, T.E., McCray, P.B., Jr., and Perlman, S. (2012). Intranasal treatment with poly(I* C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *J Virol*, 86, 11416-11424.

Résumé

Alors que les infections virales représentent toujours un problème majeur de santé publique, notamment en raison de l'émergence de nouveaux virus, notre arsenal thérapeutique reste limité. Les antiviraux à action directe existant sont généralement très spécifiques d'une espèce virale donnée générant l'apparition de souches résistantes aux traitements. L'objectif au laboratoire a donc été de chercher de nouveaux antiviraux à large spectre ciblant l'hôte. Pour cela, deux systèmes de criblage distincts ont été mis au point au laboratoire. La première stratégie de criblage, basée sur la combinaison d'infections *in vitro* par les virus recombinants de la rougeole et du chikungunya, a permis d'identifier deux molécules actives : le ChX-77 qui est une triaminopyrimidine, et le sr1057 qui est une pyrroloquinoxaline. Dans ce travail, nous décrivons les propriétés antivirales puissantes *in vitro* de ChX77 aussi bien contre les virus de la rougeole et du chikungunya que contre le virus Cocksackie B3, trois virus à ARN très distincts. La molécule sr1057, quant à elle, présente une activité inhibitrice non seulement contre des virus à ARN tels que le virus de la rougeole, le virus du chikungunya et le virus Ebola, mais aussi contre des virus à ADN tels que les virus de l'herpès simplex humains et équins *in vitro*. Ce qui en fait des molécules antivirales à large spectre qui cibleraient probablement l'hôte car elles ont la capacité d'inhiber la réplication des virus de familles complètement différentes. La seconde stratégie développée a permis d'identifier ChX79, un dérivé 1H-benzimidazole-4-carboxamides, stimulant la réponse immunitaire innée par l'utilisation d'une lignée rapportrice exprimant la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse aux interférons (ISRE ; Interferon-Stimulated Response Element). Cette molécule présente de remarquables propriétés immunostimulatrices et induit spécifiquement certains gènes impliqués dans la réponse interféron de type I *via* la protéine adaptatrice MAVS et le facteur de transcription IRF1. Par ailleurs, cette molécule induit un programme de stress cellulaire intégré associé notamment à des dommages à l'ADN. Enfin, l'originalité de cette molécule demeure dans sa capacité à agir de façon synergique sur la réponse cellulaire à de l'ADN exogène permettant la production des quantités importantes d'interféron de type I *via* une voie STING dépendante. Ces résultats éclairent les mécanismes susceptibles de moduler la réponse cellulaire à de l'ADN cytosolique, un PAMP associé aux infections par des virus ou des bactéries, mais également à des stress génotoxiques liés à des radiations ou des agents carcinogènes.

Abstract

While viral infections are still a major public health problem, particularly because of the emergence of new viruses, our therapeutic arsenal remains limited. The existing Direct-acting antivirals are usually very specific for a given virus species generating the development of resistance to treatment. The objective of the laboratory was looking for new broad-spectrum antivirals targeting the host. For this, two different screening systems have been developed in the laboratory. The first strategy, based on the combination of infections *in vitro* with recombinant measles and chikungunya viruses, allowed us to identify two active molecules: the ChX-77 which is a triaminopyrimidine, and the sr1057 which is a pyrroloquinoxaline. In this work we describe the powerful antiviral properties *in vitro* of ChX77 against both measles and chikungunya viruses and against the Cocksackievirus B3, three very distinct RNA viruses. The sr1057 molecule, for its part, has an inhibitory activity not only against RNA viruses such as measles, chikungunya and Ebola viruses, but also against DNA viruses such as human and equine herpes simplex virus *in vitro*. These results suggest that these drugs, with a broad-spectrum antiviral activity, target probably the host because they have the ability to inhibit the viral replication of viruses from completely different families. The second strategy developed allowed us to select ChX79, a 1H-benzimidazole-4-carboxamides, stimulating the innate immune response by using a rapporteur line expressing luciferase under the control of an interferon response element (ISRE: Interferon-Stimulated Response Element). This molecule has remarkable immunostimulatory properties and induces specifically genes involved in type I interferon response *via* the mitochondrial signaling protein MAVS and the transcription factor IRF1. Finally, the originality of this molecule remains in its ability to prime efficiently cellular response to transfected plasmid DNA as assessed by potent synergistic effects on IFN- β secretion and ISG expression levels *via* STING-dependent pathway. All together, These results bring tools to decipher the mechanisms that modulate the cellular response to the cytosolic DNA, a PAMP associated to infections by viruses or bacteria, but also to genotoxic stress related to radiation or carcinogens.