



HAL
open science

Propriétés antivirales d'AM-001, une molécule inhibant EPAC1, une protéine de l'hôte

Alexandre Bertin

► **To cite this version:**

Alexandre Bertin. Propriétés antivirales d'AM-001, une molécule inhibant EPAC1, une protéine de l'hôte. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03859985

HAL Id: dumas-03859985

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03859985v1>

Submitted on 18 Nov 2022

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

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

ANNEE 2022 THESE : 2022– TOU 3 – 4046

PROPRIETES ANTIVIRALES D'AM-001, UNE MOLECULE INHIBANT EPAC1, UNE PROTEINE DE L'HOTE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BERTIN Alexandre, Jean, Guillaume

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :
Monsieur Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Romain VOLMER
Mme Christelle CAMUS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1^{ère}
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2^{ème}
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*

M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
M. **CROVILLE Guillaume**, *Viropologie et génomique cliniques*
Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*

Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Doyen de la Faculté des sciences pharmaceutiques
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Département des sciences pharmaceutiques, Université de Toulouse III
Département de virologie, CHU de Toulouse

Qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse, Veuillez accepter mes hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Romain Volmer

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Microbiologie-Infectiologie

Qui a accepté de m'accompagner dans la réalisation de cette thèse
Merci pour son soutien tout au long de ce travail, sa pédagogie et sa patience. Qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

A Madame la Docteure Christelle Camus

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Biologie moléculaire

Qui nous fait l'honneur de participer au jury de thèse
Qu'elle trouve ici mes remerciements les plus sincères.

Aux membres de l'équipe IHAP INRAE-ENVT qui ont participé à cette thèse

Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INDEX DES ILLUSTRATIONS	13
INTRODUCTION.....	16
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I. MOLÉCULES ANTIVIRALES : GÉNÉRALITÉS.....	18
1) <i>Etat des lieux des molécules antivirales.....</i>	18
2) <i>Principaux antiviraux ciblant le virus, cibles et mécanismes d'action.....</i>	19
3) <i>Principaux antiviraux ciblant l'hôte, cibles et mécanismes d'action.....</i>	24
3.1. Augmenter/moduler la réponse immunitaire.....	24
3.2. Cibler les protéines de l'hôte indispensables au cycle viral.....	28
3.2.1. Molécules utilisées en thérapeutique ou en développement.....	28
3.2.2. Comment rechercher de nouvelles molécules ciblant l'hôte ?.....	30
II. ETUDE APPROFONDIE DE AM-001.....	32
1) <i>Généralités sur l'AMPc et ses effecteurs.....</i>	32
2) <i>EPAC1, une cible pharmacologique intéressante.....</i>	33
2.1. Gène, structure et localisation.....	33
2.2. Les rôles cellulaires d'EPAC1.....	35
2.3. Effets de l'inhibition d'EPAC sur les infections virales.....	39
3) <i>AM-001, un inhibiteur non compétitif sélectif d'EPAC1.....</i>	41
3.1. Identification et caractérisation de la molécule.....	41
3.2. Comparaison par rapport aux autres inhibiteurs d'EPAC.....	43
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE	45
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	45
1) <i>Etude de l'effet antiviral d'AM-001.....</i>	45
1.1. Culture cellulaire.....	45
1.2. Infections par différents virus.....	46
1.2.1. Infection par les virus influenza en pré-traitement.....	47
1.2.2. Infection par les virus influenza en post-traitement.....	47
1.2.3. Infection par le virus MV-Luc en pré-traitement.....	48
1.3. Titrage des virus suite aux expériences.....	48
1.3.1. Titrage des virus influenza en PFU.....	48
1.3.2. Titrage des virus influenza en TCID50.....	50
1.4. Titration de MV-Luc.....	51
1.5. Détection de la cytotoxicité.....	51
1.6. Détection de la virucidie.....	52
1.7. Analyse statistique des résultats.....	52
2) <i>Fabrication d'un plasmide / Projet CRISPR CAS9 en cellules humaines Calu-3.....</i>	53
2.1. Description du projet.....	53
2.2. Séquences d'ARN guide à insérer.....	53
2.2.1. Choix des séquences à insérer.....	53
2.2.2. Préparation et phosphorylation des oligonucléotides.....	54
2.3. Préparation du plasmide lentiGuide-Puro.....	55

2.3.1. Description du plasmide lentiGuide-Puro	55
2.3.2. Transformation du plasmide lentiGuide-Puro	56
2.3.3. Extraction des plasmides	57
2.3.4. Vérification des plasmides obtenus	58
2.3.5. Digestion et déphosphorylation des plasmides LGP produits	61
2.4. Réaction de ligation	62
2.5. Transformation et extraction des plasmides produits	63
II. RÉSULTATS	65
1) <i>Infection de cellules A549 par le virus PR8 avec AM-001 à 10µM en pré-</i> <i>traitement.....</i>	65
2) <i>Infection de cellules MDCK par les virus PR8 et H7N1 avec AM-001 à 20µM</i> <i>en pré et post-traitement.....</i>	66
3) <i>Infection de cellules CALU-3 par le virus PR8 avec AM-001 à 10µM en pré</i> <i>et post-traitement.....</i>	70
4) <i>Infection des cellules 293-T par MV-Luc avec AM-001 à 20µM, 2 µM et</i> <i>0.2µM en pré-traitement</i>	71
5) <i>Etude de l'effet virucide d'AM-001.....</i>	72
III. DISCUSSION	73
CONCLUSION	80
ANNEXES	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83

Liste des abréviations

AC : Adénylyl cyclase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AdV : Adénovirus
AKAP : A-kinase anchoring protéines
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ARNg : ARN guide
ARNm : ARN messenger
BM-cylin : Combinaison de tiamuline et de minocycline
BRET : Bioluminescence résonance energy transfer
BSA : Sérum d'albumine bovin
CamKII : Calcium/calmodulin-dépendant protéine kinase II
CAMYEL : EPAC1-based BRET sensor
CCR5 : CC chemokine receptor 5
CDC25-HD : Cell division cycle 25 homology domain
CMV : CytomégaloVirus
CNB : Cyclic nucleotide binding
CNG: Cyclic nucleotide-gated
COVID-19: Coronavirus disease 2019
CPLA2 : phospholipase cytosolique A2
CRIS : Cyclic nucleotide receptor involved in sperm function
CypB : Cyclophilin B
DAAs : Direct-acting antiviral agents
DEP : Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DTT: Dithiothréitol
EBOV : Ebola Virus
EMA : Agence Européenne du Médicament
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
EPAC : Exchange proteins directly activated by AMPc
FDA : Food and Drug Administration
GDP : Guanosine diphosphate
GEFs: Guanine exchange factors
GRE : Glucose responsive element
GRK5 : G protein coupled receptor kinase 5
GTP : Guanosine triphosphate
H7N1 GD, H7N1 Z4 : Souches d'Influenza A/Turkey/Italy/977/1999
HBV : Virus de l'hépatite B
HCN : Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
HuCoV-229E : Human coronavirus 229E
HCV : Virus de l'hépatite C
HCV RdRp : HCV NS5B ARN dépendante ARN polymérase
HMPV : Human metapneumovirus
HRE : Hypoxia Responsive Element
Hsp : heat shock protein

HSV-1 : Herpes simplex virus 1
HSV-2 : Herpes simplex virus 2
HPV : papillomavirus humain
IC50 : Concentration inhibitrice médiane
IFN : Interféron
IMP : importine
IMPDH : inosine monophosphate déshydrogénase
IRF-9 : interferon regulatory factor 9
ISGF 3 : interferon-stimulated gene factor 3
ISRE : Interferon-stimulated response elements
KO : Knock-out
LB : Milieu Lysogeny broth
LGP : Plasmide lentiGuide-Puro
MAP : microtubule-associated proteins
MAPK : protéine kinase mitogen-activated
MDCK : Madin-Carby Canine Kidney
MEME : Minimum Essential Medium Eagle
MERS : Middle East respiratory syndrom
MOI : Multiplicity of infection
MV : Virus de la rougeole
MV-Luc : Souche vaccinale modifiée de la rougeole exprimant le gène de la luciférase firefly
NS5B : Protéine non structurale du HCV
PBS : Phosphate buffered saline
PDE : Cyclic nucleotide phosphodiesterase
PFU : Plage formant unite
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIF : Péritonite infectieuse féline
PKA : Protéine kinase A
PKB : Protéine kinase B
PKC : Protéine kinase C
PLC ϵ : Phospholipase C-epsilon
PNK : Polynucleotide kinase
POPDC : Popeye domain containing proteins
PR8 : Souche d'Influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)
RA : RAS association
RABV : Rabies virus, virus de la rage
Rap1 GEF : Rap1 guanine exchange factors
REM : RAS-exchange motif
RSV : Virus syncytial respiratoire
SARS-Cov : severe acute respiratory syndrome coronavirus
STAT : signal transducers and activator of transcription
Stbl3: One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent *E. coli*
SVF : Sérum de veau foetal
TCID50 : Median Tissue Culture Infectious Dose
TGF bêta : Transforming growth factor-beta
TLR : récepteur toll-like
TNF alpha : Tumour Necrosis Factor alpha
TPCK : Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
TyK : tyrosine kinase

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSV : Vesicular Stomatitis Virus

Index des illustrations

Figure 1 : Nombre de spécialités antivirales selon le virus ciblé d'après (6), N=88..	18
Figure 2 : Les conséquences de la reconnaissance du signal interféron (37).....	26
Figure 3 : Les effecteurs de l'AMPc dans un cardiomyocyte (89).....	33
Figure 4 : Structure des gènes EPAC (91)	34
Figure 5 : Mécanisme de l'activation d'EPAC1 (89).....	34
Figure 6 : EPAC1 signalosomes (98)	36
Figure 7 : Modèle du rôle d'EPAC1 dans l'intégrité des jonctions endothéliales (99)	37
Figure 8 : Actions d'EPAC et de PKA dans une cellule musculaire lisse des voies respiratoires (107)	38
Figure 9 : Structure d'AM-001 (125).....	41
Figure 10 : Structure du complexe AM-001/EPAC1 (126)	43
Figure 11 : Protocole d'infection par virus Influenza en post-traitement	48
Figure 12 : Exemple de résultats de plages virales pouvant être comptées.....	49
Figure 13 : Exemple de résultats de TCID50 pour deux lignes testées.....	50
Figure 14 : Plan des tests de cytotoxicité NT.....	51
Figure 15 : Carte du plasmide lentiGuide-Puro.	56
Figure 16 : Produits des digestions des plasmides LGP, lentiGuide CTRL g1 et lentiGuide CTRL g2.	59
Figure 17 : Produit des digestions des plasmides pCMVR8.74 et pMD2.G.	60
Figure 18 : Produit de la digestion de LGP par Esp31	62
Figure 19 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules A549 infectées par le virus PR8.....	66
Figure 20 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules MDCK infectées par le virus PR8 en pré-traitement et en post-traitement.....	67
Figure 21 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 à 20µM sur des cellules MDCK infectées par le virus H7N1 GD en pré-traitement et en post-traitement.....	68
Figure 22 : Essai de cytotoxicité d'AM-001 sur cellules MDCK.	69
Figure 23 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules prétraitées CALU-3 infectées par le virus PR8	70
Figure 24 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules prétraitées 293-T infectées par le virus MV-Luc	71
Figure 25 : Vérification des propriétés virucides d'AM-001	72
Tableau 1 : Principales molécules ciblant le virus, cible et mode d'action.....	20
Tableau 2 : Localisation d'EPAC1 et d'EPAC2	35
Tableau 3 : Les inhibiteurs d'EPAC1 et d'EPAC2 et leur mode d'inhibition (89).....	43
Tableau 4 : Les trois séquences les plus intéressantes pour réaliser le KO d'EPAC1 avec CRISPR/CAS9.....	54
Tableau 5 : Quantité de matière et d'eau ajoutée pour chaque séquence d'oligonucléotides.....	55
Tableau 6 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de phosphorylation des oligonucléotides	55

Tableau 7 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de digestion du plasmide LGP avec Esp31 ou Xho1.....	59
Tableau 8 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de digestion et de déphosphorylation de LGP.....	61
Tableau 9 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de ligation entre chaque couple d'oligonucléotides et LGP déphosphorylé.....	63
Tableau 10 : Nombre de colonies par conditions.....	64
Tableau 11 : Concentrations pour chaque clone de plasmides LGP2 et LGP3	64

Introduction

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. Ils peuvent infecter toutes les formes de vie et dépendent du matériel cellulaire de l'hôte pour leur survie. Chez l'Homme, ils peuvent causer des épidémies et des pandémies. Nous connaissons tous aujourd'hui le severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV 2), responsable d'une pandémie ayant causée dans le monde au moins la mort de plus de 6.4 millions de personnes (1). Ce virus cause la maladie appelée la COVID-19 (Coronavirus disease 2019). Initialement, il n'y avait pas de traitement antiviral efficace. Actuellement, l'agence européenne du médicament (EMA) a approuvé huit traitements (2).

Cependant, le SARS-Cov-2 n'est pas l'unique virus à causer des pandémies ou des épidémies. Parmi les virus ayant eu un impact majeur sur l'homme au 21ème siècle, nous pouvons citer : le virus de l'influenza aviaire, de la grippe porcine, Ebola, le SARS-CoV-1, le SARS-CoV-2 et le middle east respiratory syndrom (MERS) (3). D'autres virus ont été de véritables catastrophes chez les animaux sauvages ou d'élevage comme la peste porcine africaine, l'influenza aviaire ou la fièvre aphteuse. La recherche sur les molécules antivirales est donc un enjeu majeur de notre siècle pour faire face aux virus.

L'arsenal thérapeutique contre les virus est relativement limité. Le développement de nouvelles molécules est complexe et long. Il faut d'abord trouver une molécule d'intérêt, puis prouver son effet. Il faut ensuite vérifier son innocuité et son efficacité sur des cellules puis sur un modèle animal. Il reste alors à effectuer des essais cliniques indispensables pour évaluer leur innocuité et leur efficacité.

Comprendre les virus est un bon pas en avant vers de nouvelles opportunités thérapeutiques. Plus le cycle est connu, plus il y a de cibles potentielles identifiées pour le bloquer.

Ainsi, les virus piratent certaines voies de la cellule comme les voies de signalisation de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cette molécule est un second messenger essentiel au fonctionnement cellulaire. Ses régulateurs et effecteurs sont nombreux. Une nouvelle famille d'effecteurs a été découverte à la fin du siècle

dernier : les exchange proteins directly activated by AMPc, appelées EPAC. Elles sont notamment impliquées dans la régulation de la fonction cardiaque et du métabolisme du glucose. L'inhibition de protéines de cette famille a montré un intérêt contre certains virus.

Dans ce manuscrit, nous présenterons quel est l'arsenal thérapeutique actuel contre les virus de manière générale, en précisant les avantages et inconvénients des deux grandes catégories : les molécules ciblant le virus et celles ciblant l'hôte pour bloquer l'infection virale. Dans un deuxième temps, nous étudierons les propriétés antivirales d'une molécule, AM-001, inhibant EPAC1, une protéine de l'hôte, sur des cultures cellulaires en présence de différents virus. Nous verrons aussi la construction d'un lentivirus-guide dans le but de produire des cellules knock-out (KO) pour EPAC1 par la méthode CRISPR CAS9.

Partie I : Etude Bibliographique

I. Molécules antivirales : Généralités

1) Etat des lieux des molécules antivirales

La recherche de molécules antivirales est assez récente lorsqu'on la compare à celle des antibiotiques. Ces derniers ont commencé à se développer dès 1941 avec la découverte de la pénicilline. Les premières molécules antivirales ont été découvertes en 1963, avec l'idoxuridine ayant une efficacité topique (4), puis en 1969 avec l'amantadine. Il faut ensuite attendre 1979 pour voir l'arrivée d'une nouvelle molécule assez révolutionnaire et encore très utilisée contre l'herpès simplex virus, l'aciclovir (5).

De 1987 à 2017, sur 88 spécialités commercialisées aux Etats-Unis, 43 d'entre elles ont eu une indication contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), soit quasiment la moitié (6). Sur le reste des spécialités antivirales approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) de 1987 à 2017, les antiviraux visent le Virus de l'Hépatite C (HCV), le Virus de l'Hépatite B (HBV), l'Influenza, le Cytomégalovirus (CMV) le Virus de l'Herpès Simplex (HSV) (Figure 1). 5.7% visent d'autres virus.

Nombre de spécialités antivirales selon le virus ciblé (N=88)

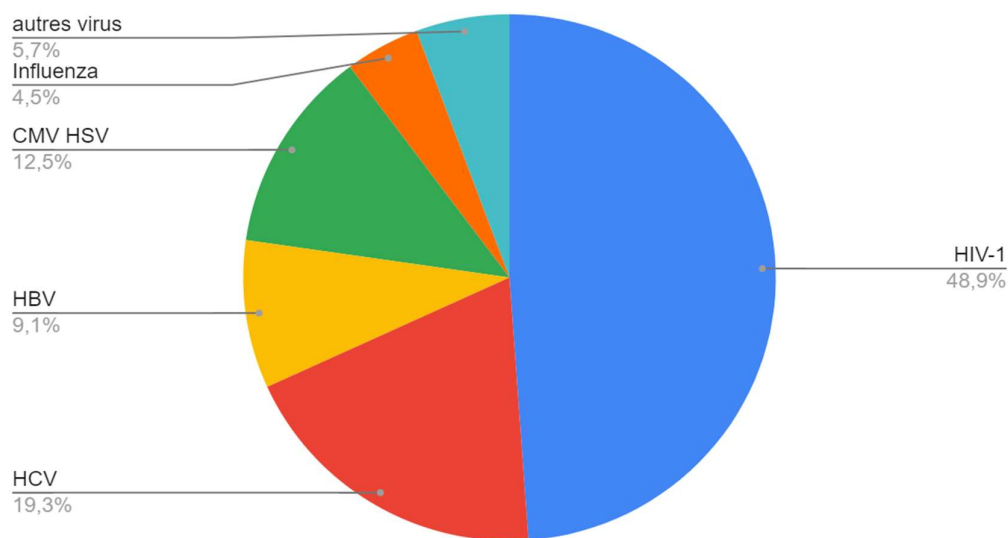


Figure 1 : Nombre de spécialités antivirales selon le virus ciblé d'après (6), N=88

Toujours sur ces 88 spécialités, seulement 13 d'entre elles ont un mécanisme d'action ciblant la cellule-hôte. Le reste agit directement sur le virus (6). De nombreuses infections virales restent sans traitement antiviral comme l'infection par le virus de la rage pour ne citer que celui-ci (7).

La découverte du VIH a considérablement accéléré la recherche d'antiviraux comme on peut le constater Figure 1. Depuis 2017, de nouvelles molécules ont été mises sur le marché du médicament humain. Pour ce qui est du SARS-CoV-2, de nombreuses molécules ciblant le virus ont été développées très récemment mais nous ne les évoquons pas dans ce manuscrit.

2) Principaux antiviraux ciblant le virus, cibles et mécanismes d'action

Les avantages des molécules agissant directement sur le virus sont une bonne efficacité, une grande spécificité ainsi que des effets secondaires a priori moins importants. En revanche, ces molécules seraient à l'origine de l'apparition d'un nombre plus élevé de résistances.

Le Tableau 1 reprend quelques molécules ciblant le virus directement en précisant leur mode d'action.

Molécule	Cible	Mode d'action	Virus ciblé(s)
Aciclovir	Polymérase virale	Insertion dans l'ADN viral et blocage de l'élongation	HSV1, HSV2 CMV, VZV Epstein barr virus
Sofosbuvir	Polymérase virale	Insertion dans l'ARN viral et blocage de la polymérase	HCV
Lédipasvir	Polymérase virale	Blocage de la protéine NS5A impliquée dans la réplication	HCV
Telaprevir	Polymérase virale	Blocage de la protéine NS3/4A impliquée dans la réplication	HCV
Ribarivine	Polymérase virale	Blocage de la polymérase, induction de mutagenèse, inhibition de l'IMPDH, induction de gènes inductibles par interférons	<i>Paramyxoviridae</i> <i>Flaviviridae</i> <i>Picornaviridae</i> <i>Orthomyxoviridae</i> <i>Reoviridae</i> <i>Orthomyxoviridae</i> <i>Arenaviridae</i> <i>Bunyaviridae</i>

Favipiravir	Polymérase virale	Induction de mutagenèse	HCV, Influenza A, B, C, certains virus à ARN
Tenofovir	Transcriptase inverse	Blocage de la transcriptase inverse	HIV-1, HVB
Abacavir	Transcriptase inverse	Blocage de la transcriptase inverse	HIV-1, HVB
Nevirapine	Transcriptase inverse	Blocage de la transcriptase inverse	HIV-1
Elvitegravir	Protéine virale (Intégrase virale)	Déstabilisation du génome viral lors de l'intégration	HIV
Ritonavir	Protéine virale	Blocage du clivage des polyprotéines gag et gagpol	HIV-1
Enfuvirtide	Protéine virale	Blocage de la formation de la conformation de gp41	HIV
Amantadine	Protéine virale	Blocage de la protéine M2, un canal à proton abaissant le pH des endosomes	Influenza A
Oseltamivir	Protéine virale	Blocage des neuraminidases, enzyme rompant la liaison virion-membrane	Influenza A et B

Tableau 1 : Principales molécules ciblant le virus, cible et mode d'action.

Dans ce tableau, les molécules sont réparties en trois catégories : celles ciblant les polymérases virales (bleu), celles ciblant les transcriptases inverses (vert) et celles ciblant les protéines virales (orange)

Certains antiviraux ciblent les polymérases virales. Les nucléosides acycliques, dont fait partie l'aciclovir, sont efficaces contre l'herpès simplex virus 1 et 2, le CMV, Epstein-Barr virus et le Varicella Zoster virus (5,6). L'aciclovir inhibe la réplication virale sans bloquer la mitose et les autres fonctions cellulaires. Contre HSV-1 et HSV-2, cette molécule est activée par phosphorylation dans les cellules infectées par une protéine virale : la thymidine kinase. L'aciclovir monophosphate formé est ensuite phosphorylé par des enzymes cellulaires (9) et s'insère dans l'Acide désoxyribonucléique (ADN) viral ce qui empêche son élongation (8).

La ribavirine est un antiviral agissant sur plusieurs virus de familles très différentes dont les *Paramyxoviridae*, les *Flaviviridae*, les *Picornaviridae*, les *Orthomyxoviridae*, les *Reoviridae*, les *Orthomyxoviridae*, les *Arenaviridae* et les *Bunyaviridae*. Il y a plusieurs théories quant à son ou ses mécanismes d'action (11). La ribavirine tirerait une partie de son action de l'inhibition d'une protéine cellulaire,

l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). La ribavirine peut aussi agir en tant qu'analogue du guanosine triphosphate (GTP) et de l'adénosine triphosphate (ATP), ce qui conduirait à un taux de mutagenèse augmenté dans les virus à ARN. Il a été montré que l'activité mutagène est corrélée à l'activité antivirale (12). La ribavirine peut aussi inhiber la polymérase à ARN de l'HCV. Enfin, elle aurait une activité immunomodulatrice et induirait des gènes inductibles par certains interférons (11).

Une autre molécule, le favipiravir, agit d'une manière similaire à l'un des mécanismes d'action de la ribavirine. Elle provoque un excès des mutations de la guanine vers l'adénosine et de la cytosine vers l'uracile lors de la réplication de l'ARN du virus de l'Hépatite C (HCV) (13). Le favipiravir est aussi actif contre l'influenza A, B et C, et d'autres virus dans une moindre mesure (poliovirus, rhinovirus...) (14). Cette molécule, comme la ribavirine (15), serait intéressante pour traiter des souches résistantes aux antiviraux classiquement utilisés.

Depuis les années 2010, il est possible de guérir du HCV, c'est-à-dire de ne plus avoir de traces du virus dans le sang vingt-quatre semaines après le dernier traitement. En 2018, il y avait onze spécialités permettant cette guérison. Leur utilisation dépend du génotype du virus et du patient traité (cirrhose, co-infection avec le VIH...). Ces spécialités sont composées de molécules uniques ou bien d'association ce qui permet de limiter l'apparition de résistances (16). On distingue trois catégories de molécules : les inhibiteurs de protéase NS3A/4A (telaprevir, voxilaprevir, glécaprevir), les inhibiteurs de NS5A (lédipasvir, elbasvir) et les inhibiteurs de NS5B (sofosbuvir). Ces trois catégories bloquent l'action de la polymérase du HCV.

Après être entré par endocytose, le virus de l'Hépatite C va répliquer son génome, initialement ARN positif pour produire de nouveaux virions. Chaque étape du cycle viral est une cible potentielle. L'une des molécules particulièrement efficace et révolutionnaire est le sofosbuvir qui agit comme un inhibiteur de la HCV NS5B ARN dépendante ARN polymérase (RdRp) (17). L'antiviral doit d'abord subir une étape de métabolisation intracellulaire. La molécule formée est un analogue triphosphate de l'uridine et de ce fait un inhibiteur compétitif de la HCV NS5B polymérase. Elle s'insère dans l'ARN viral en cours de synthèse par la HCV RdRp ce qui conduit à son inhibition.

Le virus est donc bloqué dans sa progression puisqu'il ne peut plus produire de nouveaux génomes.

L'antiviral sofosbuvir est spécifique, c'est-à-dire qu'il ne va cibler que le virus et n'aura pas d'effets sur la réplication du génome des cellules de l'hôte. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'effets secondaires à son utilisation. De plus, il n'inhibe pas toutes les formes du virus mais seulement quelques génotypes, d'où l'utilisation d'associations de molécules selon le génotypage.

In vivo, il a été observé sur de nombreux cas de résistances aux molécules utilisées, comme la mericitabine ou le sofosbuvir (18). Dans certains cas, la résistance peut être croisée avec d'autres antiviraux actifs contre le HCV. Cependant, il est important de noter que certaines mutations conférant les plus fortes résistances pénalisent le virus en le faisant se répliquer plus lentement (19). Selon les génotypes étudiés, des mutations sur le génome viral sont sélectionnées, notamment la double mutation L159F/L320F du génotype 1a. Les associations de molécules permettent, comme dans le cas du VIH, en ciblant des étapes différentes du cycle viral, de diminuer l'apparition de résistances.

Contre le VIH, il existe sept classes de molécules bloquant le virus (20). Les inhibiteurs de la transcriptase inverse en forment trois selon la nature des molécules inhibitrices : les nucléotides (tenofovir...), les nucléosides (abacavir, stavudine, lamivudine...) et les non-nucléosides (nevirapine, rilpivirine...). Les nucléotides et les nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse ont un groupe hydroxyl en moins, ce qui empêche la formation d'une liaison phosphodiester pendant la formation de l'ADN, ce qui bloque la réplication du virus. Ces deux classes d'antirétroviraux peuvent aussi être utilisées dans le traitement de l'hépatite B. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse non-nucléosides vont se fixer près du site actif de la transcriptase inverse, ce qui modifie la conformation de l'enzyme (21). Ils ne fonctionnent pas sur la transcriptase inverse de la souche HIV-2. Des résistances à ces classes d'inhibiteurs sont retrouvés dans beaucoup d'études, comme la mutation M184V/I (22).

Les autres antiviraux actifs contre le HIV agissent contre des protéines virales : Les inhibiteurs des intégrases virales sont portés par l'elvitegravir et le raltégravir. Ces molécules perturbent la stabilisation du génome viral en inhibant la réaction

d'intégration (20). Le principal avantage de cette famille est la moindre fréquence d'apparition de résistance du VIH à ces molécules par rapport aux autres familles, ce qui en fait un bon candidat pour les trithérapies (23).

Les inhibiteurs des protéases virales fonctionnent sur HIV-1. Il existe notamment le ritonavir et le lopinavir. Ils empêchent le clivage des précurseurs des polyprotéines gag et gagpol. Il était initialement attendu une faible résistance du VIH à ces molécules. Cependant, les gènes codant les protéases virales ont une grande plasticité. Les résistances aux inhibiteurs des protéases virales sont liées au changement du site de clivage des protéases et sont communément engendrées par l'utilisation de ces inhibiteurs (24, 25).

Les inhibiteurs de la fusion membranaire sont composés de l'enfuvirtide entre autres. Cette dernière molécule inhibe la formation de la conformation de la protéine virale gp41 nécessaire pour la fusion virale. Il a été montré dès l'essai de phase 1 que l'enfuvirtide utilisée seule sur patients humains provoque la sélection de souches virales résistantes à cette molécule dès quatorze jours (26).

Les inhibiteurs de la maturation virale sont représentés par le bevirimat. Cependant, les essais cliniques ont été abandonnés et la molécule n'est pas commercialisée (20).

Les traitements contre le HIV sont maintenant réalisés à partir de combinaisons de plusieurs de ces molécules, comme par exemple un ou deux nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse et un inhibiteur des intégrases virales. Ces doubles ou triples thérapies permettent de devenir indétectable dans la plupart des cas. L'apparition de résistances est réduite du fait de la grande efficacité et de l'utilisation de molécules ayant des cibles différentes (27).

Contre les virus Influenza de manière générale, on distingue deux familles d'antiviraux, tous deux agissant sur des protéines indispensables au cycle viral : les inhibiteurs de la protéine M2 et les inhibiteurs des neuraminidases (28).

La première famille d'inhibiteurs d'Influenza bloque la protéine M2, un canal à protons qui va baisser le pH dans les endosomes (29). Cette famille d'antiviraux ne fonctionne que sur l'Influenza A. L'amantadine et la rimantadine en sont les constituants principaux. Il a été montré que l'utilisation de l'amantadine peut rapidement entraîner *in vivo* et *in vitro* l'apparition de virus résistants à cette molécule (30). Les souches Influenza A résistantes à l'amantadine sont tellement présentes

dans le monde que la molécule n'est plus recommandée pour son activité antivirale (31).

Les neuraminidases sont des enzymes qui rompent la liaison entre le virion et la membrane cellulaire, ce qui permet la diffusion du virus dans l'hôte. L'oseltamivir fait partie des inhibiteurs des neuraminidases qui fonctionnent sur les souches d'Influenza A et B en bloquant ces neuraminidases sur la surface des virus. Très efficace, son utilisation massive en France n'a pas mené initialement à l'apparition de résistances de 2002 à 2005 (32). Cependant, sur 437 souches isolées dans 18 pays européens en 2008, 14 % sont résistantes à l'oseltamivir (33). Au Japon, une étude décrit très bien l'apparition de souche d'Influenza A résistante à l'oseltamivir : sur 50 échantillons provenant d'enfants, 18 % avaient des mutations de la neuraminidase suite au traitement (34). Dans ce même pays, sur 74 échantillons d'Influenza B provenant aussi d'enfants traités, une souche s'est montrée résistante à l'oseltamivir, contre aucune sur 348 échantillons provenant de personnes de tout âge non traitées (35).

3) Principaux antiviraux ciblant l'hôte, cibles et mécanismes d'action

Les molécules ciblant l'hôte apportent certains avantages par rapport à celles ciblant le virus. Elles permettraient de diminuer l'apparition de résistances puisqu'elles sont dirigées contre l'hôte. Elles auraient aussi un spectre potentiellement plus large. Les antiviraux ciblant l'hôte peuvent avoir des effets systémiques, dus à leur métabolisation comme tous les médicaments, mais comme leur mode d'action cible l'hôte, ils peuvent avoir de graves conséquences sur le fonctionnement des cellules et des organes.

3.1. Augmenter/moduler la réponse immunitaire

Les interférons thérapeutiques (IFN) sont les principales molécules utilisées pour renforcer la réponse immunitaire chez l'homme. Ils miment l'interféron alpha et beta, qui sont des interférons de type I.

Il existe plusieurs interférons α , codées par un nombre de gènes différents selon les espèces, ayant des activités antivirales, antibactériennes et antiprolifératives

différentes. Ils font partie de l'arsenal défensif précoce des cellules face aux infections, l'immunité innée. Il n'y a qu'un interféron β codé par un seul gène ainsi que des interférons gamma, tau et lambda. La première description d'un effet antiviral date de 1957 (36).

Lors de l'infection d'une cellule par un virus, celle-ci va produire des interférons qui vont diffuser aux cellules avoisinantes. Les interférons α et β vont être reconnus par les récepteurs de l'interféron α (IFNAR1 et IFNAR2), ubiquitaires. La liaison de l'interféron aux récepteurs induit une cascade de phosphorylation faisant intervenir plusieurs effecteurs jusqu'au facteur de régulation IRF-9 pour activer le facteur de gène stimulé par l'interféron ISGF-3. Ce dernier va entrer dans le noyau de la cellule et par l'intermédiaire de composants de réponse stimulés par l'interféron (ISRE), va activer des gènes promoteurs de gènes inductibles par interféron. D'autres protéines, comme la protéine kinase mitogen-activated (MAPK) ou la phospholipase cytosolique A2 (CPLA2), sont activées par la reconnaissance des interférons de type I par leurs récepteurs en faisant intervenir les Janus kinases par exemple (37).

D'autres effecteurs activés par les interférons peuvent aussi provoquer l'expression des gènes CXCL 9,10 et 11 (38). Les chimiokines produites sont des CXC chémokine ligands qui se fixent sur le récepteur CXCR3, ce qui favorise le chimiotactisme et la migration cellulaire pro-inflammatoire (39).

Les interférons participent à l'immunité innée et jouent un rôle important dans la protection antivirale. Leur reconnaissance par les récepteurs induit l'expression de certains gènes ou activer des protéines qui vont permettre de bloquer le virus à différentes étapes du cycle. Trois voies sont détaillées dans la Figure 2. La voie PKR conduit à l'inhibition rapide de la traduction. La voie du système 2-5A permet l'activation de l'endoribonucléase RNase L qui va cliver l'ARN cellulaire et viral. Enfin, les protéines Mx perturbent, entre autres, la transcription virale.

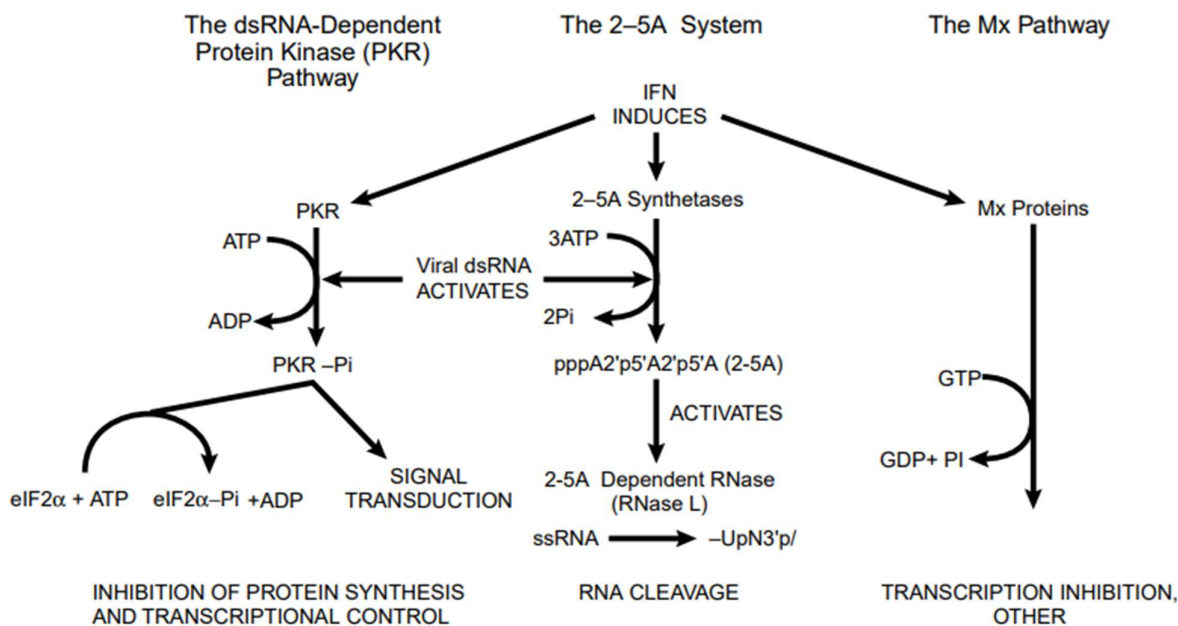


Figure 2 : Les conséquences de la reconnaissance du signal interféron (37)

En thérapeutique, des IFN α ou β sont utilisés pour moduler la réponse immunitaire de l'hôte en plus de ceux déjà produits par ses cellules lors d'infection virale. Cependant, les virus possèdent des mécanismes pour moduler la réponse produite par les IFN. Ils peuvent bloquer leur synthèse ou bloquer l'activation des protéines induites (40).

Il existait en 2021 cinq IFN antiviraux disponibles en tant que spécialités. Ils ciblent le papillomavirus humain (IFN- α 3), le HCV (IFN- α con1, Peg-IFN- α 2a, IFN- α 2b Peg-IFN- α 2b) et le HBV (Peg-IFN- α 2a, IFN- α 2b). Ils sont utilisés selon l'âge du patient ou la présence d'une association d'une infection par HIV et HCV.

Le traitement à l'interféron a prouvé son intérêt dans le traitement du HCV. Utilisé seul, l'IFN permettait une disparition du virus dans le sang dans 30 à 60% des cas. C'est en association avec la ribavirine qu'il est le plus intéressant. Ces deux médicaments combinés entraînent une absence de HCV dans le sang dans 80 à 90% des cas de HCV génotype 2/3 et 40 à 50% des cas de HCV génotype 1 (41). Il s'agissait d'un traitement de référence avant l'utilisation de molécules plus efficaces en première intention.

Contre le virus de l'Hépatite E, le Peginterféron reste un traitement de choix mais cela est discuté en raison d'effets secondaires importants et de l'efficacité suspectée supérieure de la ribavirine seule (42).

Contre le SARS-CoV-2, l'IFN de type I aurait aussi prouvé un certain intérêt. Administré en intranasal sur des hamsters infectés, il permettrait de diminuer les titres viraux et de réduire la perte de poids. Il faut cependant l'administrer de manière prophylactique, avant les premiers signes cliniques pour observer un effet bénéfique. Cela démontre une importance primordiale du moment d'administration de l'IFN, qui joue une course contre la montre avec le virus (43).

L'utilisation d'IFN provoque beaucoup d'effets secondaires, ce qui en fait un inconvénient majeur (44). En effet, ils provoquent dans 70 à 100% des cas une fatigue voire une dépression. Ils peuvent aussi provoquer une atteinte de la fonction thyroïdienne jusqu'à 20% des cas. Dans une moindre mesure, ils peuvent être à l'origine d'une anémie, d'une thrombopénie, d'une neutropénie voire d'une pancytopenie, d'une myélosuppression et de troubles du comportement (45).

D'autres IFN sont en développement comme le PEG-IFN- λ , un interféron de type III, actif contre le HCV et utilisé en association avec la ribavirine (46). Cet interféron a l'avantage de provoquer moins d'effets secondaires, notamment hématologiques. L'interféron- λ et le PEG-IFN- λ activent les protéines Mx et le système 2-5A en se fixant sur un récepteur spécifique, présent dans les cellules hépatiques notamment (47).

Il existe une autre molécule utilisée en thérapeutique et qui augmente la production de cytokines chez l'hôte : L'imiquimod est un agoniste des récepteurs toll-like (TLR), composé synthétique appartenant à la famille des imidazoquinolones (48). Cette molécule, utilisée contre le papillomavirus humain (HPV) par voie topique, entraîne une augmentation de la production de cytokines (IFN α , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8) par les macrophages, ce qui provoque une stimulation de l'immunité innée et acquise de l'hôte à l'origine d'une régression des verrues du HPV (49).

3.2. Cibler les protéines de l'hôte indispensables au cycle viral

3.2.1. Molécules utilisées en thérapeutique ou en développement

Le maraviroc a été mis sur le marché en 2007 par la FDA. Il s'agit d'un antagoniste du CCR5 présent sur les lymphocytes CD4. En se fixant au site allostérique du récepteur, il empêche l'accrochage du R5 HIV-1 et R5 HIV-2, virus pouvant s'attacher via le récepteur CCR5, à la cellule. Chez des patients asymptomatiques, cela a pour conséquence de baisser la charge d'ARN virale par millilitre de deux log₁₀ (50).

Dans la famille des antagonistes du CCR5, actifs contre le R5 HIV-1, on trouve d'autres molécules, pour le moment non approuvées. L'aplaviroc et le vicriviroc, avec un mécanisme d'action similaire au maraviroc, ont atteint la phase 3 de leur développement. L'aplaviroc a été abandonnée à cause d'une hépatotoxicité importante (51) et le vicriviroc a passé la phase III mais n'a pas montré une efficacité suffisante pour être commercialisé (52). TAK-779 a quant à lui montré une biodisponibilité trop faible pour être utilisé chez l'homme (53). Des analogues de chimiokines RANTES modifiées dans leur extrémité N se liant à CCR5, sont aussi des inhibiteurs de l'attachement du R5 HIV-1 en provoquant l'internalisation du CCR5. Ils n'ont cependant pas atteint les essais cliniques du fait d'une efficacité moindre (54).

Le cenicriviroc est un antagoniste du CCR5 et du CCR2. Il a réussi la phase 2b des essais cliniques pour le R5 HIV-1 (55) et serait efficace contre R5 HIV-2 (56). Il n'y a actuellement pas d'étude de phase III pour cet antiviral.

Le maraviroc et les autres antiviraux de la même famille du fait de leur spécificité élevée font face à une résistance par sélection de souches du HIV préexistantes ayant une affinité supérieure pour le CXCR4, surtout s'ils sont utilisés seuls (57).

Il existe des anticorps monoclonaux : l'ilbalizumab, et PRO-140, deux anticorps monoclonaux humanisés IgG4. L'ilbalizumab possède un mécanisme particulier : il bloque l'entrée du HIV-1 en se fixant au CD4. Cela réduit la flexibilité du récepteur et bloque l'accès de la protéine virale d'attachement gp120 au CXCR4 et au CCR5. Son efficacité a été prouvée en phase 3 notamment contre les souches HIV-1 multirésistantes (58). PRO-140 cible directement CCR5 et a réussi les essais de phase 2b (60).

Une autre famille de molécules potentiellement actives contre le HIV, les inhibiteurs de CXCR4 sont pour le moment moins connus et étudiés que la famille précédente. Leur efficacité est moindre car les souches utilisant CXCR4 sont coexistantes avec les souches R5, alors que l'inverse est faux. Ils s'utilisent donc en association avec les inhibiteurs des souches R5. Le principal représentant, le plerixafor, a prouvé son efficacité en étude de phase 1 contre le HIV-1 (60). Il posséderait cependant un effet stimulant sur les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et des recherches sont en cours pour documenter ses effets secondaires et une potentielle indication en tant que mobilisateur de cellules hématopoïétiques (62).

Ces antiviraux et potentiels antiviraux ont globalement une efficacité équivalente à des antiviraux ciblant le virus directement. Ils ont cependant un spectre réduit, limité à un virus ou à une souche d'un virus.

Des molécules ayant initialement été développées pour une autre indication peuvent se révéler antivirales. Ainsi, l'ivermectine a montré *in vitro* une activité antivirale contre le SARS-CoV-2, l'Influenza A, le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune, le virus Hendra, l'adénovirus humain et d'autres virus (62). Dans le cas du SARS-CoV-2, les études sur modèle animal ont montré une bonne efficacité mais sur l'homme, il n'y a pas eu de preuves d'efficacité (62–64). L'ivermectine tirerait son activité antivirale en culture cellulaire de l'inhibition de l'importine (IMP) α . Les IMP sont une superfamille de protéines de signalisation et de transport pour les protéines de poids supérieur à 45kDa, leur permettant d'entrer dans le noyau de la cellule. Ces importines sont utilisées par les virus pour orienter la réponse immunitaire.

Les inhibiteurs des cyclophilines ont montré leur efficacité contre le HBV, le VIH et certains coronavirus. Les cyclophilines sont une famille d'isomérases peptidyl-propyl *cis/trans* (PPIases) très conservée (65). Leurs rôles cellulaires sont variés et elles sont impliquées dans la progression des tumeurs, l'inflammation, la neurodégénération, le diabète... Il a été démontré que l'inhibition de la cyclophiline B (CypB) empêche la réplication du HCV (66). C'est en utilisant la cyclosporine A, un inhibiteur de la CypB et un immunosuppresseur, que le rôle de la CypB dans la réplication du virus a été mis en évidence. La cyclosporine A aurait ainsi une activité antivirale, tout comme certains de ses analogues comme l'alisporivir (non

immunosuppresseur), contre le VIH et certains coronavirus comme le virus de la PIF ou le SARS-Cov-1 *in vitro* (67–69).

Initialement, l'alisporivir, analogue non immunosuppresseur de la cyclosporine A, a été une piste sérieuse dans le traitement de la COVID-19 (70), un essai clinique de phase II est toujours en cours (71). Il a néanmoins des effets secondaires importants. Il cause une hyperbilirubinémie dose dépendante réversible (72) et une hypertriglycéridémie (73). 6 % des patients traités avec l'alisporivir présentaient des effets secondaires, majoritairement des troubles digestifs(73). Malheureusement, lors d'un essai clinique de phase III qui évaluait l'efficacité d'une combinaison alisporivir-interféron-ribavirine ou interféron-ribavirine contre le HCV génotype 1 sur plus de 1000 patients, sept cas de pancréatite aiguë, dont une mortelle chez une personne qui prenait le traitement avec alisporivir, ont eu lieu, ce qui n'a pas permis à la molécule d'être retenue comme traitement pour le moment (74).

On pense qu'avec les antiviraux agissant sur l'hôte, il n'y a pas ou très peu de résistance. Cela a été démontré que le taux de résistance suite au traitement à l'alisporivir n'est pas nul mais est significativement réduit par rapport aux antiviraux ciblant les protéines virales (75). Les molécules ciblant les protéines de l'hôte, stables, seraient moins sujettes au développement de résistances des virus que les molécules ciblant les protéines virales, qui elles sont très variables du fait des capacités d'évolution virale (76). Il est important de noter qu'avec un antiviral ciblant l'hôte, le polymorphisme génétique de l'hôte peut baisser l'efficacité de l'antiviral (73).

3.2.2. Comment rechercher de nouvelles molécules ciblant l'hôte ?

Pour trouver de nouvelles molécules antivirales agissant sur l'hôte, plusieurs méthodes sont utilisées par les équipes de recherche.

Une première méthode consiste à étudier les cycles viraux et leurs interactions avec les cellules. Les virus utilisent le matériel cellulaire pour produire de nouveaux virions et infecter d'autres cellules. En étudiant leur cycle, il est alors possible de repérer les protéines, lipides ou autres composants de l'hôte impliqués dans celui-ci. Certains cycles sont très bien compris et leurs composants cellulaires ont été identifiés comme pour l'HCV (76). Pour le SARS-CoV-2, une grande partie de son cycle a été

documentée et continue à l'être (77). Dans un second temps, il faut trouver des molécules qui ont un effet sur le cycle viral, de manière directe ou indirecte, par exemple en orientant la réponse immunitaire.

Une autre méthode, le repositionnement, consiste à tester l'ensemble des molécules existantes, antivirales particulièrement, mais aussi antitumorales, antiparasitaires, antibiotiques etc. Le principe est de trouver une méthode identique pour tester toutes les molécules *in vitro* et de ne prendre que les plus intéressantes. Là aussi, puisqu'il s'agit d'essais identiques selon les molécules, on peut délaissier certains antiviraux intéressants selon le type cellulaire utilisé ou les propriétés de certaines de ces molécules (78, 79).

Une troisième méthode consiste à inactiver certains gènes de manière aléatoire, par la méthode CRISPR KO principalement, dans des cellules d'une même lignée, de les infecter et d'analyser le génome des populations survivantes. Cette méthode a été utilisée pour rechercher de nouveaux gènes impliqués dans l'infection par les coronavirus humains(80). Dans le même principe on peut activer un gène au lieu de l'inactiver. On obtient des gènes pro-virus et anti-virus. Cependant, cette méthode ne permet pas de comprendre totalement l'implication des gènes et des protéines dont se sert le virus pour infecter les cellules. Le screening est aléatoire et certains gènes n'ont ainsi pas pu être sélectionnés. De plus, il y a une grande dépendance de la lignée choisie pour réaliser l'expérience (80). D'autres méthodes existent comme le criblage à haut débit bi-hybride (HTY2H) (90).

Dans chacun de ces cas, les molécules sélectionnées peuvent être modifiées pour augmenter la biodisponibilité ou pour obtenir des caractéristiques physico-chimiques plus compatibles avec les cellules.

II. Etude approfondie de AM-001

Dans ce travail, nous avons évalué les propriétés antivirales d'AM-001, une molécule inhibant une protéine de l'hôte, la protéine d'échange directement activée par l'AMPc, EPAC1.

1) Généralités sur l'AMPc et ses effecteurs

Pour comprendre le fonctionnement d'EPAC1, il faut d'abord comprendre celui de l'AMPc. Il s'agit d'un second messager universel (81). L'AMPc est impliqué dans le métabolisme de la cellule en général, la régulation du calcium, la sécrétion extracellulaire ou encore la contraction des muscles (82).

Lorsqu'un effecteur extracellulaire s'attache aux protéines G, l'AMPc est synthétisé à partir de l'ATP et de l'action de l'adénylyl cyclase (AC) (83). Au niveau de la cellule, il existe un gradient d'AMPc : les différents compartiments de la cellule ont des concentrations différentes en AMPc. Pour maintenir cette compartimentalisation, il existe des régulateurs. Ce sont les nucléotides cycliques phosphodiesterases (PDE), les protéines d'ancrage A-kinase (AKAP) et les Adénylyl cyclase (AC) (84).

L'AMPc agit sur des capteurs spécifiques pour délivrer son message, comme le montre la Figure 3 en prenant l'exemple d'un cardiomyocyte. Ces capteurs ont en commun un segment cyclic nucleotide binding (CNB). Il existe aujourd'hui cinq familles identifiées :

- Les Protéines kinases A (PKA) : effecteur de l'AMPc le plus connu, ubiquiste (85).
- CNG et HCN : des canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques, voltage dépendant, conduisant Na⁺ et K⁺ (86).
- Popeye domain containing proteins (POPDC) : moins connu malgré un rôle dans l'arythmie cardiaque notamment (87).
- Cyclic nucleotide receptor involved in sperm function (CRIS) : indispensable pour la spermatogénèse et la motilité des spermatozoïdes (88)
- EPAC1 et EPAC2 : exchange proteins directly activated by AMPc 1 et 2, que nous allons maintenant voir en détail.

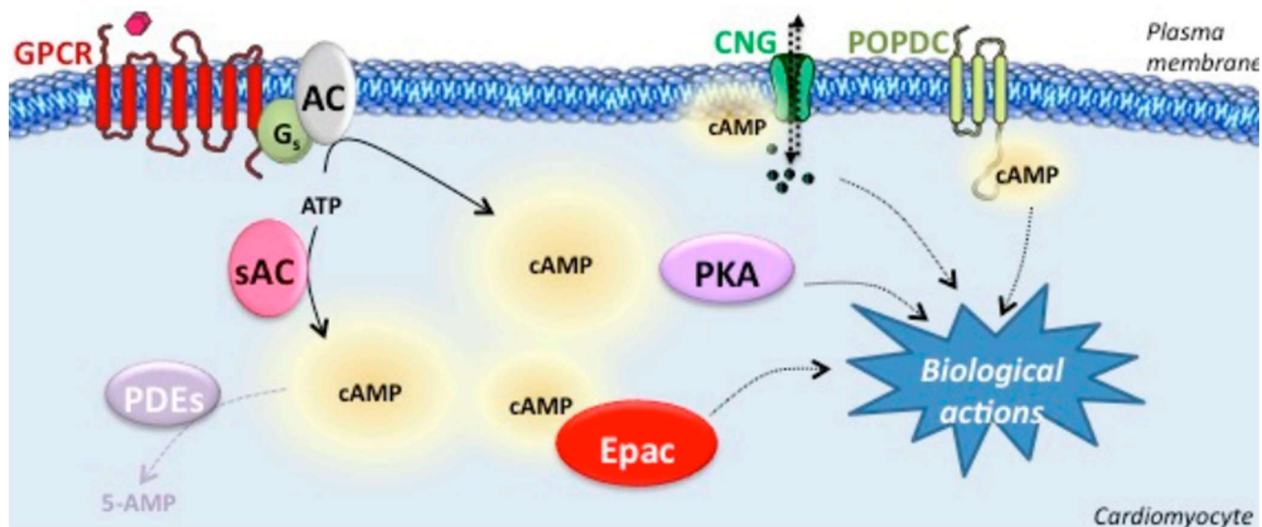


Figure 3 : Les effecteurs de l'AMPc dans un cardiomyocyte (89)

Dans ces cellules, l'AMPc est un second messenger indispensable à certaines actions biologiques, comme la contraction musculaire. CRIS n'est pas sur le schéma car on le retrouve seulement dans certaines cellules de l'appareil génital

2) EPAC1, une cible pharmacologique intéressante

EPAC1 et EPAC2 sont des protéines d'échange activées de manière directe par l'AMP cyclique. Découvertes en 1998, elles appartiennent aux Rap1 guanine nucleotide exchange factors (Rap1 GEF) (89).

2.1. Gène, structure et localisation

EPAC1 est codé par le gène RAPGEF3 sur le chromosome 12 chez l'homme, et EPAC2 par RAPGEF4, sur le chromosome 2 chez l'homme (90). Il s'agit de protéines monomériques d'environ 100kDa. Les gènes des deux protéines sont détaillés Figure 4. On peut voir qu'il y a une partie catalytique C-terminale et une partie régulatrice N-terminale. La différence majeure entre EPAC1 et EPAC2 est la présence supplémentaire d'un domaine CNB dans EPAC2 (cAB sur la Figure 4).

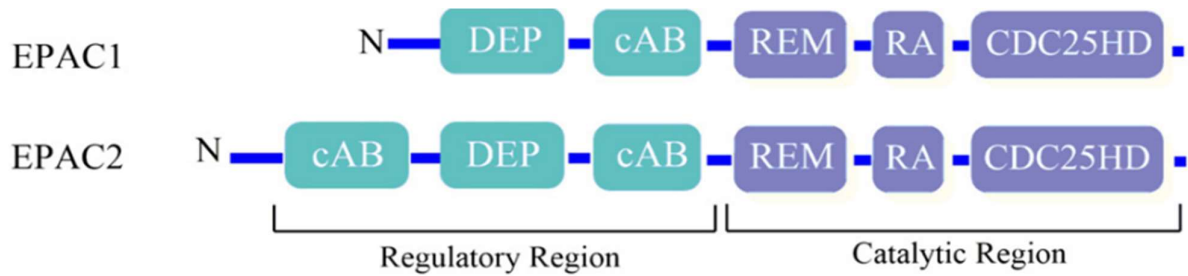


Figure 4 : Structure des gènes EPAC (91)

Lorsqu'il n'y a pas d'AMPc, la région régulatrice recouvre totalement la région catalytique, empêchant ainsi l'activité de la protéine. Il y a aussi un segment Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin (DEP) impliqué dans la localisation intracellulaire de la protéine. EPAC1 peut se retrouver dans plusieurs compartiments cellulaires : lié à la membrane plasmique avec un lipide de celle-ci, l'acide phosphatidique (91), avec un centre d'organisation de microtubule, dans la mitochondrie ou proche du réticulum sarcoplasmique (92, 93). La région catalytique est constituée d'un RAS-exchange motif (REM) impliqué dans le maintien de la conformation active d'EPAC, d'un domaine RAS-association (RA) qui interagit avec Rap1 et d'un domaine CDC25-HD, appelé aussi guanine nucleotide exchange factor for Ras-like small GTPases, qui promeut la transformation du GDP en GTP par Rap1 comme le montre la Figure 5 (98).

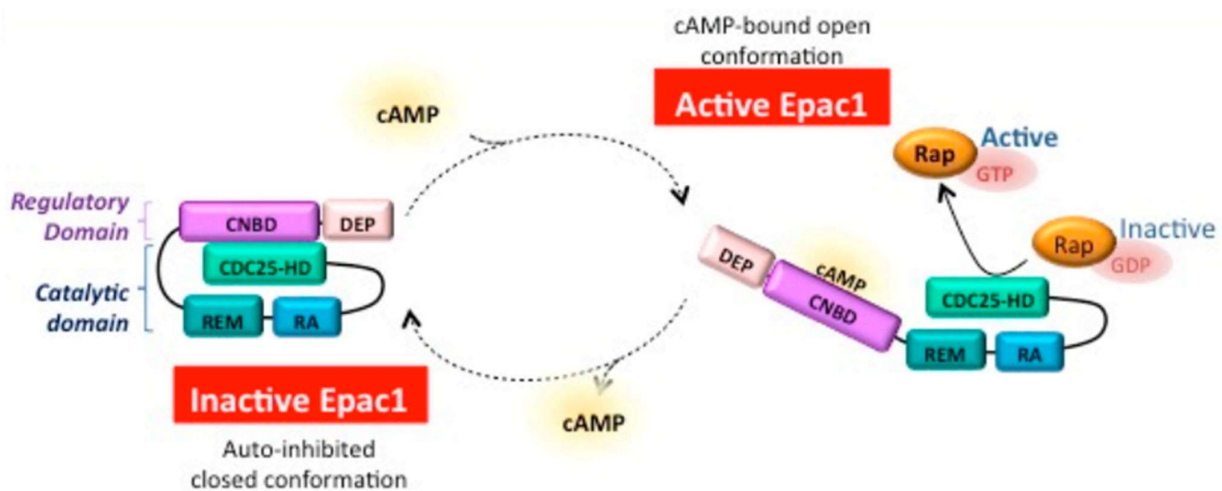


Figure 5 : Mécanisme de l'activation d'EPAC1 (89)

C'est donc en présence d'AMPc que Rap1, une Ras-like GTPase, va se lier aux segments de la région catalytique d'EPAC, comme on le voit sur la Figure 5. Elle va ainsi être activée et avoir des effets cellulaires. Cependant, Rap1 n'est pas nécessaire pour toutes les actions cellulaires d'EPAC (94)

EPAC1 et EPAC2 ont toutes deux des actions diverses dans la cellule et dans différents tissus. EPAC1 est présente de manière ubiquiste dans les organes et les tissus, mais en plus grande quantité dans certains tissus, détaillés dans le tableau 2 ci-dessous. EPAC2 n'est pas détectable dans de nombreux tissus (89). Nous allons nous concentrer par la suite sur EPAC1 pour décrire les différents effets qu'elle engendre. Ses effets sont dépendants du type de cellule où elle se trouve.

	EPAC1	EPAC2
Localisation	Tous les organes , tissus et préférentiellement : cœur, vaisseaux sanguins, reins, tissu adipeux, tissu nerveux, ovaires, utérus, muscles squelettiques, glandes thyroïdes (95)	Se trouve seulement dans : glandes surrénales, cœur, intestin, tissu nerveux, testicules (89, 95) Dans une quantité faible : foie, hypophyse, poumons, reins, pancréas (63, 64)

Tableau 2 : Localisation d'EPAC1 et d'EPAC2

2.2. Les rôles cellulaires d'EPAC1

Nous allons détailler quelques mécanismes et actions cellulaires d'EPAC1, parmi de nombreux autres dans ces mêmes tissus ou dans d'autres. Comme le montre la Figure 6, les rôles d'EPAC1 sont trop nombreux et complexes pour les expliciter tous dans cette étude. EPAC1 est impliqué dans la réaction inflammatoire, le fonctionnement cardiaque, la régulation du glucose, le contrôle de la prolifération des myocytes des voies respiratoires, la migration cellulaire, les liaisons entre les cellules...

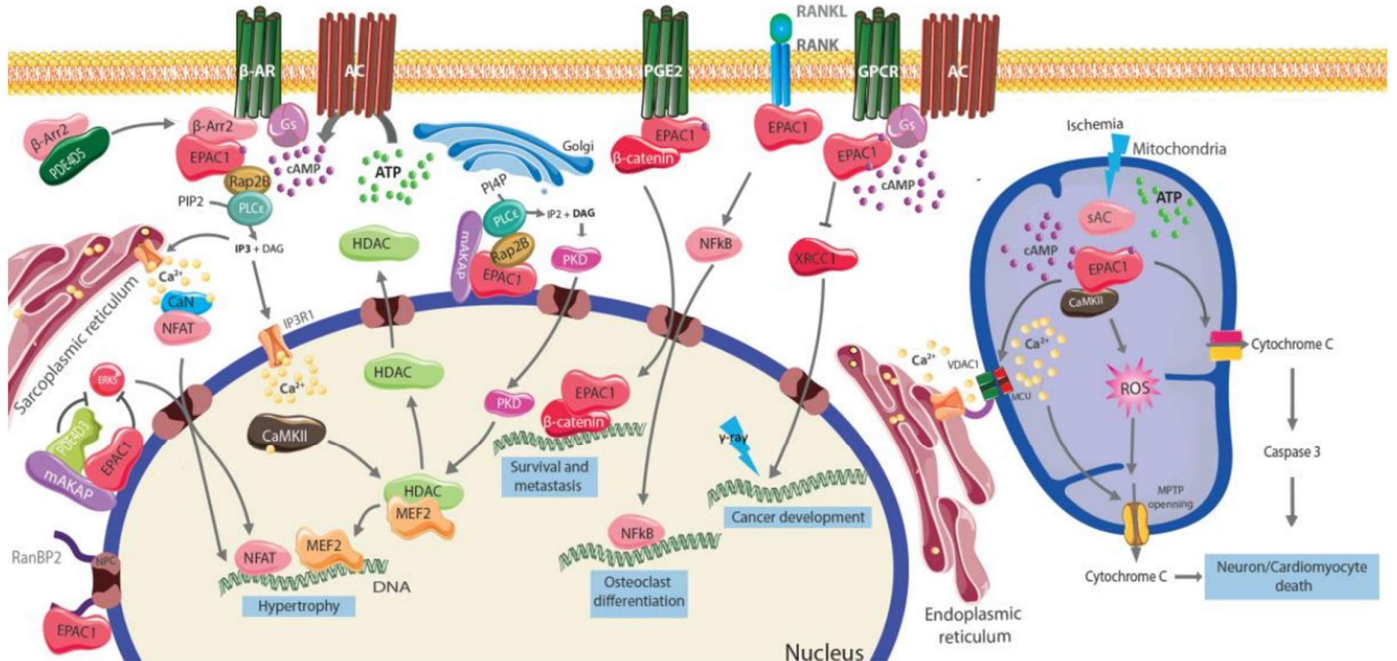


Figure 6 : EPAC1 signalosomes (98)

L'activation de complexe activant EPAC1 provoque des cascades de réaction pour activer des facteurs de transcription prohypertrophiques notamment

Tout d'abord, EPAC1 et Rap1 jouent un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine et des microtubules, résumé Figure 7. La stimulation d'EPAC1 dans des cellules avec un réseau d'actine non organisé provoque une dynamisation de ce réseau en filaments notamment en périphérie des cellules (98).

Indépendamment de Rap1, EPAC1 participe à la formation des microtubules. Son activation augmente le taux d'élongation et la longueur globale des microtubules dans les cellules vasculaires endothéliales (94, 99). De plus, EPAC1 se lierait aux protéines associées aux microtubules (MAP), des protéines participant à la régulation des microtubules. Cependant, des études sont nécessaires pour établir que la liaison d'EPAC1 aux MAP contribue à l'élongation des microtubules (98, 100).

L'activation d'EPAC1 a pour conséquence d'inhiber l'action de TNF alpha et TGF bêta. Ces derniers peuvent être produit par les cellules endothéliales. Ils induisent une désorganisation du réseau de filaments d'actine et de microtubules (101, 102). Il a aussi été montré que le complexe EPAC1-Rap1 contribue aussi à la formation des jonctions serrées par l'intermédiaire des liaisons E-cadhérine (110, 115).

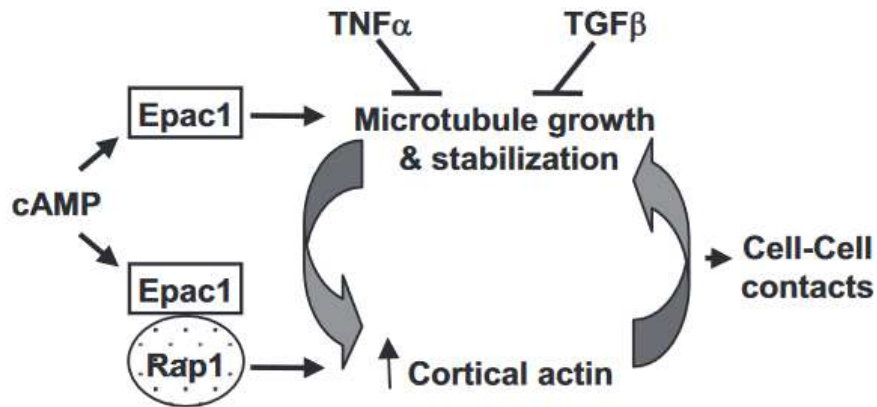


Figure 7 : Modèle du rôle d'EPAC1 dans l'intégrité des jonctions endothéliales (99)

Les recherches sur les souris Knock-out (KO) pour EPAC1 nous apprennent beaucoup sur les actions de cette protéine (104). Ces souris présentent une hypertriglycéridémie, un défaut de sécrétion d'insuline, une intolérance au glucose. Cette intolérance peut être expliquée par une diminution d'expression du gène du transporteur de glucose Glut2 ou bien une diminution de la translocation du transporteur à la membrane plasmique. Cela suggère l'implication d'EPAC1 dans la régulation du glucose et plus largement la physiopathologie du diabète. De plus, on observe aussi chez ces souris une organisation anormale des îlots pancréatiques.

Dans une autre étude sur les souris KO pour EPAC1 et EPAC2, il a été montré que la protéine Rap1 est inactive sans les deux formes d'EPAC, ce qui suggère une action synergique des deux protéines (105). L'inactivation des deux gènes engendre un déficit dans les interactions sociales, dans l'apprentissage et dans la mémorisation qui ne se retrouve pas chez des souris KO pour une des protéines.

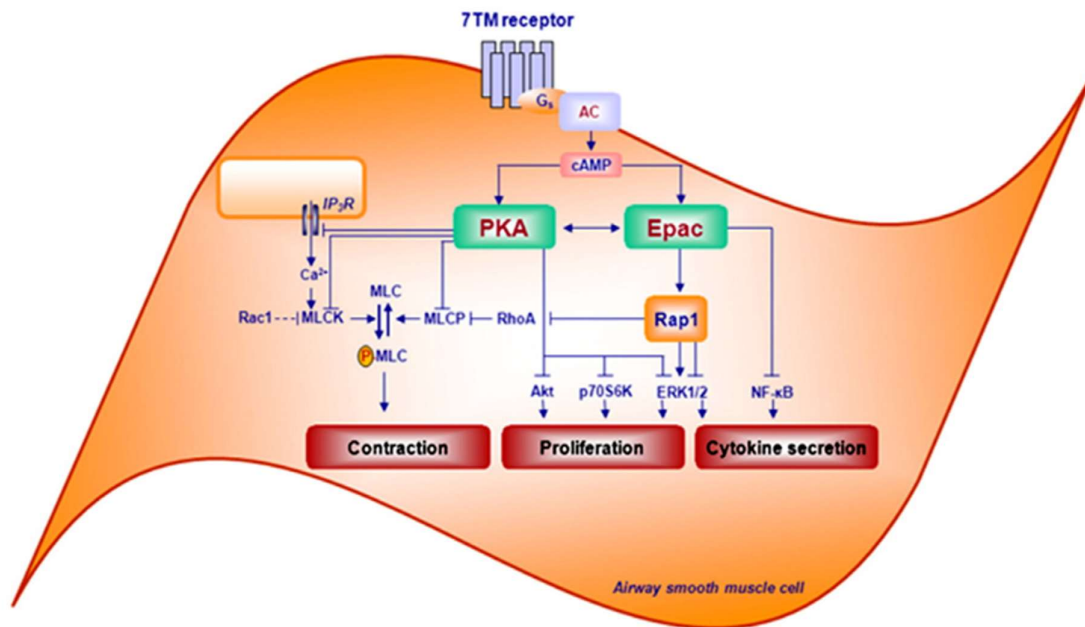


Figure 8 : Actions d'EPAC et de PKA dans une cellule musculaire lisse des voies respiratoires (107)

Il a été montré qu'EPAC1 et EPAC2 ont une action sur les fibroblastes et les myocytes des muscles lisses des voies respiratoires. Leur action est décrite dans la Figure 8, et fait intervenir plus d'effecteurs. La voie AMPc/EPAC et AMPc/PKA sont complémentaires. Les cellules musculaires lisses peuvent proliférer dans certaines conditions, comme l'asthme. Les deux voies permettent d'inhiber cette prolifération (106).

EPAC1 a aussi des actions spécifiques dans les cardiomyocytes : les récepteurs Bêta adrénergiques lors d'activation aiguë ont des effets stimulants sur le cœur. Une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc est alors induite et est détectée par les PKA. Cette dernière régule la contraction-relaxation des cardiomyocytes et a été pendant longtemps la cible d'inhibiteurs pour protéger le cœur lors d'insuffisance cardiaque. En revanche, lors d'une activation chronique, un remodelage a lieu par surstimulation des récepteurs Bêta adrénergiques, ce qui peut conduire à une insuffisance cardiaque (107).

Lors de la stimulation Bêta-adrénergique des cardiomyocytes, la voie EPAC (1 et 2)/PLC ϵ /PKC/CamKII stimule le relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique (108). Ainsi, comme PKA, EPAC1 et EPAC2 participent à la contractilité cardiaque (91), les deux protéines auraient donc un effet pro-arythmique.

EPAC1 et EPAC2 sont deux protéines aux caractéristiques intéressantes pour être utilisées en thérapeutique, en les inhibant notamment. Les souris KO pour EPAC1 et EPAC2 sont viables mais les effets du KO varient selon les études. Une étude suggère que la suppression d'EPAC1 chez les souris aurait des propriétés cardioprotectrices face au stress cardiaque (109), une autre que cette suppression atténuerait l'hypertrophie du cœur (110) mais ce dernier résultat est discuté et n'est pas retrouvé dans les différentes études (111). La voie AMPc-EPAC serait également indépendante de AMPc-PKA dans le développement de l'insuffisance cardiaque (110). Les différences de résultats entre les études sur le rôle d'EPAC1 dans l'hypertrophie cardiaque pourraient être expliquées par l'utilisation de souris provenant de lignées différentes (91). La surexpression d'EPAC1 dans des cellules nerveuses augmenterait l'apoptose, processus qui n'est pas induit par EPAC1 dans les cardiomyocytes (112).

EPAC1 jouerait un rôle dans les tumeurs malignes. Sa suractivation conduirait à l'augmentation de l'invasion par des cellules métastatiques d'un tissu (115). Cet effet ne se retrouve pas lorsqu'on suractive la voie PKA-dépendante. EPAC1 étant impliquée dans la migration cellulaire, la protéine favorise celle des cellules cancéreuses, comme dans les mélanomes (115) ou les cancers du pancréas (116).

Il est important de mentionner le fait qu'EPAC1 et EPAC2 sont des protéines dont les mécanismes d'action ne sont pas tous élucidés. Les effets d'EPAC1 sur l'apoptose des cardiomyocytes, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie cardiaque sont controversés et ne font pas encore consensus (91).

2.3. Effets de l'inhibition d'EPAC sur les infections virales

Une étude sur un coronavirus humain, le HCoV-229E, montre qu'une augmentation d'AMPc permet de diminuer le titre viral ainsi que la production d'un récepteur qui permet au virus d'être endocyté (117). Ces éléments nous suggèrent

que la régulation de l'AMPc, et donc ses modulateurs dont EPAC1, serait une voie intéressante pour trouver des traitements antiviraux. La principale hypothèse pour expliquer l'efficacité de l'inhibition de la voie AMPc/EPAC1 contre le SARS-CoV2 est le blocage des ACs ce qui empêche son endocytose (118).

Au vu des nombreuses fonctions d'EPAC1, plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'un effet antiviral ou proviral. Un mécanisme intéressant est celui de la voie ADP/P2Y13. Pendant une infection virale, les virus induisent par différents mécanismes une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, ce qui va suractiver EPAC1 et avoir un effet pro-viral. Les IFN produits par l'organisme vont avoir l'effet inverse et activer la voie ADP/P2Y13 ce qui inactive EPAC1 (119).

Face à Ebola Virus (EBOV), un inhibiteur ou le KO d'EPAC1 bloquent la réplication de ce virus dans les cellules endothéliales. Pour déterminer l'étape où le cycle viral est bloqué, le Vesicular Stomatitis Virus (VSV) exprimant une glycoprotéine d'EBOV a été utilisé. En utilisant la microscopie électronique, il a été mis en évidence qu'avec traitement à ESI09, un inhibiteur d'EPAC1 et EPAC2, le virus restait bloqué à la surface des membranes. Une analyse de la quantité ARN viral a montré qu'il ne se trouvait pas, pour le groupe traité avec l'inhibiteur, dans les endosomes précoces, à l'inverse du groupe non traité (120).

Contre le Human metapneumovirus (HMPV) et un adénovirus (AdV) humain, L'utilisation d'un inhibiteur sélectif d'EPAC1, le CE3F4, permet seulement d'obtenir une légère diminution de concentration de certaines cytokines (121).

Il a été découvert un effet antiviral d'ESI-09, un inhibiteur d'EPAC2 et d'EPAC1, sur le RSV (122). Il y aurait peut-être un effet anti-inflammatoire de cet inhibiteur, bien que la diminution de la production d'IL 1alpha, entre autres, puisse être attribué aussi au blocage de la réplication de ce virus. Seule l'inhibition d'EPAC2 aurait un effet sur la réplication du virus : les cellules KO EPAC1 avaient un titre similaire aux cellules infectées témoin et les cellules KO EPAC2 avaient un titre significativement réduit par rapport aux deux premières.

EPAC2 contribuerait aussi la réplication d'autres virus comme le HMPV et l'AdV et augmenterait la production de cytokines inflammatoires pendant ces infections (121).

Ces résultats encourageants dans la recherche de nouvelles classes thérapeutiques vont dans le même sens qu'une autre étude, cette fois sur les

coronavirus : un inhibiteur d'EPAC1 et d'EPAC2, ESI-09, a montré une activité antivirale remarquable contre le MERS, et dans une moindre mesure contre le SARS-CoV-1 (123). On peut aussi souligner que les chercheurs ont testé un inhibiteur de la voie de signalisation PKA-dépendante, H89, sans activité antivirale.

3) AM-001, un inhibiteur non compétitif sélectif d'EPAC1

3.1. Identification et caractérisation de la molécule

L'inhibition d'EPAC1 peut ainsi avoir une action antivirale sur certains virus. Nous allons nous intéresser à AM-001.

AM-001 est un dérivé thieno(2,3-b)pyridine. Plus précisément, il s'agit du 3-amino-N-(4-fluorophenyl)-4-phenyl-6-(2-thienyl)thienol[2,3b]pyridine-2-carboxamide, dont la structure est présentée dans la Figure 9. Cette molécule a été identifiée dans une étude en 2019 comme étant spécifiquement inhibitrice non-compétitive d'EPAC1 (124).

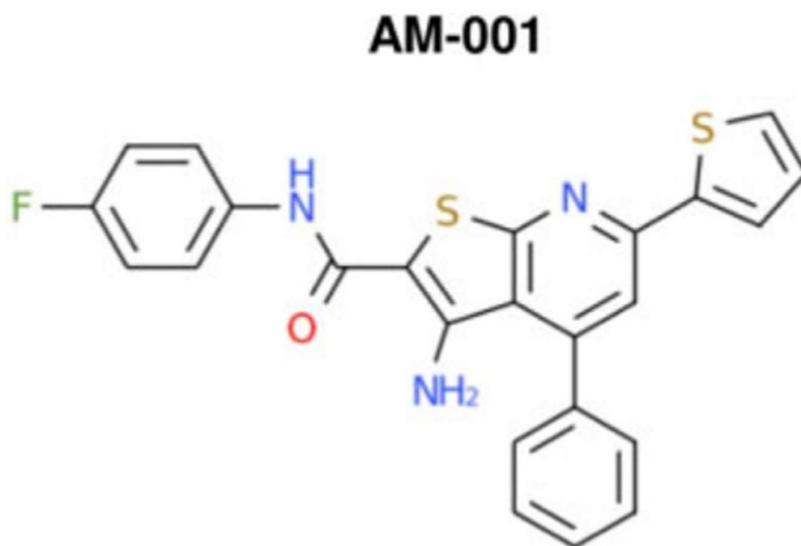


Figure 9 : Structure d'AM-001 (125)

Cette étude de 2019 a caractérisé AM-001 initialement en tant que molécule ayant une action protectrice du cœur lors de stress cardiaque chronique. D'autres dérivés de cette molécule ont été testés mais aucun n'apparait plus intéressant qu'AM-001.

L'activité d'AM-001 a été détectée par Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Le composé testé est mis en évidence en présence de Rap1, de

CAMYEL, un EPAC1-based BRET sensor et de l'AMPc. En mesurant la différence de fluorescence initiale et à l'inhibition maximale, et en la comparant à celle d'un témoin positif, on obtient un pourcentage d'inhibition relatif au témoin. AM-001 est un inhibiteur non compétitif, ce qui veut dire qu'il n'empêche pas le substrat d'EPAC1 de se lier à la protéine. La concentration inhibitrice médiane (IC50) d'AM-001 est de 53.7µM, et n'est pas modifiée par les concentrations d'AMPc (124).

Pour déterminer la spécificité de la molécule, les chercheurs ont utilisé la méthode EPAC GEF activity. Le composé a été mis en contact avec Rap1, un analogue du GDP fluorescent, un autre analogue du GDP non fluorescent en excès, EPAC1 ou EPAC2, et un agoniste de l'AMPc. Avec cette méthode, l'IC50 a été de 47.8µM avec EPAC1 contre un IC50 supérieur à 1000µM avec EPAC2 (124).

AM-001 se lie à la conformation inactive d'EPAC1 et la stabilise, ce qui empêche l'activation en présence d'AMPc. Les domaines CDC25-HD et CNB sont ainsi rapprochés comme on peut le voir sur la Figure 10. Ce site est différent chez EPAC2 : la plus grande différence se situe sur la boucle entre REMb1 et CNBDb10, sur les 18 acides aminés d'EPAC1 et les 19 d'EPAC2 la formant, il y en a seulement deux en commun, ce qui pourrait expliquer la sélectivité d'AM-001 (125).

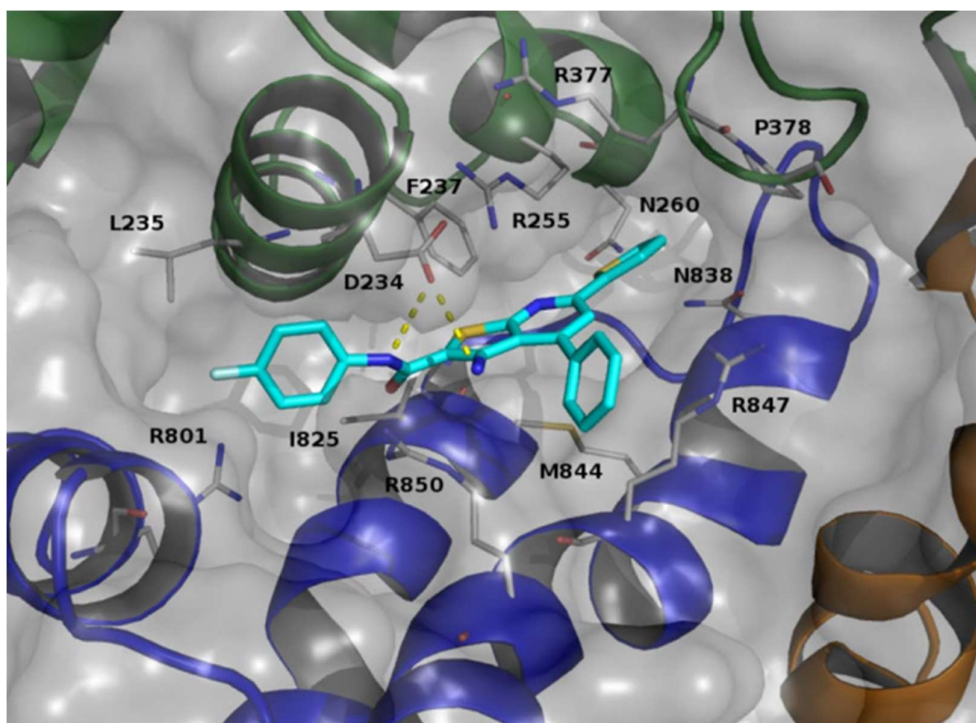


Figure 10 : Structure du complexe AM-001/EPAC1 (126)

En vert : CNB et DEP ; en bleu : CDC25-HD; en orange : REM; en cyan :AM-001 ; en pointillés : liaisons hydrogène

En culture cellulaire, la molécule n'est pas cytotoxique pour les lignées HEK293, NRVMs, H9C2 d'après cette même étude et elle inhibe EPAC1 dans ces cellules.

AM-001, grâce à ses propriétés inhibitrices d'EPAC1, a montré un effet protecteur contre l'ischémie-reperfusion en utilisation aigue *in vivo*, protégeant aussi les cardiomyocytes contre la suractivation par les récepteurs Bêta-adrénergiques et contre l'hypertrophie en empêchant la formation du complexe GRK5/EPAC1 (126).

3.2. Comparaison par rapport aux autres inhibiteurs d'EPAC

D'autres molécules ont une action inhibitrice documentée comme CE3F4. Cependant, cette molécule, même si elle inhibe préférentiellement EPAC1, n'en est pas assez spécifique et peut inhiber EPAC2. Elle présente un IC50 plus faible qu'AM-001. Son principal inconvénient est qu'elle montrerait une faible biodisponibilité *in vivo* (127), ce qui expliquerait le fait qu'elle ne réduit pas la taille de l'infarctus contrairement à AM-001 utilisée à 8mg/kg (124). Les autres molécules connues à ce jour ayant une action assez intéressante sont détaillées dans le Tableau 3 suivant (92).

Nom de la molécule	Protéine(s) inhibée(s)	Mode d'inhibition	Référence
AM-001	EPAC1	Non compétitif	(124)
CE3F4	EPAC1	Uncompetitive	(127)
ESI-08	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(128)
ESI-09	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(116)
HJC0197	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(128)
HJC0726	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(129)
NY0123	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(129)
NY0460	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(130)
NY0562	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(130)
ZL0524	EPAC1 et EPAC2	Compétitif	(131)
5376753	EPAC1 et EPAC2	Non compétitif	(132)

Tableau 3 : Les inhibiteurs d'EPAC1 et d'EPAC2 et leur mode d'inhibition (89)

La molécule AM-001 s'est donc présentée comme pertinente par rapport à d'autres : elle est sélective d'EPAC1 bien plus spécifiquement que CE3F4. Cela permet d'étudier mieux le rôle d'EPAC1 seulement notamment dans le cadre d'infection virale pour notre étude. De plus, cela pourrait occasionner moins d'effets secondaires sur un modèle animal.

Contrairement à d'autres inhibiteurs d'EPAC1, l'effet de protection cardiaque d'AM-001 a été prouvé *in vivo* démontrant que le composé a une biodisponibilité suffisante pour exercer son inhibition.

Le projet EPACORONA, fruit d'une collaboration entre l'I2MC INSERM-Toulouse et IHAP INRAE-ENVIT, a eu pour but de tester les propriétés antivirales d'AM-001 contre le SARS-CoV-2, en culture cellulaire et sur modèle animal Hamster doré (*Mesocricetus auratus*). Les résultats sur culture cellulaire (lignée CALU-3) ont été encourageants. AM-001 est ainsi active contre ce virus dès 10 μ M, que ce soit en pré traitement ou post traitement. Sur le modèle animal Hamster doré, les résultats se sont révélés décevants, le traitement à AM-001 n'ayant pas eu d'effet bénéfique face à l'infection au SARS-CoV-2. Il conviendrait de tester sur d'autres modèles animaux comme des souris, pour qui la pharmacocinétique d'AM-001 est mieux connue.

Partie II : Etude Expérimentale

Objectifs : Il s'agit de tester la molécule AM-001 sur d'autres virus que le SARS-CoV-2, de mieux préciser son mécanisme d'action et de vérifier l'éventuelle toxicité de la molécule sur les lignées cellulaires utilisées. Enfin, un objectif de ce travail a été de participer à la création de cellules KO pour EPAC1 dans le but de vérifier si l'activité antivirale d'AM-001 est bien liée à l'inhibition d'EPAC1.

I. Matériels et Méthodes

1) Etude de l'effet antiviral d'AM-001

1.1. Culture cellulaire

Plusieurs types cellulaires ont été utilisés pour les expériences réalisées. Les cellules ont toutes été conservées dans un incubateur à 37°C. Les passages ont été réalisés avec du Phosphate buffered saline (PBS), mis en contact une ou deux fois avec les cellules et de la trypsine dans un volume tel que conseillé par le fabricant des contenants utilisés (133). Ils ont été réalisés selon le type cellulaire dès que la confluence dépassait 80%.

Quelle que soit la lignée, les cellules sont contrôlées régulièrement au microscope pendant la culture et les expériences pour vérifier l'absence de mort cellulaire, et comptées avec une cellule de Thoma ou de Malassez pour les passages.

Cellules A549 : cellules épithéliales basales alvéolaires adénocarcinomiques humaines. Elles ont été cultivées dans un milieu composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de pénicilline à 100U/mL et de streptomycine à 100µg/mL. Le passage de ces cellules ne comportait qu'un lavage au PBS, puis de la trypsine. Il est important de noter que ces cellules ont été testées positives à *Mycoplasma*.

Pour le milieu d'infection, il s'agissait de DMEM avec 0.2% d'albumine sérique bovine (BSA), de pénicilline à 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL et de trypsine TPCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) Thermo Scientific Pierce, que nous appellerons TPCK, à 1µg/mL.

Cellules MDCK : cellules épithéliales de rein de chien. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM ou DMEM High glucose comprenant 10% de SVF, de pénicilline a 100U/mL et de streptomycine à 100µg/mL. Le passage de celles-ci comportait deux lavages au PBS, puis de la trypsine.

Pour le milieu d'infection, il s'agissait de DMEM ou DMEM High glucose, avec 0.2% de BSA, de pénicilline a 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL et de TPCK à 1µg/mL.

Cellules 293T : cellules embryonnaires rénales humaines exprimant une protéine mutante : SV40 large T antigen. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM High glucose comprenant 10% de SVF décomplémenté, de pénicilline a 100U/mL et de streptomycine à 100µg/mL. Le passage de celles-ci comportait un lavage au PBS, puis de la trypsine.

Pour le milieu d'infection, il s'agissait de DMEM High glucose, avec 2% de SVF décomplémenté, de pénicilline a 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL.

Cellules Calu-3 : cellules épithéliales bronchiolaires adénocarcinomiques humaines. Ces cellules doublent bien moins rapidement que les autres lignées utilisées. Le passage de celles-ci comportait deux lavages au PBS, puis de la trypsine. Elles utilisent un milieu comportant pour moitié DMEM F12 avec 20% de SVF, de pénicilline a 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL et de 1% de glutaMAX™-I (L-alanyl-L-glutamine) et l'autre moitié de ce même milieu mais ayant déjà été au contact des cellules, récupéré et filtré au fur et à mesure.

Pour le milieu d'infection, il s'agissait de DMEM F12, avec 2% de BSA, de pénicilline a 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL et de TPCK à 1µg/mL.

1.2. Infections par différents virus

Pour les expérimentations, nous avons utilisé les virus suivants :

Virus Influenza :

- Souche d'Influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1), appelée PR8 par la suite
- Souche d'Influenza A/turkey/Italy/977/1999 (H7N1), deux ont été utilisées ayant des titres différents, appelées par la suite H7N1 GD et H7N1 Z4

Virus de la rougeole :

- MV-Luc : souche vaccinale modifiée de la rougeole exprimant le gène de la luciférase firefly

1.2.1. Infection par les virus influenza en pré-traitement

Indifféremment des lignées cellulaires, l'infection en pré-traitement uniquement avec les virus Influenza s'est déroulée de manière suivante :

Les cellules subissent un passage et sont mises en culture dans le contenant désiré au moins 24 heures avant l'infection, de sorte à avoir au moment de l'infection une confluence supérieure à 90%.

Le jour même, les milieux d'infection sont préparés avec AM-001, le DMSO, ou juste le milieu seul. Les puits sont lavés deux fois au PBS et rempli avec les milieux contenant les conditions de l'expérience (différentes concentrations d'AM-001, DMSO, témoin...).

Le contenant est mis à incuber pendant deux heures à 37°C puis l'infection est réalisée selon la MOI de l'expérience puis la plaque est remise une heure à incuber. Les cellules subissent un lavage deux fois au PBS et sont réincubées 24 à 48 heures selon l'expérience. La récolte d'échantillon est variable selon les expériences.

1.2.2. Infection par les virus influenza en post-traitement

Les cellules subissent un passage et sont mises en culture dans le contenant désiré au moins 24 heures avant l'infection, de sorte à avoir au moment de l'infection une confluence supérieure à 90%.

Le jour même, les milieux d'infections des différentes conditions sont préparés. Pour simplifier, le protocole est détaillé dans la Figure 11.

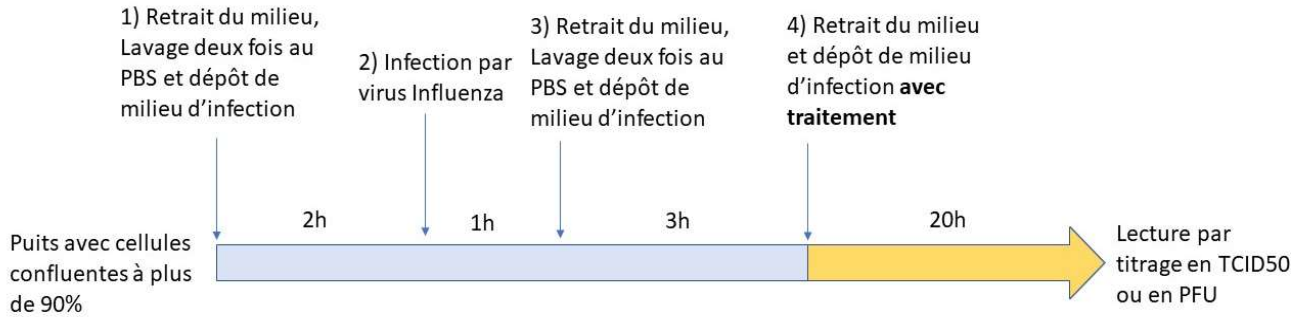


Figure 11 : Protocole d'infection par virus Influenza en post-traitement

Lorsque les expériences pré-traitement et post-traitement ont été effectuées en même temps, les changements de milieu se sont fait en nombre identique dans les deux cas pour avoir des conditions identiques liées à la manipulation des cellules. Ainsi, le milieu d'infection avec traitement pour les puits en pré-traitement a été retiré et ajouté trois fois (point 1., 3. et 4.).

1.2.3. Infection par le virus MV-Luc en pré-traitement

Les cellules subissent un passage et sont mises en culture dans le contenant désiré au moins 24 heures avant l'infection, de sorte à avoir au moment de l'infection une confluence supérieure à 90%.

Le milieu initial est retiré et remplacé par du milieu d'infection, avec traitement. Le contenant est mis à incuber pendant deux heures à 37°C. Le virus est ensuite rajouté puis le contenant est remis à incuber pendant 24 heures avant analyse.

1.3. Titrage des virus suite aux expériences

1.3.1. Titrage des virus influenza en PFU

Cette méthode nécessite de faire pousser préalablement des cellules MDCK dans des plaques de 12 ou de 6 puits 24h avant l'infection de sorte à avoir un tapis confluent à plus de 90%. Avant l'infection par les échantillons, les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de PBS pour éliminer le SVF du milieu initial.

Les échantillons à tester sont dilués dans du milieu DMEM avec 0,2% de BSA de pénicilline à 100U/mL, de streptomycine à 100µg/mL et de TPCK 1000X. Les dilutions vont de 1/10 à 1/100000. Il y a deux puits pour chaque dilution.

800µL de cette dilution sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont mises à l'incubateur à 37°C pendant une heure. Il y a ensuite un lavage deux fois avec du PBS, 1mL par puits. Un nouveau milieu est administré aux cellules : composé de moitié par du milieu MEME 2X, de l'autre moitié par de l'Avicel 24g/L, et de 0,2% de BSA et de TPCK1000X. Les plaques sont ensuite incubées pendant 72 heures à 37°C.

Pour enlever le milieu, il faut déposer 1mL de PBS par puits et ensuite retirer tout le milieu, en remettant du PBS si nécessaire. Les puits sont recouverts de moins de 1mL de cristal violet à 0,1% puis lavés en récupérant le cristal violet et enfin égouttés. Il ne reste alors plus qu'à compter les plages virales. Les puits qui servent à calculer le titre sont ceux qui ont de préférence entre 20 et 50 plages virales, comme sur la Figure 12. Le titre est calculé en ramenant le nombre de plages au volume déposé initialement.

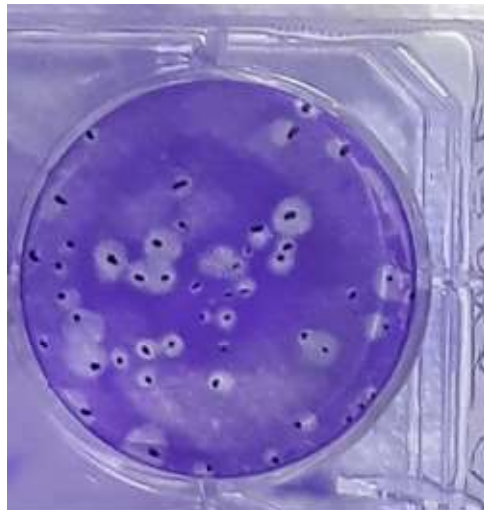


Figure 12 : Exemple de résultats de plages virales pouvant être comptées.

Chaque point compte une plage virale. Certaines d'entre elles peuvent se rejoindre et se confondre

1.3.2. Titration des virus influenza en TCID50

Cette méthode nécessite de faire pousser préalablement des cellules MDCK dans des plaques de 96 puits 24h avant infection de sorte à avoir 60 à 80% de confluence. Avant l'infection par les échantillons, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS pour éliminer le SVF du milieu de culture. Tous les puits reçoivent ensuite 100µL de milieu d'infection sauf la première ligne de 8 puits.

Les échantillons à tester sont dilués dans du milieu d'infection de cellule MDCK au 1/10. La première ligne reçoit 146 µL de cette dilution. Il y a quatre lignes par échantillons pour le calcul de TCID50 et le plus souvent les échantillons sont testés en triplicats.

46µL de la première ligne sont déposés dans la seconde puis mélangés puis retirés et mis dans la troisième. Ainsi de suite jusqu'à l'avant dernière ligne pour avoir un témoin négatif en dernière ligne. Aux 100µL de chaque puits est ajouté 100µL de milieu d'infection. Les plaques sont mises à l'incubateur à 37°C pendant une heure. Il y a ensuite un lavage deux fois avec du PBS et 100µL de milieu d'infection sont déposés. Les plaques sont de nouveau mises à l'incubateur à 37°C une heure. 100µL de milieu d'infection sont rajoutés pour un total de 200µL par puits.

Enfin, les plaques sont mises à l'incubateur à 37°C pendant 72 heures.

L'analyse se fait par un test d'hémagglutination. Après les trois jours d'incubation, 50µL sont prélevés par puits et déposés dans une autre plaque de 96 puits, auquel il est ajouté 50µL d'hématies de poulets à 1%. Après dix minutes d'incubation, la lecture est possible : la plus petite dilution positive pour chaque ligne est notée (Figure 13). Le titre viral en TCID50 est calculé avec la méthode de Reed et Muench (134)



Figure 13 : Exemple de résultats de TCID50 pour deux lignes testées.

La plus petite dilution positive pour la première ligne est la huitième et pour la deuxième la sixième. Les hématies ne sont pas lysées pour les dilutions plus petites.

1.4. Titration de MV-Luc

Après infection des puits par le MV-Luc pendant 24 heures, le Luciférase assay Buffer, préparé à partir des réactifs du Luciférase assay system est ajouté à raison de la moitié du volume de milieu par puits à température ambiante. Les cellules vont être ainsi lysées. Après contrôle au microscope de cette lyse, chaque solution est transférée dans un puit d'une plaque opaque.

La plaque est ensuite lue au CLARIOstar® BMG Labtech, qui va mesurer l'activité de la Luciférase firefly.

1.5. Détection de la cytotoxicité

Le milieu utilisé durant l'expérience est le milieu d'infection. Cette méthode nécessite de faire pousser préalablement les cellules que l'on veut tester dans une plaque de 96 puits pendant 24h, seulement dans les puits de couleur orange, jaune ou bleue en Figure 14.

Le milieu des puits colorés est ensuite retiré et il est ajouté le milieu contenant soit le DMSO, soit AM-001, soit seul, aux concentrations décrites dans la Figure 14. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 24 heures. 10µL de MTT (Cell Prolifération Kit I de Roche) sont ajoutés dans tous les puits non vides. Le MTT est métabolisé par les cellules viables en formazan, formant des cristaux colorant le milieu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	40.0	20.0	10.0	5.0	2.5	1.3	0.63	0.31	0.16	0.08		
	40.0	20.0	10.0	5.0	2.5	1.3	0.63	0.31	0.16	0.08		
	40.0	20.0	10.0	5.0	2.5	1.3	0.63	0.31	0.16	0.08		
	40.0	10.0	2.5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	40.0	10.0	2.5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	40.0	10.0	2.5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		

Figure 14 : Plan des tests de cytotoxicité NT.

Non traité, fond orange : puits traité avec AM-001 avec des concentrations allant de 40 μ M à 0,08 μ M,
Fond bleu : puits traité au DMSO avec concentrations allant de 40 μ M à 2,5 μ M.
Fond gris : milieu d'infection sans cellules, fond noir : puits vides.

Les plaques sont incubées 4 heures. 100 μ L de solution de solubilisation du Cell proliferation Kit I sont déposés dans les puits non vides. Enfin les plaques sont incubées pendant au moins 12 heures.

La lecture des plaques s'est faite au CLARIOstar® de BMG Labtech. L'absorbance est mesurée à 550nm puis à 690nm. Les valeurs à 690nm sont soustraites à celles à 550nm. Il suffit alors de faire le ratio des traités par rapports aux non traités. On obtient un pourcentage de viabilité par rapport aux plaques non traités.

1.6. Détection de la virucidie

Nous avons utilisé un virus influenza à haut titre viral conservé sur glace pendant la préparation de l'expérience. Les concentrations d'AM-001 ont été de 20 μ M, 2 μ M et 0,2 μ M. Le témoin positif est le Triton-X-100, un détergent capable de désorganiser les membranes lipidiques, dont celle des virus (135).

La vérification de la virucidie ou non de notre molécule se fait en mettant en contact le virus et AM-001 pour un volume total de 200 μ L, sans cellules à différentes concentrations à 37°C pendant une heure. Ensuite, 1mL de milieu d'infection est rajouté à la solution.

L'analyse se fait en TCID50 comme décrite précédemment, les échantillons ne sont en revanche pas dilués une nouvelle fois avant inoculation dans les plaques.

1.7. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été analysés avec GraphPad Prism en utilisant une transformation logarithmique en base 10. Nous avons comparé les différentes conditions avec une analyse de test t de Student non apparié.

2) Fabrication d'un plasmide / Projet CRISPR CAS9 en cellules humaines Calu-3

2.1. Description du projet

Un des projets de l'équipe de virologie dans cette étude sur AM-001 est d'obtenir des cellules KO pour EPAC1. Cela permettrait de vérifier si l'infection par les différents virus utilisés, notamment le SARS-Cov-2, est réduite. L'action inhibitrice d'EPAC1 de AM-001 serait alors bien à l'origine de la baisse du titre viral. La méthode choisie pour réaliser ce KO d'EPAC1 est la méthode CRISPR/CAS9 (136, 137). L'équipe possède déjà des cellules Calu-3 exprimant Cas9.

L'objectif de ce travail a été de participer à ce projet en fabriquant un vecteur viral ayant inséré un ARN guide spécifique d'EPAC1.

2.2. Séquences d'ARN guide à insérer

2.2.1. Choix des séquences à insérer

Les séquences d'oligonucléotides sont déterminées grâce au site internet CHOPCHOP ([CHOPCHOP \(uib.no\)](http://chopchop.uib.no)). En indiquant le gène que l'on souhaite enlever, RAPGEF3, le site nous donne une liste ordonnée de séquences d'oligonucléotides. Elles sont classées selon ces critères : le score d'efficacité, le nombre de séquences hors cibles, la non-correspondance, le nombre de régions auto-complémentaires plus longues que trois nucléotides (138), le pourcentage de guanine et cytosine et l'emplacement de l'ARNg dans le gène.

Le score d'efficacité est basé sur la présence ou non de guanine en position 20. Il est calculé comme décrit dans la littérature notamment (rational). Le nombre de séquences hors cibles nous indique avec combien d'autres séquences celle choisie est complémentaire. Les trois colonnes de non-correspondances (MM0, MM1, MM2, MM3) indique le nombre de transcrits hors cibles que l'ARN guide pourrait cibler, avec 0, 1, 2 ou 3 non-correspondances. Le pourcentage de guanine et cytosine lorsqu'il est compris entre 40 et 70% augmente les chances de réussite du protocole CRISPR/CAS9 (139). Enfin, un ARN guide proche de l'extrémité 5' aura statistiquement des chances de réussite supérieures à un autre proche de l'extrémité 3'.

Les séquences retenues par le site pour le gène RAPGEF3 sont données dans le Tableau 4 :

Rang	Séquence cible	Localisation	Sens	Contenu en GC (%)	Auto-complémentarité	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficacité
1	CGAGGGCCAGTCGGTATACCCGG	chr12:47739191	+	65	0	0	0	0	0	50.72
2	GGCCAGTCGGTATACCCGGTGG	chr12:47739194	+	70	0	0	0	0	1	70.65
3	CTCACCGATAGAGCCTAAGGTGG	chr12:47751718	+	55	2	0	0	0	1	67.49

Tableau 4 : Les trois séquences les plus intéressantes pour réaliser le KO d'EPAC1 avec CRISPR/CAS9

Une fois ce résultat obtenu, les couples d'oligonucléotides ont donc été commandés. Il faut cependant rajouter aux séquences du Tableau 4 la séquence CACCG ainsi que la séquence complémentaire contenant la séquence CAAA à son extrémité. Cela permettra par la suite de pouvoir insérer ces séquences dans le plasmide lentiGuide-Puro et digéré par BsmBI.

Ces séquences sont renommées ci-dessous (sens 5' - 3') :

RAPGEF3_g1s : CACCGCGAGGGCCAGTCGGTATACC

RAPGEF3_g1as : AAACGGGCCAGTCGGTATACCCGGC

RAPGEF3_g2s : CACCGGGGCCAGTCGGTATACCCGG

RAPGEF3_g2as : AAACCCGGGTATACCGACTGGCCCC

RAPGEF3_g3s : CACCGCTCACCGATAGAGCCTAAGG

RAPGEF3_g3as : AAACCCTTAGGCTCTATCGGTGAGC

2.2.2. Préparation et phosphorylation des oligonucléotides

La préparation des oligonucléotides consiste à ajouter un volume d'eau distillée stérile à chacun en fonction de la quantité de matière précisée par le fabricant. Cet ajout est détaillé dans le Tableau 5.

Oligonucléotide	Quantité de matière (nmol)	Quantité d'eau distillée ajoutée (µL)
RAPGEF3_g1s	39.7	397
RAPGEF3_g1as	53.7	537

RAPGEF3_g2s	55.9	559
RAPGEF3_g2as	36.5	365
RAPGEF3_g3s	45.5	455
RAPGEF3_g3as	58	580

Tableau 5 : Quantité de matière et d'eau ajoutée pour chaque séquence d'oligonucléotides

L'étape suivante est la phosphorylation de ces oligonucléotides. Elle est indispensable pour permettre l'insertion de ces derniers pendant l'étape de ligation.

Protocole de phosphorylation :

- Phosphorylation réalisée avec les quantités détaillées dans le Tableau 6, par ordre d'ajout, pour chaque couple d'oligonucléotides :

	Volume (µL)
Eau distillée stérile	6,5
T4 Ligation Buffer (10X)	1
Couple d'oligonucléotides (n° 1, 2 ou 3)	1 pour chaque oligonucléotide
T4 PNK	0,5

Tableau 6 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de phosphorylation des oligonucléotides

- Incubation 30 minutes à 37°C puis 5 minutes à 95°C, puis baisse de 5°C par minute jusqu'à 25°C dans un thermocycleur
- Dilution dans de l'eau distillée stérile au 1/200

Les oligonucléotides phosphorylés obtenus sont placés au congélateur à -20°C.

2.3. Préparation du plasmide lentiGuide-Puro

2.3.1. Description du plasmide lentiGuide-Puro

Le vecteur utilisé pour réaliser le KO d'EPAC1 est un plasmide, lentiGuide-Puro (LGP) (137) en Figure 15, qui contiendra une des séquences décrites précédemment.

Created with SnapGene®

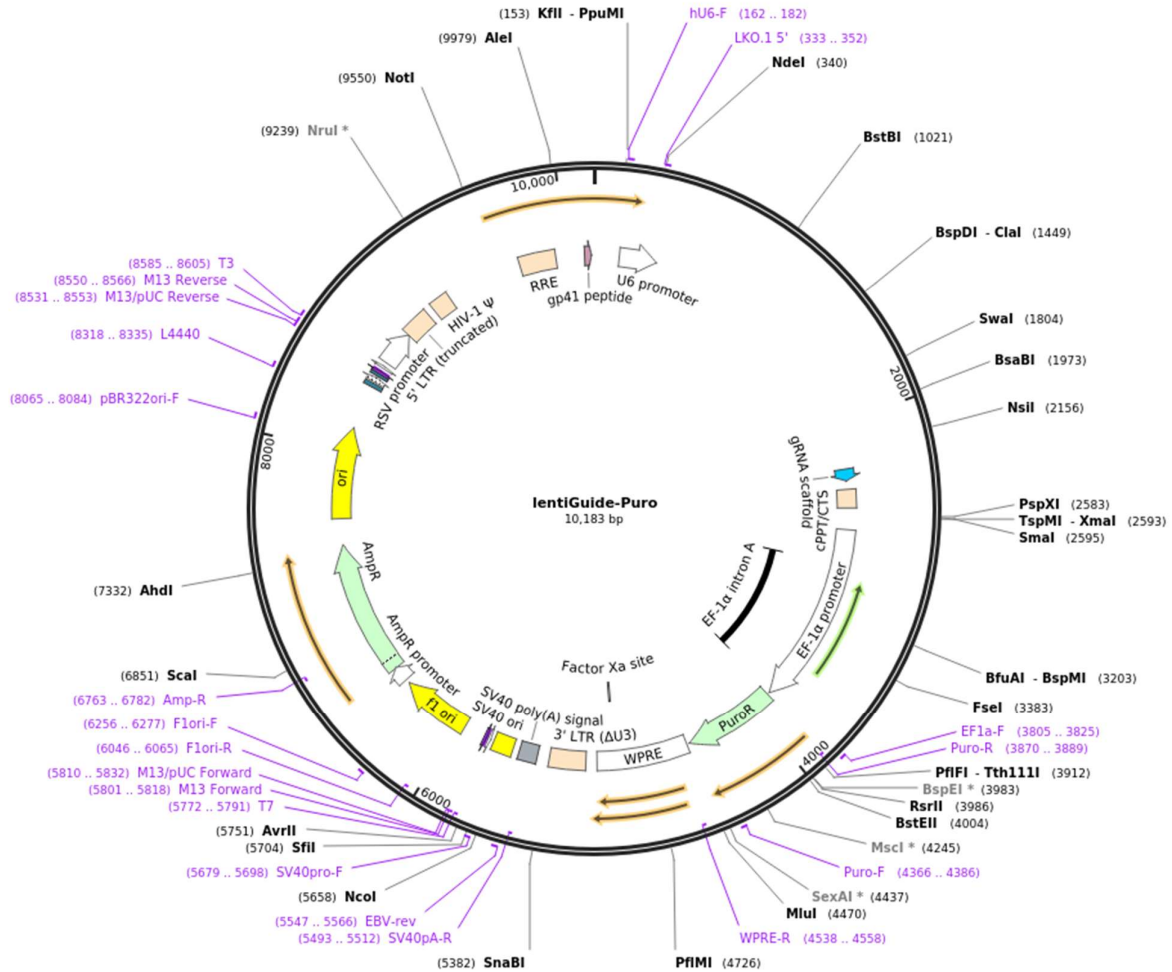


Figure 15 : Carte du plasmide lentiGuide-Puro.

Site de restriction (non exhaustif) en noir, amorces en violet, créée avec Snapgene® (140)

2.3.2. Transformation du plasmide lentiGuide-Puro

Avant de pouvoir insérer ces séquences, le plasmide doit être amplifié en grande quantité. Pour cela, des bactéries One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent *E. coli*, appelées par la suite bactéries Stbl3, ont été utilisées.

Protocole de transformation :

Les étapes suivantes nécessitent de travailler sous bec bunsen.

- Dépôt de 1µL de plasmide lentiGuide-Puro avec des bactéries Stbl3, conservées initialement à -80°C, pendant dix minutes sur glace
 - Choc thermique : pendant 45 secondes, les bactéries sont chauffées dans un bain marie à 42°C, puis remises sur glace pendant cinq minutes
 - Ajout de 100µL de SOC medium
 - Incubation et agitation à 37°C pendant 40 minutes
 - Etalement : sur une gélose Lysogeny broth (LB) avec ampicilline à 100µg/mL
 - Incubation jusqu'au lendemain, soit au moins 12 heures, à 37°C
 - Prélèvement de deux colonies, chacune transférée dans un tube contenant 4 ml de milieu LB et ampicilline à 100µg/mL
 - Incubation et agitation au moins 12h à 37°C
- Les bactéries obtenues sont stockées à 4°C.

2.3.3. Extraction des plasmides

Les extractions ont été réalisées avec le kit NucleoSpin® Plasmid, avec le protocole suivant :

- Centrifugation 30 secondes à 11,000g 1 à 5mL de culture de bactéries Stbl3 précédemment obtenues
- Lyse des bactéries : Ajout de 250µL de Buffer A1 pour remettre en suspension les bactéries dans un milieu tampon. Ajout de 250µL de Buffer A2 pour lyser les bactéries. Mélanger les tubes de bas en haut 6 à 8 fois. Incuber 5 minutes à température ambiante. Ajout de 300µL de Buffer A3. Mélanger les tubes de bas en haut 6 à 8 fois une nouvelle fois jusqu'à la disparition de la couleur du lysat.
- Clarification du lysat : centrifugation 5 à 10 minutes à 11,000g
- Ligation du plasmide : placer une colonne NucleoSpin® Plasmid dans un tube de collection et décanter au maximum 700µL du surnageant précédemment obtenu à la fois en le centrifugeant une minute à 11,000g.

Jeter la solution récoltée et garder la colonne. Répéter jusqu'à n'avoir plus de surnageant disponible.

- Lavage de la membrane : ajout de 500µL de Buffer AW. Centrifuger une minute à 11,000g. Jeter la solution récoltée. Répéter une deuxième fois. Ajout de 600µL de Buffer A4. Centrifuger une minute à 11,000g. Jeter la solution récoltée.
- Séchage de la membrane : centrifuger deux minutes à 11,000g
- Elution : placer la colonne NucleoSpin® Plasmid utilisée dans un tube Eppendorf. Ajout de 50µL de Buffer AE. Incubation une minute à température ambiante. Centrifugation une minute à 11,000g.

2.3.4. Vérification des plasmides obtenus

Pour vérifier que le plasmide lentiGuide-Puro a bien été amplifié par les bactéries, plusieurs étapes sont nécessaires. Tout d'abord, les plasmides contiennent un gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries qui ont poussé pendant l'étape d'amplification sont donc normalement résistantes à l'ampicilline si elles ont bien intégré le plasmide.

Nous aurions pu envoyer les extractions précédemment effectuées au séquençage pour vérifier la présence du plasmide. Cependant, à cette étape, il est plus facile de digérer le résultat de l'extraction avec une enzyme coupant le plasmide.

Nous avons ainsi utilisé l'enzyme Esp31 (BsmBI) (10 U/µl), coupant lentiGuide-Puro à la base 406 et 2291 en reconnaissant la séquence suivante : CGTCTC. On aurait donc deux fragments d'environ 1800 paires de base et de 8400 paires de base. Nous avons aussi utilisé Xho1 (10 U/µl), coupant le plasmide LGP à la base 2583 et 3644 en reconnaissant la séquence CTCGAG. Les deux fragments seraient alors de 1000 et 9000 paires de base.

Protocole de digestion et de détection des fragments digérés :

- Digestion réalisée avec les quantités détaillées dans le Tableau 7, par ordre d'ajout :

	Volume (µL)
Eau (filtré au Thermo Scientific™ Barnstead™ Nanopure™)	15
Plasmide	2
Milieu Tampon	2
Enzyme (Esp31/Xho1)	1

Tableau 7 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de digestion du plasmide LGP avec Esp31 ou Xho1.

- Pour la digestion avec l'enzyme Esp31, 1µL de DTT à 20mM a été ajouté, le milieu Tampon est le Buffer Tango. Pour la digestion avec Xho1, le milieu Tampon est le Buffer Cutsmart
- Incubation dans un bain-marie sec à 37°C pendant deux heures
- Migration sur gel à 1% d'agarose à 100 V, contenant un agent intercalant, le SYBR safe dilué au 1/20 000, pendant une à deux heures
- Lecture avec GelDoc Go Imaging System de Bio-Rad, la plaque est montrée Figure 16

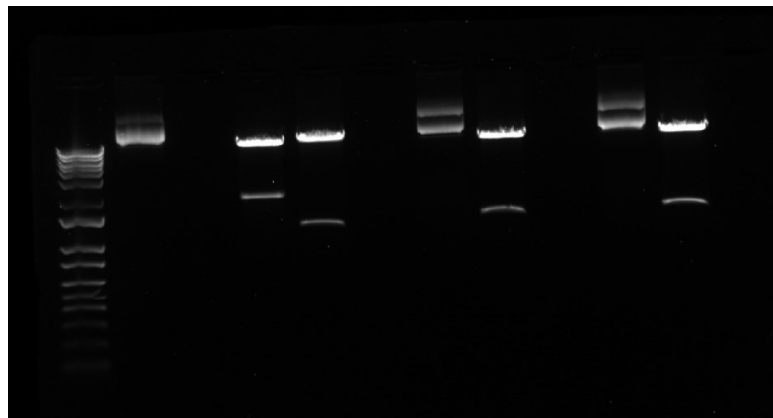


Figure 16 : Produits des digestions des plasmides LGP, lentiGuide CTRL g1 et lentiGuide CTRL g2. De gauche à droite : échelle, LGP non digéré, LGP digéré avec Xho1, LGP digéré avec Esp31, lentiGuide CTRL g1 digéré avec Xho1, lentiGuide CTRL g1 digéré avec Esp31, lentiGuide CTRL g2 digéré avec Xho1, lentiGuide CTRL g2 digéré avec Esp31

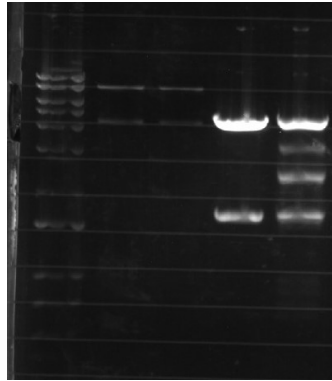


Figure 17 : Produit des digestions des plasmides pCMVR8.74 et pMD2.G.

De gauche à droite : échelle, pCMVR8.74 deux fois digéré avec EcoRV puis pMD2.G deux fois digéré avec BamHI

Comme on peut le voir en Figure 16 et en Figure 17, LGP n'est pas le seul plasmide que nous avons amplifié et vérifié. Quatre plasmides utiles pour la suite du projet ont subi le même protocole que le premier plasmide, à l'exception de l'absence de lavage au Buffer AW, et à l'utilisation d'enzymes différentes. Ces quatre autres plasmides sont :

- Le plasmide pCMVR8.74 : il exprime les gènes gag pol tat rev du HIV-1. pCMVR8.74 provient de Didier Trono (Addgene plasmid # 22036 ; <http://n2t.net/addgene:22036> ; RRID:Addgene_22036). Digéré avec EcoRV.
- Le plasmide pMD2.G : il exprime VSV-G, une protéine de l'enveloppe du VSV, pMD2.G provient de Didier Trono (Addgene plasmid # 12259 ; <http://n2t.net/addgene:12259> ; RRID:Addgene_12259) Digéré avec BamHI
- lentiGuide CTRL g1
- lentiGuide CTRL g2

Les deux lentiGuide proviennent de l'étude (141). Ce sont des lentiGuide-Puro contenant un ARN guide contrôle négatif humain.

Les cartes des plasmides pMD2.G et pCMVR8.74 sont respectivement disponibles en Annexes 1 et 2.

2.3.5. Digestion et déphosphorylation des plasmides LGP produits

La digestion et la déphosphorylation vont nous permettre de préparer le plasmide pour l'insertion de la séquence d'ARN guide. Un fragment du plasmide d'origine sera perdu mais il ne contient pas de segment nécessaire au projet.

Protocole de digestion, de déphosphorylation et d'extraction

- Digestion réalisée avec les quantités détaillées dans le Tableau 8, par ordre d'ajout :

	Volume (µL)
Eau (filtré au Thermo Scientific™ Barnstead™ Nanopure™)	2.5
Plasmide	20
Buffer Fast Digest 10X	3
DTT	1.5
Enzyme Esp31 FastDigest	1
Phosphatase	2

Tableau 8 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de digestion et de déphosphorylation de LGP

- Incubation 30 minutes à 37°C
- Migration sur gel à 0,6% d'agarose, à 50V, pendant 3h30
- Découpage de la bande la plus lourde sur le gel, Figure 18
- Transfert dans un tube Eppendorf et ajout de 200µL de Buffer NTI par 100mg de gel
- Incubation 10 minutes à 50°C au bain-marie, dissolution du gel
- Centrifugation 30 secondes à 11,000 g du liquide obtenu préalablement placé dans un NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column dans un tube de collection.
- Lavage de la membrane : ajout de 700µL de Buffer NT3 dans la colonne. Centrifuger 30 secondes à 11,000g. Jeter le contenu du tube de collection. Répéter ces opérations une deuxième fois.

- Séchage de la membrane : centrifuger une minute à 11,000g
- Chauffage du Buffer NE à 70°C pendant cinq minutes
- Elution : ajout de 30µL de Buffer NE chauffé et incubation une minute à température ambiante. Centrifuger une minute à 11,000g

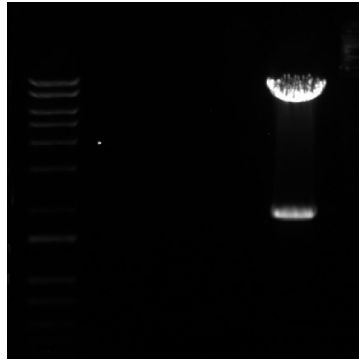


Figure 18 : Produit de la digestion de LGP par Esp31

Le plasmide obtenu est placé au congélateur à -20°C. La quantité a été mesurée à 45,5 ng/µL.

2.4. Réaction de ligation

Une fois que les plasmides lentiGuide-Puro sont déphosphorylés, ils ne peuvent normalement plus se fermer et la ligation avec les oligonucléotides phosphorylés est possible.

Le témoin négatif est réalisé avec du plasmide lentiGuide-Puro digéré et déphosphorylé sans les oligonucléotides, remplacé par de l'eau.

Protocole de ligation :

- Ligation réalisée avec les quantités détaillées dans le Tableau 9, par ordre d'ajout :

	Volume (μL)
Eau (filtré au Thermo Scientific™ Barnstead™ Nanopure™)	1
Plasmide lentiGuide-Puro	1
Oligonucléotides phosphorylés	7
Quick ligase Buffer 10X	1
Quick ligase	1

Tableau 9 : Volume ajouté par ordre d'ajout pour la réaction de ligation entre chaque couple d'oligonucléotides et LGP déphosphorylé.

Il y a une ligation par couple d'oligonucléotides, ainsi que le témoin négatif où les oligonucléotides sont remplacés par de l'eau

- Incubation 20 minutes à température ambiante, puis 10 minutes à 70°C

Les produits de ligation sont conservés au congélateur à -20°C.

2.5. Transformation et extraction des plasmides produits

Cette étape va nous permettre de vérifier si l'ARN guide a bien été inséré dans le plasmide. En effet, le témoin négatif a été digéré et déphosphorylé. L'étape de ligation n'est censée n'avoir aucun effet sur ce plasmide. Ce dernier resterait alors ouvert car les séquences des extrémités ne sont pas complémentaires et ne sont pas phosphorylées. L'étape de transformation ne va sélectionner que les bactéries ayant intégré le plasmide et donc le gène de résistance à l'ampicilline.

Cette étape se déroule de la même manière que décrite précédemment au point I.2.3.b. Il y a quatre conditions différentes : le témoin négatif et les trois plasmides différents, ayant chacun inséré un couple d'oligonucléotides. Nous l'avons réalisée plusieurs fois car elle n'avait initialement pas fonctionné.

Le Tableau 10 récapitule le nombre de colonies se développant après étalement sur gélose LB-ampicilline et incubation sur plus de 12 heures à 37°C.

Condition	Témoin négatif	Plasmide LGP1	Plasmide LGP2	Plasmide LGP3
Nombre de colonies	0	0	6	7

Tableau 10 : Nombre de colonies par conditions.

Ces conditions étant le témoin négatif et les trois LGP avec leur couple d'oligonucléotides insérés dans le plasmide, dans le cas où la ligation a fonctionné

On peut voir que les bactéries en contact avec le témoin négatif n'ont pas poussé alors que celles transformées avec le plasmide LGP2 et LGP3 ont poussé. On peut donc légitimement en conclure que ces bactéries ont pu le produire en grande quantité. Les bactéries transformées avec le plasmide LGP1 ne se sont pas développées.

Le repiquage puis l'incubation sur la nuit en milieu LB-ampicilline a été fait pour quatre colonies des deux conditions ayant fonctionnées.

L'extraction des plasmides s'est déroulée de la manière décrite précédemment au point I.2.3.c. Le Tableau 11 donne les concentrations de chaque extraction. Les lettres A, B, C, D correspondent aux quatre colonies prélevées pour chaque plasmide.

Plasmide LGP2	Concentrations (ng/μL)	Plasmide LGP3	Concentrations (ng/μL)
A	59.3	A	51.9
B	60.4	B	56.1
C	60.7	C	71.8
D	66.5	D	60.5

Tableau 11 : Concentrations pour chaque clone de plasmides LGP2 et LGP3

Lors de l'envoi au séquençage, les plasmides LGP2B et LGP3B se sont révélés avoir la bonne séquence.

Nous avons donc réussi à rassembler les composants du vecteur viral : le plasmide LGP2B ou LGP3B, et les deux plasmides pCMVR8.74 et pMD2.G. Il restera à transférer ces plasmides sur des cellules 293T. Elles produiront alors le vecteur viral au complet qui sera récupéré dans le surnageant. La transduction se fera sur des cellules CALU-3 exprimant déjà Cas9.

II. Résultats

1) Infection de cellules A549 par le virus PR8 avec AM-001 à 10µM en pré-traitement

En infectant des cellules A549 avec le virus PR8 puis en titrant en PFU, nous avons démontré un effet antiviral d'AM-001 à 10µM en pré-traitement. Les expériences ont été faites en triplicats. Le virus PR8, titré initialement à 6E+06 pfu/mL, a été utilisé avec une MOI de 0,001. On peut toutefois noter que les cellules A549 étaient contaminées par des mycoplasmes. Il n'y a pas eu de mort cellulaire mise en évidence dans les puits de cellules A549, traitées ou non.

On peut voir les résultats de l'expérience sur la Figure 19. Les cellules traitées avec la molécule ont un titre nul sur le surnageant prélevé à 24h en pfu/ml. Le virus n'est pas détectable ce qui signifie qu'aucune plaque n'a été mise en évidence aux dilutions effectuées, comme pour les cellules non infectées. Il s'agit d'un résultat très encourageant. Le témoin positif et les cellules traitées avec le DMSO présentent en revanche un titre semblable.

Nous n'avons pas réalisé de nouvelles expériences avec les cellules A549 car leur croissance n'était pas optimale et le traitement à la BM-cyclin contre les mycoplasmes n'a pas été efficace.

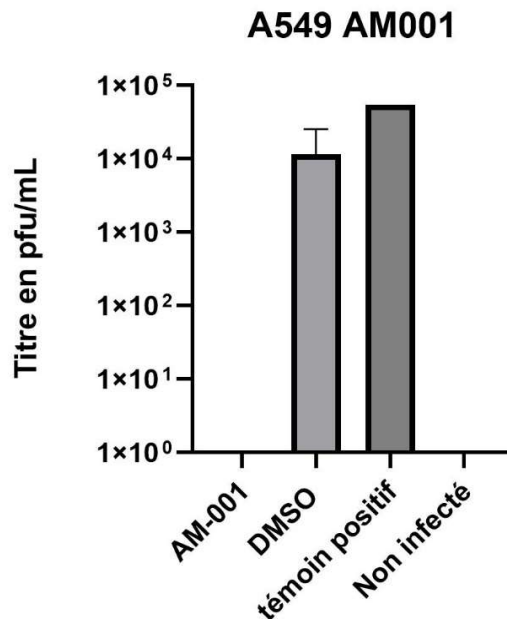


Figure 19 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules A549 infectées par le virus PR8.

AM-001 est à 10µM, le DMSO est à 0,1%. La MOI est de 0,001. Le titrage en PFU s'est fait sur le surnageant 24h après infection.

2) Infection de cellules MDCK par les virus PR8 et H7N1 avec AM-001 à 20µM en pré et post-traitement

Après avoir démontré un effet antiviral sur les cellules A549, nous avons essayé de faire de même sur des cellules plus faciles à cultiver, les cellules MDCK. Nous avons donc testé le virus PR8 sur ces cellules en analysant les prélèvements du surnageant à 24h en titrant par TCID50.

Cette fois, AM-001 est testée à 20µM et à 2µM en pré-traitement et en post-traitement selon les modalités détaillées au point I.1.2.b. La MOI est de 0,001 et le virus PR8 est titré à 6E+06 pfu/mL. Le DMSO a été utilisé à 0,2%. Les résultats sont présentés Figure 20. Les expériences ont été faites en triplicats. Il faut noter que les cellules prétraitées avec 20µM d'AM-001 ont subi une perte supérieure à 80% au bout de 24h : elles n'ont donc pas été analysées. Les autres puits ont eu un tapis conservé.

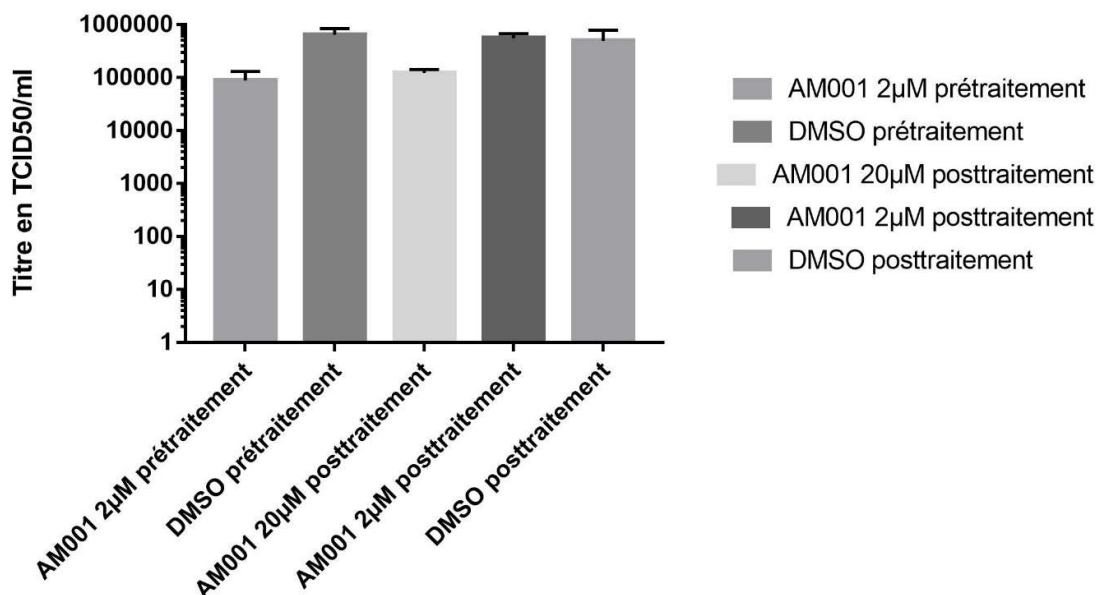


Figure 20 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules MDCK infectées par le virus PR8 en pré-traitement et en post-traitement.

Par une analyse statistique, décrite au point I.1.7, nous pouvons aussi dire que les cellules traitées à 2µM ont un titre viral significativement inférieur au titre viral des cellules au DMSO prétraitées. Il y a donc bien un effet antiviral observé en pré-traitement, bien que faible, à 2µM. En revanche, les titres viraux des cellules post-traitées ne sont pas significativement différents par la même analyse statistique. Il n'y a donc pas d'effet antiviral en post-traitement sur ces cellules.

Nous avons fait la même expérience avec AM-001 à 20µM seulement sur des cellules MDCK infectés avec le virus H7N1 GD titré à 6.25E+07 TCID50/mL en moyenne, en prélevant le surnageant de 24h et en l'analysant par TCID50. La MOI est de 0,001. Le DMSO a été utilisé à 0,2%. Les résultats sont présentés Figure 21. Les expériences ont été réalisées en triplicats.

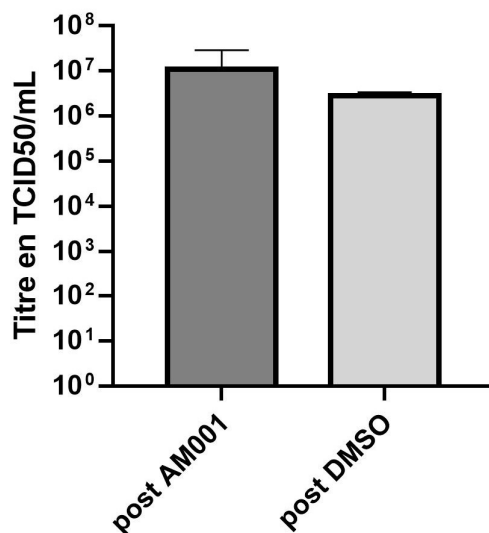


Figure 21 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 à 20 μ M sur des cellules MDCK infectées par le virus H7N1 GD en pré-traitement et en post-traitement.

Cette fois également les cellules prétraitées avec la molécule à 20 μ M sont en partie lysées. Par une analyse statistique, décrite au point I.1.7, nous pouvons dire qu'il n'y a pas de différences significatives entre les cellules post-traitées et les cellules non traitées. L'absence d'effet antiviral en post-traitement de notre molécule est donc vérifiée dans cette expérience.

Face à cette mort cellulaire inexplicquée, nous avons entrepris plusieurs essais de cytotoxicité. Nous avons d'abord réalisé un essai en mettant en contact les cellules MDCK avec la molécule à différentes concentrations sans changer le milieu comme fait dans le protocole de l'expérience précédente. Les résultats sont présentés dans la Figure 22.

Par une analyse statistique, les différentes concentrations n'ont pas de différences significatives entre elles. On peut alors dire que jusqu'à 40 μ M, AM-001 n'est pas toxique pour ces cellules, selon ce protocole.

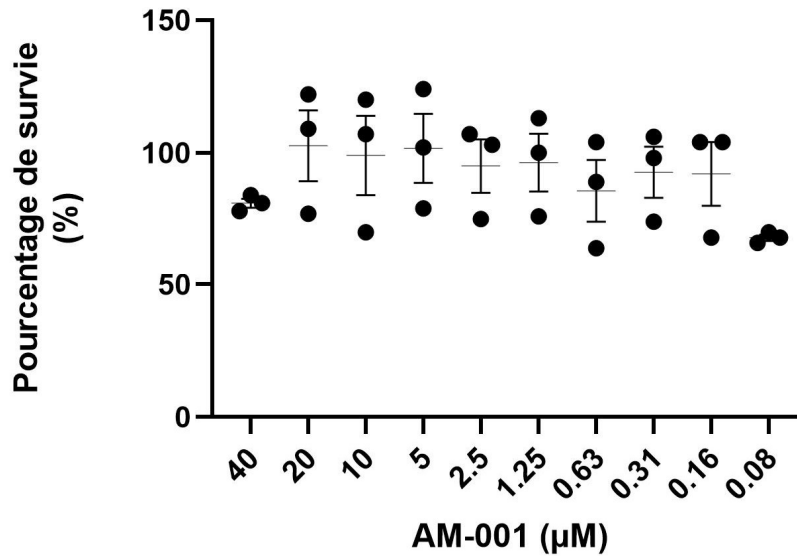


Figure 22 : Essai de cytotoxicité d'AM-001 sur cellules MDCK.

Les points représentent chacun un puits, l'intervalle représente l'erreur standard moyenne et la ligne centrale la moyenne

Un deuxième essai a été réalisé pour tester le protocole de pré-traitement des deux expériences précédentes, celui où il y a eu mort cellulaire. Les cellules sont ici traitées avec l'AM-001 une première fois, puis le milieu est retiré avec un lavage deux fois au PBS. Un nouveau milieu contenant AM-001 est ensuite remis, et enfin il y a une étape de retrait du milieu et d'ajout de milieu AM-001. L'objectif initial de ce protocole était de pouvoir comparer les cellules post-traitées aux cellules prétraitées en leur faisant subir le même stress lié aux changements de milieu.

Cette fois, il est observé une absence des cellules avant analyse à partir de 5 µM jusqu'à 40µM. Cela implique une toxicité très importante ou bien un décollement des cellules lié à leur manipulation par exemple. Cela est compatible avec les résultats obtenus à 20µM en pré-traitement avec ce protocole. Une hypothèse quant à la mort cellulaire ou au décollement cellulaire serait l'accumulation intracellulaire d'AM-001 suite aux multiples rajouts de milieu. Cela nous permet d'exclure l'hypothèse d'un éventuel rôle de l'infection par le virus dans ce phénomène.

3) Infection de cellules CALU-3 par le virus PR8 avec AM-001 à 10µM en pré et post-traitement

Nous avons enfin testé notre molécule sur des cellules CALU-3. Il s'agit d'une expérience indispensable puisqu'il est prévu de produire des cellules CALU-3 KO pour EPAC1. S'il n'y a pas d'effet antiviral sur cette lignée, l'étude des cellules KO serait compromise.

Les résultats sont détaillés sur la Figure 23. Les expériences ont été réalisées en triplicats. Le virus PR8 est le même qu'utilisé précédemment. La MOI a été de 0,001. La molécule AM-001 a été utilisée à 10µM et le DMSO à 0,1%. Il n'y a pas eu de mort cellulaire mise en évidence dans les puits de cellules CALU-3. Les prélèvements ont été faits 24h après l'infection et analysés en titrage par PFU.

Par une analyse statistique, décrite au point I.1.7, nous avons pu mettre en évidence un effet antiviral significatif d'AM-001 sur CALU-3 à 10µM.

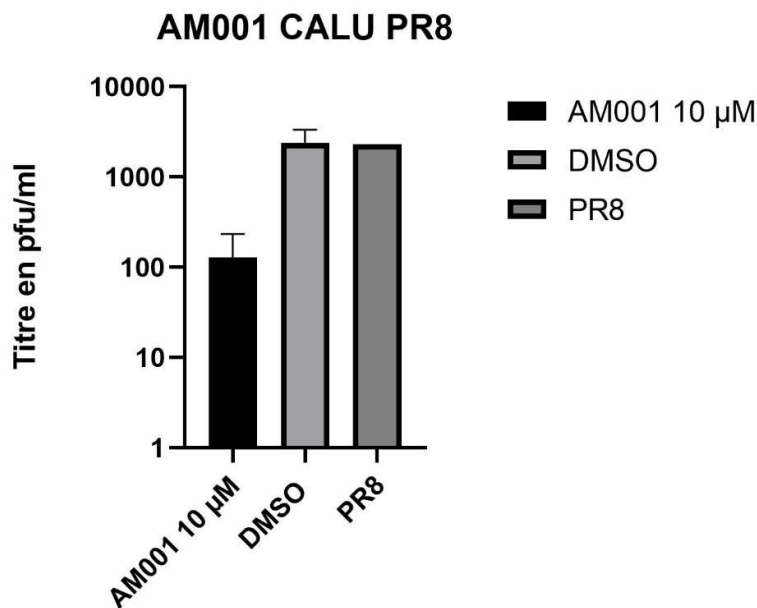


Figure 23 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules prétraitées CALU-3 infectées par le virus PR8

4) Infection des cellules 293-T par MV-Luc avec AM-001 à 20µM, 2 µM et 0.2µM en pré-traitement

Notre hypothèse sur le mode d'action d'AM-001 est que la molécule bloquerait les virus entrant par endocytose. MV-Luc entre dans les cellules par fusion à la membrane plasmique. Nous nous attendons donc à une absence d'efficacité de la molécule sur MV-Luc. Pour cela, nous avons infecté des cellules 293-T avec MV-Luc en présence de la molécule selon le protocole décrit au point I.1.2.c. Les expériences ont été réalisées dans six puits par conditions. Les résultats sont présentés Figure 24.

Par une analyse statistique, décrite au point I.1.7, nous pouvons dire que l'activité de la luciférase est identique dans le surnageant des cellules traitées avec la molécule à 20µM par rapport aux cellules non traitées.

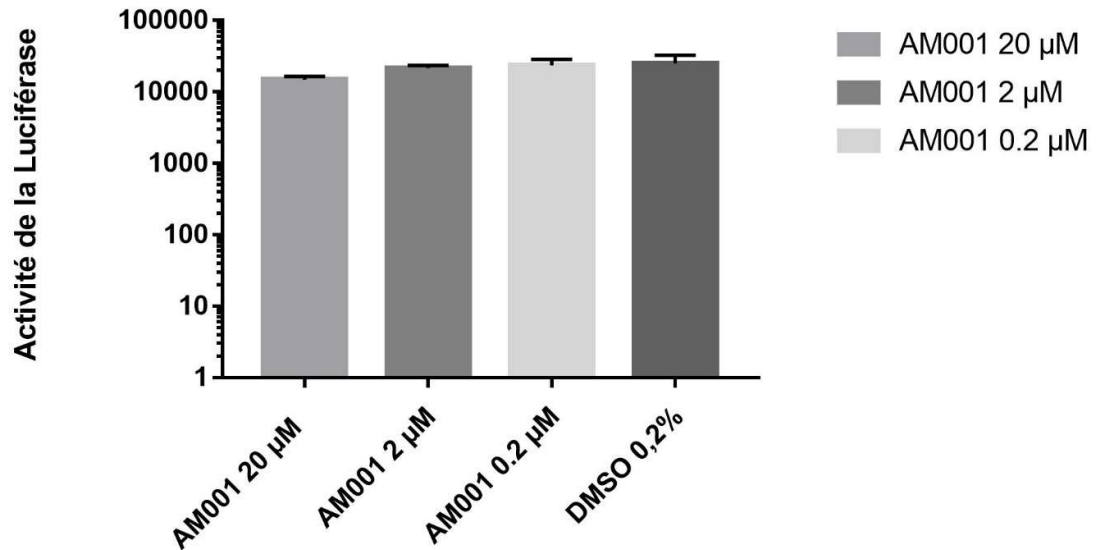


Figure 24 : Etude de l'effet antiviral d'AM-001 sur des cellules prétraitées 293-T infectées par le virus MV-Luc

Cette absence d'effet antiviral nous apporte une information sur le fonctionnement hypothétique de l'effet antiviral de la molécule AM-001 : elle fonctionnerait seulement sur les virus qui entreraient dans la cellule par endocytose, et non par fusion de membrane comme avec le virus de la rougeole (142, 143). Son mode d'action est donc sûrement lié au phénomène d'endocytose.

Pour nous conforter dans cette idée, nous avons tenté d'infecter des cellules HEP-2 avec un RSV-Luc humain mais malheureusement, nous n'avons pas détecté

d'activité de la luciférase au cours des essais donc nous n'avons pas pu réaliser cette expérience.

5) Etude de l'effet virucide d'AM-001

Il a été nécessaire de s'assurer de la non-virucidie de la molécule pour continuer nos expériences. Si AM-001 présente des propriétés virucides sur les virus utilisés, alors la molécule inactive directement les virus dans le milieu de culture lors de l'inoculation, comme le ferait un désinfectant. Il apparaît indispensable de vérifier cet effet sur AM-001. S'il s'avérait sur la molécule, ce ne serait pas son mode d'action sur EPAC1 qui serait à l'origine de son effet antiviral et il ne serait pas a priori efficace sur modèle vivant.

Pour cela, nous avons mis en contact le virus et la molécule puis nous avons titré en TCID₅₀ la solution obtenue, comme décrit au point I.1.3.b. Les expériences ont été réalisées en triplicats. AM-001 a été testée à différentes concentrations.

Nous avons utilisé un virus H7N1, il s'agit d'un virus enveloppé. Par une analyse statistique, nous avons donc démontré une absence de virucidie de notre molécule, dont les résultats sont montrés Figure 25.

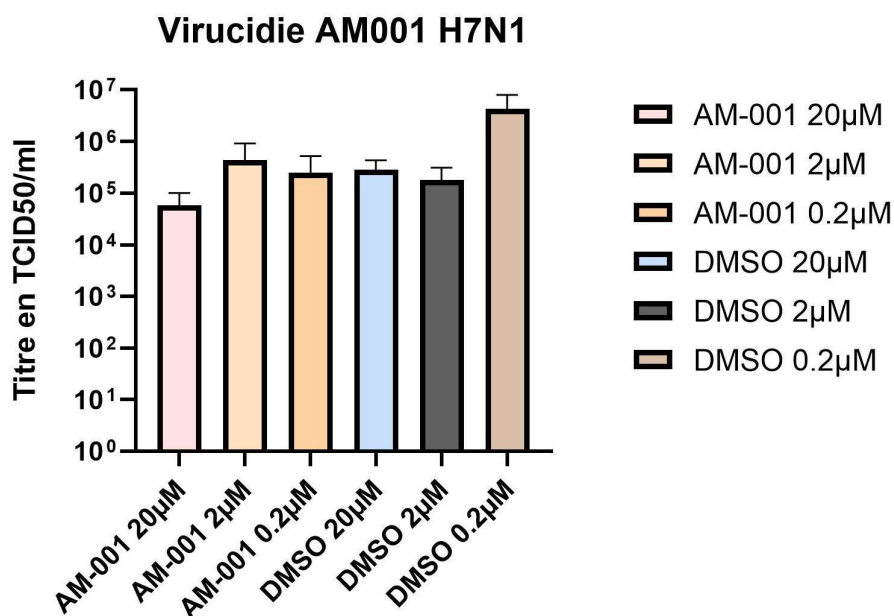


Figure 25 : Vérification des propriétés virucides d'AM-001

III. Discussion

Une molécule antivirale efficace *in vitro*

Au vu de nos résultats de la molécule AM-001 sur plusieurs lignées cellulaires (A549, CALU-3) et sur différentes souches du virus Influenza, nous pouvons dire que cette molécule a un effet antiviral à partir de 10 μ M. Un effet antiviral suffisant reste à démontrer pour des concentrations supérieures ou égales à 10 μ M pour la lignée MDCK. Les expériences de l'équipe de virologie de l'ENVT ont elles aussi montré un effet antiviral d'AM-001 sur SARS-CoV-2. Cependant, l'étude sur modèle animal n'a pas montré d'effet antiviral d'AM-001. Nous aurions pu effectuer un travail plus poussé en réalisant des études de cinétique sur les virus utilisés, à des concentrations bien plus larges.

L'effet antiviral a toutes les chances d'être concentration-dépendante dans le cas où cet effet est bien lié à l'action inhibitrice d'EPAC1. En effet, d'après (124), cette action inhibitrice est concentration-dépendante, sans réduire la concentration efficace médiane de l'AMPc. Cette dernière caractéristique est intéressante : cela veut dire que l'action antivirale de la molécule AM-001, si elle est bien liée à l'inhibition d'EPAC1, n'est pas influencé par les concentrations d'AMPc. Cette étude a été réalisée jusqu'à 60 μ M et mesure à 53 μ M la concentration inhibitrice médiane sur la protéine.

Relier l'effet antiviral de notre molécule et son action inhibitrice a été en partie élucidé puisqu'AM-001 ne présente pas de caractéristiques virucides. De plus, les cellules CALU-3 KO pour EPAC1 permettraient de mettre fin à ce questionnement en prouvant que c'est bien l'inhibition d'EPAC1 qui est à l'origine du blocage du virus. Par manque de temps, seules les premières étapes de la création des cellules CALU-3 KO pour EPAC1 ont été réalisées. Nous nous attendions à ce résultat puisque d'autres études avec des cellules KO pour EPAC ont montré un certain niveau de résistance à certaines infections virales (123), mais cela n'a pas été montré pour un virus Influenza ou le SARS-CoV-2.

Un mode d'action pas encore élucidé

Pour aller plus loin dans l'analyse de la molécule AM-001, nous avons essayé de déterminer le moment où elle bloquerait l'infection virale. Nous n'avons pas pu identifier clairement l'étape où agirait AM-001. Cependant, nous pouvons formuler des hypothèses en nous aidant de la littérature et de nos résultats. La molécule agissant sur l'hôte et non sur le virus, une des hypothèses de départ serait qu'elle ne présenterait pas beaucoup de spécificité. Cela a été vérifié puisqu'elle bloque des virus différents : deux souches d'Influenza et le SARS-CoV-2. Il s'agit de virus enveloppés, à ARN et dont l'un des modes d'entrée dans la cellule, le seul pour l'Influenza, est la voie endolysosomale. Cette voie implique plusieurs mécanismes cellulaires contrairement à la fusion membranaire.

Les résultats de l'infection par le MV-Luc avec la molécule en traitement nous apprend qu'elle ne fonctionne pas sur ce virus et plus largement qu'elle ne fonctionnerait pas sur les virus entrant par fusion membranaire. Une expérience similaire sur le hRSV aurait pu consolider cette hypothèse.

L'inhibition d'EPAC1 n'agit donc pas a priori sur l'attachement des virus au vu de sa non-spécificité et d'une étude du blocage d'EPAC sur le MERS (123). Elle n'agit pas non plus sur les phases les plus tardives de la maturation du virus, au vu des résultats de l'infection par Influenza des cellules MDCK qui montrent une absence d'efficacité de la molécule quatre heures après infection.

ESI-09, un autre inhibiteur d'EPAC1, bloquerait un virus modifié Ebola-VSV à des stades débutants, et plus précisément après l'attachement et avant la formation d'endosomes précoces(120). Ces résultats ont été obtenus par microscopie électronique et par quantification de l'ARN viral dans les endosomes précoces. On peut supposer qu'il se passe la même chose dans les cellules traitées avec AM-001 et infectées avec un Influenza.

Contrairement à nos résultats, ESI-09 serait efficace contre Ebola-VSV en post-traitement (120). Nous avons montré une absence d'efficacité de la molécule en mettant en contact la molécule quatre heures après infection et en analysant à 24 heures à une MOI de 0.001. Dans l'étude, la mise en contact s'est faite un jour après infection par un Ebola virus modifié à une MOI de 0,5 et l'analyse deux jours après. Les protocoles étant différents, il est difficile de conclure sur une réelle absence d'efficacité d'AM-001 en post-traitement.

Cette étude est très intéressante car elle propose une explication assez précise de l'action antivirale de ESI-09 : EBOV utilise la voie PI3K/PKB pour entrer dans la cellule (144). Cette voie est régulée par EPAC et PKA notamment (145, 146) et l'inhibition d'EPAC1 la bloquerait. Nous n'avons pas pu vérifier cela pour AM-001 et les virus utilisés. Toutefois, il s'agit d'une hypothèse intéressante car les virus Influenza A utilisent la voie PI3K. L'activation de la voie PI3K par ces virus contribue à l'acidification des endosomes tardifs (147). La PI3K pourrait d'ailleurs être la cible de nouveaux agents antiviraux (148). Malheureusement, il a été montré une toxicité importante de son inhibition dans le traitement des cancers (149).

Même s'il ne s'agit pas de virus, les études sur les Rickettsioses nous apportent des pistes de réflexion. Tout d'abord, une étude a révélé que l'infection par *R. australis* était inhibée par ESI-09. On retrouve un blocage entre l'attachement et l'invasion en infectant des cellules endothéliales aortiques, KO pour EPAC1, avec cette bactérie (150). On sait aussi qu'une autre bactérie très proche, *R. conorii*, utilise PI3K pour infecter les cellules non-macrophages et pour pirater le système de microtubules, renforçant un peu plus l'hypothèse précédente (151).

Une autre hypothèse pour expliquer l'activité antivirale d'AM-001 est le blocage de la formation d'endosomes, ou de la diminution de l'acidification de ceux-ci. En effet, plusieurs études mettent en évidence le rôle d'EPAC dans l'endocytose : ESI-09 diminuerait l'internalisation d'un récepteur de surface, 67LR (152). Ce récepteur est impliqué dans l'endocytose de plusieurs agents infectieux comme les prions ou le virus de la dengue (153, 154).

Si l'on s'intéresse aux coronavirus, nous avons vu que le MERS-CoV et le SARS-CoV-1 sont bloqués par les inhibiteurs d'EPAC1. L'étude qui a mis au jour cette inhibition ne propose pas d'explication pour cette activité antivirale (123). L'équipe de

virologie a montré un effet antiviral d'AM-001 sur le SARS-CoV-2. Le rôle de l'AMPc est encore mal compris dans les infections par les coronavirus respiratoires (118).

Ainsi, à l'heure actuelle, aucune étude, y compris la nôtre, n'explique clairement et avec certitude le mécanisme antiviral des inhibiteurs d'EPAC1. Le rôle de cette protéine demeure inconnu pour de nombreuses infections virales comme celles des coronavirus. Les virus et les bactéries ont co-évolué avec leurs hôtes et détournent certaines voies de communication de la cellule dont EPAC1 à leur avantage. Il n'est pas exclu, au vu de l'implication d'EPAC1 dans de nombreux mécanismes cellulaires, que son inhibition par AM-001, ou ESI-09, empêche certaines infections virales ou bactériennes de manière différente selon les souches et les lignées cellulaires.

AM-001 pourrait aussi favoriser des infections bactériennes au lieu d'avoir une action protectrice contre certains virus. En effet, il a été montré que l'activation d'EPAC permet de protéger de l'autophagie provoquée par *Coxiella burnettii* (155). Dans cette étude, il a aussi été montré qu'un Knock down d'EPAC favoriserait le développement de la bactérie dans ses vacuoles. L'autophagie est également une voie utilisée par *S. aureus* pour entrer et se multiplier. Une augmentation de l'AMPc permettrait, par la voie EPAC1, de l'inhiber. *S. aureus* va faire baisser la concentration de l'AMPc et empêcher l'activation d'EPAC1 pour utiliser ce mécanisme cellulaire à son avantage (156). Les inhibiteurs d'EPAC n'ont pas été testés sur cette bactérie, il est donc difficile de prévoir si l'infection serait favorisée, inhibée ou indifférente.

Pour ce qui est des virus utilisés, nous aurions pu tester la molécule sur des cellules infectées par un virus non enveloppé, en nous attendant à une absence d'efficacité d'AM-001. Il serait intéressant de comparer l'effet de la molécule sur différentes souches du SARS-CoV-2. Par exemple, le variant Omicron utilise préférentiellement la voie cathepsine-L donc celle endosomale pour infecter les cellules, contrairement au variant Delta (157).

Une toxicité *in vivo* et *in vitro* à vérifier

Un autre axe est important pour notre étude. Il s'agit de vérifier la toxicité d'AM-001. C'est une étape importante à notre niveau mais qui sera surtout à vérifier dans

les essais *in vivo*. En effet, EPAC1 est, nous l'avons vu précédemment, participe à de nombreux phénomènes cellulaires. L'inhibition d'EPAC1 à elle seule n'est a priori pas toxique puisque les souris KO pour EPAC1 sont viables et ne présentent pas d'anomalies majeures compromettant leur survie (109). La molécule AM-001 en elle-même pourrait causer des dommages cellulaires, organiques ou fonctionnels. Notre étude permet seulement de vérifier la toxicité cellulaire aux concentrations utilisées avec des protocoles bien définis. Des concentrations supérieures à 60 μM ont déjà été utilisées sur animal vivant ou culture cellulaire et n'ont pas montré de toxicité majeure (124). Nous n'avons pas observé de mort cellulaire sur les lignées CALU-3, 293-T et A549. Aussi, aucun essai de cytotoxicité n'a été réalisé sur ces lignées, mais on peut dire qu'à priori il n'y a pas ou peu de cytotoxicité. La lignée pour laquelle il y en a eu est la lignée MDCK. Ce sont des cellules de l'épithélium rénal de chien qui n'ont pas présenté de cytotoxicité en utilisant un protocole similaire à celui des autres lignées. C'est en retirant le milieu déjà présent et en le remplaçant plusieurs fois, dans le but de faire subir un stress identique aux cellules prétraitées et post-traitées, que nous avons observé une mortalité ou un décollement cellulaire lié aux manipulations répétées très important : plus de 80% du tapis cellulaire s'était ainsi décollé pendant les deux expériences de pré et post-traitement. De plus, nous pouvons exclure l'hypothèse d'une influence du virus dans cette mortalité puisque, d'une part, nous avons réalisé les expériences avec deux virus Influenza différents, et d'autre part, nous retrouvons ce décollement cellulaire dans les essais de cytotoxicité, réalisées sans infection.

Nous n'avons pour le moment que des hypothèses pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, elle fait suite à des stress cellulaires, constitués par les changements de milieu. Il y a pu y avoir une accumulation intracellulaire de la molécule, liée ou non au stress du changement de milieu. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier la toxicité d'AM-001 à des concentrations bien plus élevées que 40 μM .

Des propriétés pouvant remettre en question l'effet antiviral d'AM-001

La fabrication de cellules CALU-3 KO pour EPAC1 semble aussi indispensable pour aller plus loin dans la compréhension des interactions entre EPAC1 et les virus, Influenza ou coronavirus respiratoires mais surtout pour bien associer le pouvoir antiviral d'AM-001 et son mode d'action connu.

Il a récemment été mis en évidence que de nombreuses molécules testées, dont certaines en essais de phase 2, devaient leur activité antivirale à un phénomène déjà connu, la phospholipidose (158). Ce phénomène est causé par l'accumulation de phospholipides et caractérisé par la formation de membranes dites verticillées ou mousseuses, par la présence d'inclusion cytoplasmiques constitués de corps lamellaires dans certains organes (159). *In vivo*, il s'avère toxique pour les cellules si les doses utilisées de drogues sont trop élevées (160). Cette caractéristique, si elle était avérée sur notre molécule, pourrait signifier une absence d'efficacité *in vivo* et un désintérêt pour l'aspect antiviral de la molécule. Aucune des molécules amphiphiles cationiques testées dans l'étude (109) n'a d'effet antiviral significatif *in vivo* contrairement à ce qui est observé *in vitro*.

Ces molécules ont des points communs. Elles sont pour la plupart amphiphiles cationiques. Leurs pKa est supérieur à 7.4 et leurs rapports log(octanol/eau) est supérieur à 3. On peut citer l'hydroxychloroquine, l'amiodarone et l'azithromycine qui d'ailleurs ne respecte pas ces caractéristiques. Nous n'avons pas d'informations sur le pKa et le log(octanol/eau) d'AM-001. Ces indicateurs pourraient se calculer mais nous ne pouvons pas nous prémunir du calcul de l'éventuelle concentration à laquelle la molécule induirait de la phospholipidose pour la comparer à celle induisant un effet antiviral. De plus, certaines molécules induisent le phénomène de phospholipidose sans présenter les caractéristiques présentées plus haut. Pour étudier cela, cette étude propose une méthode reproductible et assez simple qui sera réalisée prochainement par l'équipe de virologie (158).

Conclusion

Notre étude a permis de mettre en évidence une activité antivirale de la molécule AM-001, un inhibiteur sélectif d'EPAC1, *in vitro*, sur les virus Influenza, en parallèle de l'équipe de virologie qui a testé la molécule sur le SARS-CoV-2. Son spectre antiviral est encore à explorer mais il est possible qu'il se limite aux virus enveloppés entrant par la voie endolysosomale. Ces expériences ne permettent pas de comprendre le mécanisme en jeu dans le blocage de l'infection virale. EPAC1 est en effet une protéine dont les interactions avec les virus restent mal connues et à explorer. Il s'agit aussi d'une protéine impliquée dans beaucoup de processus cellulaires. Son inhibition par d'autres molécules peut aussi révéler une activité antibactérienne.

Il reste un long chemin à parcourir avant une possible utilisation d'AM-001 en thérapeutique en tant que molécule antivirale. Des expériences ont été faites et vont être poursuivies *in vivo* et *in vitro* par l'équipe de virologie de l'ENVT et d'autres équipes pour évaluer l'efficacité de la molécule sur le SARS-CoV-2 et vérifier sa toxicité. Ce virus est la principale cible des études de molécules antivirales de nos jours. Le fait qu'AM-001 cible une protéine de l'hôte plutôt que le virus en lui-même est à la fois un avantage puisque cela peut limiter l'apparition de résistances. En revanche, cela peut être un frein en raison de la toxicité, pas assez explorée dans notre cas, de ces molécules.

AM-001 pourrait aussi être étudiée en synergie avec d'autres antiviraux utilisés ou en développement. Dans l'hypothèse où la molécule bloque la voie endolysosomale du SRAS-CoV-2 seulement, un inhibiteur de la voie de fusion membranaire directe pourrait être étudié avec AM-001.

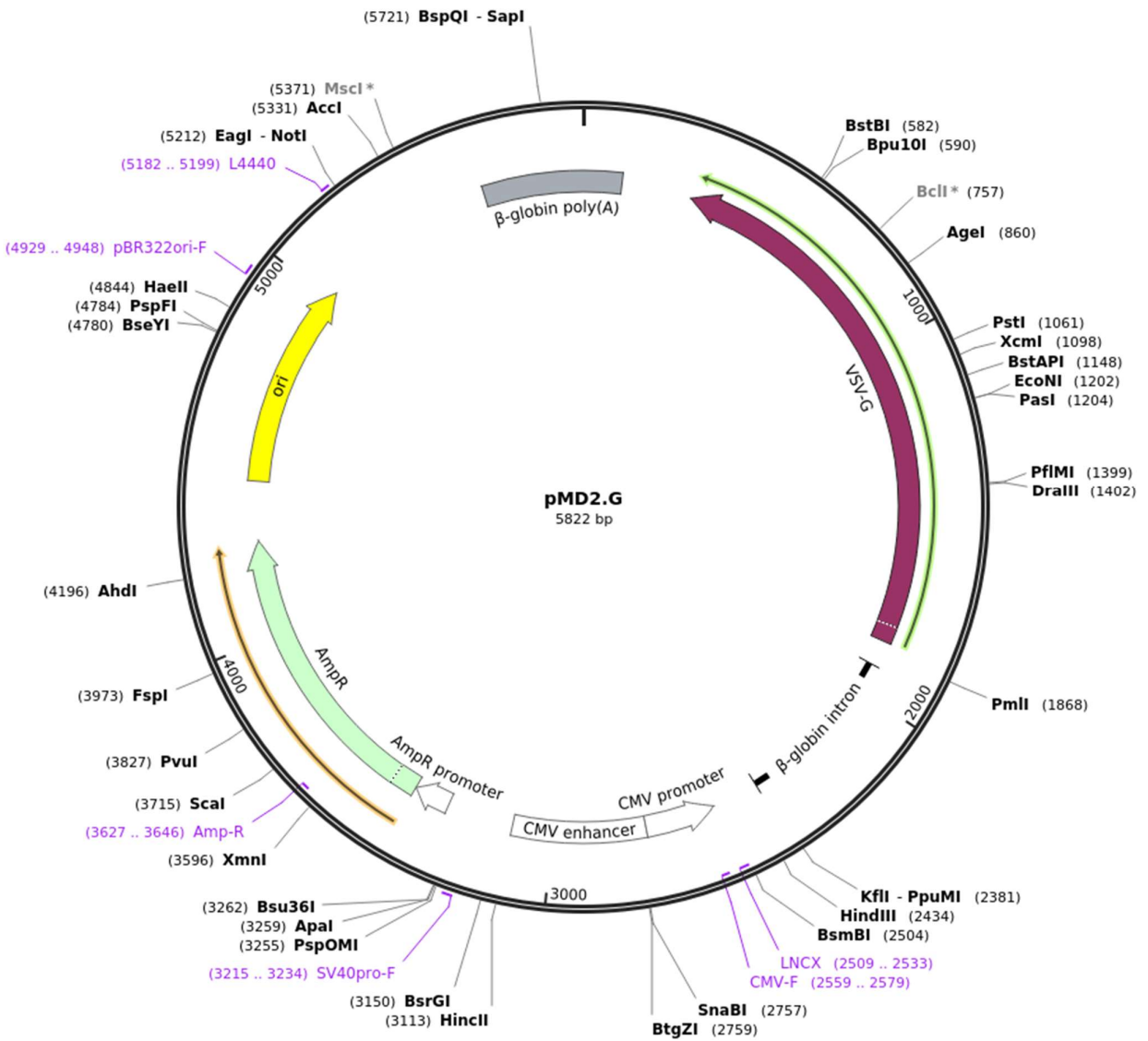
Ce n'est pas la seule utilisation que l'on pourrait en faire, nous savons qu'AM-001 aurait une action protectrice contre l'ischémie-reperfusion entre autres (124). D'autres molécules inhibitrices d'EPAC1 et d'EPAC2 ont présenté des caractéristiques anticancéreuses, antibactériennes par exemple (116, 150). De tels effets restent à prouver pour notre molécule.

Annexes

Annexe 1 :

Carte du plasmide pMD2.G, crée avec Snapgene® d'après (161)

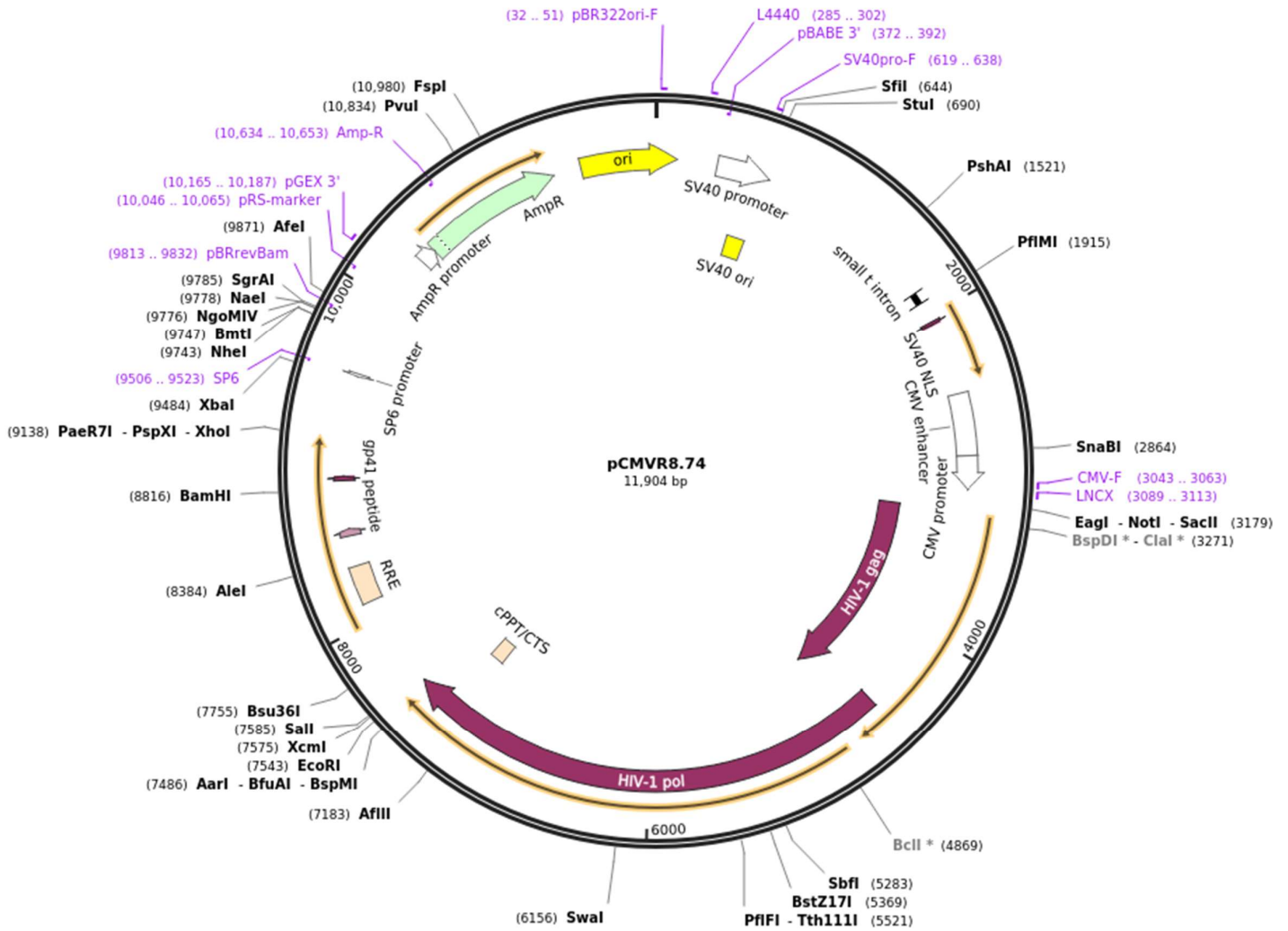
Created with SnapGene®



Annexe 2

Carte du plasmide pCMVR8.74, créée avec Snapgene® d'après (162)

Created with SnapGene®



Références bibliographiques

1. COVID-19 Map. *Johns Hopkins Coronavirus Resource Center*. [en ligne]. [Consulté le 18 février 2022]. Disponible à l'adresse: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
2. PINHO, Ana Catarina. COVID-19 treatments. *European Medicines Agency*. [en ligne]. 18 février 2021. [Consulté le 24 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-treatments>
3. TOMPA, Dharma Rao, IMMANUEL, Aruldoss, SRIKANTH, Srimari et KADHIRVEL, Saraboji. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mars 2021. Vol. 172, pp. 524-541. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.076.
4. HALL-SMITH, S. P., CORRIGAN, M. J. et GILKES, M. J. Treatment of Herpes Simplex with 5-Iodo-2'-deoxyuridine. *British Medical Journal*. 8 décembre 1962. Vol. 2, n° 5318, pp. 1515-1516.
5. FIELD, Hugh J., BELL, Susanne E., ELION, Gertrude B., NASH, Anthony A. et WILDY, Peter. Effect of Acycloguanosine Treatment on Acute and Latent Herpes Simplex Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. avril 1979. Vol. 15, n° 4, pp. 554-561.
6. CHAUDHURI, Shuvam, SYMONS, Julian A. et DEVAL, Jerome. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Research*. juillet 2018. Vol. 155, pp. 76-88. DOI 10.1016/j.antiviral.2018.05.005.
7. JACKSON, A. C. Rabies: a medical perspective. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. août 2018. Vol. 37, n° 2, pp. 569-580. DOI 10.20506/rst.37.2.2825.
8. RICHARDS, D.M., CARMINE, A.A., BROGDEN, R.N., HEEL, R.C., SPEIGHT, T.M. et AVERY, G.S. Acyclovir A Review of its Pharmacodynamic Properties and Therapeutic Efficacy: *Drugs*. novembre 1983. Vol. 26, n° 5, pp. 378-438. DOI 10.2165/00003495-198326050-00002.
9. MILLER, W. H. et MILLER, R. L. Phosphorylation of acyclovir diphosphate by cellular enzymes. *Biochemical Pharmacology*. 1 décembre 1982. Vol. 31, n° 23, pp. 3879-3884. DOI 10.1016/0006-2952(82)90305-7.
10. SIDWELL, R. W., ROBINS, R. K. et HILLYARD, I. W. Ribavirin: an antiviral agent. *Pharmacology & Therapeutics*. 1979. Vol. 6, n° 1, pp. 123-146. DOI 10.1016/0163-7258(79)90058-5.
11. PAESHUYSE, Jan, DALLMEIER, Kai et NEYTS, Johan. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Current Opinion in Virology*. 1 décembre 2011. Vol. 1, n° 6, pp. 590-598. DOI 10.1016/j.coviro.2011.10.030.
12. CROTTY, S., MAAG, D., ARNOLD, J. J., ZHONG, W., LAU, J. Y., HONG, Z., ANDINO, R. et CAMERON, C. E. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine*. décembre 2000. Vol. 6, n° 12, pp. 1375-1379. DOI 10.1038/82191.
13. DE ÁVILA, Ana I., GALLEGO, Isabel, SORIA, Maria Eugenia, GREGORI, Josep, QUER, Josep, ESTEBAN, Juan Ignacio, RICE, Charles M., DOMINGO, Esteban et PERALES, Celia. Lethal Mutagenesis

of Hepatitis C Virus Induced by Favipiravir. *PLoS ONE*. 18 octobre 2016. Vol. 11, n° 10, pp. e0164691. DOI 10.1371/journal.pone.0164691.

14. FURUTA, Y., TAKAHASHI, K., FUKUDA, Y., KUNO, M., KAMIYAMA, T., KOZAKI, K., NOMURA, N., EGAWA, H., MINAMI, S., WATANABE, Y., NARITA, H. et SHIRAKI, K. In Vitro and In Vivo Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. avril 2002. Vol. 46, n° 4, pp. 977-981. DOI 10.1128/AAC.46.4.977-981.2002.

15. FELD, Jordan J., JACOBSON, Ira M., SULKOWSKI, Mark S., POORDAD, Fred, TATSCH, Fernando et PAWLOTSKY, Jean-Michel. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. janvier 2017. Vol. 37, n° 1, pp. 5-18. DOI 10.1111/liv.13212.

16. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDSA Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 novembre 2018. Vol. 67, n° 10, pp. 1477-1492. DOI 10.1093/cid/ciy585.

17. LI, Jie Jack et JOHNSON, Douglas S. *Innovative Drug Synthesis*. . John Wiley & Sons, 2015. ISBN 978-1-118-82002-5.

18. TONG, Xiao, LE POGAM, Sophie, LI, Lewyn, HAINES, Kristin, PISO, Katherine, BARONAS, Victoria, YAN, Jun-Mei, SO, Sung-Sau, KLUMPP, Klaus et NÁJERA, Isabel. In Vivo Emergence of a Novel Mutant L159F/L320F in the NS5B Polymerase Confers Low-Level Resistance to the HCV Polymerase Inhibitors Mericitabine and Sofosbuvir. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 mars 2014. Vol. 209, n° 5, pp. 668-675. DOI 10.1093/infdis/jit562.

19. SVAROVSKAIA, Evguenia S., DVORY-SOBOL, Hadas, PARKIN, Neil, HEBNER, Christy, GONTCHAROVA, Viktoria, MARTIN, Ross, OUYANG, Wen, HAN, Bin, XU, Simin, KU, Karin, CHIU, Sophia, GANE, Edward, JACOBSON, Ira M., NELSON, David R., LAWITZ, Eric, WYLES, David L., BEKELE, Neby, BRAINARD, Diana, SYMONDS, William T., MCHUTCHISON, John G., MILLER, Michael D. et MO, Hongmei. Infrequent Development of Resistance in Genotype 1–6 Hepatitis C Virus–Infected Subjects Treated With Sofosbuvir in Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 décembre 2014. Vol. 59, n° 12, pp. 1666-1674. DOI 10.1093/cid/ciu697.

20. CLERCQ, Erik De. The design of drugs for HIV and HCV. *Nature Reviews Drug Discovery*. décembre 2007. Vol. 6, n° 12, pp. 1001-1018. DOI 10.1038/nrd2424.

21. PATEL, Parth H. et ZULFIQAR, Hassam. *Reverse Transcriptase Inhibitors*. [en ligne]. StatPearls Publishing, 2022. [Consulté le 4 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551504/>

22. CLUTTER, Dana S, JORDAN, Michael R, BERTAGNOLIO, Silvia et SHAFER, Robert W. HIV-1 Drug Resistance and Resistance Testing. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. décembre 2016. Vol. 46, pp. 292-307. DOI 10.1016/j.meegid.2016.08.031.

23. MBHELE, Nokuzola, CHIMUKANGARA, Benjamin et GORDON, Michelle. HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 mai 2021. Vol. 57, n° 5, pp. 106343. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2021.106343.

24. ARTS, Eric J. et HAZUDA, Daria J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. avril 2012. Vol. 2, n° 4, pp. a007161. DOI 10.1101/cshperspect.a007161.
25. CROXTALL, Jamie D. et PERRY, Caroline M. Lopinavir/Ritonavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. *Drugs*. 1 octobre 2010. Vol. 70, n° 14, pp. 1885-1915. DOI 10.2165/11204950-000000000-00000.
26. WEI, Xiping, DECKER, Julie M., LIU, Hongmei, ZHANG, Zee, ARANI, Ramin B., KILBY, J. Michael, SAAG, Michael S., WU, Xiaoyun, SHAW, George M. et KAPPES, John C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. juin 2002. Vol. 46, n° 6, pp. 1896-1905. DOI 10.1128/AAC.46.6.1896-1905.2002.
27. SAAG, Michael S., GANDHI, Rajesh T., HOY, Jennifer F., LANDOVITZ, Raphael J., THOMPSON, Melanie A., SAX, Paul E., SMITH, Davey M., BENSON, Constance A., BUCHBINDER, Susan P., DEL RIO, Carlos, ERON, Joseph J., FÄTKENHEUER, Gerd, GÜNTHARD, Huldrych F., MOLINA, Jean-Michel, JACOBSEN, Donna M. et VOLBERDING, Paul A. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 27 octobre 2020. Vol. 324, n° 16, pp. 1651-1669. DOI 10.1001/jama.2020.17025.
28. EMA. Antiviral medicines for pandemic influenza. *European Medicines Agency*. [en ligne]. 17 septembre 2018. [Consulté le 17 avril 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/pandemic-influenza/antiviral-medicines-pandemic-influenza>
29. WANG, Jing-Fang et CHOU, Kuo-Chen. Recent Advances in Computational Studies on Influenza A Virus M2 Proton Channel. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 12, n° 10, pp. 971-978.
30. BEAN, W. J., THRELKELD, S. C. et WEBSTER, R. G. Biologic potential of amantadine-resistant influenza A virus in an avian model. *The Journal of Infectious Diseases*. juin 1989. Vol. 159, n° 6, pp. 1050-1056. DOI 10.1093/infdis/159.6.1050.
31. KODE, Sadhana S., PAWAR, Shailesh D., TARE, Deeksha S., KENG, Sachin S. et MULLICK, Jayati. Amantadine resistance markers among low pathogenic avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry in India, during 2009–2017. *Microbial Pathogenesis*. 1 décembre 2019. Vol. 137, pp. 103779. DOI 10.1016/j.micpath.2019.103779.
32. FERRARIS, Olivier, KESSLER, Nicole, VALETTE, Martine et LINA, Bruno. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine*. 10 novembre 2006. Vol. 24, n° 44-46, pp. 6656-6659. DOI 10.1016/j.vaccine.2006.05.050.
33. LACKENBY, A., HUNGNES, O., DUDMAN, S. G., MEIJER, A., PAGET, W. J., HAY, A. J. et ZAMBON, M. C. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance*. 31 janvier 2008. Vol. 13, n° 5, pp. 3-4. DOI 10.2807/ese.13.05.08026-en.
34. KISO, Maki, MITAMURA, Keiko, SAKAI-TAGAWA, Yuko, SHIRAISHI, Kyoko, KAWAKAMI, Chiharu, KIMURA, Kazuhiro, HAYDEN, Frederick G., SUGAYA, Norio et KAWAOKA, Yoshihiro. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet (London, England)*. 28 septembre 2004. Vol. 364, n° 9436, pp. 759-765. DOI 10.1016/S0140-6736(04)16934-1.
35. HATAKEYAMA, Shuji, SUGAYA, Norio, ITO, Mutsumi, YAMAZAKI, Masahiko, ICHIKAWA, Masataka, KIMURA, Kazuhiro, KISO, Maki, SHIMIZU, Hideaki, KAWAKAMI, Chiharu, KOIKE, Kazuhiko,

- MITAMURA, Keiko et KAWAOKA, Yoshihiro. Emergence of Influenza B Viruses With Reduced Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. *JAMA*. 4 avril 2007. Vol. 297, n° 13, pp. 1435-1442. DOI 10.1001/jama.297.13.1435.
36. A, Isaacs et J, Lindenmann. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. [en ligne]. 9 décembre 1957. Vol. 147, n° 927. [Consulté le 4 janvier 2022]. DOI 10.1098/rspb.1957.0048.
37. STARK, George R., KERR, Ian M., WILLIAMS, Bryan R. G., SILVERMAN, Robert H. et SCHREIBER, Robert D. How Cells Respond to Interferons. *Annual Review of Biochemistry*. 1998. Vol. 67, n° 1, pp. 227-264. DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.
38. FORERO, Adriana, OZARKAR, Snehal, LI, Hongchuan, LEE, Chia Heng, HEMANN, Emily A., NADJOMBATI, Marija S., HENDRICKS, Matthew R., SO, Lomon, GREEN, Richard, ROY, Chandra N., SARKAR, Saumendra N., VON MOLTKE, Jakob, ANDERSON, Stephen K., GALE, Michael et SAVAN, Ram. Differential activation of the transcription factor IRF1 underlies the distinct immune responses elicited by type I and type III interferons. *Immunity*. 17 septembre 2019. Vol. 51, n° 3, pp. 451-464.e6. DOI 10.1016/j.immuni.2019.07.007.
39. GROOM, Joanna R et LUSTER, Andrew D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology and cell biology*. février 2011. Vol. 89, n° 2, pp. 10.1038/icb.2010.158. DOI 10.1038/icb.2010.158.
40. SEN, G. C. Viruses and interferons. *Annual Review of Microbiology*. 2001. Vol. 55, pp. 255-281. DOI 10.1146/annurev.micro.55.1.255.
41. HUANG, Yan, LI, Ming-Hui, HOU, Min et XIE, Yao. Peginterferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis C in the era of direct-acting antivirals. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 15 octobre 2017. Vol. 16, n° 5, pp. 470-479. DOI 10.1016/S1499-3872(17)60044-4.
42. PETERS VAN TON, A. M., GEVERS, T. J. G. et DRENTH, J. P. H. Antiviral therapy in chronic hepatitis E: a systematic review. *Journal of Viral Hepatitis*. 2015. Vol. 22, n° 12, pp. 965-973. DOI 10.1111/jvh.12403.
43. BESSIÈRE, Pierre, WASNIEWSKI, Marine, PICARD-MEYER, Evelyne, SERVAT, Alexandre, FIGUEROA, Thomas, FORET-LUCAS, Charlotte, COGGON, Amelia, LESELLIER, Sandrine, BOUÉ, Frank, CEBRON, Nathan, GAUSSERÈS, Blandine, TRUMEL, Catherine, FOUCRAS, Gilles, SALGUERO, Francisco J., MONCHATRE-LEROY, Elodie et VOLMER, Romain. Intranasal type I interferon treatment is beneficial only when administered before clinical signs onset in the SARS-CoV-2 hamster model. *PLoS Pathogens*. 9 août 2021. Vol. 17, n° 8, pp. e1009427. DOI 10.1371/journal.ppat.1009427.
44. ALAO, Hawwa et JAKE LIANG, T. Alternative interferons and immunomodulators in the treatment of hepatitis C. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. février 2014. Vol. 34 Suppl 1, pp. 133-138. DOI 10.1111/liv.12402.
45. MALIK, U. R., MAKOWER, D. F. et WADLER, S. Interferon-mediated fatigue. *Cancer*. 15 septembre 2001. Vol. 92, n° 6 Suppl, pp. 1664-1668. DOI 10.1002/1097-0142(20010915)92:6+<1664::aid-cnrc1494>3.0.co;2-9.
46. LIN, Fan-ching et YOUNG, Howard A. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. août 2014. Vol. 25, n° 4, pp. 369-376. DOI 10.1016/j.cytogfr.2014.07.015.

47. BRAND, Stephan, ZITZMANN, Kathrin, DAMBACHER, Julia, BEIGEL, Florian, OLSZAK, Torsten, VLOTIDES, George, EICHHORST, Sören T., GÖKE, Burkhard, DIEPOLDER, Helmut et AUERNHAMMER, Christoph J. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon- λ s IL-28A and IL-29. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 3 juin 2005. Vol. 331, n° 2, pp. 543-548. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.04.004.
48. VIDAL, David. Topical Imiquimod: Mechanism of Action and Clinical Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 6, n° 5, pp. 499-503.
49. HOBER, D., AJRAM, L., CHEHADEH, W., LAZREK, M., GOFFARD, A., DEWILDE, A. et WATTRÉ, P. [Mechanisms of imiquimod indirect antiviral activity]. *Annales De Biologie Clinique*. avril 2005. Vol. 63, n° 2, pp. 155-163.
50. GULICK, Roy M., LALEZARI, Jacob, GOODRICH, James, CLUMECK, Nathan, DEJESUS, Edwin, HORBAN, Andrzej, NADLER, Jeffrey, CLOTET, Bonaventura, KARLSSON, Anders, WOHLFEILER, Michael, MONTANA, John B., MCHALE, Mary, SULLIVAN, John, RIDGWAY, Caroline, FELSTEAD, Steve, DUNNE, Michael W., VAN DER RYST, Elna et MAYER, Howard. Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 HIV-1 Infection. *The New England journal of medicine*. 2 octobre 2008. Vol. 359, n° 14, pp. 1429-1441. DOI 10.1056/NEJMoa0803152.
51. CRABB, Charlene. GlaxoSmithKline ends aplaviroc trials. *AIDS*. 21 mars 2006. Vol. 20, n° 5, pp. 641. DOI 10.1097/01.aids.0000216362.59657.96.
52. CASEIRO, Marcos M., NELSON, Mark, DIAZ, Ricardo S., GATHE, Joseph, DE ANDRADE NETO, Jose L., SLIM, Jihad, SOLANO, Antonio, NETTO, Eduardo M., MAK, Carmen, SHEN, Junwa, GREAVES, Wayne, DUNKLE, Lisa M., VILCHEZ, Regis A. et ZEINECKER, Jennifer. Vicriviroc plus optimized background therapy for treatment-experienced subjects with CCR5 HIV-1 infection: final results of two randomized phase III trials. *The Journal of Infection*. octobre 2012. Vol. 65, n° 4, pp. 326-335. DOI 10.1016/j.jinf.2012.05.008.
53. BABA, Masanori, TAKASHIMA, Katsunori, MIYAKE, Hiroshi, KANZAKI, Naoyuki, TESHIMA, Koichiro, WANG, Xin, SHIRAIISHI, Mitsuru et IIZAWA, Yuji. TAK-652 Inhibits CCR5-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection In Vitro and Has Favorable Pharmacokinetics in Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. novembre 2005. Vol. 49, n° 11, pp. 4584-4591. DOI 10.1128/AAC.49.11.4584-4591.2005.
54. LOBRITZ, Michael A., RATCLIFF, Annette N., MAROZSAN, Andre J., DUDLEY, Dawn M., TILTON, John C. et ARTS, Eric J. Multifaceted Mechanisms of HIV Inhibition and Resistance to CCR5 Inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. juin 2013. Vol. 57, n° 6, pp. 2640-2650. DOI 10.1128/AAC.02511-12.
55. THOMPSON, Melanie, SAAG, Michael, DEJESUS, Edwin, GATHE, Joseph, LALEZARI, Jay, LANDAY, Alan L., CADE, Jerry, ENEJOSA, Jeffrey, LEFEBVRE, Eric et FEINBERG, Judith. A 48-week randomized phase 2b study evaluating cenicriviroc versus efavirenz in treatment-naïve HIV-infected adults with C-C chemokine receptor type 5-tropic virus. *AIDS (London, England)*. 27 mars 2016. Vol. 30, n° 6, pp. 869-878. DOI 10.1097/QAD.0000000000000988.
56. VISSEAU, Benoit, CHARPENTIER, Charlotte, COLLIN, Gilles, BERTINE, Mélanie, PEYTAVIN, Gilles, DAMOND, Florence, MATHERON, Sophie, LEFEBVRE, Eric, BRUN-VÉZINET, Françoise et DESCAMPS, Diane. Cenicriviroc, a Novel CCR5 (R5) and CCR2 Antagonist, Shows In Vitro Activity against R5 Tropic HIV-2 Clinical Isolates. *PLoS ONE*. 6 août 2015. Vol. 10, n° 8, pp. e0134904. DOI 10.1371/journal.pone.0134904.

57. JUBB, Becky, LEWIS, Marilyn, MCFADYEN, Lynn, SIMPSON, Paul, MORI, Julie, CHAN, Phylinda, WEATHERLEY, Barry, VAN DER RYST, Elna, WESTBY, Mike et CRAIG, Charles. Incidence of CXCR4 tropism and CCR5-tropic resistance in treatment-experienced participants receiving maraviroc in the 48-week MOTIVATE 1 and 2 trials. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 19 décembre 2019. Vol. 27, pp. 2040206619895706. DOI 10.1177/2040206619895706.
58. EMU, Brinda, FESSEL, Jeffrey, SCHRADER, Shannon, KUMAR, Princy, RICHMOND, Gary, WIN, Sandra, WEINHEIMER, Steven, MARSOLAIS, Christian et LEWIS, Stanley. Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *The New England Journal of Medicine*. 16 août 2018. Vol. 379, n° 7, pp. 645-654. DOI 10.1056/NEJMoa1711460.
59. DHODY, Kush, POURHASSAN, Nader, KAZEMPOUR, Kazem, GREEN, Derry, BADRI, Shide, MEKONNEN, Hana, BURGER, Denis et MADDON, Paul J. PRO 140, a monoclonal antibody targeting CCR5, as a long-acting, single-agent maintenance therapy for HIV-1 infection. *HIV clinical trials*. juin 2018. Vol. 19, n° 3, pp. 85-93. DOI 10.1080/15284336.2018.1452842.
60. HENDRIX, Craig W., FLEXNER, Charles, MACFARLAND, Ronald T., GIANDOMENICO, Christen, FUCHS, Edward J., REDPATH, Ella, BRIDGER, Gary et HENSON, Geoffrey W. Pharmacokinetics and Safety of AMD-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. juin 2000. Vol. 44, n° 6, pp. 1667-1673.
61. FLOMENBERG, Neal, DIPERSIO, John et CALANDRA, Gary. Role of CXCR4 chemokine receptor blockade using AMD3100 for mobilization of autologous hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematologica*. 2005. Vol. 114, n° 4, pp. 198-205. DOI 10.1159/000088410.
62. MARTIN, Alexander J. et JANS, David A. Antivirals that target the host IMP α / β 1-virus interface. *Biochemical Society Transactions*. 26 février 2021. Vol. 49, n° 1, pp. 281-295. DOI 10.1042/BST20200568.
63. LÓPEZ-MEDINA, Eduardo, LÓPEZ, Pío, HURTADO, Isabel C., DÁVALOS, Diana M, RAMIREZ, Oscar, MARTÍNEZ, Ernesto, DÍAZGRANADOS, Jesus A., OÑATE, José M., CHAVARRIAGA, Hector, HERRERA, Sócrates, PARRA, Beatriz, LIBREROS, Gerardo, JARAMILLO, Roberto, AVENDAÑO, Ana C., TORO, Dilian F., TORRES, Miyerlandi, LESMES, Maria C., RIOS, Carlos A. et CAICEDO, Isabella. Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19. *JAMA*. 13 avril 2021. Vol. 325, n° 14, pp. 1426-1435. DOI 10.1001/jama.2021.3071.
64. VALLEJOS, Julio, ZONI, Rodrigo, BANGHER, María, VILLAMANDOS, Silvina, BOBADILLA, Angelina, PLANO, Fabian, CAMPIAS, Claudia, CHAPARRO CAMPIAS, Evangelina, MEDINA, Maria Fernanda, ACHINELLI, Fernando, GUGLIELMONE, Hector Andres, OJEDA, Jorge, FARIZANO SALAZAR, Diego, ANDINO, Gerardo, KAWERIN, Pablo, DELLAMEA, Silvana, AQUINO, Antonia Cristina, FLORES, Victor, MARTEMUCCI, Carolina N., MARTINEZ, Silvina Maria, SEGOVIA, Juan Emanuel, REYNOSO, Paola Itati, SOSA, Noelia Carolina, ROBLEDO, Mariana Elizabeth, GUARROCHENA, Joaquina Maria, VERNENGO, Maria Mercedes, RUIZ DIAZ, Natalia, MEZA, Elba et AGUIRRE, María Gabriela. Ivermectin to prevent hospitalizations in patients with COVID-19 (IVERCOR-COVID19) a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Infectious Diseases*. 2 juillet 2021. Vol. 21, pp. 635. DOI 10.1186/s12879-021-06348-5.
65. FRAUSTO, Stephen D., LEE, Emily et TANG, Hengli. Cyclophilins as Modulators of Viral Replication. *Viruses*. 11 juillet 2013. Vol. 5, n° 7, pp. 1684-1701. DOI 10.3390/v5071684.
66. Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. [en ligne]. [Consulté le 5 janvier 2022].

67. TANAKA, Yoshikazu, SATO, Yuka, OSAWA, Shuichi, INOUE, Mai, TANAKA, Satoka et SASAKI, Takashi. Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A. *Veterinary Research*. 2012. Vol. 43, n° 1, pp. 41. DOI 10.1186/1297-9716-43-41.
68. PFEFFERLE, Susanne, SCHÖPF, Julia, KÖGL, Manfred, FRIEDEL, Caroline C., MÜLLER, Marcel A., CARBAJO-LOZOYA, Javier, STELLBERGER, Thorsten, VON DALL'ARMI, Ekatarina, HERZOG, Petra, KALLIES, Stefan, NIEMEYER, Daniela, DITT, Vanessa, KURI, Thomas, ZÜST, Roland, PUMPOR, Ksenia, HILGENFELD, Rolf, SCHWARZ, Frank, ZIMMER, Ralf, STEFFEN, Imke, WEBER, Friedemann, THIEL, Volker, HERRLER, Georg, THIEL, Heinz-Jürgen, SCHWEGMANN-WESSELS, Christel, PÖHLMANN, Stefan, HAAS, Jürgen, DROSTEN, Christian et VON BRUNN, Albrecht. The SARS-Coronavirus-Host Interactome: Identification of Cyclophilins as Target for Pan-Coronavirus Inhibitors. *PLoS Pathogens*. 27 octobre 2011. Vol. 7, n° 10, pp. e1002331. DOI 10.1371/journal.ppat.1002331.
69. PAWLITSKY, Jean-Michel. SARS-CoV-2 pandemic : Time to revive the cyclophilin inhibitor alisporivir. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 mai 2020. pp. ciaa587. DOI 10.1093/cid/ciaa587.
70. TOTURA, Allison L. et BAVARI, Sina. Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 8 mars 2019. Vol. 14, n° 4, pp. 397-412. DOI 10.1080/17460441.2019.1581171.
71. SOFTIC, Laurent, BRILLET, Rozenn, BERRY, François, AHNOU, Nazim, NEVERS, Quentin, MORIN-DEWAELE, Margot, HAMADAT, Sabah, BRUSCELLA, Patrice, FOURATI, Slim, PAWLITSKY, Jean-Michel et AHMED-BELKACEM, Abdelhakim. Inhibition of SARS-CoV-2 Infection by the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir (Debio 025). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 23 juin 2020. Vol. 64, n° 7, pp. e00876-20. DOI 10.1128/AAC.00876-20.
72. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus - Flisiak - 2008 - Hepatology - Wiley Online Library. [en ligne]. [Consulté le 6 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22131>
73. PAWLITSKY, Jean-Michel, FLISIAK, Robert, SARIN, Shiv K., RASENACK, Jens, PIRATVISUTH, Teerha, CHUANG, Wan-Long, PENG, Cheng-Yuan, FOSTER, Graham R., SHAH, Samir, WEDEMEYER, Heiner, HÉZODE, Christophe, ZHANG, Wei, WONG, Kelly A., LI, Bin, AVILA, Claudio, NAOUMOV, Nikolai V. et TEAM, on behalf of the VITAL-1 study. Alisporivir plus ribavirin, interferon free or in combination with pegylated interferon, for hepatitis C virus genotype 2 or 3 infection. *Hepatology*. 2015. Vol. 62, n° 4, pp. 1013-1023. DOI 10.1002/hep.27960.
74. S, Zeuzem, FLISIAK, Robert, VIERLING, John, W, Mazur, MAZZELLA, Giuseppe, S, Thongsawat, ABDURAKHMANOV, Djamel, N, Van, CALISTRU, Petre, HEO, Jeong, CAROL, Stanciu, M, Gould, M, Makara, HSU, Shih-Jer, P, Buggisch, D, Samuel, D, Mutimer, B, Nault, MERZ, Michael et GROUP, ESSENTIAL. Randomised clinical trial: alisporivir combined with peginterferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection (ESSENTIAL II). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 4 août 2015. Vol. 42, pp. 829-844. DOI 10.1111/apt.13342.
75. PUYANG, Xiaoling, POULIN, Danielle L., MATHY, Joanna E., ANDERSON, Leah J., MA, Sue, FANG, Zheng, ZHU, Shejin, LIN, Kai, FUJIMOTO, Roger, COMPTON, Teresa et WIEDMANN, Brigitte. Mechanism of Resistance of Hepatitis C Virus Replicons to Structurally Distinct Cyclophilin Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. mai 2010. Vol. 54, n° 5, pp. 1981-1987. DOI 10.1128/AAC.01236-09.

76. PAWLOTSKY, Jean-Michel. What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? *Antiviral Research*. mai 2014. Vol. 105, pp. 22-25. DOI 10.1016/j.antiviral.2014.02.008.
77. V'KOVSKI, Philip, KRATZEL, Annika, STEINER, Silvio, STALDER, Hanspeter et THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews. Microbiology*. 28 octobre 2020. pp. 1-16. DOI 10.1038/s41579-020-00468-6.
78. JIN, Zhenming, DU, Xiaoyu, XU, Yechun, DENG, Yongqiang, LIU, Meiqin, ZHANG, Bing, LI, Xiaofeng, ZHANG, Leike, DUAN, Yinkai, YU, Jing, WANG, Lin, YANG, Kailin, LIU, Fengjiang, YOU, Tian, LIU, Xiaoce, YANG, Xiuna, BAI, Fang, LIU, Hong, LIU, Xiang, GUDDAT, Luke W, XIAO, Gengfu, QIN, Chengfeng, SHI, Zhengli, RAO, Zihé et YANG, Haitao. Structure-based drug design, virtual screening and high-throughput screening rapidly identify antiviral leads targeting COVID-19. . pp. 29.
79. PRASHANTHA, C. N., GOUTHAMI, K., LAVANYA, L., BHAVANAM, Sivaramireddy, JAKHAR, Ajay, SHAKTHIRAJU, R. G., SURAJ, V., SAHANA, K. V., SUJANA, H. S., GURUPRASAD, N. M. et RAMACHANDRA, R. Molecular screening of antimalarial, antiviral, anti-inflammatory and HIV protease inhibitors against spike glycoprotein of coronavirus. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 1 janvier 2021. Vol. 102, pp. 107769. DOI 10.1016/j.jmgm.2020.107769.
80. GOUJON, Caroline, REBENDENNE, Antoine, ROY, Priyanka, BONAVENTURE, Boris, VALADAO, Ana Chaves, DESMARETS, Lowiese, ROUILLÉ, Yves, TAUZIET, Marine, ARNAUD-ARNOULD, Mary, GIOVANNINI, Donatella, LEE, Yenarae, DEWEIRD, Peter, HEGDE, Mudra, DE GRACIA, Francisco Garcia, MCKELLAR, Joe, WENCKER, Mélanie, DUBUISSON, Jean, BELOUZARD, Sandrine, MONCORGÉ, Olivier et DOENCH, John. Bidirectional genome-wide CRISPR screens reveal host factors regulating SARS-CoV-2, MERS-CoV and seasonal HCoVs. *Research Square*. 27 mai 2021. pp. rs.3.rs-555275. DOI 10.21203/rs.3.rs-555275/v1.
81. RALL, T. W. et SUTHERLAND, Earl W. FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES. *Journal of Biological Chemistry*. 1 juin 1958. Vol. 232, n° 2, pp. 1065-1076. DOI 10.1016/S0021-9258(19)77422-5.
82. RALPH, R. K. Cyclic AMP, calcium and control of cell growth. *FEBS letters*. 5 septembre 1983. Vol. 161, n° 1, pp. 1-8. DOI 10.1016/0014-5793(83)80719-4.
83. HALLS, Michelle L. et COOPER, Dermot M. F. Adenylyl cyclase signalling complexes – Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*. 1 avril 2017. Vol. 172, pp. 171-180. DOI 10.1016/j.pharmthera.2017.01.001.
84. AHMED, Alveena, BOULTON, Stephen, SHAO, Hongzhao, AKIMOTO, Madoka, NATARAJAN, Amarnath, CHENG, Xiaodong et MELACINI, Giuseppe. Recent Advances in EPAC-Targeted Therapies: A Biophysical Perspective. *Cells*. 19 novembre 2019. Vol. 8, n° 11, pp. 1462. DOI 10.3390/cells8111462.
85. GUO, Li, LEE, Audrey A., RIZVI, Tilat A., RATNER, Nancy et KIRSCHNER, Lawrence S. The Protein Kinase A Regulatory Subunit R1A (Prkar1a) Plays Critical Roles in Peripheral Nerve Development. *The Journal of Neuroscience*. 13 novembre 2013. Vol. 33, n° 46, pp. 17967-17975. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0766-13.2013.
86. BIEL, Martin. Cyclic Nucleotide-regulated Cation Channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 3 avril 2009. Vol. 284, n° 14, pp. 9017-9021. DOI 10.1074/jbc.R800075200.

87. New kids on the block_ The Popeye domain containing (POPDC) protein family acting as a novel class of cAMP effector proteins in striated muscle | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 21 janvier 2022].
88. KRÄHLING, Anke Miriam, ALVAREZ, Luis, DEBOWSKI, Katharina, VAN, Qui, GUNKEL, Monika, IRSEN, Stephan, AL-AMOUDI, Ashraf, STRÜNKER, Timo, KREMMER, Elisabeth, KRAUSE, Eberhard, VOIGT, Ingo, WÖRTGE, Simone, WAISMAN, Ari, WEYAND, Ingo, SEIFERT, Reinhard, KAUPP, Ulrich Benjamin et WACHTEN, Dagmar. CRIS—A Novel cAMP-Binding Protein Controlling Spermiogenesis and the Development of Flagellar Bending. *PLoS Genetics*. 5 décembre 2013. Vol. 9, n° 12, pp. e1003960. DOI 10.1371/journal.pgen.1003960.
89. DE ROOIJ, Johan, ZWARTKRUIS, Fried J. T., VERHEIJEN, Mark H. G., COOL, Robbert H., NIJMAN, Sebastian M. B., WITTINGHOFER, Alfred et BOS, Johannes L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. décembre 1998. Vol. 396, n° 6710, pp. 474-477. DOI 10.1038/24884.
90. BANERJEE, Upasana et CHENG, Xiaodong. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*. 10 octobre 2015. Vol. 570, n° 2, pp. 157-167. DOI 10.1016/j.gene.2015.06.063.
91. FUJITA, Takayuki, UMEMURA, Masanari, YOKOYAMA, Utako, OKUMURA, Satoshi et ISHIKAWA, Yoshihiro. The role of Epac in the heart. *Cellular and Molecular Life Sciences*. février 2017. Vol. 74, n° 4, pp. 591-606. DOI 10.1007/s00018-016-2336-5.
92. BOUVET, BLONDEAU, et LEZOUALC'H. The Epac1 Protein: Pharmacological Modulators, Cardiac Signalosome and Pathophysiology. *Cells*. 29 novembre 2019. Vol. 8, n° 12, pp. 1543. DOI 10.3390/cells8121543.
93. Cell Cycle-dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP* | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 12 janvier 2022].
94. SEHRAWAT, Seema, ERNANDEZ, Thomas, CULLERE, Xavier, TAKAHASHI, Mikiko, ONO, Yoshitaka, KOMAROVA, Yulia et MAYADAS, Tanya N. AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties. *Blood*. 13 janvier 2011. Vol. 117, n° 2, pp. 708-718. DOI 10.1182/blood-2010-02-268870.
95. A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. [en ligne]. [Consulté le 25 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.282.5397.2275>
96. UENO, Hiroaki, SHIBASAKI, Tadao, IWANAGA, Toshihiko, TAKAHASHI, Kazuo, YOKOYAMA, Yuichi, LIU, Li-Mei, YOKOI, Norihide, OZAKI, Nobuaki, MATSUKURA, Shigeru, YANO, Hideki et SEINO, Susumu. Characterization of the Gene EPAC2: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Expression, and Identification of the Liver-Specific Isoform. *Genomics*. 1 novembre 2001. Vol. 78, n° 1, pp. 91-98. DOI 10.1006/geno.2001.6641.
97. OZAKI, Nobuaki, SHIBASAKI, Tadao, KASHIMA, Yasushige, MIKI, Takashi, TAKAHASHI, Kazuo, UENO, Hiroaki, SUNAGA, Yasuhiro, YANO, Hideki, MATSUURA, Yoshiharu, IWANAGA, Toshihiko, TAKAI, Yoshimi et SEINO, Susumu. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature Cell Biology*. novembre 2000. Vol. 2, n° 11, pp. 805-811. DOI 10.1038/35041046.
Bandiera_abtest: aCg_type: Nature Research Journalsnumber: 11Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing Group

98. SEHRAWAT, Seema, CULLERE, Xavier, PATEL, Sunita, ITALIANO, Joseph et MAYADAS, Tanya N. Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Molecular Biology of the Cell*. mars 2008. Vol. 19, n° 3, pp. 1261-1270. DOI 10.1091/mbc.e06-10-0972.
99. MEI, Fang C. et CHENG, Xiaodong. Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton. *Molecular bioSystems*. octobre 2005. Vol. 1, n° 4, pp. 325-331. DOI 10.1039/b511267b.
100. YARWOOD, S. J. Microtubule-associated proteins (MAPs) regulate cAMP signalling through exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). *Biochemical Society Transactions*. décembre 2005. Vol. 33, n° Pt 6, pp. 1327-1329. DOI 10.1042/BST20051327.
101. PETRACHE, Irina, BIRUKOVA, Anna, RAMIREZ, Sarah I., GARCIA, Joe G. N. et VERIN, Alexander D. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. mai 2003. Vol. 28, n° 5, pp. 574-581. DOI 10.1165/rcmb.2002-0075OC.
102. BIRUKOVA, Anna A., SMUROVA, Ksenya, BIRUKOV, Konstantin G., USATYUK, Peter, LIU, Feng, KAIBUCHI, Kozo, RICKS-CORD, Anila, NATARAJAN, Viswanathan, ALIEVA, Irina, GARCIA, Joe G. N. et VERIN, Alexander D. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. octobre 2004. Vol. 201, n° 1, pp. 55-70. DOI 10.1002/jcp.20055.
103. Rap1 ...Ecadherin. [en ligne]. [Consulté le 11 janvier 2022].
104. Exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1)-deficient mice develop β -cell dysfunction and metabolic syndrome. [en ligne]. [Consulté le 11 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.13-230433>
105. YANG, Ying, SHU, Xiaogang, LIU, Dan, SHANG, You, WU, Yan, PEI, Lei, XU, Xin, TIAN, Qing, ZHANG, Jia, QIAN, Kun, WANG, Ya-Xian, PETRALIA, Ronald S., TU, Weihong, ZHU, Ling-Qiang, WANG, Jian-zhi et LU, Youming. EPAC Null Mutation Impairs Learning and Social Interactions via Aberrant Regulation of miR-124 and Zif268 Translation. *Neuron*. 23 février 2012. Vol. 73, n° 4, pp. 774-788. DOI 10.1016/j.neuron.2012.02.003.
106. Distinct PKA and Epac compartmentalization in airway function and plasticity | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 12 janvier 2022].
107. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 25 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19110970/>
108. Epac and Phospholipase C μ Regulate Ca²⁺ Release in the Heart by Activation of Protein Kinase C μ and Calcium-Calmodulin Kinase II* | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 11 janvier 2022].
109. LAURENT, Anne-Coline, BISSERIER, Malik, LUCAS, Alexandre, TORTOSA, Florence, ROUMIEUX, Marie, DE RÉGIBUS, Annélie, SWIADER, Audrey, SAINTE-MARIE, Yannis, HEYMES, Christophe, VINDIS, Cécile et LEZOUALC'H, Frank. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 1 janvier 2015. Vol. 105, n° 1, pp. 55-64. DOI 10.1093/cvr/cvu242.

110. OKUMURA, Satoshi, FUJITA, Takayuki, CAI, Wenqian, JIN, Meihua, NAMEKATA, Iyuki, MOTOTANI, Yasumasa, JIN, Huiling, OHNUKI, Yoshiki, TSUNEOKA, Yayoi, KUROTANI, Reiko, SUITA, Kenji, KAWAKAMI, Yuko, HAMAGUCHI, Shogo, ABE, Takaya, KIYONARI, Hiroshi, TSUNEMATSU, Takashi, BAI, Yunzhe, SUZUKI, Sayaka, HIDAKA, Yuko, UMEMURA, Masanari, ICHIKAWA, Yasuhiro, YOKOYAMA, Utako, SATO, Motohiko, ISHIKAWA, Fumio, IZUMI-NAKASEKO, Hiroko, ADACHI-AKAHANE, Satomi, TANAKA, Hikaru et ISHIKAWA, Yoshihiro. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *Journal of Clinical Investigation*. 2 juin 2014. Vol. 124, n° 6, pp. 2785-2801. DOI 10.1172/JCI64784.
111. PEREIRA, Laëtitia, CHENG, Hongqiang, LAO, Dieu Hung, NA, Li, VAN OORT, Ralph J., BROWN, Joan Heller, WEHRENS, Xander H.T., CHEN, Ju et BERS, Donald M. Epac2 Mediates Cardiac β 1-Adrenergic Dependent SR Ca²⁺ Leak and Arrhythmia. *Circulation*. 26 février 2013. Vol. 127, n° 8, pp. 913-922. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.12.148619.
112. SUZUKI, Sayaka, YOKOYAMA, Utako, ABE, Takaya, KIYONARI, Hiroshi, YAMASHITA, Naoya, KATO, Yuko, KUROTANI, Reiko, SATO, Motohiko, OKUMURA, Satoshi et ISHIKAWA, Yoshihiro. Differential Roles of Epac in Regulating Cell Death in Neuronal and Myocardial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 30 juillet 2010. Vol. 285, n° 31, pp. 24248-24259. DOI 10.1074/jbc.M109.094581.
113. HARPER, Kelly, ARSENAULT, Dominique, BOULAY-JEAN, Stephanie, LAUZIER, Annie, LUCIEN, Fabrice et DUBOIS, Claire M. Autotaxin Promotes Cancer Invasion via the Lysophosphatidic Acid Receptor 4: Participation of the Cyclic AMP/EPAC/Rac1 Signaling Pathway in Invadopodia Formation. *Cancer Research*. 1 juin 2010. Vol. 70, n° 11, pp. 4634-4643. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-09-3813.
114. LEE, Jae-Wook, LEE, Jiyoung et MOON, Eun-Yi. HeLa Human Cervical Cancer Cell Migration Is Inhibited by Treatment with Dibutyl-*c*-AMP. *Anticancer Research*. 1 juillet 2014. Vol. 34, n° 7, pp. 3447-3455.
115. BALJINNYAM, Erdene, UMEMURA, Masanari, DE LORENZO, Mariana S, XIE, Lai-Hua, NOWYCKY, Martha, IWATSUBO, Mizuka, CHEN, Suzie, GOYDOS, James S et IWATSUBO, Kousaku. G β γ subunits inhibit Epac-induced melanoma cell migration. *BMC Cancer*. 17 juin 2011. Vol. 11, pp. 256. DOI 10.1186/1471-2407-11-256.
116. ALMAHARIQ, Muayad, TSALKOVA, Tamara, MEI, Fang C., CHEN, Haijun, ZHOU, Jia, SASTRY, Sarita K., SCHWEDE, Frank et CHENG, Xiaodong. A Novel EPAC-Specific Inhibitor Suppresses Pancreatic Cancer Cell Migration and Invasion. *Molecular Pharmacology*. janvier 2013. Vol. 83, n° 1, pp. 122-128. DOI 10.1124/mol.112.080689.
117. Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol, and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 17 janvier 2022].
118. ASLAM, Muhammad et LADILOV, Yury. Targeting the sAC-Dependent cAMP Pool to Prevent SARS-Cov-2 Infection. *Cells*. 25 août 2020. Vol. 9, n° 9, pp. E1962. DOI 10.3390/cells9091962.
119. ZHANG, Chengfei, YAN, Yan, HE, Hongwang, WANG, Li, ZHANG, Na, ZHANG, Jie, HUANG, Hongjun, WU, Nannan, REN, Hua, QIAN, Min, LIU, Mingyao et DU, Bing. IFN-stimulated P2Y13 protects mice from viral infection by suppressing the cAMP/EPAC1 signaling pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*. 1 mai 2019. Vol. 11, n° 5, pp. 395-407. DOI 10.1093/jmcb/mjy045.

120. Viruses | Free Full-Text | Exchange Protein Directly Activated by cAMP Modulates Ebola Virus Uptake into Vascular Endothelial Cells. [en ligne]. [Consulté le 17 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/10/563>
121. CHOI, Eun-Jin, WU, Wenzhe, CONG, Xiaoyan, ZHANG, Ke, LUO, Jiaqi, YE, Sha, WANG, Pingyuan, SURESH, Adarsh, ULLAH, Uneeb Mohammad, ZHOU, Jia et BAO, Xiaoyong. Broad Impact of Exchange Protein Directly Activated by cAMP 2 (EPAC2) on Respiratory Viral Infections. *Viruses*. 21 juin 2021. Vol. 13, n° 6, pp. 1179. DOI 10.3390/v13061179.
122. Exchange Proteins Directly Activated by cAMP and Their Roles in Respiratory Syncytial Virus Infection. [en ligne]. [Consulté le 17 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JVI.01200-18>
123. TAO, X., MEI, F., AGRAWAL, A., PETERS, C. J., KSIAZEK, T. G., CHENG, X. et TSENG, C.-T. K. Blocking of Exchange Proteins Directly Activated by cAMP Leads to Reduced Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology*. 1 avril 2014. Vol. 88, n° 7, pp. 3902-3910. DOI 10.1128/JVI.03001-13.
124. LAUDETTE, Marion, COLUCCIA, Antonio, SAINTE-MARIE, Yannis, SOLARI, Andrea, FAZAL, Loubina, SICARD, Pierre, SILVESTRI, Romano, MIALET-PEREZ, Jeanne, PONS, Sandrine, GHALEH, Bijan, BLONDEAU, Jean-Paul et LEZOUALC'H, Frank. Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress. *Cardiovascular Research*. [en ligne]. 14 mars 2019. [Consulté le 9 décembre 2021]. DOI 10.1093/cvr/cvz076.
125. BUFANO, Marianna, LAUDETTE, Marion, BLONDEAU, Jean-Paul, LEZOUALC'H, Frank, NALLI, Marianna, SILVESTRI, Romano, BRANCALE, Andrea et COLUCCIA, Antonio. Modeling Epac1 interactions with the allosteric inhibitor AM-001 by co-solvent molecular dynamics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. novembre 2020. Vol. 34, n° 11, pp. 1171-1179. DOI 10.1007/s10822-020-00332-y.
126. BOCCCELLA, Nicola, PAOLILLO, Roberta et PERRINO, Cinzia. Epac1 inhibition as a novel cardioprotective strategy: lights and shadows on GRK5 canonical and non-canonical functions. *Cardiovascular Research*. 1 octobre 2019. Vol. 115, n° 12, pp. 1684-1686. DOI 10.1093/cvr/cvz188.
127. COURILLEAU, Delphine, BOUYSSOU, Pascal, FISCHMEISTER, Rodolphe, LEZOUALC'H, Frank et BLONDEAU, Jean-Paul. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 25 octobre 2013. Vol. 440, n° 3, pp. 443-448. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.09.107.
128. CHEN, Haijun, TSALKOVA, Tamara, MEI, Fang C., HU, Yaohua, CHENG, Xiaodong et ZHOU, Jia. 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 juin 2012. Vol. 22, n° 12, pp. 4038-4043. DOI 10.1016/j.bmcl.2012.04.082.
129. YE, Na, ZHU, Yingmin, CHEN, Haijun, LIU, Zhiqing, MEI, Fang C., WILD, Christopher, CHEN, Haiying, CHENG, Xiaodong et ZHOU, Jia. Structure-Activity Relationship Studies of Substituted 2-(Isoxazol-3-yl)-2-oxo-*N'*-phenyl-acetohydrazonoyl Cyanide Analogues: Identification of Potent Exchange Proteins Directly Activated by cAMP (EPAC) Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 13 août 2015. Vol. 58, n° 15, pp. 6033-6047. DOI 10.1021/acs.jmedchem.5b00635.
130. YE, Na, ZHU, Yingmin, LIU, Zhiqing, MEI, Fang C., CHEN, Haiying, WANG, Pingyuan, CHENG, Xiaodong et ZHOU, Jia. Identification of novel 2-(benzo[d]isoxazol-3-yl)-2-oxo-N-

- phenylacetohydrazonoyl cyanide analogues as potent EPAC antagonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 7 juillet 2017. Vol. 134, pp. 62-71. DOI 10.1016/j.ejmech.2017.04.001.
131. Structure-activity relationships of 2-substituted phenyl-N-phenyl-2-oxoacetohydrazonoyl cyanides as novel antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP (EPACs) | Elsevier Enhanced Reader. [en ligne]. [Consulté le 20 janvier 2022].
132. BROWN, Loren M., ROGERS, Kathleen E., AROONSAKOOL, Nakon, MCCAMMON, J. Andrew et INSEL, Paul A. Allosteric Inhibition of Epac. *The Journal of Biological Chemistry*. 17 octobre 2014. Vol. 289, n° 42, pp. 29148-29157. DOI 10.1074/jbc.M114.569319.
133. Useful Numbers for Cell Culture - FR. [en ligne]. [Consulté le 2 février 2022]. Disponible à l'adresse: [//www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html](http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html)
134. REED, L.J. et MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*. 1 mai 1938. Vol. 27, n° 3, pp. 493-497. DOI 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
135. LANCER, Janice A. et HOWARD, Colin R. The disruption of infectious bronchitis virus (IBV-41 strain) with Triton X-100 detergent. *Journal of Virological Methods*. 1980. Vol. 1, n° 2, pp. 121-131. DOI 10.1016/0166-0934(80)90021-X.
136. CONG, Le et ZHANG, Feng. Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System. In : PRUETT-MILLER, Shondra M. (éd.), *Chromosomal Mutagenesis*. [en ligne]. New York, NY : Springer, 2015. pp. 197-217. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 2 février 2022]. ISBN 978-1-4939-1862-1.
137. SANJANA, Neville E., SHALEM, Ophir et ZHANG, Feng. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods*. août 2014. Vol. 11, n° 8, pp. 783-784. DOI 10.1038/nmeth.3047.
138. THYME, Summer B., AKHMETOVA, Laila, MONTAGUE, Tessa G., VALEN, Eivind et SCHIER, Alexander F. Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. *Nature Communications*. 10 juin 2016. Vol. 7, n° 1, pp. 11750. DOI 10.1038/ncomms11750.
139. TSAI, Shengdar Q., ZHENG, Zongli, NGUYEN, Nhu T., LIEBERS, Matthew, TOPKAR, Ved V., THAPAR, Vishal, WYVEKENS, Nicolas, KHAYTER, Cyd, IAFRATE, A. John, LE, Long P., ARYEE, Martin J. et JOUNG, J. Keith. GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature biotechnology*. février 2015. Vol. 33, n° 2, pp. 187-197. DOI 10.1038/nbt.3117.
140. Addgene lentiGuide-Puro Sequencing Result - Sequence Analyzer. [en ligne]. [Consulté le 31 janvier 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.addgene.org/browse/sequence/331247/>
141. MAUDET, Claire, BERTRAND, Matthieu, LE ROUZIC, Erwann, LAHOUESSA, Hichem, AYINDE, Diana, NISOLE, Sébastien, GOUJON, Caroline, CIMARELLI, Andrea, MARGOTTIN-GOGUET, Florence et TRANSY, Catherine. Molecular Insight into How HIV-1 Vpr Protein Impairs Cell Growth through Two Genetically Distinct Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 8 juillet 2011. Vol. 286, n° 27, pp. 23742-23752. DOI 10.1074/jbc.M111.220780.
142. LAKSONO, Brigitta M., DE VRIES, Rory D., MCQUAID, Stephen, DUPREX, W. Paul et DE SWART, Rik L. Measles Virus Host Invasion and Pathogenesis. *Viruses*. 28 juillet 2016. Vol. 8, n° 8, pp. 210. DOI 10.3390/v8080210.

143. YANAGI, Yusuke, TAKEDA, Makoto et OHNO, Shinji. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *Journal of General Virology*. 1 octobre 2006. Vol. 87, n° 10, pp. 2767-2779. DOI 10.1099/vir.0.82221-0.
144. SAEED, Mohammad F., KOLOKOLTSOV, Andrey A., FREIBERG, Alexander N., HOLBROOK, Michael R. et DAVEY, Robert A. Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS pathogens*. 29 août 2008. Vol. 4, n° 8, pp. e1000141. DOI 10.1371/journal.ppat.1000141.
145. GÜNDÜZ, Dursun, TROIDL, Christian, TANISLAV, Christian, ROHRBACH, Susanne, HAMM, Christian et ASLAM, Muhammad. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK Signalling in cAMP/Epac-Mediated Endothelial Barrier Stabilisation. *Frontiers in Physiology*. [en ligne]. 2019. Vol. 10. [Consulté le 14 février 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01387>
146. MEI, Fang C., QIAO, Jingbo, TSYGANKOVA, Oxana M., MEINKOTH, Judy L., QUILLIAM, Lawrence A. et CHENG, Xiaodong. Differential Signaling of Cyclic AMP: OPPOSING EFFECTS OF EXCHANGE PROTEIN DIRECTLY ACTIVATED BY CYCLIC AMP AND cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE ON PROTEIN KINASE B ACTIVATION*. *Journal of Biological Chemistry*. 29 mars 2002. Vol. 277, n° 13, pp. 11497-11504. DOI 10.1074/jbc.M110856200.
147. AYLLON, Juan, GARCÍA-SASTRE, Adolfo et HALE, Benjamin G. Influenza A viruses and PI3K. *Virulence*. 1 juillet 2012. Vol. 3, n° 4, pp. 411-414. DOI 10.4161/viru.20932.
148. HALE, B. G. et RANDALL, R. E. PI3K signalling during influenza A virus infections. *Biochemical Society Transactions*. avril 2007. Vol. 35, n° Pt 2, pp. 186-187. DOI 10.1042/BST0350186.
149. BUCHANAN, Christina M., LEE, Kate L. et SHEPHERD, Peter R. For Better or Worse: The Potential for Dose Limiting the On-Target Toxicity of PI 3-Kinase Inhibitors. *Biomolecules*. 22 août 2019. Vol. 9, n° 9, pp. E402. DOI 10.3390/biom9090402.
150. GONG, Bin, SHELITE, Thomas, MEI, Fang C., HA, Tuha, HU, Yaohua, XU, Guang, CHANG, Qing, WAKAMIYA, Maki, KSIAZEK, Thomas G., BOOR, Paul J., BOUYER, Donald H., POPOV, Vsevolod L., CHEN, Ju, WALKER, David H. et CHENG, Xiaodong. Exchange protein directly activated by cAMP plays a critical role in bacterial invasion during fatal rickettsioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 26 novembre 2013. Vol. 110, n° 48, pp. 19615-19620. DOI 10.1073/pnas.1314400110.
151. MARTINEZ, Juan J. et COSSART, Pascale. Early signaling events involved in the entry of Rickettsia conorii into mammalian cells. *Journal of Cell Science*. 1 octobre 2004. Vol. 117, n° 21, pp. 5097-5106. DOI 10.1242/jcs.01382.
152. GOPALAKRISHNA, Rayudu, GUNDIMEDA, Usha, ZHOU, Sarah, BUI, Helena, DAVIS, Andrew, MCNEILL, Thomas et MACK, William. Laminin-1 induces endocytosis of 67KDa laminin receptor and protects Neuroscreen-1 cells against death induced by serum withdrawal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1 janvier 2018. Vol. 495, n° 1, pp. 230-237. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.11.015.
153. TIO, Phaik Hooi, JONG, Wan Wui et CARDOSA, Mary Jane. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virology Journal*. 25 mars 2005. Vol. 2, pp. 25. DOI 10.1186/1743-422X-2-25.

154. NELSON, John, MCFERRAN, Neil V., PIVATO, Géraldine, CHAMBERS, Emma, DOHERTY, Caroline, STEELE, David et TIMSON, David J. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Bioscience Reports*. février 2008. Vol. 28, n° 1, pp. 33-48. DOI 10.1042/BSR20070004.
155. MANSILLA PAREJA, María Eugenia, GAURÓN, Maria Celeste, ROBLEDO, Esteban, AGUILERA, Milton Osmar et COLOMBO, María Isabel. The cAMP effectors, Rap2b and EPAC, are involved in the regulation of the development of the *Coxiella burnetii* containing vacuole by altering the fusogenic capacity of the vacuole. *PLoS ONE*. 14 février 2019. Vol. 14, n° 2, pp. e0212202. DOI 10.1371/journal.pone.0212202.
156. MESTRE, María Belén et COLOMBO, María Isabel. Staphylococcus aureus promotes autophagy by decreasing intracellular cAMP levels. *Autophagy*. 1 décembre 2012. Vol. 8, n° 12, pp. 1865-1867. DOI 10.4161/auto.22161.
157. PIA, Luisanna et ROWLAND-JONES, Sarah. Omicron entry route. *Nature Reviews Immunology*. 26 janvier 2022. pp. 1. DOI 10.1038/s41577-022-00681-9.
158. TUMMINO, Tia A., REZELJ, Veronica V., FISCHER, Benoit, FISCHER, Audrey, O'MEARA, Matthew J., MONEL, Blandine, VALLET, Thomas, WHITE, Kris M., ZHANG, Ziyang, ALON, Assaf, SCHADT, Heiko, O'DONNELL, Henry R., LYU, Jiankun, ROSALES, Romel, MCGOVERN, Briana L., RATHNASINGHE, Raveen, JANGRA, Sonia, SCHOTSAERT, Michael, GALARNEAU, Jean-René, KROGAN, Nevan J., URBAN, Laszlo, SHOKAT, Kevan M., KRUSE, Andrew C., GARCÍA-SASTRE, Adolfo, SCHWARTZ, Olivier, MORETTI, Francesca, VIGNUZZI, Marco, POGNAN, Francois et SHOICHET, Brian K. Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*. 30 juillet 2021. Vol. 373, n° 6554, pp. 541-547. DOI 10.1126/science.abi4708.
159. BREIDEN, Bernadette et SANDHOFF, Konrad. Emerging mechanisms of drug-induced phospholipidosis. *Biological Chemistry*. 18 décembre 2019. Vol. 401, n° 1, pp. 31-46. DOI 10.1515/hsz-2019-0270.
160. OBEIDAT, Mohammad, ISAACSON, Alexandra L., CHEN, Stephanie J., IVANOVIC, Marina et HOLANDA, Danniele. Zebra-like bodies in COVID-19: is phospholipidosis evidence of hydroxychloroquine induced acute kidney injury? *Ultrastructural Pathology*. 20 novembre 2020. Vol. 44, n° 4-6, pp. 519-523. DOI 10.1080/01913123.2020.1850966.
161. Addgene: pMD2.G. [en ligne]. [Consulté le 21 février 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.addgene.org/12259/>
162. Addgene: pCMVR8.74. [en ligne]. [Consulté le 21 février 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.addgene.org/22036/>

Toulouse 2022 THESE : 2022– TOU 3 – 4046

Titre : Propriétés antivirales d'AM-001, une molécule inhibant EPAC1, une protéine de l'hôte

Directeur de thèse : Dr Romain Volmer, Maître de conférences de l'ENVT, Microbiologie-Infectiologie

Nom : BERTIN

Prénom : Alexandre

Résumé : Les molécules antivirales visent le plus souvent le virus lui-même. Plus rarement, elles peuvent viser directement l'hôte dans le but de moduler la réaction inflammatoire induite par le virus ou de bloquer le cycle viral. AM-001 est une molécule inhibitrice spécifique d'EPAC1, une protéine de signalisation activée par l'AMP cyclique intervenant dans de nombreux phénomènes cellulaires. AM-001 possède une activité antivirale sur certains virus Influenza mais n'en présenterait pas contre le virus de la rougeole. Cette molécule n'est pas cytotoxique aux concentrations utilisées. Les résultats obtenus prouvent que cette molécule est assez intéressante pour être testée sur modèle vivant.

Mots clefs : antiviraux, AM-001, EPAC1, AMPc

Title: Antiviral properties of AM-001, a molecule inhibiting EPAC1, a host protein

Abstract: Antivirals target mostly virus itself. More rarely they directly target the host to modulate inflammatory reaction induced by the viral infection or block viral cycle. AM-001 is an inhibitory molecule that is specific of EPAC1, an exchange protein directly activated by cAMP. EPAC1 plays a role in many cellular mechanisms. AM-001 has an antiviral activity against Influenza virus but is ineffective against measles virus. The molecule is not cytotoxic when it is used to concentration that give an antiviral effect. The results showed here proved that AM-001 is ready to be tested in

Key words: antivirals, AM-001, EPAC1, cAMPs