




Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 23862

To cite this version:

Fusade-Boyer, Maxime . *Etude des propriétés antivirales d'un modulateur de la protéine Kinase R*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 107 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIVIRALES D'UN MODULATEUR DE LA PROTÉINE KINASE R

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

FUSADE-BOYER Maxime

Né, le 25/05/1990 à MELUN (77)

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Romain VOLMER

M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 03/11/2017

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>ÉPIDÉMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGÈRE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHÉSIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MÉDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MÉDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES ÉQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

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

Virologie-Infectiologie

Qui m'a permis de réaliser cette thèse bien choisie
Merci pour son soutien sans faille tout au long de ce travail, sa disponibilité, sa gentillesse et sa patience, que j'espère n'avoir pas trop mise à l'épreuve.
Qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie-Infectiologie

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse
Merci pour son implication dans le travail de cette thèse, sa disponibilité, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses précieux conseils au cours de ces cinq dernières années.
Qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

A ceux qui ont participé à cette thèse à travers leur collaboration

Le Docteur Sylvie Lecollinet – Directeur de recherches à ANSES/ ENVA Maison-Alfort

Le Docteur Pierre Olivier Vidalain – Directeur de recherche à l’Institut Pasteur de Paris

Le Docteur Franck Gallardo – Fondateur de Neovirtech Toulouse

Le Docteur Sokunthea Top – Chercheur à Neovirtech Toulouse

Le Docteur Pierre Bessière – Vétérinaire à l’UMR 1225 IHAP Toulouse

Josyane Loupiaz – Technicienne en virologie à l’UMR1225 IHAP Toulouse

Qu’ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères.

Table des matières

Liste des abréviations	9
Index des illustrations	13
Introduction	15
 Partie I : Etude Bibliographique	 17
I. L'immunité antivirale innée.....	17
A. La détection de l'infection virale	17
1. La reconnaissance des virus par les TLR	18
2. La reconnaissance des virus par les hélicases à ARN.....	20
3. La reconnaissance des virus par les NOD-like receptors.....	22
B. De la détection aux effecteurs : les IFN-I	22
C. Les effecteurs de la réponse antivirale	24
1. Le système 2'5'-oligoadénylate synthétase/RNase L et les protéines Mx	22
2. La voie PKR – eIF2 α -P – GADD34	26
a. <i>La protéine kinase R : un PRR également effecteur</i>	26
i. Les PAMPs activateurs de la PKR	31
b. <i>GADD34</i>	33
II. Interactions entre virus et la voie PKR/GADD34.....	37
A. Des virus inhibiteurs de PKR.....	37
B. Des virus avantagés par l'activation de la PKR.....	41
C. Des virus exprimant un homologue de GADD34.....	42
D. L'inhibition de GADD34 : une stratégie antivirale innovante	44
III. La sephin1 : un inhibiteur de GADD34.....	46
A. Utilisation de la sephin1 dans le cadre des maladies neurodégénératives	46
B. Propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques	47
1. Propriétés pharmacocinétiques.....	48
2. Etude de toxicité.....	48
 Partie II : Etude expérimentale.....	 50
I. Description du projet.....	50
II. Matériels et méthodes	50
A. Etudes <i>in vitro</i>	50
1. Etudes de l'effet antiviral en conditions <i>in vitro</i>	50
a. <i>Virus de la myxomatose</i>	50
b. <i>Virus hRSV</i>	52
c. <i>Virus de la rougeole</i>	53
d. <i>Virus influenza A</i>	53
e. <i>Virus West Nile</i>	54
f. <i>Virus de l'encéphalite japonaise</i>	54
2. Etude de l'impact de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α	54
a. <i>Virus de la myxomatose</i>	55
i. <i>Infection</i>	55

ii.	Lyse des cellules	55
iii.	Protocole de western blot	56
b.	<i>Virus de la rougeole</i>	57
3.	Etude de l'induction de GADD34 dans les cellules infectées	57
a.	<i>Induction de GADD34 par le virus de la myxomatose</i>	57
i.	Infection et stimulation à la tunicamycine	57
ii.	Lyse des cellules	58
iii.	Protocole d'immunoprécipitation.....	58
b.	<i>Etude de l'induction de GADD34 par le virus de la rougeole</i>	59
B.	Etudes de l'effet antiviral de la sephin1 en conditions <i>in vivo</i>	60
1.	Etudes chez le lapin	60
a.	<i>Infection expérimentale et administration de la sephin1</i>	60
b.	<i>Suivi de l'excrétion virale par PCR quantitative</i>	62
i.	Extraction d'ADN	62
ii.	Protocole de PCR quantitative.....	62
2.	Etudes chez la souris	63
a.	<i>Infection expérimentale et administration de la sephin1</i>	63
b.	<i>Evaluation de la charge virale par PCR quantitative</i>	65
i.	Extraction d'ARN	65
ii.	Protocole de RT-PCR quantitative.....	66
III.	Résultats	66
A.	Effet antiviral de la sephin1 démontré en culture cellulaire	66
B.	Absence d'effet antiviral de la sephin1 en culture cellulaire pour certains virus	70
C.	Etude de l'impact de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α	73
D.	Surexpression de GADD34 dans les cellules infectées	75
E.	Etudes de l'effet antivirale de la sephin1 en conditions <i>in vivo</i>	76
1.	Etude chez le lapin.....	76
2.	Etude chez la souris.....	78
IV.	Discussion	79
	Conclusion	87

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNdb :	Acide désoxyribonucléique double brins
ADNsb :	Acide désoxyribonucléique simple brin
ARNsb :	Acide ribonucléique simple brin
ARNdb :	Acide ribonucléique double brin
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
AIM2 :	Absent in melanoma 2
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATF4 :	Facteur d'activation de transcription 4
ATP :	Adénosine triphosphate
BP100 :	Boîte de pétri 100mm de diamètre
BSA :	Albumine de serum bovin
CARD :	Caspase activation and recruitment domain
CHIKV :	Virus du chikungunya
CHOP :	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CMVH :	Cytomégalovirus humain
CpG :	Cytidine-phosphate-guanosine
CReP :	Constitutive revertant of eIF2 ^{tive} revertant
DENV :	Virus de la dengue
DHX9 :	DEXH-Box Helicase 9
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dsRBD :	Double strand RNA binding domain
dsRMB :	Double strand RNA binding motif
EBV :	Virus Epstein-barre
EBOV :	Virus Ebola
ECP :	Effet cytopathique
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra- acétique
eEF1A :	Eukaryotic translation elongation factor 1A
eIF2/3/4/5 :	Eukaryotic initiation factor 2/3/4/5
eIF2 α :	Sous unité α du facteur d'initiation eucaryote 2
eIF2 α -P :	Sous unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 phosphorylée
eIF2B :	Eukaryotic initiation factor 2B
ERO1 :	Endoplasmic reticulum oxydoreductin
GCN2 :	General control nonderepressible 2
GDP :	Guanosine diphosphate
GP :	Glycoprotéines
GTP :	Guanosine triphosphate
HIV :	Virus de l'immunodéficience humaine
HPIV-1 :	Virus parainfluenza 1 humain
HPRT :	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRI :	Heme-regulated inhibitor
HRP :	Horseradish peroxidase
hRSV :	Virus respiratoire syncytial humain

HSV-1/2 :	Virus Herpes simplex de type 1 ou 2
IFI 200 :	Interferon-inducible 200
IFN-I :	Interférons de type I
IFNAR :	Interferon nterreceptor
IRES :	Internal ribosome entry site
IRF :	Interferon regulatory factor
ISG :	Interferon stimulated gene
ISRE :	Interferon sequence response element
IT08 :	Italy 2008
LASV :	Virus Lassa
LGP2 :	Laboratory of genetics and physiology 2
LPS :	Lipopolysacharides
LRR :	Leucin-Rich Repeats
MDA5 :	Melanoma differentiation associated protein 5
MDCK :	Madin-Darby canine kidney
MEM :	Minimum essential media
MOI :	Multiplicity of infection
MV :	Virus de la rougeole
MyD88 :	Myeloid differentiation primary response 88
MYXV :	Virus de la myxomatose
NDV :	Virus de la maladie de Newcastle
NiV :	Virus Nipah
NK :	Natural Killer
NLR :	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor
NLRC :	NOD-like receptor with caspase domain
NLRP3 :	NOD-like recpetor with pyrin domain 3
NOD :	Nucleotide-binding oligomerization domain
NS :	Non structural
NY99 :	New-York 1999
PACT :	Protein activator of the interferon-induced protein kinase
PAMP :	Pathogen associated molecular pattern
PBS :	Phosphate buffered saline
PCRq :	Polymerase chain reaction quantitative
PERK :	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFU :	Plaque forming unit
Poly(I:C) :	Acide polyinosinique-polycytidylique
PP1 :	Protéine phosphatase 1
PPP1R15A/B :	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A/15B
PRR :	Pattern recognition receptors
RHA :	RNA helicase A
RIG-I :	Retinoic acid-inducible gene I
RK13 :	Rabbit kidney cell line 13
RLR :	Retinoid acid-inducible gene (RIG)-like receptors
RNP :	Ribonucléoprotéine
ROS :	Reactive oxygen species
RT-PCRq :	Reverse transcription-polymerase chain reaction quantitative
RVFV :	Virus de la fièvre de la vallée du Rift
SeV :	Virus Sendai

SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFTSV :	Virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie
SID :	<i>Semel in die</i>
SVF :	Serum de veau foetal
TAR :	Transactivation responsive region
TBS :	Tris-buffered saline
TGS :	Tris-glycine-SDS
TIR :	Toll/interleukin-1 receptor
TLR :	Toll-like Receptor
TPCK :	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
uORF :	Upstream open reading frame
UTR :	Untranslated transcribed region
VACV :	Virus de la vaccine
VP35 :	Viral protein 35
VSV :	Virus de la stomatite vésiculeuse
WNV :	Virus West Nile

Index des illustrations

Figure 1 : Présentation des différents domaines des RLR et virus activateurs de RIG-I	21
Figure 2 : Schéma explicatif de la voie de signalisation simplifiée des IFN-I.....	24
Figure 3 : Voie d'activation du système 2'5'-OAS/RNase L.....	25
Figure 5 : Mode d'intervention d'eIF2 dans l'initiation de la traduction	28
Figure 6 : Implication de la phosphorylation d'eIF2 α dans l'arrêt de la synthèse protéique.....	29
Figure 7 : Différentes voies impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 α	30
Figure 8 : Voie simplifiée PKR-eIF2 α -GADD34	35
Figure 9 : Protéines virales inhibitrices de la PKR.....	41
Figure 10 : Alignement de séquences de la partie C-terminale de GADD34 humaine avec 31 autres protéines apparentées	43
Figure 11 : Structure chimique du guanabenz et de la sephin1	47
Figure 12 : Étude de l'effet antiviral de la sephin1 par infection de cellules RK13 par le MYXV.....	51
Figure 13 : Étude de l'effet de la sephin1 sur la phosphorylation de eIF2 α	55
Figure 14 : Infection expérimentale des lapins par le MYXV	61
Figure 15 : Plan de cages de l'infection expérimentale par le hRSV	63
Figure 16 : Infection expérimentale des souris par le hRSV.....	65
Figure 17 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules RK13 infectées par le MYXV	67
Figure 18 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules Hep2 infectées par le hRSV	68
Figure 19 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus MV-Luc.....	69
Figure 21 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus West Nile.....	71
Figure 22 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus de l'encéphalite japonaise.....	72
Figure 23 : Détection d'eIF2 α -P par western blot sur cellules RK13 à 6 et 24h post-infection par le MYXV	73
Figure 24 : Détection d'eIF2 α -P par western blot sur cellules 293T à 6 et 24h post-infection par le virus MV-Luc	74
Figure 25 : Détection de GADD34 par western blot après immunoprécipitation sur cellules RK13 infectées par le MYXV	75
Figure 26 : Détection de GADD34 par western blot après immunoprécipitation sur cellules 293T infectées par le virus MV-Luc	76
Figure 27 : Evolution de l'excrétion virale de lapins infectés par le MYXV en fonction du temps.....	77
Figure 28 : Etude de la charge virale en fonction des concentrations de sephin1 en conditions <i>in vivo</i>	78

Introduction

Qu'on le veuille ou non, notre monde est en changement perpétuel, et avec lui, les maladies qui en font partie. Il est désormais admis que de par la vitesse à laquelle nous adaptions notre environnement à nos attentes, nous favorisons l'émergence ou la ré-émergence de certaines maladies. Ainsi, la lutte contre les maladies infectieuses reste toujours d'actualité et doit être menée sur tous les fronts : de la compréhension des interactions entre hôte et agents pathogènes, à l'épidémiologie, en passant par le développement de nouveaux vaccins et stratégies thérapeutiques. Les virus, par leur capacité d'adaptation étonnante, ont toute leur place au sein de cette grande famille des maladies émergentes. Les antiviraux, un axe important de lutte contre les infections virales, présentent cependant des limites, du fait même de la physiopathologie des infections virales. En effet, les virus, des microorganismes à réplication intracellulaire passés maîtres dans l'art de détourner les systèmes physiologique et immunitaire, peuvent être parfois difficiles à atteindre. Peu de médicaments antiviraux spécifiques sont disponibles pour traiter les infections virales et l'arsenal thérapeutique est à ce jour limité. Certaines molécules sont efficaces *in vitro*, mais atteignent difficilement leur cible, administrées à un organisme vivant, et il faut ajouter à cela la problématique du développement de résistances de certains virus à certaines thérapies. Les mécanismes antiviraux qui ciblent l'hôte présentent généralement un spectre antiviral plus large et la barrière pour développer des résistances à ces molécules est généralement plus haute que pour les molécules ciblant directement des fonctions virales (Keeffe, Rossignol 2009). L'utilisation de l'interféron- α est un exemple de thérapie qui active les mécanismes antiviraux mis en place par l'hôte, mais qui présente toutefois des effets secondaires importants et qui requiert une administration parentérale.

Au cours de ce travail, nous proposons l'étude des propriétés antivirales d'une molécule interagissant avec un mécanisme de l'immunité antivirale innée : la voie PKR-eIF2 α -GADD34. Dans le cas d'une infection virale, l'activation de la PKR, une

protéine antivirale cellulaire, induit un blocage de la synthèse protéique dans les cellules infectées, afin d'enrayer la réplication virale, cette dernière nécessitant une machinerie cellulaire de traduction protéique fonctionnelle. GADD34, connue également sous la dénomination de PPP1R15A, entre en jeu comme rétrocontrôle négatif de ce système antiviral, en permettant un rétablissement de la synthèse protéique au sein de la cellule. Ainsi, il est possible qu'en inhibant GADD34 au cours d'une infection virale, le blocage de la synthèse protéique soit prolongé et renforcé de cette façon l'effet antiviral initié par l'activation de la PKR. Le choix de GADD34 comme cible thérapeutique présente un autre intérêt : en effet, la surexpression de GADD34 dans les cellules infectées observée pour certains virus suggère qu'un inhibiteur ciblant cette protéine aurait une plus grande spécificité pour les cellules infectées qui sont précisément celles où l'on souhaite observer un blocage de la synthèse protéique (Landeras-Bueno et al. 2016; Hölzer et al. 2016). C'est en utilisant la sephin1, une molécule de synthèse développée pour son action inhibitrice de GADD34 dans le traitement des maladies neurodégénératives chez l'homme, que nous avons décidé de tester cette hypothèse.

Après avoir précisé certains mécanismes de l'immunité innée essentiels à la compréhension de ce travail, nous avons étudié au cours de ce projet l'effet antiviral de la sephin1 en culture cellulaire, puis essayé de confirmer son activité inhibitrice de GADD34 avant d'envisager son étude en conditions *in vivo*.

Partie I : Etude Bibliographique

I. L'immunité antivirale innée

Suite à une infection virale, la réponse immunitaire innée de l'hôte vise à neutraliser rapidement le virus selon deux axes principaux : l'immunité innée intracellulaire dépendante essentiellement des interférons de type I (IFN-I) et l'immunité innée extracellulaire, basée sur l'intervention de plusieurs cellules spécialisées telles que les cellules « Natural Killer » (NK), macrophages et autres cellules immunitaires. Nous détaillerons seulement l'immunité innée intracellulaire, qui nous intéresse ici tout particulièrement.

A. La détection de l'infection virale

L'activation d'une réponse immunitaire précoce repose dans un premier temps sur la capacité de la cellule hôte à percevoir la présence du virus. Cette détection des agents pathogènes est permise par des récepteurs, souvent conservés au cours de l'évolution, appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRR). Ces PRR sont capables de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes appelés « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMP) comme des lipopolysaccharides, des lipoprotéines bactériennes, des protéines microbiennes et des nucléotides. Les conséquences de leur activation sont la synthèse d'IFN-I et/ou de plusieurs cytokines pro-inflammatoires aboutissant à la mise en place d'effecteurs antimicrobiens. Parmi les différents PRR identifiés jusqu'à présent, on compte notamment les Toll-like Receptors (TLR), les retinoid acid-inducible gene (RIG)-like receptors (RLR), les nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLR) et la famille des IFI 200 avec AIM2 (Kanneganti 2010; Wilkins, Gale 2010). Les PRR impliqués dans l'immunité antivirale sont principalement certains TLR et les RLR.

1. La reconnaissance des virus par les TLR

La structure générale d'un TLR comporte un domaine LRR (Leucin-Rich Repeats) extracellulaire, ou intra-vésiculaire pour les TLR endosomaux, riche en résidus leucine impliqués dans la reconnaissance des PAMP. Il comporte également un domaine transmembranaire et un domaine globulaire TIR (Toll-interleukin 1 Receptor) cytoplasmique impliqué dans la signalisation. Jusqu'à présent 10 TLR ont été identifiés chez l'homme et 12 chez la souris, ainsi que la plupart des PAMP permettant leur activation. Seule la partie LRR est responsable de la détection des pathogènes : ainsi, du fait de leur localisation, les TLR ne peuvent pas détecter de pathogènes à localisation cytoplasmique ou nucléaire. Les principaux TLR impliqués dans la réponse antivirale sont les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 avec également la découverte plus récente de l'implication du TLR4.

La localisation du TLR3 diffère selon le type cellulaire. Celui-ci est situé dans les endosomes des cellules dendritiques et exprimé à la surface cellulaire des fibroblastes et de certains macrophages (Matsumoto et al. 2003). Il est activé par la fixation d'ARN bicaténaire (ARNdb) génomique de certains virus ou celui produit lors de la multiplication virale. Il semblerait que l'activation du TLR3 induise préférentiellement la production de cytokines inflammatoires par rapport à celle d'IFN-I (Alexopoulou et al. 2001). Concernant le rôle joué par le TLR3 dans la réponse antivirale, il apparaît très variable en fonction des virus. Il a été rapporté que les souris TLR3^{-/-} étaient plus sensibles à l'infection par le cytomegalovirus murin (MCMV) que les souris de phénotype sauvage, soulignant ainsi le rôle du TLR3 dans la réponse antivirale. Cependant, cette observation n'est pas vérifiée pour tous les virus. En effet, pour plusieurs virus à ARN simple brin, tels que le virus West Nile, les *Phlebovirus*, et les virus influenza, l'activation du TLR3 semble être un facteur aggravant. Dans le cas du virus West Nile, il a été montré que la présence du TLR3 était nécessaire pour l'infection du système nerveux central par le virus (Wang et al. 2004). Pour les *Phlebovirus* et les virus influenza A, le rôle du TLR3 semble passer par une réponse pro-inflammatoire trop importante délétère à l'hôte (Le Goffic et al. 2006; Gowen et al. 2006, p. 3).

L'activation des TLR7, TLR8 et TLR9, exprimés dans les endosomes des cellules dendritiques plasmacytoïdes mène à la synthèse d'IFN-I en quantité importante,

notamment de sous-type α (Iwasaki, Medzhitov 2004). Les récepteurs TLR7 et TLR8 sont très proches d'un point de vue phylogénétique et reconnaissent tous deux les ARN monocaténaux riches en résidus guanosine et uridine, produits lors d'infections par des virus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), les virus influenza A ou le virus Sendai (Diebold et al. 2004; Lee et al. 2007). Le TLR9 est activé par des séquences d'ADN bactériens ou viraux contenant des dinucléotides CpG (cytidine-phosphate-guanosine) non méthylés. Il est ainsi impliqué dans la reconnaissance des herpesvirus HSV-1, HSV-2 et du cytomégalovirus murin (Hochrein et al. 2004; Lund et al. 2003). L'activation de ces TLR permet également la production de cytokines inflammatoires et d'IFN-I (Kawai, Akira 2006).

Le TLR4, présent préférentiellement à la surface des monocytes, macrophages et cellules dendritiques est surtout connu pour être activé par le LPS des bactéries à Gram négatif. Cependant, certains virus ont le pouvoir de l'activer, ce qui ne joue pas toujours en faveur de l'hôte, car cela peut engendrer la mise en place d'un processus inflammatoire marqué. Cela a notamment été décrit pour le virus Ebola, pour lequel l'activation du TLR4 par la protéine GP aboutit à une augmentation du bourgeonnement viral et serait probablement un des facteurs impliqués dans le processus inflammatoire sévère observé chez les patients infectés par ce virus (Okumura et al. 2010; Saghazadeh, Rezaei 2017). Les patients atteints par le virus RSV présentent souvent un processus inflammatoire marqué et l'implication du TLR4 dans ce phénomène a également été suspectée et débattue (Kurt-Jones et al. 2000; Lizundia et al. 2008; Ehl et al. 2004; Marr, Turvey 2012).

2. La reconnaissance des virus par les hélicases à ARN

Il a été montré que, dans les cellules dendritiques, une infection par le hRSV déclenchait la production d'IFN-I indépendamment de l'intervention des TLR et de la PKR, mais de manière entièrement dépendante de la voie d'entrée du virus dans le cytosol et de sa réplication (Hornung et al. 2004). Ces observations suggèrent l'existence de récepteurs autres, capables de détecter la présence des virus dans le cytoplasme. Le récepteur retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) fut la première protéine de cette nouvelle famille de récepteurs impliqués dans la réponse antivirale à être identifiée comme un acteur de la reconnaissance des acides nucléiques viraux dans le cytoplasme, éclairant ainsi sur les voies alternatives aux TLR dans la détection des virus.

Les RIG-I like récepteurs (RLRs) sont une famille de PRR cytosoliques essentiels dans la détection des virus à ARN et à l'initiation de la réponse immunitaire innée. La famille des RLRs comporte trois types de récepteurs : les Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) et Laboratory of genetics an physiology 2 (LGP2). Ces trois récepteurs sont exprimés par la plupart des cellules immunitaires et non immunitaires, et leur activation aboutit à la production d'IFN-I via IRF3 et IRF7, ainsi qu'à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via NFκB. RIG-I et MDA5 reconnaissent différents types d'acides nucléiques viraux, mais donnent lieu à la même voie de signalisation. RIG-I est impliqué dans la reconnaissance de nombreux virus à ARN, tels que le virus Sendai, les virus influenza A et B, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le virus de la rougeole (MV), le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus Ebola (EBOV), le virus de la dengue (DENV) et le virus de l'hépatite C (Fig.1). L'activation de RIG-I repose sur son interaction avec de courtes molécules d'ARN double ou simple brin, pourvues d'un groupement triphosphate à leur extrémité 5' (Pichlmair et al. 2006). Ce dernier est présent sur l'ARN de nombreux virus, contrairement aux ARN cellulaires qui portent une coiffe en 5' : 7-methyl guanosine pour les ARNm ou monophosphate pour les ARNt et les ARNr (Schlee et al. 2007). La présence du groupement triphosphate en 5' semble importante pour la reconnaissance d'ARNsb, mais est discutée pour la reconnaissance des ARNdb par RIG-I (Kato et al. 2008; Schmidt et al. 2009). De façon plus surprenante, l'infection par certains virus à ADN peut être

détectée par RIG-I. Cela a été montré pour l'Herpes Simplex de type I (HSV-I), le virus Epstein-Barr (EBV) et le virus de la vaccine (VACV) (Melchjorsen et al. 2010; Chiu, Macmillan, Chen 2009; Samanta et al. 2006) (Fig 1). L'intervention de RIG-I dans l'immunité antivirale de ces virus peut s'expliquer par la synthèse d'ARNdb avec une extrémité 5' triphosphate obtenue après action de l'ARN polymérase III, participant ainsi à l'immunité innée (Chiu, Macmillan, Chen 2009). Le récepteur MDA5 est impliqué dans la reconnaissance de longs fragments d'ARNdb de taille supérieure à 1kb, non présents dans les cellules à l'état physiologique. Les *Picornaviridae* ont été les premiers virus à être identifiés comme activateur de MDA5, puis d'autres ont suivi par la suite, tels que le virus West Nile, le virus de la rage, le virus de la dengue et les rotavirus, pour lesquels MDA5 intervient de manière synergique avec RIG-I, ces virus pouvant donc être reconnus par les deux récepteurs. Enfin, MDA5 et RIG-I sont tous deux capables de détecter des fragments d'ARN présentant un groupement monophosphate à leur extrémité 3', ces fragments étant le fruit de l'action d'une RNase antivirale : la RNase L (Malathi et al. 2007, 2010).

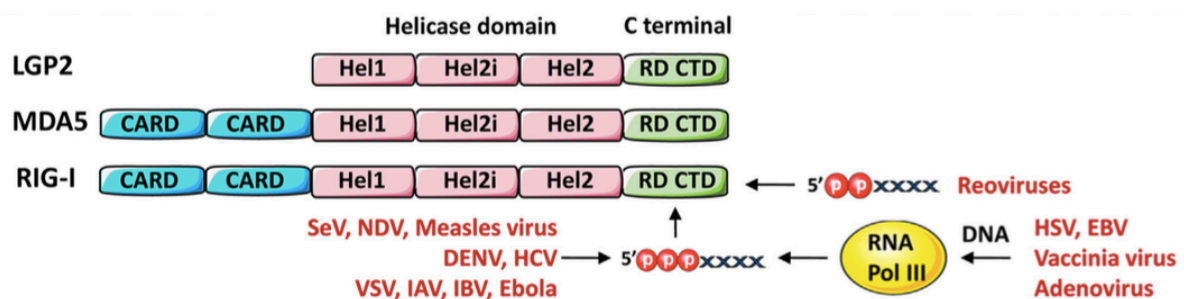


Figure 1 : Présentation des différents domaines des RLR et virus activateurs de RIG-I
D'après Liu, Olganier, Lin 2017

Les virus ont innové de façon à déjouer la plupart des mécanismes de défense antivirale. Le virus de la rougeole est par exemple capable de bloquer la déphosphorylation de RIG-I, étape essentielle à son activation (Mesman et al. 2014). Le virus hRSV, ainsi que les virus de la dengue et le virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopenie (SFTSV), empêchent la migration de RIG-I ou de MAVS vers la mitochondrie (Santiago et al. 2014; Rey-Jurado, Kalergis 2017). Le

virus hRSV est également capable, via les protéines NS1 et NS2, de provoquer la dégradation de RIG-I par les protéasomes (Goswami et al. 2013). La protéine NS1 des virus influenza A inhibe l'ubiquitination de RIG-I par TRIM25 (Rajsbaum et al. 2012). Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, les hantavirus et le virus de la maladie de Borna ont opté pour la stratégie du camouflage, en ôtant de manière post-transcriptionnelle le groupement 5' triphosphate, inhibant ainsi leur détection par RIG-I (Habjan et al. 2008). Bien entendu, il existe une multitude d'autres stratégies employées par les virus pour contrecarrer les voies de signalisation des RLR.

3. La reconnaissance des virus par les NOD-like receptors

Les NLR sont des protéines cytoplasmiques connues pour leur implication dans la régulation de la réponse inflammatoire et de l'apoptose. Ce n'est que récemment que leur importance dans la réponse antivirale innée a été étudiée. Ces récepteurs possèdent un domaine LRR C-terminal, impliqué dans la reconnaissance des ARN viraux, et un domaine effecteur, le plus souvent CARD ou pyrine en N-terminal. Les NLR impliqués dans la réponse antivirale identifiés jusqu'à ce jour sont : NLRP3, NLRC2 et NLRC5. A titre d'exemple, l'activation de NLRP3 a été observée secondairement à des infections par les virus influenza A et le virus Sendai mais l'implication directe des virus n'a pas pour autant été démontrée. En effet, il est probable, du moins pour les virus Influenza A, que l'activation de NLRP3 soit secondaire au stress cellulaire déclenché par l'infection virale et passe plutôt par la détection de ROS, plutôt que par la reconnaissance directe de structures virales (Allen et al. 2009).

B. De la détection aux effecteurs : les IFN-I

Nous avons vu qu'il existait plusieurs récepteurs capables de détecter directement ou indirectement une infection virale, première étape essentielle à la mise en place de la réponse immunitaire innée. Les interférons de type I occupent une place cruciale, puisqu'ils font le lien entre la détection et la réponse effectrice antivirale. Ces molécules peuvent être produites par la plupart des types cellulaires,

incluant les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales. Il est important de préciser que les cellules expriment un niveau basal d'IFN α/β essentiel à une induction rapide en cas d'infection virale (Hata et al. 2001). La production et la régulation de la synthèse des IFN-I se fait en plusieurs temps. Suite à une activation des PRR, l'induction de la synthèse d'IFN-I, majoritairement β dans un premier temps, se fait de manière immédiate et précoce, via l'activation d'IRF3. Dans un second temps, l'IFN-I produit entraîne une surexpression d'IRF7 permettant par son activation l'amplification de la production d'IFN α/β (Hata et al. 2001). L'amplification du signal repose également sur la présence d'une expression constitutive d'IFN α IF en l'absence d'infection, permettant le passage à un niveau d'expression d'IRF7 supérieur à un certain seuil de manière rapide en cas d'infection virale, de façon à ce que les cellules passent rapidement dans un état « antiviral » (Hata et al. 2001). En se fixant sur les récepteurs IFNAR, exprimés par quasiment tous les types cellulaires, les IFN-I produits activent ensuite STAT1 et STAT2, qui vont pouvoir former avec IRF9 le complexe de transcription ISGF3 (González-Navajas et al. 2012) (Fig. 2). Après translocation nucléaire, ce complexe se fixe sur la séquence ISRE située sur le promoteur des gènes stimulés par l'IFN (ISG) et induit ainsi leur expression nécessaire à la mise en place d'une réponse antivirale (Saito et al. 2007). Les IFN-I produits vont aller se fixer sur les récepteurs IFNAR des cellules productrices, mais aussi sur ceux des cellules non infectées et ainsi les sensibiliser à la lutte contre les virus. Il existe une multitude de gènes codés par les ISG impliqués plus ou moins directement dans la réponse antivirale. De plus, les IFN-I sont également impliqués dans la maturation des cellules dendritiques, la cytotoxicité des cellules NK et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, assurant ainsi la liaison entre immunité innée et immunité adaptative (Honda, Takaoka, Taniguchi 2006). Nous allons étudier à présent les principaux effecteurs mis en jeu dans l'immunité antivirale innée.

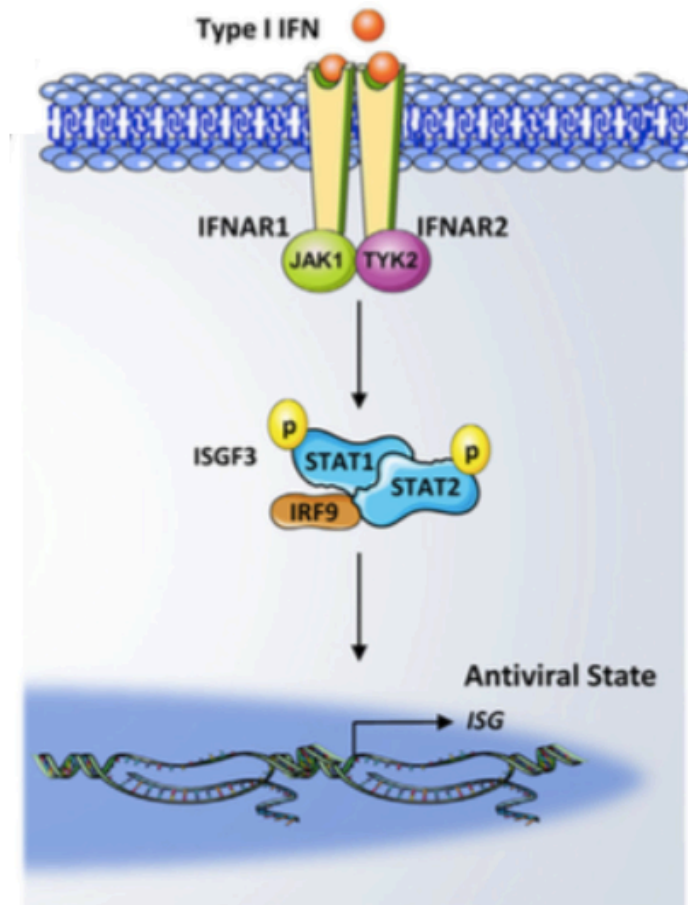


Figure 2 : Schéma explicatif de la voie de signalisation simplifiée des IFN-I
D'après Liu, Olagnier, Lin 2017

C. Les effecteurs de la réponse antivirale

Il existe de nombreux ISG capables de s'opposer aux infections virales (Sadler, Williams 2008); cependant, le rôle antiviral précis d'un grand nombre d'entre eux reste assez mal caractérisé. Nous décrivons dans ce paragraphe les ISG les mieux caractérisés en lien direct avec le travail expérimental présenté par la suite.

1. Le système 2'5'-oligoadénylate synthétase/RNase L et les protéines Mx

La synthèse d'IFN-I induit l'expression de la 2'5'-oligoadénylate synthétase (2'5'-OAS), une phosphotransférase permettant l'activation de la RNase L, elle-même produite de manière constitutive sous forme inactive dans les cellules. Il résulte de l'activation de ce système une dégradation des molécules d'ARN aussi bien virales que cellulaires via la RNase L, permettant ainsi le blocage de la

réplication virale (Fig. 3). Si la dégradation des ARN viraux est privilégiée par ce système, la dégradation des ARNr cellulaires apparaît néanmoins essentielle dans le blocage de la réplication virale (Li, Blackford, Hassel 1998; Wreschner et al. 1981)

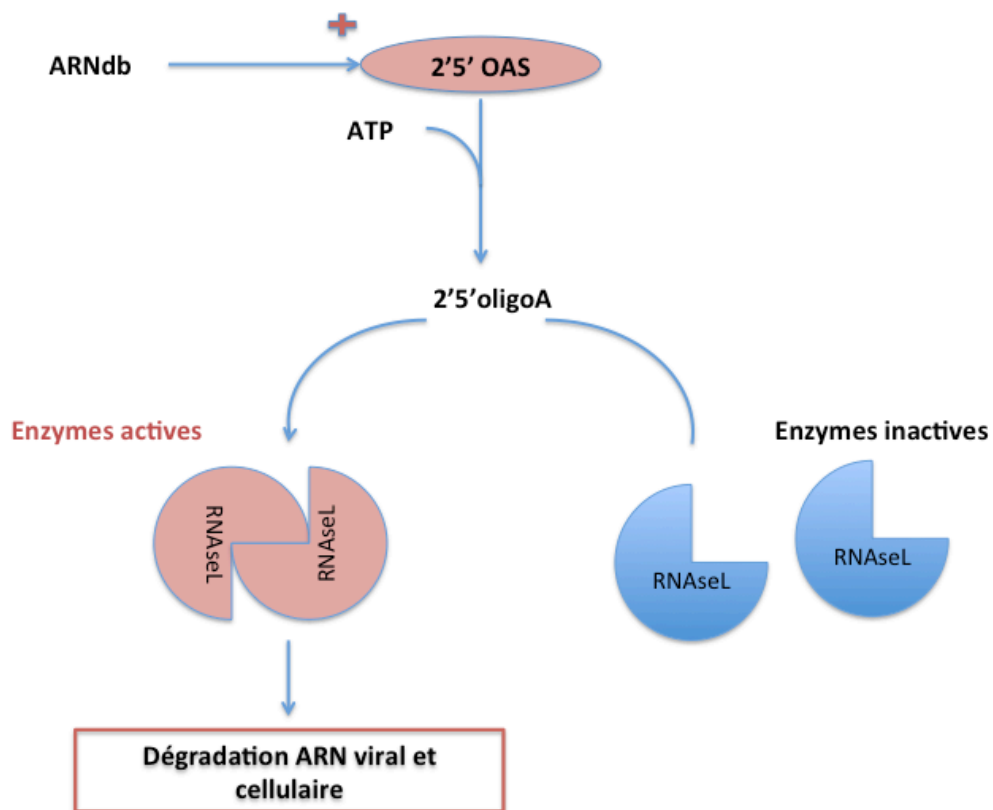


Figure 3 : Voie d'activation du système 2'5'-OAS/RNase L.

Les protéines Mx sont un autre exemple d'effecteurs antiviraux. Ces GTPases de haut poids moléculaire, apparentées à la superfamille des dynamines (Haller, Kochs 2002), exercent des fonctions variées dans des processus comme l'endocytose, le transport vésiculaire ou encore la morphogenèse de la mitochondrie (Song, Schmid 2003). L'un de leurs mécanismes d'action antivirale, le seul à ce jour bien décrit, consiste en une interaction directe de la protéine avec certains composants viraux. Ainsi, l'interaction directe de la protéine MxA avec la nucléoprotéine du virus de Thogoto empêche l'import de cette dernière dans le noyau et par conséquent, la transcription du génome viral (Kochs, Haller 1999). Au départ

considérées comme protéines antivirales des virus à ARN négatif, au fil des années, le rôle antiviral des protéines Mx a été élargi à de nombreuses familles virales. Ainsi, si la plupart de ses cibles sont des virus enveloppés à ARNs négatif (Pavlovic, Haller, Staeheli 1992; Schneider-Schaulies et al. 1994; Zhao et al. 1996) son action antivirale s'exerce également contre des virus à ARNs positif, comme le virus de la forêt de Semliki (Landis et al. 1998).

2. La voie PKR – eIF2 α -P – GADD34

a. La protéine kinase R : un PRR également effecteur

C'est en 1972 qu'une équipe de chercheurs londonienne mit en évidence un blocage de la traduction des ARNm du virus de la vaccine, après traitement à l'interféron de cellules infectées (Metz, Esteban 1972; Friedman et al. 1972). Plus tard, c'est le rôle joué par l'ARNdb, naturel ou synthétique, dans la mise en œuvre de ce blocage qui fut élucidé. C'est encore quelques années plus tard qu'a été identifiée la protéine intervenant au cœur de ce système, connue aujourd'hui sous le nom de protéine kinase R (PKR) (Lebleu et al. 1976; Roberts et al. 1976; Clemens et al. 1993).

La PKR est une protéine kinase cytosolique présente dans les cellules à un niveau basal qui varie en fonction du type de tissu et du degré de différenciation. La PKR étant codée par un ISG, son expression est augmentée par les IFN α/β , ce qui facilite sa mobilisation par la réponse immunitaire innée antivirale.

D'un point de vue biochimique, la PKR est une sérine/thréonine kinase de 551 acides aminés, avec deux sites de liaison à l'ARNdb (dsRMB1 et dsRMB2) localisés en portion N-terminale et un domaine à activité kinase en C-terminale (Meurs et al. 1990). L'activation de la PKR au cours d'une infection virale se fait par la reconnaissance d'acides nucléiques viraux, ce qui induit un réarrangement structural menant à la dimérisation de deux monomères de PKR (Cole 2007), puis à la phosphorylation des résidus thréonine 446 et 451 situés dans la boucle d'activation (Galabru, Hovanessian 1987; Romano et al. 1998; Dey et al. 2005) (Fig. 4). La PKR activée peut alors phosphoryler son principal substrat, la sérine 51 de la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de traduction eucaryote (eIF2 α) (Dar, Dever, Sicheri 2005;

Pathak, Schindler, Hershey 1988; Samuel 1993). Pour comprendre les conséquences de cette phosphorylation sur la synthèse protéique, il convient de comprendre le rôle joué par eIF2.

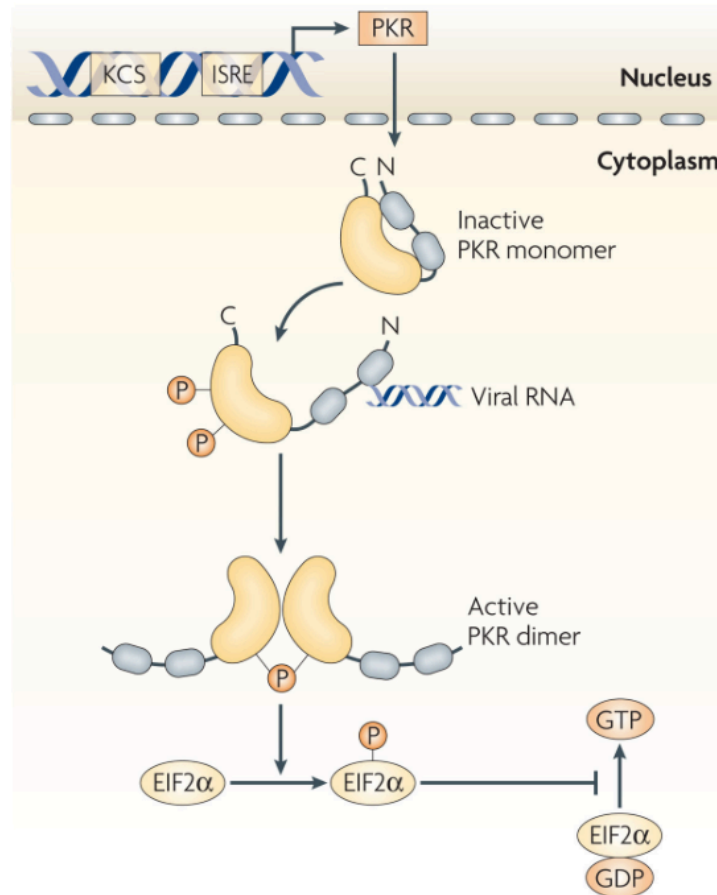


Figure 4 : Voie d'activation de la PKR

D'après Sadler, Williams 2008

eIF2 est une protéine G hétérotrimérique, formant un complexe composé de trois sous-unités (α , β et γ) avec la GTP et l'ARNt initiateur de traduction. Ce complexe peut s'associer avec la sous-unité ribosomale 40S par l'intermédiaire de eIF3.

L'association de eIF4 permet la reconnaissance de l'extrémité 5' de l'ARNm par le complexe, qui peut ensuite identifier par translation unidirectionnelle, le codon d'initiation AUG. La reconnaissance de ce dernier par le complexe entraîne l'hydrolyse de GTP par eIF5, ce qui engendre la libération de eIF2-GDP et la fixation

de la sous-unité 60S du ribosome, permettant l'élongation. Le facteur d'échange de nucléotide guanylique eIF2B intervient dans le recyclage du groupement GDP de eIF2 en GTP et ainsi permet sa réactivation (Schneider, Mohr 2003) (Fig. 5).

Après phosphorylation de la sous-unité α de eIF2, celle-ci peut se lier à eIF2B, empêchant ainsi le recyclage du groupement GDP en GTP et aboutissant à un arrêt de l'initiation de la traduction (Fig. 6). La quantité d'eIF2B dans les cellules étant limitée, la phosphorylation de petites quantités d'eIF2 α par la PKR peut avoir des effets importants sur la traduction par séquestration d'eIF2B. La machinerie traductionnelle cellulaire étant bloquée, le virus ne peut plus l'utiliser pour sa propre réplication.

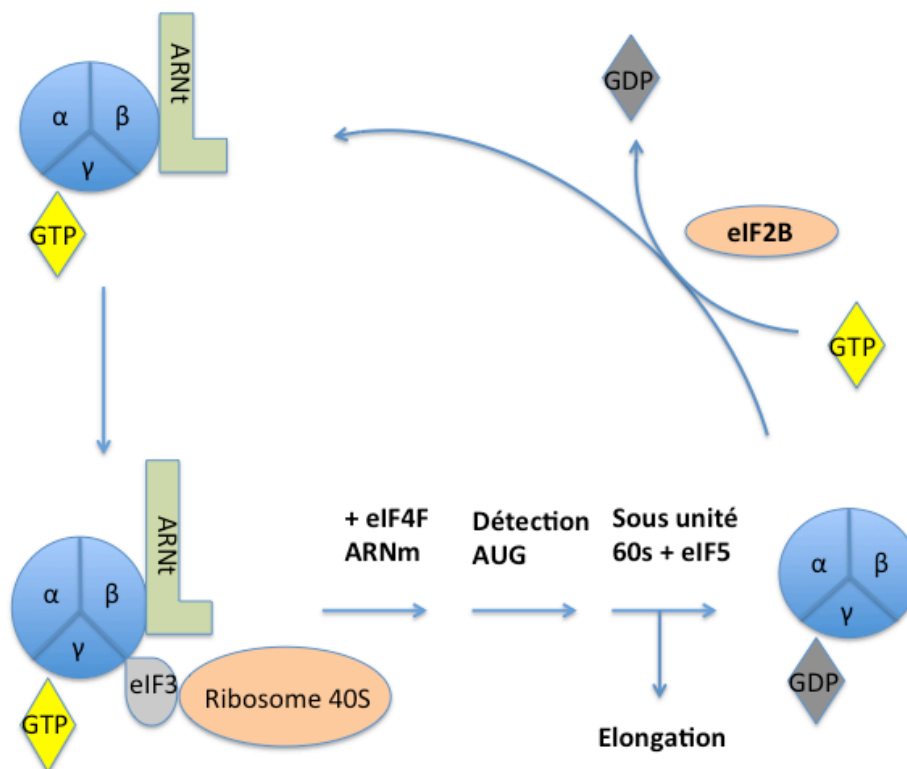


Figure 5 : Mode d'intervention d'eIF2 dans l'initiation de la traduction

eIF2 est représenté en bleu, composé de ses trois sous unités α , β et γ .

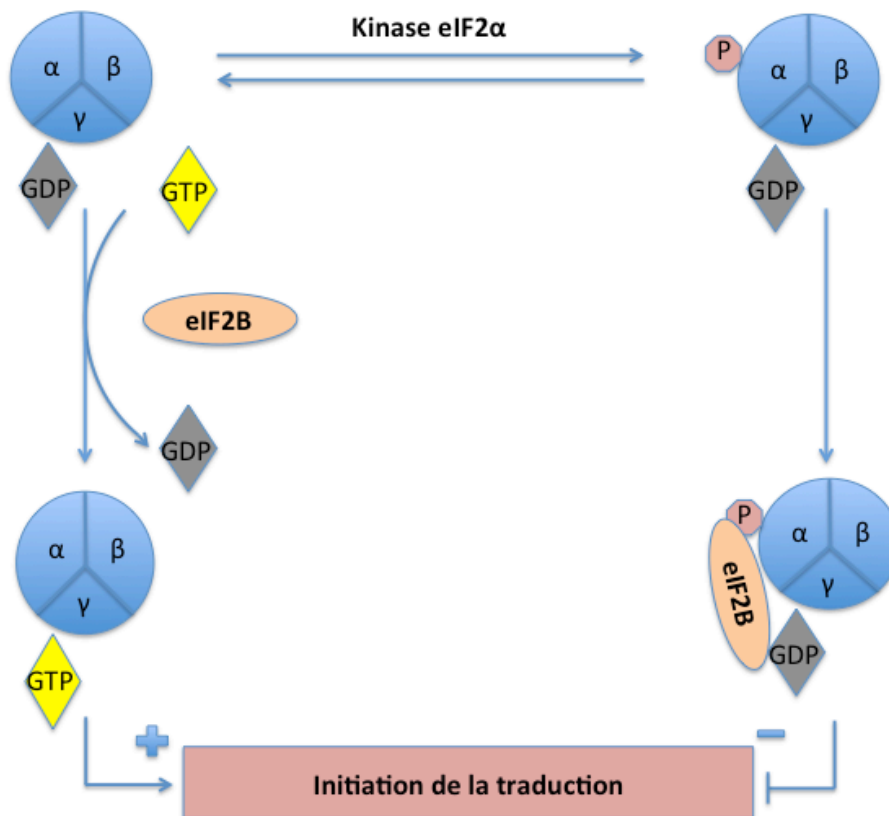


Figure 6 : Implication de la phosphorylation d'eIF2α dans l'arrêt de la synthèse protéique
 eIF2 est représenté en bleu, composé de ses trois sous unités α, β et γ.

Il est important de préciser que d'autres kinases cellulaires peuvent être impliquées dans la phosphorylation d'eIF2α, en réponse à une situation de stress cellulaire. A ce jour, trois protéines kinases en plus de la PKR sont capables de phosphoryler eIF2α et ainsi de bloquer l'initiation de la synthèse protéique : PERK, activée suite à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique, GCN2, activée en cas de carence en acide aminée dans la cellule et HRI, activée dans un contexte de déficit en hème dans les globules rouges ou bien suite à un stress oxydatif (Donnelly et al. 2013) (Fig. 7).

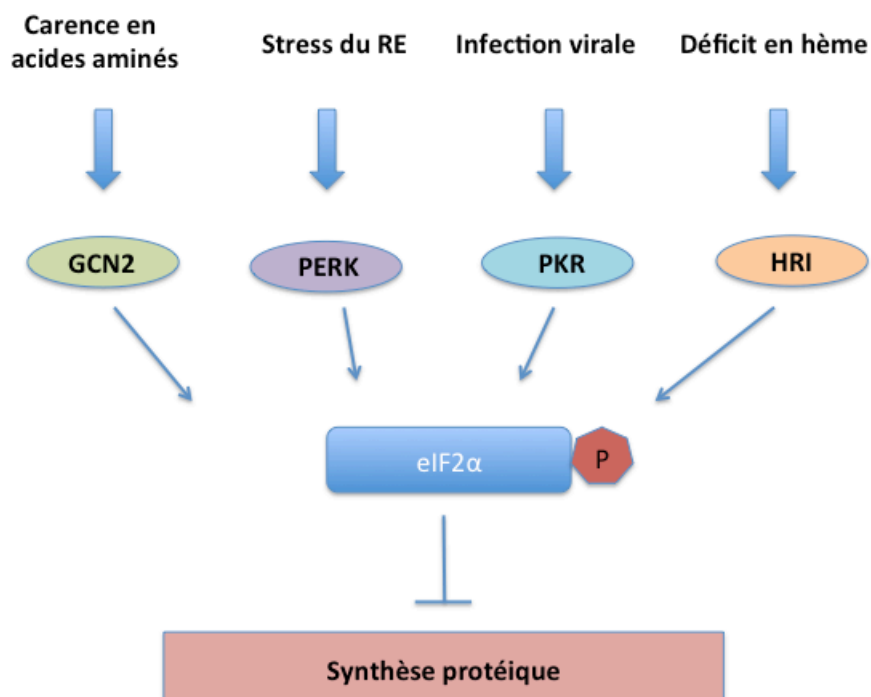


Figure 7 : Différentes voies impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 α

Au delà de sa fonction de reconnaissance des ARN viraux, la PKR est impliquée dans de nombreux autres processus cellulaires. Toujours dans le domaine de la lutte contre les virus, si nous avons vu que la PKR était induite par les IFN- α/β , il faut savoir qu'elle est également capable d'en induire la production, se comportant en ce sens comme un PRR (Balachandran et al. 2000; Diebold et al. 2003). Des souris n'exprimant pas la PKR, de même que des cellules dérivées de ces dernières, ont présenté une réponse réduite à l'activation de différents TLR, suggérant ainsi l'implication de la PKR comme modulateur dans les voies de signalisation de ces PRR (Goh, deVeer, Williams 2000). La PKR est également impliquée dans de nombreux autres processus cellulaires tels que la réponse au stress cellulaire, l'apoptose et la production de cytokines. La PKR serait impliquée de manière indirecte dans l'activation de NF κ B en jouant sur la stabilisation de I κ B β et déclencherait l'apoptose notamment via des interactions avec IRF-1 et p53 (Cheshire, Williams, Baldwin 1999; Der et al. 1997). Le stress cellulaire observé suite à des traitements à base d'arsenite ou de thapsigargine est également un activateur de la PKR, via l'intervention de la protéine PACT (Ito, Yang, May 1999; Ruvolo et al. 2001). La PKR, par le blocage de la production de protéines virales, ainsi que par

ses implications dans la synthèse de cytokines antivirales et dans le processus d'apoptose, apparaît comme une arme antivirale de premier choix au service de l'immunité innée.

i. Les PAMPs activateurs de la PKR

Afin d'identifier le plus précisément possible les PAMP permettant l'activation de la PKR, beaucoup de laboratoires ont utilisé des acides polyinosinique-polycytidyliques (poly I:C), qui sont des ARNdb synthétiques, permettant une analyse plus fine de l'impact de la structure, de la taille et des modifications des ribonucléotides dans l'activation de la PKR. Les travaux effectués sur ces ARN de synthèse ont permis d'identifier le profil des ARN activateurs de la PKR. Tout d'abord, les longues molécules d'ARN bicaténaires de taille supérieure à 30pb ont été les premiers ARN démontrés comme activateurs de la PKR. Puis, il a été observé que des ARN plus courts, d'environ une quinzaine de nucléotides, formant des structures en boucle, étaient également capables d'activer la PKR (Nallagatla et al. 2007). Il avait été établi que ces ARN partiellement double brin devaient porter un groupement triphosphate en 5' pour pouvoir activer la PKR, mais une récente étude publiée en 2016 semble accorder un rôle beaucoup moins important au groupement 5' triphosphate dans l'activation de la PKR (Mayo et al. 2016). En revanche, la présence d'extrémités 3' et 5' monocaténaires semble indispensable. Cette étude remet également en cause la taille minimale de 30pb des ARNdb, requise pour l'activation de la PKR (Mayo et al. 2016). Concernant la nécessité de la présence d'un groupement triphosphate en 5' pour activer la PKR, elle est également nuancée dans une étude publiée en 2015. Dans celle-ci, il est montré que dans certains cas l'activation est dépendante de l'activation 5' triphosphate, alors que dans d'autres cas une extrémité 5' monophosphate ou 5'-OH suffisent (Youssef et al. 2015). Cette étude suggère que le contexte structural pourrait modifier la dépendance de l'activation de la PKR vis à vis de l'extrémité 5' triphosphate.

La présence d'ARNdb a été observée dans des cellules infectées par des virus dont le génome était constitué d'ARNdb, comme les réovirus, mais également dans des cellules infectées par des virus appartenant à des familles virales dont le génome était constitué d'ARN positif, tels que les *Togaviridae*, *Coronaviridae*,

Picornaviridae et *Flaviviridae*. Dans le cas de ces virus à ARN positif, il a été suggéré que la présence d'ARNdb s'expliquait par des intermédiaires de réplication ou par appariement à l'origine de formation de structures bicaténaires secondaires (Jacobs, Langland 1996). Les ARNm du sous-type 1 du virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) présentent à leur extrémité 5' un élément *trans*-activating responsive (TAR) : une structure secondaire capable d'activer la PKR (I, Cw, Jd 2006). Des ARNdb ont également été mis en évidence dans des cellules infectées par des virus ADN tels que le virus de la vaccine (VACV), le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) et le cytomégalovirus humain (HCMV) (Colby, Jurale, Kates 1971; Jacquemont, Roizman 1975; Pettersson, Philipson 1974; Hakki, Geballe 2005; Weber et al. 2006).

Si de l'ARNdb a pu être mis en évidence dans des cellules infectées par des virus à ADN, à ARN positif et à ARNdb, ce n'est pas le cas des cellules infectées par des virus à ARN négatif pour lesquelles les quantités d'ARNdb sont très faibles voire nulles (Weber et al. 2006). Cependant, des études récentes réalisées sur les virus Sendai (SeV) et parainfluenza de type 1 (HPIV-1), mutés de façon à ne pas exprimer de protéine C fonctionnelle, ont permis la mise en évidence de quantité significative d'ARNdb capable d'activer la PKR et MDA-5 (Takeuchi et al. 2008; Boonyaratanakornkit et al. 2011). Ainsi, il est probable, du moins pour ces deux virus, que l'absence d'ARNdb détectable dans les cellules infectées soit due à l'activité importante de la protéine C qui inhibe la formation d'ARNdb.

Il est suggéré que l'activation de la PKR dans les cellules infectées par des virus à ARN négatif puisse se faire par l'intermédiaire de la protéine cellulaire PACT (Patel, Sen 1998; Weber et al. 2006; Peters et al. 2001). Une autre étude met en avant le rôle que peuvent jouer les ribonucléoprotéines virales du virus Influenza B dans l'activation de la PKR (Dauber et al. 2009). Il est tentant de se demander s'il pouvait en être de même pour les virus appartenant à l'ordre des *Mononegavirales*. Pour ces virus, l'encapsidation est beaucoup plus compacte que celle des *Orthomyxoviridae*. Par conséquent, il n'est pas certain que ces virus puissent activer la PKR via leurs RNP virales, comme cela a été démontré pour le virus influenza B (Dauber, Wolff 2009; Albertini et al. 2006), mais il a néanmoins été démontré que certains *Mononegavirales* tels que le virus Ebola (EBOV) et le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), ainsi que le virus de la Fièvre de la Valley du Rift (RVFV), un

Bunyaviridae, étaient capables d'activer la PKR, même si le ou les mécanismes n'ont pas encore été élucidés (Habjan et al. 2009; Schümann, Gantke, Mühlberger 2009). Une autre particularité des *Mononegavirales* est la transcription d'un ARN leader. L'ARN leader des *Mononegavirales* est un potentiel PAMP activateur de PKR. En effet, cet ARN à l'extrémité 5'triphosphate est transcrit par le promoteur le plus proximal, donc en quantité importante et il n'est encapsidé que lorsqu'une certaine quantité de nucléoprotéines s'est accumulée dans la cellule infectée. Il est notamment impliqué dans l'activation de RIG-I par le virus de la rougeole (Leppert et al. 1979; Sanchez et al. 1993; Plumet et al. 2007). Enfin, la plupart des ARN génomiques des virus à ARN portent un groupement triphosphate en 5', une structure capable d'activer la PKR; cela a notamment été montré pour le virus Ebola Zaire, le virus Nipah (NiV), le virus de la rougeole (MV), le virus de la rage, le VSV, le virus Lassa (LASV) et le RVFV (Habjan et al. 2008; Hornung et al. 2006)

b. GADD34

L'augmentation du taux d'eIF2 α phosphorylé dans la cellule du fait d'une activation de la PKR ou d'une autre enzyme kinase d'eIF2 α induit une inhibition de la traduction de la plupart des ARNm, mais augmente paradoxalement la traduction d'ARNm du facteur d'activation de transcription 4 (ATF4) dont le mécanisme sera vu ultérieurement (Brush, Weiser, Shenolikar 2003). La traduction d'ATF4 entraîne alors la transcription de différents gènes tel que CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), essentiel dans la mise en place d'une réponse au stress cellulaire, ainsi que certains gènes codant pour des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique (Pavitt, Ron 2012). Les conséquences de l'expression de CHOP peuvent être l'activation de l'apoptose via l'expression de l'endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (ERO1) ou l'induction de la protéine GADD34, qui permet de rétablir la synthèse protéique dans la cellule (Marciniak et al. 2004). Le rétablissement de la synthèse protéique dans la cellule est permis par le recrutement de la protéine phosphatase 1 (PP1) par GADD34, qui forme alors un complexe trimérique avec la protéine phosphatase 1 et eIF2 α , permettant la déphosphorylation d'eIF2 α (Rojas, Vasconcelos, Dever 2015, p. 2). GADD34 exerce ainsi un

rétrocontrôle négatif sur la phosphorylation d'eIF2 α en tempérant les effets potentiellement délétères tels que l'apoptose, engendrés par une exposition prolongée de la cellule à eIF2 α phosphorylé, avec un retour de la synthèse protéique dans la cellule (Fig. 8).

Une étude publiée en 2003 a démontré l'implication directe d'ATF4 dans l'induction de GADD34, qui interagit directement avec son promoteur (Ma, Hendershot 2003). Cela suggère que GADD34 peut être induite via CHOP, mais aussi plus précocement directement par ATF4. Il est également important de préciser que la traduction des ARNm de ATF4, GADD34 et CHOP est permise par la présence d'un upstream Open Reading Frame (uORF) à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm, qui permet leur traduction, même en présence d'eIF2 α phosphorylée (Lee, Cevallos, Jan 2009). Concernant l'expression de CHOP, des données contradictoires sont référencées dans la littérature. En effet, dans l'étude publiée en 2012 par Clavarino *et al.*, il a été montré que des cellules dendritiques stimulées par de l'ARN poly(I :C) présentaient une augmentation du niveau d'ARNm de CHOP, mais pas de l'expression protéique de ce dernier (Clavarino, Cláudio, Dalet, et al. 2012). De même, dans une récente étude publiée en 2015 dans Science, il a été montré qu'en présence d'un taux élevé d'eIF2 α phosphorylé suite à l'inhibition de GADD34, une diminution de l'expression de la protéine CHOP était observée (Das et al. 2015). Ainsi, si les quantités d'ARNm de CHOP semblent augmentées dans les cellules stressées présentant un niveau d'eIF2 α important, cela ne semble pas forcément vrai pour la traduction protéique de CHOP, qui est peut être finalement bloquée par un haut niveau d'eIF2 α phosphorylé.

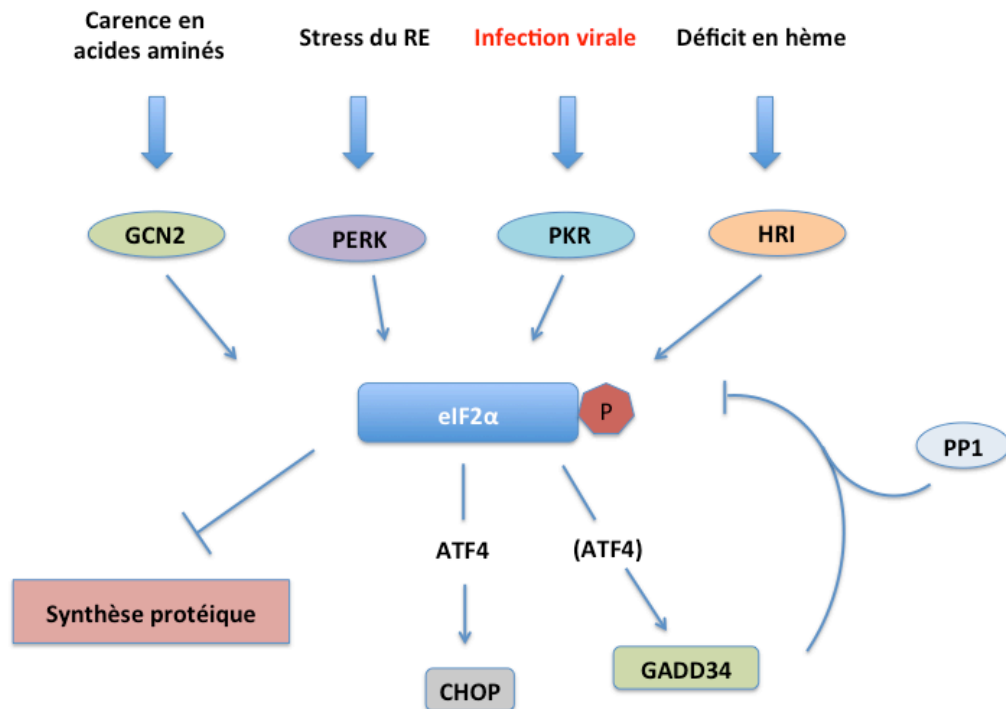


Figure 8 : Voie simplifiée PKR-eIF2 α -GADD34

L'expression de GADD34 permet ainsi un rétablissement de la traduction protéique dans la cellule afin d'éviter les effets délétères d'un blocage de la synthèse protéique. Cela permet également la production d'IFN-I et d'effecteurs antiviraux. Ceci a été montré dans une étude publiée en 2017, dans laquelle l'équipe conclut que l'arrêt de la synthèse protéique peut se faire au détriment de la production de certaines cytokines comme notamment l'IFN- β , dont l'expression n'est pas régulée par des séquences spécifiques permettant sa production en présence d'eIF2 α phosphorylé (Dalet et al. 2017; Starck et al. 2016). La voie PKR/GADD34 semble ainsi reposer sur l'alternance de deux phases : le blocage de la synthèse protéique puis son rétablissement via GADD34, favorisant la synthèse de protéines antivirales (Christine Hollander, Poola-Kella, Fornace 2003, p. 34). De ce fait, GADD34 intervient comme un acteur à part entière dans la réponse antivirale. Cependant, il semble également important de rappeler que les cellules en état de stress important, pour lesquelles les capacités de GADD34 à rétablir l'homéostasie cellulaire semblent dépassées, évoluent fréquemment vers l'apoptose (Shigemi et al. 2017). Ainsi, il est suggéré que dans un contexte d'infection virale, GADD34, par le rétablissement de la

synthèse protéique dans les cellules en état de stress, permette une protection des cellules contre le phénomène d'apoptose, un mécanisme antiviral pourtant efficace (Chou, Roizman 1994; Ito et al. 2015). Malheureusement, une reprise de la synthèse protéique est également synonyme d'un retour à la possibilité du bon déroulement du cycle viral. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 pourrait permettre de prolonger le blocage de la synthèse protéique cellulaire et donc de renforcer l'effet antiviral amorcé par la PKR. La limite d'une telle alternative étant le potentiel impact sur l'expression des IFN-I et des effecteurs antiviraux pour lesquels un retour à la synthèse protéique via la déphosphorylation d'eIF2 α peut sembler nécessaire.

D'un point de vue structural, GADD34 est constitué de 674 acides aminés organisés en plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine central de GADD34 est constitué de séquences répétées en acides aminés permettant une interaction avec eIF2 α . Ces séquences n'étant pas nécessaires à la déphosphorylation d'eIF2 α , mais permettant d'en augmenter la cinétique, il est possible qu'elles permettent de concentrer eIF2 α au voisinage de GADD34 (Rojas, Vasconcelos, Dever 2015). De plus, GADD34 subit rapidement une ubiquitination précédant sa dégradation : ainsi cette capacité à concentrer eIF2 α pourrait optimiser sa déphosphorylation dans une fenêtre de temps réduite. La partie C-terminale comporte un domaine très conservé dont la fonction n'a pas encore été identifiée, ainsi que le motif RVxF, essentiel dans le recrutement de PP1, étape précédant la déphosphorylation de eIF2 α (Connor et al. 2001; Brush, Weiser, Shenolikar 2003). En plus de GADD34, les cellules de mammifère expriment de manière constitutive la protéine CReP (PPP1R15B), qui contribue à la régulation physiologique du niveau basal d'eIF2 α phosphorylé dans toutes les cellules via son interaction avec PP1 (Jousse et al. 2003).

II. Interactions entre virus et la voie PKR/GADD34

Tous les virus ne répondent pas de la même manière face à l'activation de la voie PKR/GADD34. En effet, si contre certains virus, l'activation de cette voie est une bonne stratégie antivirale pour la cellule, d'autres virus ont trouvé le moyen de la contourner. Connaître les différents types d'interactions des virus avec cette voie est essentiel avant d'envisager l'utilisation d'une molécule thérapeutique ayant pour cible ce mécanisme antiviral.

A. Des virus inhibiteurs de PKR

Il est reconnu que certains virus sont capables de contourner cette voie de l'immunité innée en inhibant la phosphorylation d'eIF2 α via des interactions directes ou indirectes avec la PKR. Nous allons détailler plus précisément, lorsqu'elles sont connues, les stratégies utilisées par les virus testés dans le cadre de cette étude.

C'est notamment le cas des virus Influenza qui mettent en œuvre plusieurs stratégies à cet effet. Il a été démontré que les protéines NS1 des virus Influenza A et B portaient une structure similaire en N-terminal capable de se lier à l'ARNdb. Des données récentes ont montré que la protéine NS1 des virus influenza B formait via son domaine de liaison à l'ARNdb un complexe avec la PKR menant à son inactivation. La détection d'ARN viral au sein du complexe PKR/NS1 laisse penser que le blocage de la PKR par NS1 pourrait se faire aussi par la reconnaissance de ribonucléoprotéines virales (Dauber et al. 2009). Concernant la protéine NS1 des virus Influenza A, deux sites de NS1 sont impliqués dans l'inactivation de la PKR : le domaine de liaison à l'ARNdb et la région située entre les acides aminés 123 et 127. Il a été montré que la protéine NS1A était capable d'inactiver la PKR en se liant à sa région N-terminale, ce qui permet le blocage de son activation par de l'ARNdb ou par la protéine cellulaire PACT. Le site d'interaction de NS1A avec la PKR est débattu, puisque plusieurs études s'accordent à dire que ce n'est pas le site de liaison à l'ARNdb de NS1A qui intervient dans la liaison à la PKR (Li et al. 2006; Min et al. 2007). De plus, les virus Influenza peuvent contrer la PKR en faisant intervenir une protéine cellulaire régulatrice de la PKR, la protéine p58^{IPK} qui, par son interaction avec la PKR, diminue la phosphorylation d'eIF2 α (Lee et al. 1992). Le HCMV, un

Betaherpesvirinae de la famille des *Herpesviridae*, exprime quant à lui deux protéines : pTRS1 et pIRS1, qui interagissent toutes deux avec la PKR via leur extrémité C-terminale, permettant son inactivation, dont on ignore encore le mécanisme exact. Cependant, il est proposé que pTRS1 préviendrait la phosphorylation d'eIF2 α en séquestrant la PKR dans le noyau de la cellule infectée, loin de sa cible eIF2 α (Hakki et al. 2006).

Toujours dans la famille des *Herpesviridae*, le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1), un *Alphaherpesvirinae*, est capable d'inhiber l'activation de la PKR par l'expression de la protéine Us11 (Peters et al. 2002; Lussignol et al. 2013)

Le virus de la myxomatose (MYXV) un *Leporipoxvirus* de la famille des *Poxviridae*, exprime plusieurs protéines capables de contrer la PKR. De par leur génome de grande taille, les *Poxviridae* ont à leur disposition de nombreux moyens de lutte contre les mécanismes de l'immunité antivirale, dont les protéines M029 et M156. Par l'intermédiaire d'un ARN viral double brin, M029 est capable de se fixer à la PKR et d'ainsi inhiber son action antivirale. De plus, M029 se lie au complexe DHX9/RHA, situé en aval dans la voie de signalisation de la PKR. Ce complexe protéique semble détenir une action pro-virale, puisque les cellules qui en sont dépourvues ne permettent pas une réplication efficace du MYXV (Rahman et al. 2013). La protéine M156 est également capable d'inactiver la PKR de lapin spécifiquement, mais le mode d'action n'a pas encore été décrit. La capacité de M156 à inhiber spécifiquement la PKR de lapin et pas celle de l'homme suggère que cette protéine contribue à la spécificité d'hôte du MYXV (Peng et al. 2016). Cela souligne encore une fois l'importance que peut avoir la PKR en terme d'immunité antivirale.

Concernant le virus de la rougeole (MV), un virus de la famille des *Paramyxoviridae*, il a été montré que la protéine C était capable également de contrer l'activité de la PKR. En effet, il est reconnu que la protéine C de plusieurs *Paramyxovirus* est une puissante inhibitrice des mécanismes antiviraux, notamment par l'inhibition de la production d'IFN- β (Sparrer, Pfaller, Conzelmann 2012). Concernant le virus de la rougeole, en plus de son action inhibitrice sur la synthèse d'IFN- β , il est suggéré que la protéine C agirait de la même manière que celle du virus Sendai, c'est à dire en régulant la synthèse d'ARN viral, afin d'éviter que celui-ci

ne soit synthétisé en excès et active plus facilement la PKR (Toth et al. 2009; Takeuchi et al. 2008). Le virus respiratoire syncytial humain (hRSV), un virus appartenant également à la famille des *Paramyxoviridae*, est capable d'activer la PKR, puisqu'une augmentation de l'expression globale de cette dernière ainsi que de sa forme active a été observée dans les cellules infectées par le virus. Cependant, la diminution de l'expression de la PKR provoquée par traitement avec des ARN interférants n'a pas eu d'effet significatif sur la réplication virale, suggérant que l'effet antiviral de la PKR sur la réplication du virus hRSV était limité (Lindquist et al. 2011).

La protéine NSs du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift, un *Phlebovirus* de la famille des *Bunyaviridae*, est capable d'activer la dégradation de la PKR par les protéasomes afin de maintenir sa réplication au sein des cellules de l'hôte (Ikegami et al. 2009; Habjan et al. 2009).

La protéine VP35 du virus Ebola Zaïre est un facteur important dans la pathogénicité de ce virus. En plus de son activité inhibitrice de l'induction d'IFN-I par inhibition de l'activation de IRF3 et IRF7, la protéine VP35 serait capable d'interagir avec la protéine cellulaire PACT et ainsi d'empêcher l'activation de la PKR par cette dernière (Feng et al. 2007; Luthra et al. 2013).

Le virus West Nile (WNV), un *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*, ne présente pas d'inhibiteur de la PKR, mais empêche tout de même son activation. En effet, des études réalisées sur l'interaction entre la voie PKR et ce virus montrent que la PKR n'est pas activée en cas d'infection par ce virus (Elbahesh, Scherbik, Brinton 2011). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer que l'ARN viral dans des cellules infectées par le virus West Nile ne se lie pas et n'active pas la PKR. Tout d'abord, il est connu que la protéine de capsid s'associe en dimère, puis à l'ARN viral au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, et ces interactions pourraient empêcher la liaison à la PKR. Ensuite, il a été montré que l'extrémité 3' de l'ARN génomique viral présente une structure tige-boucle capable d'interagir avec plusieurs protéines cellulaires, dont eEF1A, qui semble être nécessaire à l'initiation de la synthèse du brin d'ARN viral négatif (Brinton 2002; Davis et al. 2007). De telles interactions pourraient empêcher l'interaction entre la structure tige-boucle de l'ARN viral et la PKR. L'extrémité 5' de l'ARN génomique pourrait également jouer un rôle. En effet, celle-ci porte une coiffe synthétisée en partie par la protéine NS3, qui

possède une activité ARN triphosphatase (Wengler, Wengler 1993, p. 3). La coiffe étant analogue à celle des ARNm cellulaires, on peut supposer que l'ARN viral n'est pas différencié des ARNm cellulaires par la PKR et donc n'entraîne pas son activation. De plus, l'extrémité 5' de l'ARN génomique du virus interagit également avec la protéine NS5 impliquée dans la cyclisation de l'ARN viral, empêchant peut-être également l'interaction avec la PKR (Dong, Zhang, Shi 2008). Enfin, il est connu que les *Flavivirus*, bien qu'ils se répliquent dans le cytoplasme, induisent une prolifération et des réarrangements membranaires du réticulum endoplasmique, via les protéines NS4A et NS4B. C'est dans ces vésicules dérivées du réticulum endoplasmique que se fait la réplication de l'ARN viral, avec obtention d'ARNdb intermédiaires de réplication (Gillespie et al. 2010; Mackenzie 2005; Welsch et al. 2009). Ainsi, dans les stades tardifs de réplication virale, la séquestration d'ARNdb dans les vésicules permet une proximité entre la synthèse d'ARN et des protéines virales et l'assemblage des virions. Le confinement membranaire et la concentration des différentes étapes du cycle viral pourraient représenter un moyen d'évasion de la détection du virus West Nile par la PKR. Cependant, bien que le virus West Nile ne semble pas activer la PKR, étant donné les réorganisations membranaires engendrées au niveau du réticulum endoplasmique par les *Flavivirus*, il est légitime d'imaginer que le stress occasionné au niveau de cet organite puisse activer PERK et aboutir quand même à la phosphorylation d'eIF2 α . Il semble que ce scénario existe, mais il serait dépendant des *Flavivirus*, ainsi que des souches virales. En effet, si l'infection par la souche Kunjin du virus West Nile n'entraîne pas d'activation de phosphorylation d'eIF2 α via l'activation de PERK, ce n'est pas le cas d'une infection par la souche hautement virulente NY-99 (Ambrose, Mackenzie 2011). L'infection par cette souche du virus West Nile entraîne une activation complète de la réponse au stress du réticulum endoplasmique, caractérisée notamment par une phosphorylation précoce d'eIF2 α , ainsi qu'une surexpression de CHOP et GADD34 (Medigeshi et al. 2007).

Le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), également un *Flavivirus*, serait également capable d'interagir avec la PKR. En plus de sa capacité à inhiber l'induction d'IFN- β via l'inhibition de la phosphorylation et de la translocation nucléaire de IRF-3 par de courts fragments d'ARN non codants (Chang et al. 2013), il

a été rapporté dans la littérature que la protéine NS2A du virus de l'encéphalite japonaise était capable de bloquer très précocement la phosphorylation d'eIF2 α par la PKR (Tu et al. 2012) (Fig. 9).

L'existence de ces nombreuses stratégies pour éviter l'activation de la PKR sous-entend que l'activation de cette molécule peut avoir des effets délétères pour la réplication virale. Il pourrait alors être intéressant pour ces virus de renforcer l'activité de la PKR via l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34, afin que l'effet antiviral prenne le dessus sur la réplication virale.

Virus	Protéine virale	Stratégie d'inhibition de la PKR
Influenza A	NS1	Interaction directe avec la PKR
Influenza B	NS1	Interaction directe avec la PKR
Fièvre de la vallée du Rift	NSs	Active dégradation de la PKR
Ebola	VP35	Activation de PACT
CMV humain	pTRS1 / pIRS1	Séquestration nucléaire de la PKR
Rougeole	C	Régulation de la synthèse d'ARN
Myxomavirus	M156 / M029	M029 : interaction directe avec la PKR
Encéphalite japonaise	NS2A	Non décrit

Figure 9 : Protéines virales inhibitrices de la PKR

B. Des virus avantagés par l'activation de la PKR

Pour certains virus, une activation de la PKR est bénéfique au déroulement du cycle viral. Cette observation a notamment été faite pour certains *Alphavirus*, virus appartenant à la famille des *Togaviridae* et pour le virus de l'hépatite C, un virus appartenant au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. En effet, contrairement à certains virus qui inhibent ou du moins n'activent pas la PKR, les *Alphavirus* et le virus de l'hépatite C ont la capacité d'entraîner une très forte activation de la PKR, menant à une phosphorylation quasiment totale d'eIF2 α , tout en continuant à se répliquer efficacement. Dans le cas du virus de l'hépatite C, il a

été montré que la traduction du génome viral en présence d'eIF2 α phosphorylé était possible via la présence d'une séquence IRES, avec pour conséquence de l'activation de la PKR, un blocage de la traduction des ISG, facilitant ainsi la réplication virale (Robert et al. 2006; Garaigorta, Chisari 2009). Pour les *Alphavirus*, cette même stratégie virale est permise par une structure Downstream Hairpin Loop située en aval du codon d'initiation, permettant l'initiation de la traduction de l'ARNm viral sans l'intervention d'eIF2 (Ventoso et al. 2006; Toribio et al. 2016). Ainsi, dans le cas d'une infection par le virus du chikungunya, un *Alphavirus*, il a été montré que GADD34 était nécessaire à l'obtention d'un effet antiviral par la production l'IFN- β et de d'IL-6 dans des fibroblastes embryonnaires de souris infectées (Clavarino, Cláudio, Couderc, et al. 2012, p. 34). Il apparaît ici que certains virus ont réussi à détourner l'utilisation de la PKR contre la cellule, en étant de puissants activateurs de la PKR, capables de se répliquer en présence d'eIF2 α phosphorylé. Dans ce contexte, l'induction de GADD34 et la déphosphorylation d'eIF2 α sont un mécanisme antiviral important pour rétablir la synthèse protéique afin de permettre l'expression d'IFN et d'effecteurs antiviraux.

C. Des virus exprimant un homologue de GADD34

L'alignement de séquences de différentes protéines virales avec GADD34 a permis de mettre en évidence des domaines hautement conservés entre certaines régions de ces protéines et les régions de liaison avec PP1 et d'interaction avec eIF2 α de GADD34 (Fig. 10). Ainsi, ces découvertes suggèrent que certains virus expriment un homologue de GADD34 permettant la déphosphorylation d'eIF2 α , afin de pouvoir assurer leur réplication. Ces homologues de GADD34 ont notamment été identifiés chez certains *Herpesvirus*, le virus de la peste porcine africaine et le *Canarypoxvirus* (Rojas, Vasconcelos, Dever 2015, p. 2).

Le virus HSV-1 est capable de réguler la voie PKR/GADD34 de deux manières complémentaires. L'expression de la protéine Us11 inhibe l'activation de la PKR tandis que l'expression de γ 34 .5, un homologue de GADD34, permet de rétablir des niveaux d'eIF2 α compatibles avec la synthèse des protéines virales. Il semblerait que γ 34 .5 intervienne plus précocement ; puis, en fin de cycle, lorsque des quantités abondantes d'ARNdb sont accumulées, Us11 permettrait d'inhiber l'activation de la

PKR (Mohr 2005). Le virus Herpes simplex de type 2 (HSV-2) code également pour un homologue de GADD34, la protéine ICP34.5 (Rojas, Vasconcelos, Dever 2015, p. 2).

Le virus de la peste porcine africaine est un *Asfarvirus* de la famille des *Asfarviridae*, dont la protéine DP71L est aussi un homologue de GADD34. Une étude publiée en 2010 a montré que la protéine DP71L entraînait le recrutement de PP1 suivi de la déphosphorylation d'eIF2 α . Cette étude a également montré la capacité de DP71L à inhiber l'induction de ATF4 et CHOP (Zhang et al. 2010).

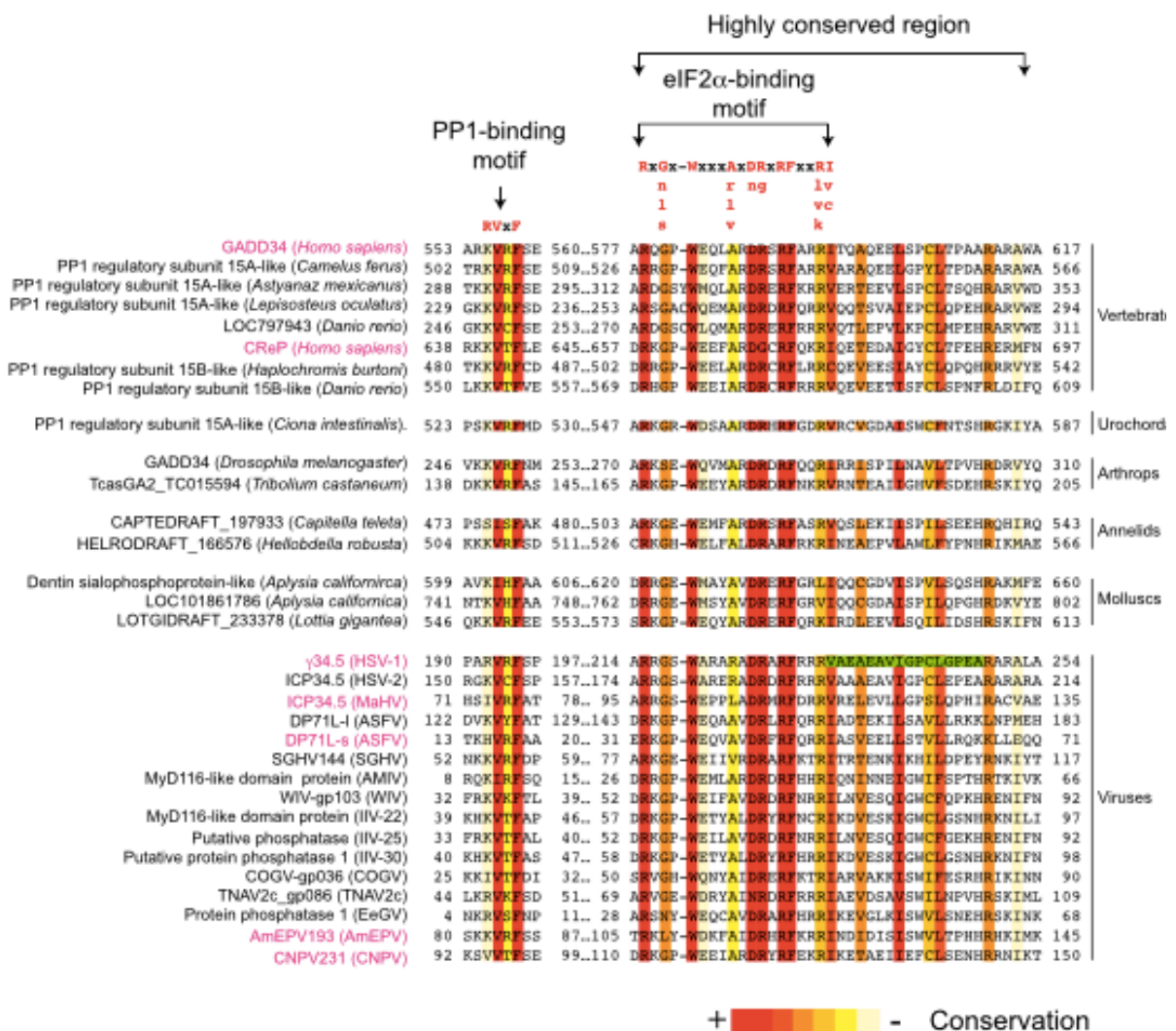


Figure 10 : Alignement de séquences de la partie C-terminale de GADD34 humaine avec 31 autres protéines apparentées

D'après Rojas, Vasconcelos, Dever 2015, p. 2

D. L'inhibition de GADD34 : une stratégie antivirale innovante

Certains virus contrent directement ou indirectement l'activation de la PKR par la synthèse de protéines inhibitrices ou en évitant son activation. À première vue, il semble que l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 pour ces virus pourrait ne pas être efficace, puisqu'en absence de stimulation de la PKR — soit de la phosphorylation d'eIF2 α —, il semblerait que GADD34, la cible de l'inhibiteur, ne soit pas exprimée. Cependant, l'inhibition de la PKR par les virus est souvent incomplète, et l'on peut tout de même espérer une efficacité de cette stratégie thérapeutique dans ce cas. De plus, comme cela a été vu avec des souches du virus West Nile, malgré la capacité de certains virus à ne pas activer la PKR, la réplication virale peut induire un stress cellulaire aboutissant à la phosphorylation d'eIF2 α via la protéine PERK ou une autre protéine kinase phosphorylant eIF2 α et menant ainsi à l'induction de GADD34 par une autre voie, justifiant ainsi l'utilité d'un inhibiteur pour ce type de virus.

Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 pourrait être une stratégie intéressante pour les virus sensibles à la phosphorylation d'eIF2 α et probablement ceux exprimant un homologue de GADD34, surtout si l'inhibiteur agit également sur l'homologue viral.

Dans d'autres cas, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 ne semble pas être une bonne stratégie antivirale. En effet, de par la capacité de certains virus à pouvoir se répliquer en présence d'eIF2 α phosphorylé, comme cela a été montré pour certains *Alphavirus* et le virus de l'hépatite C, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 risque de mener à une augmentation de la réplication virale. En effet, pour ces virus, la phosphorylation de eIF2 α ne n'empêche pas le virus de se répliquer, mais inhibe la synthèse des protéines cellulaires, dont celles pouvant présenter une activité antivirale. Il apparaît ainsi clairement qu'utiliser un inhibiteur de GADD34 dans un tel contexte pourrait avoir des conséquences néfastes pour la cellule et favorables pour le virus.

De manière générale, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 comme stratégie antivirale présente plusieurs avantages. Premièrement, la cible est un mécanisme de l'immunité antivirale innée, donc non spécifique. L'efficacité antivirale peut donc être possiblement observée pour de nombreux virus, même si nous avons vu que tous les virus ne réagissaient pas de la même manière à l'activation de cette voie antivirale.

Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur de GADD34 pourrait permettre de cibler uniquement les cellules infectées par le virus, alors qu'elles présentent déjà un état de stress, et de ne pas agir sur les cellules saines, pour lesquelles l'expression de GADD34 est normalement absente. Cette hypothèse, si elle était confirmée, assurerait une certaine spécificité de notre molécule thérapeutique vis à vis des cellules infectées, ce qui pourrait être un avantage non négligeable en terme de toxicité.

III. La sephin1 : un inhibiteur de GADD34

A. Utilisation de la sephin1 dans le cadre des maladies neurodégénératives

La Sephin1 est une molécule de synthèse dérivée du guanabenz, lui-même utilisé dans le traitement de l'hypertension chez l'homme de par son activité agoniste des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques, mais possédant également une activité inhibitrice de GADD34 convoitée pour le traitement des maladies neurodégénératives. En effet, le guanabenz permet de diminuer les effets néfastes secondaires aux situations de stress du réticulum endoplasmique, identifiées dans plusieurs maladies neurodégénératives (Tribouillard-Tanvier et al. 2008; Wang et al. 2014; Sw et al. 2015). Par l'inhibition de GADD34, il permet de réduire la synthèse protéique dans les cellules en état de stress, pour l'amener à un niveau acceptable et gérable par les protéines chaperonnes, diminuant ainsi la formation de protéines anormales (Tsaytler et al. 2011). Le guanabenz présente l'avantage de cibler uniquement les cellules en état de stress par sa capacité à inhiber GADD34, induite uniquement dans ces cellules. Le fait que le guanabenz n'inhibe pas PPP1R15B, le co-facteur de PP1 permettant de déphosphoryler eIF2 α et exprimé de façon constitutive dans les cellules, est également un avantage essentiel en terme de toxicité. Ainsi, cette stratégie semble intéressante pour le traitement des maladies à l'origine d'une accumulation de protéines anormales dans le réticulum endoplasmique, ce qui est le cas pour certaines maladies neurodégénératives (Das et al. 2015). Cependant, comme dit ci-dessus, cette molécule est à l'origine d'effets $\alpha 2$ -agoniste, observables à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, empêchant son utilisation lorsque cet effet n'est pas souhaité.

Une équipe de chercheurs a synthétisé une molécule en ôtant un atome de chlore à la molécule de guanabenz : la sephin1 (Fig. 11). La sephin1 présente également une activité inhibitrice sélective de GADD34, mais est dépourvue des effets agonistes des récepteurs $\alpha 2$ -adrenergiques. Les tests effectués chez la souris *in vivo* avec la séphin1 présentent des résultats très encourageants dans le traitement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1B et de la sclérose latérale amyotrophique, puisqu'elle prévient l'aggravation des défaillances motrices,

morphologiques et moléculaires sur des modèles murins de ces deux maladies (Das et al. 2015).



Figure 11 : Structure chimique du guanabenz et de la sephin1

B. Propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques

En amont de l'utilisation de la sephin1 comme chimiothérapie antivirale, plusieurs conditions doivent être vérifiées, au delà de son éventuelle efficacité antivirale *in vitro*. En effet, même si une activité antivirale était démontrée, il conviendrait de savoir si la sephin1 pouvait facilement atteindre et à une concentration suffisante les cellules infectées par le virus. Autrement dit, il conviendrait de s'intéresser à sa pharmacocinétique.

Pour répondre à ces questions, nous disposons de données pharmacocinétiques, qui, pour certaines, se rapportent à la sephin1 et d'autres, au guanabenz. Ces deux molécules étant très proches sur le plan structural, on peut supposer que certaines propriétés physico-chimiques du guanabenz sont extrapolables à la sephin1. Toutefois, il faut reconnaître que rien n'est extrapolable du guanabenz à la sephin1 en matière d'activité biologique et de toxicité.

1. Propriétés pharmacocinétiques

Les études pharmacocinétiques montrent qu'après administration orale à 1mg/kg pendant 60 jours chez des souris ou une administration orale unique à 10mg/kg chez le rat, la sephin1 disparaît rapidement du plasma pour se concentrer dans le système nerveux où elle est présente à des concentrations bien supérieures à celles mesurées dans le plasma. Les concentrations en sephin1 sont 7 à 44 fois plus élevées respectivement dans le cerveau et le nerf sciatique que dans le plasma (Das et al. 2015). Ces données sont concordantes avec le fait que le volume de distribution de la sephin1 est probablement très élevé, celui du guanabenz étant chez l'homme de 147L/kg suite à une administration orale. On rappelle qu'un volume de distribution élevé, soit supérieur à 1L/kg, signe une distribution tissulaire importante. Si seules les distributions plasmatiques et du système nerveux ont été étudiées, il est peu probable que la diffusion ne se fasse que dans le système nerveux. En effet, le système nerveux central étant un tissu réputé difficile d'accès du fait de la présence de la barrière hémato-méningée, il est probable que la distribution de la sephin1 est importante dans tous les tissus, étant donnée un volume de distribution supposé très élevé.

Concernant la biodisponibilité de la sephin1, elle n'est pas connue et dépend de la formulation utilisée, mais le fait que la molécule soit retrouvée dans le système nerveux et que des effets thérapeutiques soient observés *in vivo* après administration par voie orale montre qu'elle est à même d'atteindre sa cible à des concentrations efficaces.

2. Etude de toxicité

La sephin1 a été produite à partir du guanabenz pour s'affranchir des effets α_2 -adrenergiques agonistes non désirés. Il convient alors de s'assurer que cette nouvelle molécule répond bien à ces deux critères : sélectivité vis à vis de GADD34 et absence d'effet α_2 -adrenergique agoniste.

Concernant la capacité de la sephin1 à inhiber GADD34 de manière sélective et pas CReP, elle a été vérifiée en condition *in vitro* pour une concentration à 50 μ M de sephin1. Concernant l'effet α_2 -agoniste, il est absent, mais les concentrations

testées sont faibles, puisque la concentration maximale testée était de 1 μ M. Il n'est donc pas possible à partir de ces seules données publiées de garantir l'absence d'effet α 2-agoniste pour des concentrations supérieures à 1 μ M (Das et al. 2015).

Partie II : Etude expérimentale

I. Description du projet

L'effet antiviral de la sephin1 a d'abord été étudié en conditions *in vitro* pour différents virus : hRSV, MYXV, MV, influenza A, WNV et JEV. La deuxième étape était de confirmer le mécanisme d'action de la sephin1 en étudiant les conséquences du traitement sur la phosphorylation d'eIF2 α et en analysant l'expression de GADD34 dans les cellules infectées. La dernière étape fut l'étude des propriétés antivirales de la sephin1 en conditions *in vivo*. Cela a été réalisé par infections expérimentales de lapin par le MYXV et de souris par le hRSV.

II. Matériels et méthodes

A. Etudes *in vitro*

1. Etudes de l'effet antiviral en conditions *in vitro*

a. Virus de la myxomatose

Des cellules RK13 cultivées en plaque de 12 puits, confluentes à 100% ont été infectées avec une suspension virale de MYXV souche T1 à une MOI (Multiplicity of infection) de 0,05 de la façon suivante (Fig. 12) :

Tout d'abord, le milieu de culture a été retiré, puis 250 μ L de suspension virale préparée dans du DMEM ont été inoculés dans les puits « infectés ». Les 6 puits témoins négatifs « non infectés » ont été inoculés avec 250 μ L de DMEM seul. Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 2h à 37°C et 5% de CO₂. Ensuite, pour tous les puits, l'inoculum a été retiré, puis deux lavages au PBS ont été réalisés. Les puits « traités » ont ensuite reçu 1mL de milieu DMEM à 50 μ M de sephin1 et 10% SVF avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL. Les puits « non traités » ont reçu 1mL de milieu ne contenant pas de séphin1 mais du DMSO, puis les plaques ont été mises en incubation à 37°C et 5% de CO₂. 3 puits « traités » et 3 puits « non traités » ont été récoltés par grattage des cellules à 24h,

48h, 72h, 92h et 120h post-infection. Les témoins négatifs « non infectés » constitués de 3 puits traités et 3 puits non traités ont été récoltés à 120h. La récolte du virus par grattage a été réalisée de la manière suivante : pour chaque puits, un cône stérile de micropipette a été utilisé pour décoller les cellules en présence du milieu de culture, le tout a été récupéré dans un tube Eppendorf et conservé dans la glace en attendant la congélation à -20°C. En parallèle, de manière quotidienne, les cellules étaient observées en microscopie inversée de façon à évaluer les effets cytopathogènes et une éventuelle toxicité de la sephin1. La toxicité cellulaire a également été étudiée par évaluation de la viabilité cellulaire de cellules RK13, par la réalisation d'un test métabolique Vitablue-Biotool (Biotool®), utilisé selon les recommandations du fabricant.

Les échantillons ont subi trois étapes de congélation-décongélation afin de faciliter la sortie du virus des cellules. Les échantillons ont ensuite été titrés.

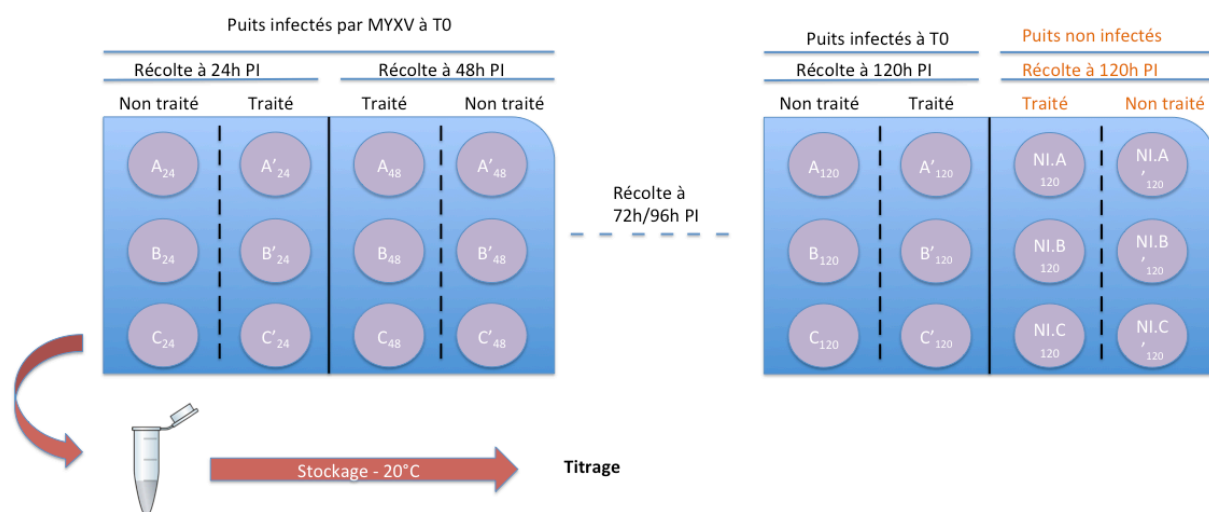


Figure 12 : Étude de l'effet antiviral de la sephin1 par infection de cellules RK13 par le MYXV
 Une autre plaque de 12 puits (schématisée en pointillés) respectant le même plan que la première plaque contient des puits récoltés à 72h et 96h post-infection (PI)

Le titrage a été réalisé sur cellules RK13 cultivées en plaques de 6 puits lorsque celles-ci présentaient une confluence de 100%. Chaque échantillon a été dilué dans des tubes à hémolyse, dans du milieu DMEM 10% de SVF avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL par dilution en cascade de 10^{-1} à 10^{-6} pour un volume final de 500µL de suspension virale. Une fois les dilutions préparées pour chaque échantillon, le milieu de culture des cellules RK13 a été retiré et 200µL

de suspension diluée de 10^{-1} à 10^{-6} ont été inoculés et le tout était homogénéisé dans chaque puits, ce pour chaque échantillon. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 1h30 à 37°C et 5% de CO₂. Deux rinçages avec 2mL de PBS ont été réalisés après retrait de l'inoculum. Puis 2mL de milieu Opti-MEM à 2% de SVF avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL ont été distribués dans chaque puits et les cellules étaient incubées pendant 48h. Après 48h d'incubation, le milieu de culture des cellules était retiré, puis 2mL de milieu MEM1X à 1% d'agarose, 2% de SVF et 30µM de NaHCO₃ à une température comprise entre 37 et 40°C étaient ajoutés dans chaque puits. Les cellules étaient ensuite remises à incuber pendant 6 jours à 37°C et 5% de CO₂. Le nombre de plages macroscopiques a ensuite été compté. Les triplicats ont été titrés séparément en 3 fois.

b. Virus hRSV

Le virus hRSV utilisé était un virus modifié génétiquement, dérivé de la souche sauvage Long, sur laquelle le gène de la luciférase a été inséré de façon à quantifier la réplication virale de manière aisée par mesure de l'activité luciférase. La souche a été fournie par le Dr Rameix-Welti (INRA Jouy-en-Josas) (Rameix-Welti et al. 2014)

Des cellules Hep2 cultivées sur deux plaques de 96 puits dans du milieu MEM1X à 2% de SVF avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL ont été infectées par la souche virale citée précédemment. Les cellules ont été infectées avec 3 MOI différentes et traitées avec de la sephin1 à des concentrations allant de 0 à 50µM, réalisées en triplicats. La sephin1 a été administrée directement dans le milieu d'infection pour les cellules traitées. Les puits non traités ont reçu du DMSO en quantité équivalente de sephin1 reçue. Les plaques ont ensuite été mises à incuber 24h à 37°C et 5% de CO₂.

La lecture des plaques a été réalisée 24h post-infection en utilisant le kit dual-luciférase[®] Reporter Assay de Promega selon les recommandations du fabricant. Le lecteur de plaque utilisé était un Clariostar (BMG Labtech). Il est à préciser que les cellules ont été transférées dans une nouvelle plaque de 96 puits utilisable par le lecteur, après l'étape de lyse cellulaire.

c. *Virus de la rougeole*

Des cellules 293T ont été infectées à une MOI de 0,1 par la souche Schwartz du virus de la rougeole, une souche vaccinale, modifiée génétiquement pour exprimer la luciférase. Les cellules ont également été traitées à des concentrations croissantes en sephin1, allant de 0 à 40 μ M, simultanément à l'inoculation virale. Les cellules contrôles ont reçu du DMSO en quantité équivalente. La toxicité cellulaire de la sephin1 a été évaluée sur des cellules 293T, par mesure de la viabilité cellulaire à l'aide du test métabolique CellTiterGlo de Promega, reposant sur la quantification de l'ATP. Ces expérimentations ont été réalisées par l'équipe du Dr Pierre-Olivier Vidalain à l'Institut Pasteur de Paris.

d. *Virus influenza A*

Des cellules A549 en culture sur plaques de 6 puits ont été infectées par la souche influenza A PR8 à une MOI de 0,01. Les cellules ont par la suite été cultivées en DMEM 0,2% BSA en présence de trypsine TPCK à 1 μ g/ml, puis récoltées à 24 et 48h post-infection.

Les échantillons ont ensuite été titrés de la manière suivante : pour chaque échantillon, des dilutions en cascade ont été réalisées de 10^{-1} à 10^{-6} , dans un volume final de 600 μ L de milieu DMEM à 0,2% de BSA avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL. Le milieu de culture (DMEM 10% de SVF avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL) de cellules MDCK à 100% de confluence a été retiré, puis, pour chaque dilution et pour chaque puits, 500 μ L ont été inoculés. Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 1 heure à 37°C et 5% de CO₂. L'inoculum a ensuite été retiré, puis 2 lavages au PBS ont été réalisés avant distribution de 2mL par puits d'un mélange constitué de 50% de milieu DMEM à 0,2% BSA, avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL, 1 μ g/ml TPCK et 50% d'Avicel[®]. Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 48h avant lecture des résultats.

e. Virus West Nile

Des cellules 293T ont été infectées avec la souche IT08 du virus West Nile et traitées à différentes concentrations de sephin1 avec comme concentration maximale 7µM. Ces expériences ont été réalisées par l'équipe du Dr Sylvie Lecollinet à l'ANSES de Maisons-Alfort.

f. Virus de l'encéphalite japonaise

Des cellules 293T ont été infectées par le virus de l'encéphalite japonaise et traitées à des concentrations de 10 et 50µM de sephin1. Ces expériences ont également été réalisées par l'équipe du Dr Sylvie Lecollinet à l'ANSES de Maisons-Alfort.

2. Etude de l'impact de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α

Afin d'étudier le mécanisme d'action antiviral de la sephin1 vis à vis de différents virus, les expériences suivantes ont été réalisées :

Des cellules ont été infectées, puis traitées simultanément avec de la séphin1 à la concentration de 50µM. Des cellules, également infectées, ont été traitées uniquement avec du DMSO en quantité équivalente de sephin1, pour évaluer l'impact potentiel du DMSO sur la phosphorylation d'eIF2 α . Des cellules non infectées ont été traitées de la même manière avec de la sephin1 ou du DMSO, de façon à voir les conséquences de la sephin1 sur des cellules saines. Les témoins positifs étaient constitués de cellules traitées avec 0,5mmol/L d'arsenite. Les cellules ont été récoltées à 6h et 24h post-infection (Fig. 13).

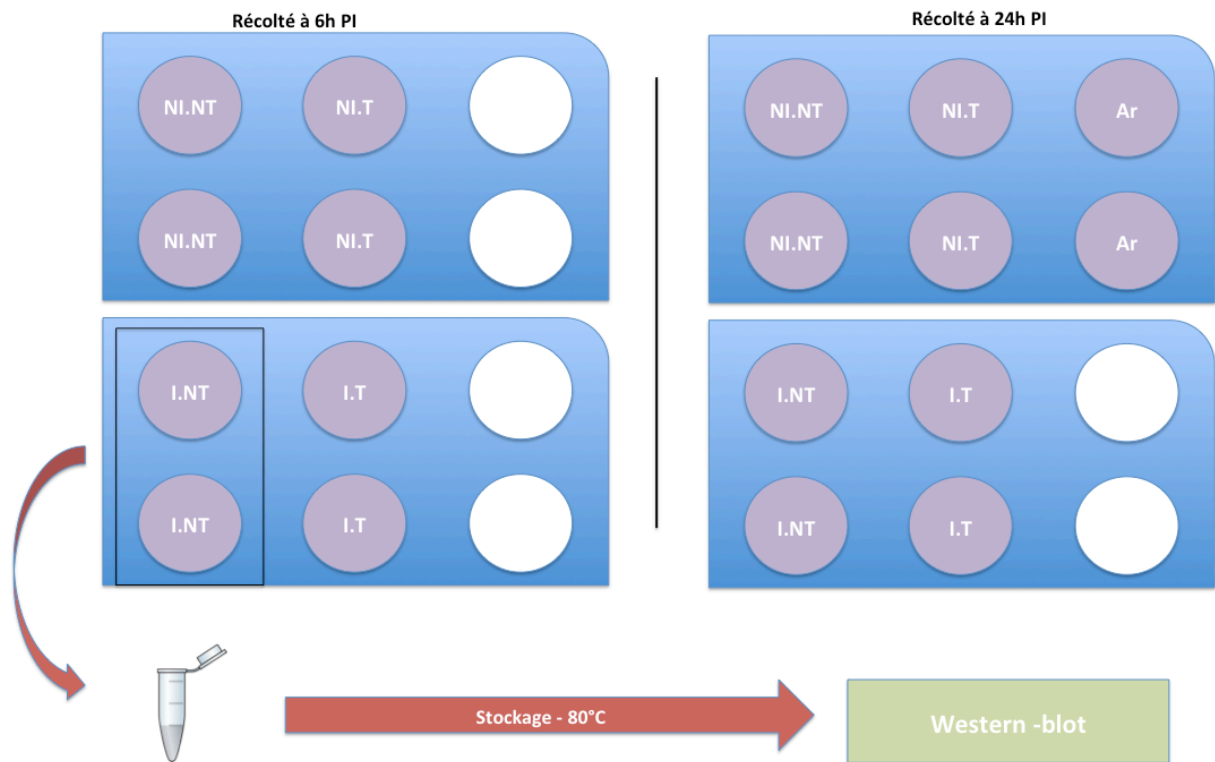


Figure 13 : Étude de l'effet de la sephin1 sur la phosphorylation de eIF2 α

NI : non infecté ; I : infecté ; NT : non traité (DMSO) ; T : traité avec 50 μ M de sephin1 ; Ar : arsenite à 0,5mmol/L (témoins positifs)

a. Virus de la myxomatose

i. Infection

Des cellules RK13 cultivées en plaques de 6 puits à 70% de confluence ont été infectées avec du virus myxomateux souche T1, à une MOI de 5. Les plaques ont ensuite été mises à incuber à 37°C et à 5% de CO₂ pendant les temps indiqués.

ii. Lyse des cellules

A 6h et à 24h post-infection, les puits ont été récoltés de la façon suivante. Pour chaque puits, 1mL de milieu a été retiré, puis les cellules ont été décollées à l'aide d'un cône stérile de micropipette dans le milieu restant. Les cellules et le milieu récoltés dans des puits présentant les mêmes conditions ont été récupérés dans un même tube Eppendorf, immédiatement transféré dans la glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 50 secondes, le surnageant a été retiré puis le culot cellulaire a été re-suspendu dans 1mL de PBS froid contenant de l'EDTA à 1mM. Cette étape de lavage a été réalisée une fois de plus avec re-suspension du culot

cellulaire dans 60µL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases, afin de récupérer les protéines intracellulaires.

Les tubes ont ensuite été mis sous agitation pendant 15min à 4°C, puis centrifugés à 15000g pendant 10min, toujours à 4°C. Pour chaque tube le surnageant contenant les protéines cellulaires a été transféré dans un autre tube Eppendorf, puis vortexé et aliquoté à un volume de 20µL avant congélation à -80°C. Concernant les témoins positifs, le traitement à l'arsenite a été réalisé 1 heure avant la lyse des cellules.

iii. *Protocole de western blot*

Un western blot a ensuite été réalisé à partir des extraits protéiques obtenus. Pour cela, des électrophorèses SDS-PAGE avec deux gels de 10 puits à 10% d'acrylamide ont été réalisés : un en vue de l'analyse d'eIF2α phosphorylé et un pour l'analyse d'eIF2α totale (phosphorylée et non phosphorylée, notée eIF2α-t), utilisé comme marqueur de normalisation des échantillons. Pour chaque échantillon, 20µL de tampon de charge ont été ajoutés avant une étape de chauffage à 100°C pendant 5min. Les échantillons ont par la suite été homogénéisés avant chargement de 15µL/puits, sur chacun des gels. L'électrophorèse a été réalisée dans du TGS à 170V pendant environ 55min.

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (Invitrogen). La membrane nécessaire à la quantification d'eIF2α-P a suivi une étape de blocage dans du TBS à 5% de BSA pendant 1h à température ambiante, puis une incubation pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-eIF2α-P polyclonal de lapin (Proteintech®) au 1/1000^{ème} dans du TBS à 5% de BSA. La membrane a ensuite été lavée 3 fois pendant 5min sous agitation avec du TBS à 0,05% de tween, à température ambiante. L'incubation secondaire a été réalisée avec l'anticorps anti-rabbit IgG HRP linked (cell Signaling technology) au 1/2000^{ème} dans du TBS à 5% de BSA, pendant 1h à température ambiante.

La membrane nécessaire à la quantification d'eIF2α-t, en vue de la normalisation, a été bloquée dans du TBS à 0,05% de tween à 5% de lait pendant 1h à température ambiante. Puis, une incubation pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-eIF2α-t polyclonal de lapin (Proteintech®) au 1/5000 dans du

TBS à 0,05% de tween et 5% de lait a été réalisée. La membrane a ensuite été lavée 3 fois pendant 5min sous agitation avec du TBS à 0,05% de tween, à température ambiante. L'incubation secondaire a été réalisée avec l'anticorps anti-rabbit IgG HRP linked (cell Signaling technology) au 1/2000^{ème} dans du TBS à 5% de lait, pendant 1h à température ambiante. Après l'incubation secondaire, les deux membranes ont été lavées à 3 reprises pendant 5min sous agitation avec du TBS à 0,05% de tween, à température ambiante. Après 5min d'incubation dans le réactif nécessaire à la révélation (Super SignalTM West Dura Extend Duration Signal, Thermo ScientificTM), la luminescence émise par les anticorps secondaires a été mesurée à l'aide du système ChemiDocTM (Bio-RadTM).

b. Virus de la rougeole

Des cellules 293T cultivées en plaque de 6 puits ont été infectées à une MOI de 5, avec une souche de virus de la rougeole modifiée présentant une activité luciférase : virus MV-Luc. Les conditions testées par cette expérimentation étaient les mêmes que pour la précédente avec le virus de la myxomatose.

Les cellules ont été lysées à 6h et 24h post-infection selon la même procédure que précédemment décrite avec le virus myxomateux. L'étape de western blot, ainsi que la révélation, ont également été réalisées selon le même protocole.

3. Etude de l'induction de GADD34 dans les cellules infectées

a. Induction de GADD34 par le virus de la myxomatose

i. Infection et stimulation à la tunicamycine

Les cellules RK13 d'une BP100 confluente à 100% ont été infectées par la souche T1 du MYXV à une MOI de 0,1 de la façon suivante : après retrait du milieu (DMEM à 10% de SVF et avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL), 4 mL de la suspension virale préparée dans du DMEM ont été ajoutés. Dans deux autres BP100, le milieu a également été enlevé, puis remplacé par 4mL de milieu DMEM. Les BP100 ont ensuite été mises à incuber pendant 2h à 37°C à 5% de CO₂. L'inoculum a ensuite été retiré, ainsi que le milieu de culture, pour les

deux autres BP100 non infectées. Les 3 BP100 ont ensuite été lavées à deux reprises avec 10mL de PBS. 10mL de milieu DMEM à 5% de SVF et avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL ont été distribués dans les 3 BP100 qui ont ensuite été mises à incuber à 37°C et 5% de CO₂. Le temps de récolte des cellules a été décidé en fonction des effets cytopathogènes observés.

8h avant récolte des cellules, de la tunicamycine a été ajoutée dans une des deux BP100 non infectées, de façon à avoir une concentration à 2,5µg/mL de tunicamycine dans le milieu de culture.

ii. Lyse des cellules

Le protocole de lyse cellulaire réalisé pour les 3 BP100 était le même que celui décrit précédemment. Pour chaque tube le surnageant contenant les protéines cellulaires a été transféré dans un autre tube Eppendorf, 900µL ont été récupérés pour réaliser l'immunoprécipitation et 60µL pour la normalisation. Les tubes de 60µL ont été congelés à -80°C et les autres contenant les 900µL ont été utilisés pour l'immunoprécipitation en suivant.

iii. Protocole d'immunoprécipitation

140µL de billes protéine A-agarose ont été lavés à trois reprises avec 1mL de tampon de lyse. 7µL d'anticorps anti-GADD34 polyclonal de lapin à 0,26µg/µL (Proteintech®) ont été ajoutés au 1mL de tampon de lyse et mis à agiter pendant 1h à température ambiante. Ensuite, trois lavages ont été réalisés comme à la première étape et les billes ont été re-suspendues dans 700µL de tampon de lyse. 100µL de la suspension de billes précédente ont été distribués dans chaque tube d'échantillon, qui ont ensuite été mis à incuber pendant 12h à 4°C sous agitation. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1500rpm pendant 1min. Après retrait du surnageant, deux lavages au tampon de lyse ont été réalisés. Pour chaque échantillon, 20µL de tampon de charge ont été ajoutés au culot de billes. Chaque échantillon a ensuite été chauffé à 100°C pendant 5min. Après homogénéisation et une rapide centrifugation, 15µL de chaque échantillon ont été déposés sur un gel à 10% d'acrylamide, qui a été soumis à une tension de 170V pendant 1h. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose.

L'étape de blocage a été réalisée dans du TBS à 0,05% de tween et 5% de BSA pendant 1h à température ambiante. L'incubation d'anticorps primaire a également été réalisée dans du TBS à 0,05% de tween et 5% de BSA avec l'anticorps anti-GADD34 polyclonal de lapin (Proteintech®) au 1/1000, pendant une nuit à 4°C. La membrane a ensuite été lavée 3 fois avec du TBS à 0,05% de tween pendant 5min. L'incubation secondaire a été réalisée avec l'anticorps anti-rabbit IgG HRP linked (cell Signaling technology) au 1/2000^{ème} dans du TBS à 0,05% de tween et 5% de BSA, pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages de 5min dans du TBS à 0,05% de tween, la membrane a été révélée à l'aide du système ChemiDoc™ (Bio-Rad™).

Un western blot a également été réalisé pour évaluer la normalisation en quantifiant eIF2 α -t dans chaque échantillon selon les protocoles détaillés précédemment.

b. Etude de l'induction de GADD34 par le virus de la rougeole

Le protocole réalisé est quasiment le même que pour l'étude de l'induction de GADD34 par le virus de la myxomatose. Dans le cas présent, la MOI était de 0,5 avec un volume d'inoculum de 1mL, le milieu utilisé était du milieu DMEM à 2% de SVF inactivé par la chaleur et avec de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL.

B. Etudes de l'effet antiviral de la sephin1 en conditions *in vivo*

1. Etudes chez le lapin

a. Infection expérimentale et administration de la sephin1

Cette étude a été réalisée sur 15 lapins néo-zélandais mâles de 12 semaines. Les lapins étaient détenus en cages individuelles, avec distribution d'eau automatique et nourris *ad libitum* avec un aliment commercial. Conformément aux bonnes pratiques d'expérimentation animale, les lapins ont eu une période d'acclimatation de 5 jours avant le début des expérimentations. Avec un poids des lapins compris entre 2,2kg et 2,8kg, nous avons choisi de les considérer tous à 3kg pour le calcul du volume de sephin1 à administrer.

Les 15 lapins ont été infectés avec 5pfu de la souche sauvage LH 3082 de MYXV, une souche pathogène de phénotype amyxomateux, en injection intradermique sur le pavillon externe de l'oreille gauche. Dès J0, le jour de l'infection, 8 lapins ont été traités par voie orale avec 5mg/kg SID (*Semel In Die*) soit une fois par jour d'une solution de sephin1 préparée dans du DMSO, mélangée à du jus d'ananas de façon à augmenter l'appétence du traitement. Le traitement a été administré de manière individuelle avec une seringue de 5mL pendant 12 jours. Les lapins « contrôles » ont été traités selon la même procédure que le groupe « traité », avec du jus d'ananas contenant uniquement du DMSO.

Tous les jours, l'évolution clinique des lapins a été suivie et tous les deux jours, des écouvillons conjonctivaux sur les deux yeux ont été réalisés, afin de suivre l'excrétion virale par qPCR, sur les lapins « traités » et « non traités ». Les écouvillons ont été stockés à -20°C en attendant d'être analysés (Fig. 14).

Afin de mettre en évidence une éventuelle virémie, 0,2mL de sang a été prélevé à l'artère auriculaire centrale avec une aiguille de 21G, sur chaque lapin à J11 post-infection. Le volume de sang prélevé a directement été transféré dans un tube contenant de l'EDTA et homogénéisé, puis le tout a été transféré dans un tube Eppendorf conservé à 4°C. 100µL de sang ont ensuite été prélevés pour chaque tube, puis transférés dans un nouveau tube contenant 20µL de protéinase K afin

d'inactiver les DNAses et de digérer les capsides virales. Les tubes ont ensuite été congelés à -80°C en attendant l'extraction d'ADN.

Les lapins présentant des signes cliniques avancés tels qu'une prostration, des difficultés respiratoires et des lésions congestives ont été euthanasiés de la façon suivante. Ils ont d'abord été anesthésiés avec un mélange à 5mg/kg de xylazine (Rompun™) et à 35mg/kg de kétamine (Imalgen®), administré par voie intramusculaire. Une fois l'animal anesthésié, l'euthanasie a été réalisée par injection dans la veine cave crâniale de pentobarbital (Dolethal®) à la posologie de 182,2mg/kg.

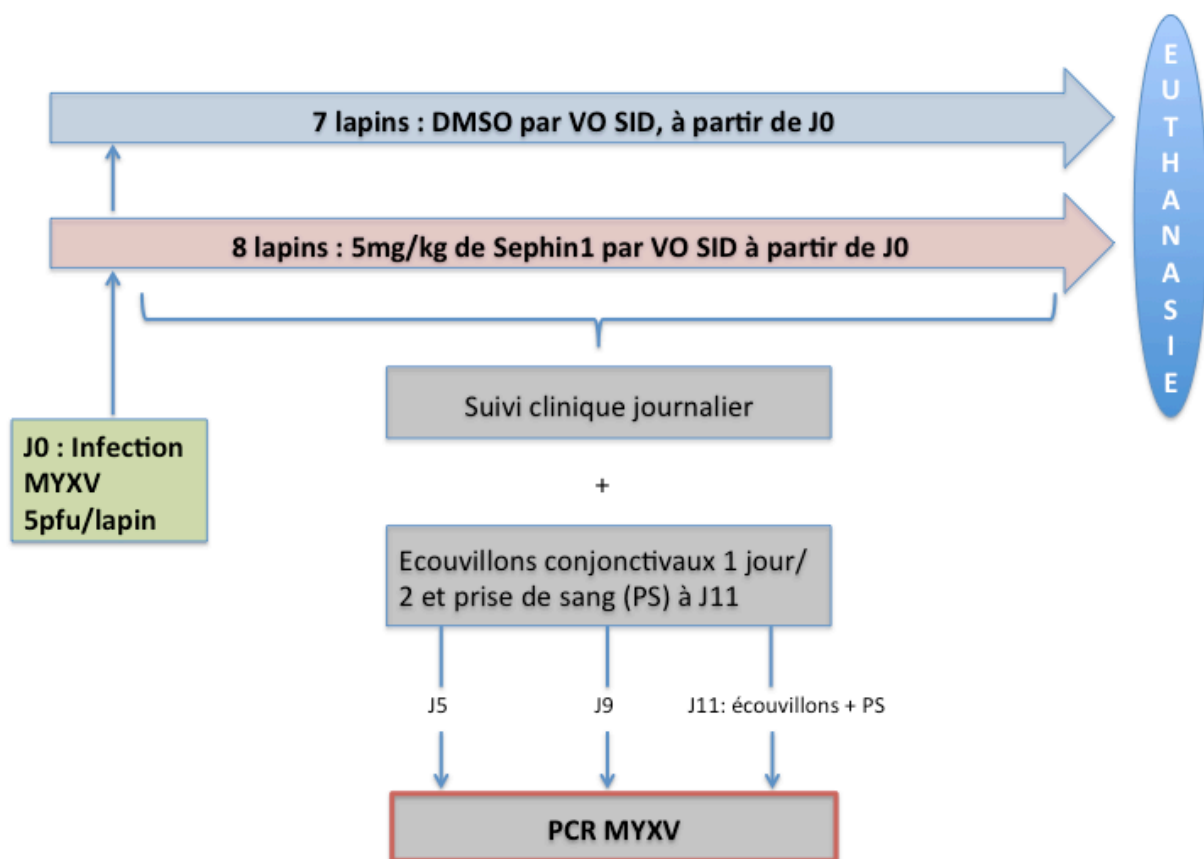


Figure 14 : Infection expérimentale des lapins par le MYXV

b. Suivi de l'excrétion virale par PCR quantitative

i. Extraction d'ADN

Les écouvillons conjonctivaux réalisés à J5, J9 et J11 post-infection ont été mis à agiter pendant 1h à température ambiante après ajout de 500µL de PBS, afin de récupérer les particules virales. Les écouvillons ont ensuite été jetés et l'extraction d'ADN a été réalisée par utilisation du Kit Gene-4-all DNA Miniprep (Bio Basics) conformément au protocole du fabricant. Après obtention de 100µL d'extrait d'ADN pour chaque échantillon, ceux-ci ont été congelés à -20°C en attendant l'analyse par PCR.

Concernant les prélèvements sanguins, l'extraction d'ADN a été réalisée avec le même kit que précédemment, utilisé également selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN obtenus ont par la suite été stockés à -20°C.

ii. Protocole de PCR quantitative

Les PCRq ont été réalisées en utilisant le kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix sur plaque de 96 puits avec une analyse en triplicats de chaque échantillon. L'amplification du gène M071L a été réalisée à l'aide du LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Le mélange réactionnel était constitué de SYBR Green Master mix (Roche) (contenant l'ADN polymerase, les nucléotides et le SYBR Green), des amorces spécifiques du gène M071L, de l'ADN extrait et de l'eau nanopure pour compléter, de telle sorte à avoir un volume total de 10µL. Le programme réalisé consistait en une étape de pré-initialisation à 95°C pendant 10min, puis 40 cycles de 15s à 95°C suivis de 40s à 60°C.

La gamme permettant de corréler les produits d'amplification géniques au nombre de copies de génome a été réalisée à partir d'un plasmide viral purifié (PSCA-M071L Myxolamp). Ce dernier a alors été dilué de 10 en 10 afin de créer une courbe standard. L'efficacité de la PCR (pente de la courbe standard) et sa linéarité (R^2) étaient de bonne qualité pour l'ensemble des qPCR (PCR quantitative) réalisées. De plus, plusieurs contrôles ont été effectués : des puits sans ADN ont permis d'attester de l'absence de dimères d'amorces et des puits contenant uniquement SG33 ont montré que les amorces étaient adaptées et que la réaction

PCR avait correctement fonctionné. Les résultats sont alors exprimés en nombre de copies d'ADN viral, normalisé par la quantité d'ADN total extrait pour chaque échantillon.

2. Etudes chez la souris

a. Infection expérimentale et administration de la sephin1

Cette étude a été réalisée sur 48 souris femelles BALB/C de 12 semaines. Les souris étaient réparties en 8 cages. Pour chaque cage, l'eau était apportée par un biberon et les souris étaient nourries *ad libitum* avec un aliment commercial. Conformément aux bonnes pratiques d'expérimentation animale, les souris ont eu une période d'acclimatation de 5 jours avant le début des expérimentations.

Nous disposons ainsi de deux groupes non infectés et de 6 groupes infectés par le virus hRSV souche Long, une souche sauvage. Parmi les deux groupes non infectés, un groupe était composé de 4 souris traitées avec 10mg/kg/j de sephin1 et un autre de 5 souris traitées avec du DMSO en quantité équivalente à 10mg/kg/j de sephin1. Parmi les trois groupes infectés, trois conditions étaient testées : traitement à 10mg/kg/j de sephin1, traitement à 1mg/kg/j de sephin1 ou bien traitement avec du DMSO en quantité équivalente à 10mg/kg/j de sephin1. Chaque cage comportait au maximum 6 souris (Fig. 15).

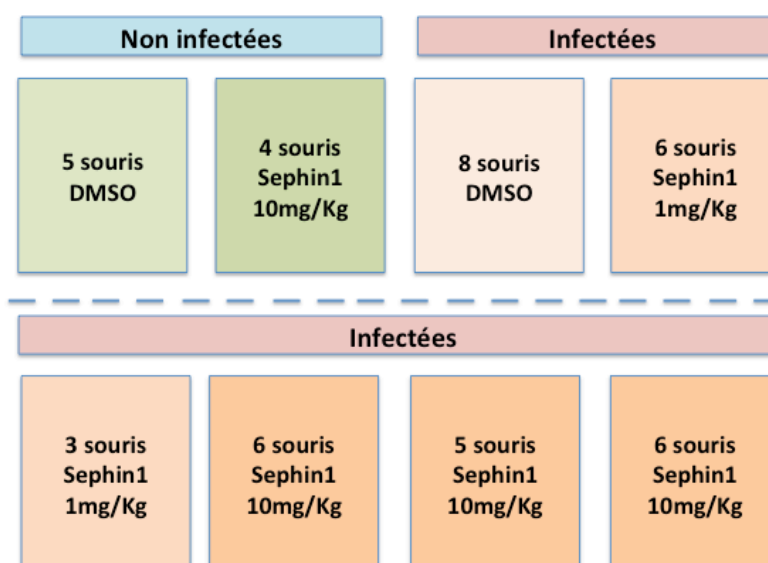


Figure 15 : Plan de cages de l'infection expérimentale par le hRSV

Le traitement initial a été commencé juste avant l'étape d'infection. Il a été administré par sondage avec une seringue de 1mL et une sonde de gavage, une fois par jour pendant 4 jours. Le poids des souris à J0 étant compris entre 15,5g et 21,3g, le poids retenu pour le calcul du volume de sephin1 à administrer était de 20g. La sephin1 ou le DMSO ont été préparés extemporanément dans du DMEM juste avant l'administration. Le volume administré était de 200µL/souris. Afin de voir l'impact du virus hRSV ou du gavage sur les souris, le poids a été relevé tous les jours.

Pour l'étape d'infection, les souris ont été anesthésiées avec une association de xylazine à 0,5mg/kg et de kétamine à 2,5mg/kg administrée par injection en intramusculaire. L'infection a été réalisée avec la souche hRSV Long par instillation nasale de $5 \cdot 10^4$ pfu/souris, soit 100µL de suspension virale.

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale à J4 post-infection, afin que le virus soit quantifié au moment où les titres viraux mesurés dans les poumons sont les plus élevés (Rameix-Welti et al. 2014).

Pour chaque souris, le nez a été prélevé après dépeçage de la tête et transféré dans un tube contenant 2mL de TRIzol[®]. Les lobes gauches pulmonaires ont été prélevés puis transférés dans un tube contenant 1mL de TRIzol[®] avec des billes métalliques de 2mm de diamètre. Ceci dans le but d'une quantification de la charge virale, le reste des poumons a été récupéré dans un tube sec, en vue d'éventuelles analyses ultérieures. Après quelques minutes à température ambiante, tous les échantillons ont été transférés dans de la carboglace puis stockés à -80°C en attendant d'être analysés (Fig. 16).

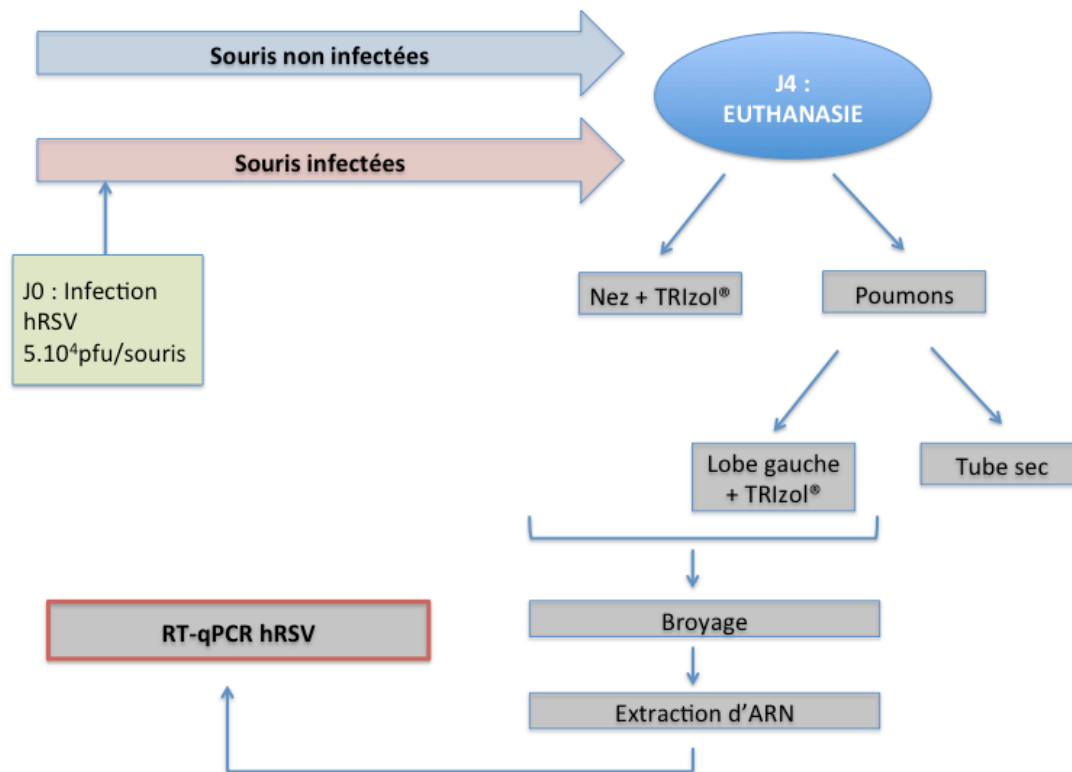


Figure 16 : Infection expérimentale des souris par le hRSV

b. Evaluation de la charge virale par PCR quantitative

i. Extraction d'ARN

Pour les échantillons constitués de nez vortexés, l'extraction a été faite à partir de 500µL de surnageant. Enfin, pour les échantillons constitués de poumon, une étape de broyage au Precellys® à 6000rpm 3 fois pendant 5 secondes a été réalisée avant l'étape d'extraction, à partir de 500µL de surnageant également.

Ensuite, 0,1mL de chloroforme a été ajouté aux 500µL d'échantillon, puis le tout a été agité manuellement pendant 15 secondes. Après une incubation de 3min à température ambiante, les tubes ont été centrifugés à 12000g pendant 15min à 4°C. 0,2mL de la phase supérieure obtenue a été récupéré, puis purifié en utilisant le protocole « RNA clean-up » du kit RNeasy® Mini Kit (Quiagen), utilisé selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ARN obtenus ont été stockés à -80°C en attendant la réalisation de la RT-qPCR.

ii. *Protocole de RT-PCR quantitative*

Préalablement l'ARN a été dosé avec le kit Qubit™ de Invitrogen™ Les RT-PCRq ont été réalisées en deux étapes. Premièrement, l'étape de rétro-transcription a été réalisée à l'aide du kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase. Le mélange réactionnel contenait l'ARN provenant des échantillons, des nucléotides, la transcriptase inverse (RevertAid Reverse Transcriptase) ainsi qu'un inhibiteur de RNase (Thermo Scientific™ RiboLock RNase inhibitor).

Ensuite, l'amplification du gène L du hRSV a été réalisée en triplicats sur plaques de 96 puits selon le même principe que pour l'analyse qPCR des échantillons obtenus avec le MYXV. Une amplification du gène de ménage HPRT a été réalisée en parallèle pour chaque échantillon, sur la même plaque que l'amplification du gène viral, également en triplicats. La charge virale obtenue a ainsi été normalisée par le taux de gène de ménage amplifié et exprimée sous forme d'un rapport « moyenne (Ct gène viral)/moyenne (Ct gène HPRT) ».

III. Résultats

A. Effet antiviral de la sephin1 démontré en culture cellulaire

Concernant le MYXV, l'observation microscopique des cellules infectées a montré des ECP plus nombreux dans les cellules non traitées que dans les cellules traitées à 50µM de sephin1. Les résultats du titrage montrent une diminution de la charge virale avec le traitement à la sephin1 d'un facteur 10 à 24h post-infection et d'un facteur 100 à 72h post-infection (Fig. 17A). Une analyse statistique par ANOVA a montré une différence significative entre les deux courbes avec une p-value inférieure à 0,05. Les cellules non infectées, traitées et non traitées ne présentent pas de différence à l'observation microscopique en terme de morphologie et de confluence, suggérant une absence de cytotoxicité de la sephin1 dans cette expérience. Cela a été confirmé par les résultats du test métabolique (Fig. 17B)

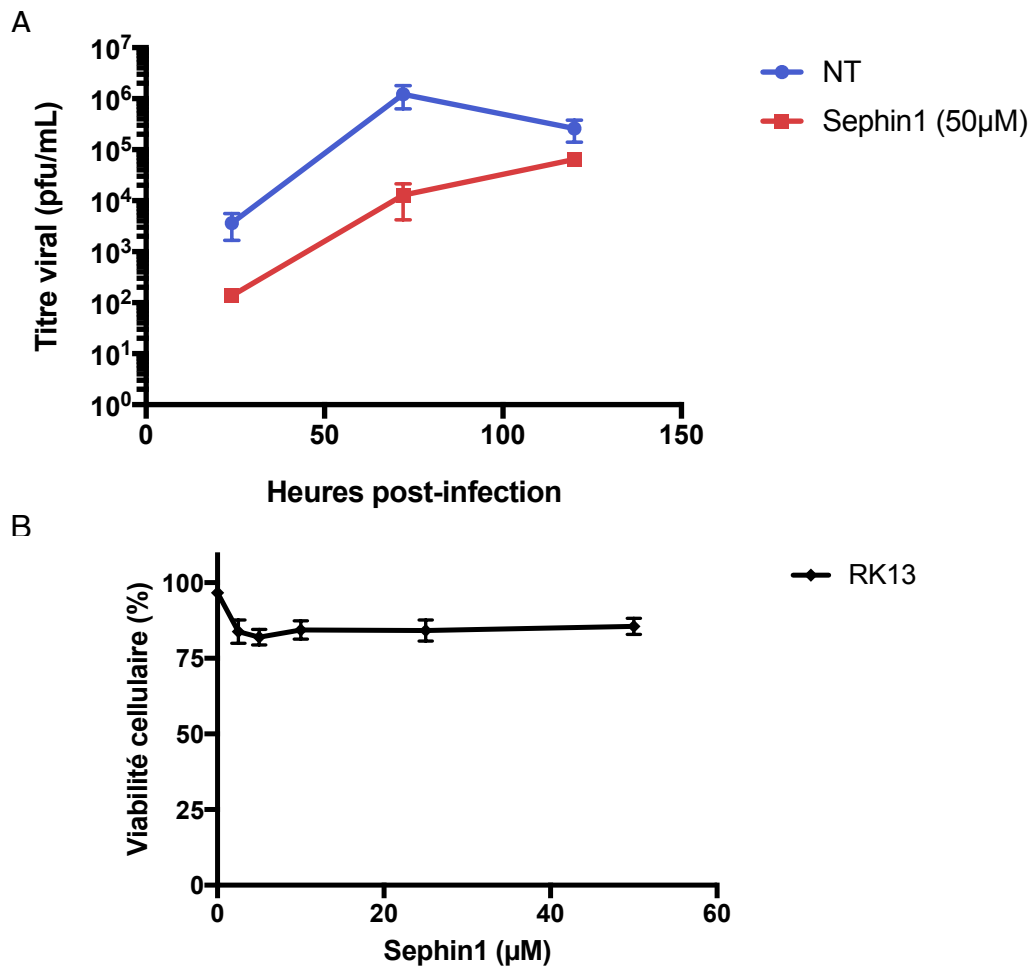


Figure 17 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules RK13 infectées par le MYXV
 A : Evolution du titre viral de MYXV au cours du temps sur cellules RK13 non traitées ayant reçues du DMSO (NT) et cellules traitées avec 50µM de sephin1
 B : Evolution de la viabilité cellulaire des RK13 en fonction de différentes concentrations de sephin1

Pour le virus hRSV, l'activité luciférase des puits traités à des concentrations de sephin1 supérieures à 25 μ mol/L est diminuée en moyenne d'un facteur 10, mettant en évidence une réplication virale nettement diminuée dans les puits traités (Fig. 18A). Concernant la toxicité cellulaire de la sephin1, celle-ci semble être relativement faible sur les cellules Hep2, puisqu'on peut voir sur la Figure 18B une différence de viabilité cellulaire faible entre les cellules non traitées et celles recevant 50 μ M de sephin1.

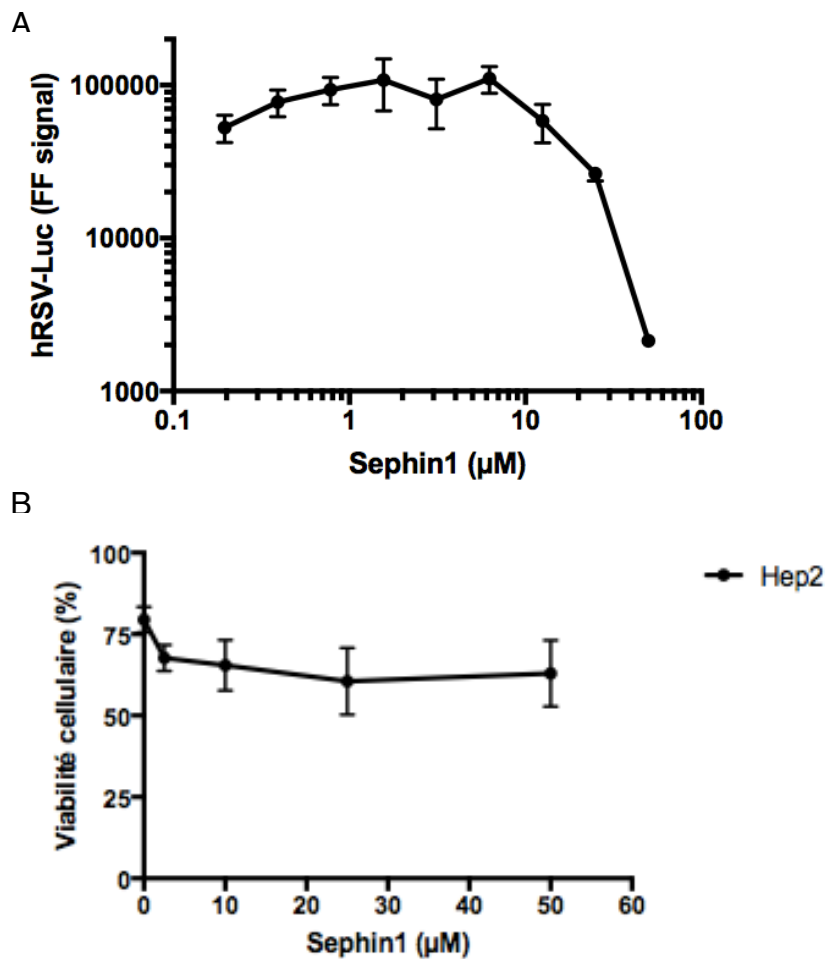


Figure 18 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules Hep2 infectées par le hRSV

A : Evolution de la réplication virale au cours du temps sur cellules Hep2 en fonction de différentes concentrations en sephin1

B : Evolution de la viabilité cellulaire des cellules Hep2 en fonction de différentes concentrations de sephin1

Un effet antiviral a également été observé contre le virus de la rougeole, puisque le pourcentage de réplication virale diminue avec les traitements à des concentrations croissantes en sephin1. Un effet antiviral est ainsi observé dès 2,5 μ M de sephin1, soit la plus petite quantité de sephin1 testée et l'effet antiviral maximal est obtenu avec la plus forte concentration testée, soit 40 μ M (Fig. 19A). La sephin1 permet bien une diminution de la réplication de la souche MV-Luc du virus de la rougeole, et ce de manière dose dépendante. Concernant la toxicité cellulaire de la sephin1, là encore elle semble mineure, puisque la différence de viabilité cellulaire entre 0 μ M et 50 μ M est faible (Fig. 19B)

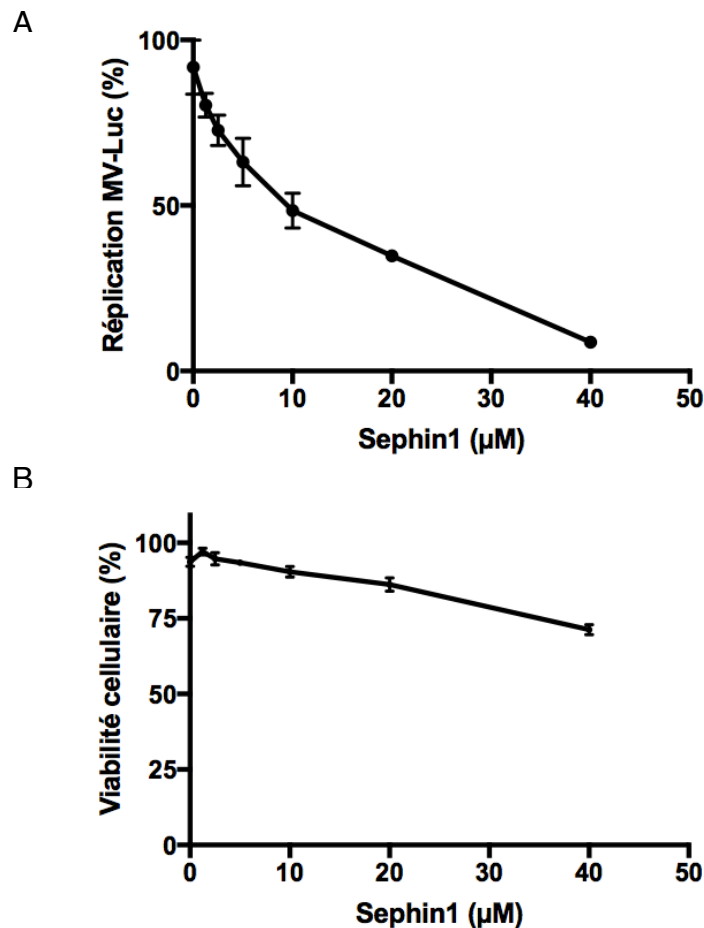


Figure 19 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus MV-Luc

A : Evolution de la réplication virale au cours du temps sur cellules 293T en fonction de différentes concentrations en sephin1

B : Evolution de la viabilité cellulaire des cellules 293T en fonction de différentes concentrations de sephin1

B. Absence d'effet antiviral de la sephin1 en culture cellulaire pour certains virus

Pour d'autres virus étudiés dans notre projet, aucun effet antiviral de la sephin1 n'a été mis en évidence en condition *in vitro*. C'est notamment le cas pour la souche PR8 du virus influenza A, cultivé sur cellules A549 (Fig. 20)

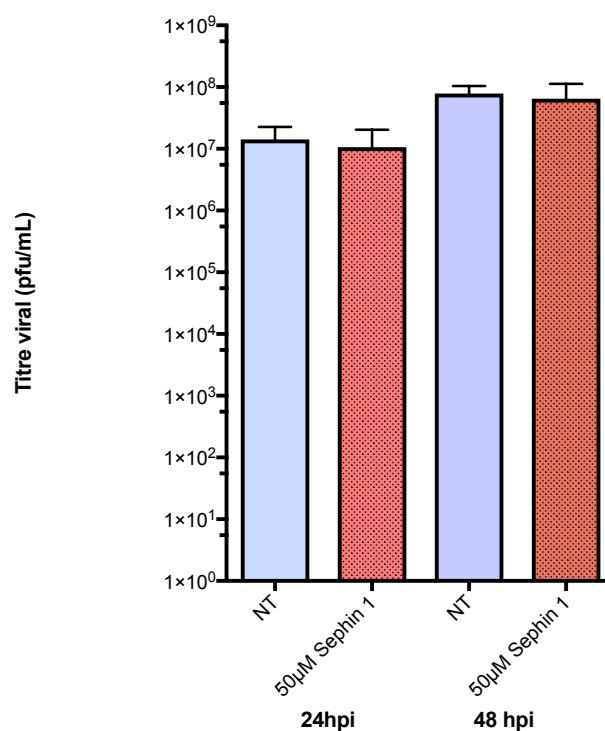


Figure 20 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules A549 infectées par la souche PR8 du virus Influenza A

NT : cellules A549 non traitées ; pi : post-infection

Il en est de même avec la souche IT88 du virus West Nile, pour laquelle une absence d'activité antivirale de la sephin1 est observée, pour des concentrations maximales testées de 7 μ M (Fig. 21). En effet, le traitement à la sephin1 à des concentrations supérieures à 7 μ M a entraîné une toxicité cellulaire importante sur cellules 293T utilisées par nos collaborateurs (Dr Sylvie Lecollinet, ANSES Maisons-Alfort), les essais n'ont donc pas été continués pour des concentrations plus élevées.

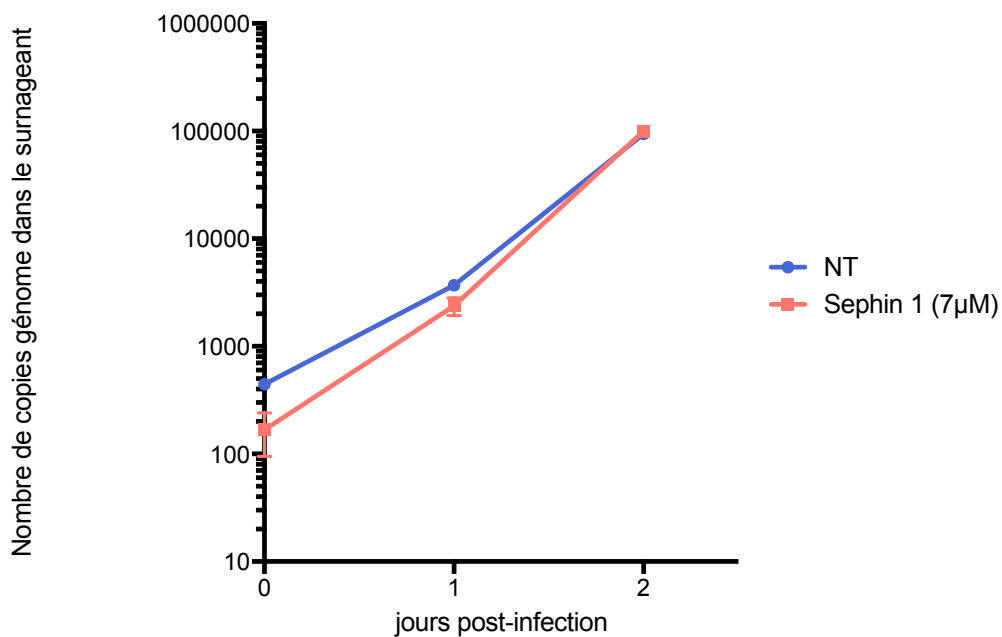


Figure 21 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus West Nile

NT : cellules 293T non traitées

Pour le virus de l'encéphalite japonaise cultivé sur cellules 293T, la sephin1 n'a montré aucun effet antiviral que ce soit à 10 ou 50 μ M (Fig. 22).

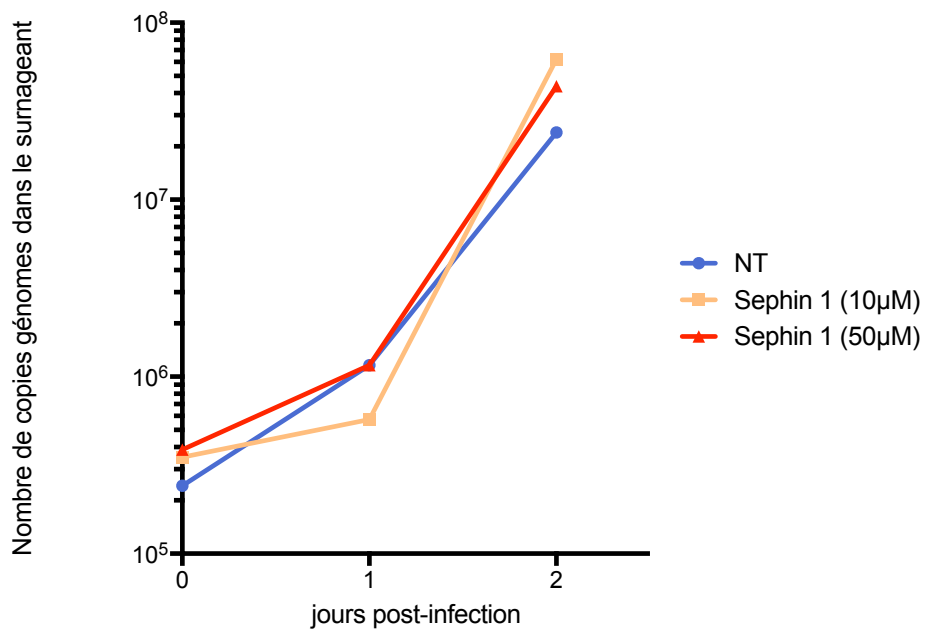


Figure 22 : Etude de l'effet antiviral de la sephin1 sur cellules 293T infectées par le virus de l'encéphalite japonaise
NT : cellules 293T non traitées

C. Etude de l'impact de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α

L'étude de la phosphorylation d'eIF2 α dans des cellules RK13 infectées par le MYXV et traitées à la sephin1 à 50 μ M montre les résultats de western blot suivants (Fig. 23).

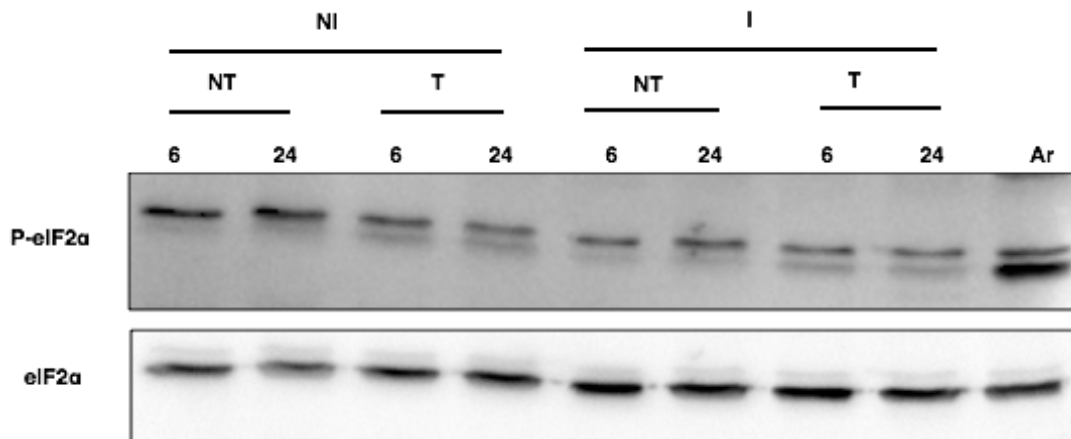


Figure 23 : Détection d'eIF2 α -P par western blot sur cellules RK13 à 6 et 24h post-infection par le MYXV

NI : cellules non infectées, I : Infectées, NT : non traitées (DMSO), T : traitées à 50 μ M de sephin1, Ar : arsenite à 0,5mmol/L, ici eIF2 α correspond à eIF2 α totale

Le signal d'eIF2 α totale étant équivalent entre les différents échantillons, la comparaison du taux d'eIF2 α -P entre les différents échantillons est possible. Les cellules stimulées à l'arsenite présentent bien un niveau élevé d'eIF2 α -P, attestant que la bande de poids moléculaire moins élevé correspond pour tous les échantillons à la forme phosphorylée d'eIF2 α , la bande de plus haut poids moléculaire étant probablement une hybridation non spécifique des anticorps. Pour les cellules non infectées, la quantité d'eIF2 α -P semble plus importante pour les cellules ayant reçu un traitement à la sephin1. Concernant les cellules infectées, la phosphorylation d'eIF2 α semble plus importante pour les cellules traitées à la sephin1. Cependant, les cellules infectées non traitées, ne présentent pas de niveaux d'eIF2 α -P supérieur aux cellules non infectées non traitées ou alors que très légèrement. Quels que soient les échantillons, les différences de niveaux de phosphorylation d'eIF2 α sont très précoces, à partir de 6h post-infection. Aucune différence n'est observée entre les temps 6 et 24h post-infection. D'après ces résultats, il semblerait que la sephin1 entraîne bien une augmentation du taux d'eIF2 α phosphorylé dans les cellules. Le western blot présenté ici est représentatif de trois expériences indépendantes.

L'infection des cellules 293T infectées par le virus de la rougeole ne semble pas entraîner la phosphorylation eIF2 α , puisque l'intensité du signal est la même pour les cellules non infectées non traitées que pour les cellules infectées, traitées et non traitées (Fig. 24). De plus, une même intensité du signal étant observée entre les cellules infectées traitées et non traitées, il n'est ici pas mis en évidence la présence d'un effet de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α à 6 et 24h post-infection. Le western blot présenté ici est représentatif de trois expériences indépendantes.

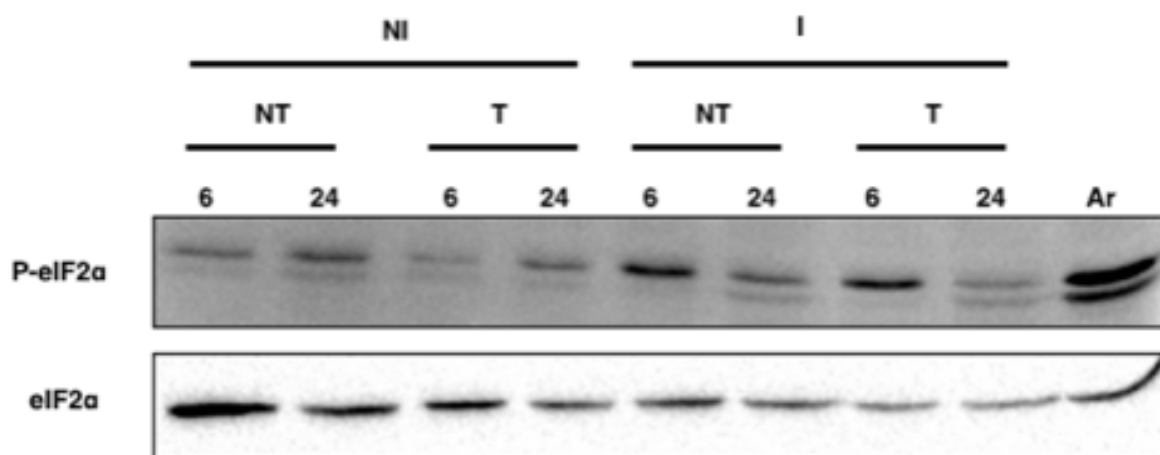


Figure 24 : Détection d'eIF2 α -P par western blot sur cellules 293T à 6 et 24h post-infection par le virus MV-Luc

NI : cellules non infectées, I : Infectées, NT : non traitées (DMSO), T : traitées à 50 μ M de sephin1, Ar : arsenite à 0,5mmol/L, ici eIF2 α correspond à eIF2 α totale

D. Surexpression de GADD34 dans les cellules infectées

Le western blot présentant les résultats de l'expression de GADD34 par des cellules infectées par le MYXV est difficilement interprétable (Fig. 25). La détection d'eIF2 α totale est utilisée pour la normalisation comme précédemment. Du fait d'une migration non homogène des protéines issues des cellules non infectées, l'interprétation est délicate. S'il semble que les cellules infectées expriment GADD34 en quantité importante comparé au témoin positif représenté par les cellules traitées à la tunicamycine (Tm), il est possible que l'expression de GADD34 soit également importante pour les cellules non infectées. Malheureusement, par manque de temps, cette expérience n'a pu être reproduite.

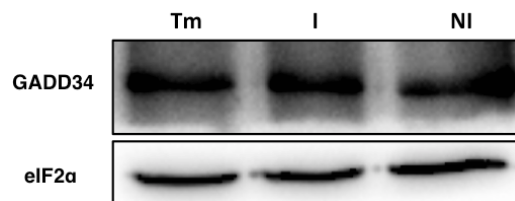


Figure 25 : Détection de GADD34 par western blot après immunoprécipitation sur cellules RK13 infectées par le MYXV

Tm : Cellules traitées à la tunicamycine (témoin positif) ; I : cellules infectées par MYXV à MOI = 0,1 ; NI : cellules non infectées, ici eIF2 α correspond à eIF2 α totale

Les résultats obtenus avec le virus de la rougeole sur cellules 293T sont plus facilement interprétables (Fig. 26). Là encore, la détection d'eIF2 α totale montre une normalisation correcte de la quantité de protéine utilisée pour chaque échantillon. Les cellules traitées à la tunicamycine présentent un niveau de GADD34 cellulaire nettement plus important que les cellules non infectées. Les cellules infectées présentent un signal quasiment de même intensité que le contrôle positif. Cela montre que le virus entraîne une surexpression de GADD34, cible de la sephin1. En revanche, les cellules non infectées présentent un niveau très bas de GADD34, ce qui est en accord avec nos espérances, l'expression de GADD34 semble faible en conditions physiologiques. Cette expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois, il serait préférable de la répéter pour confirmer ou infirmer ces observations.

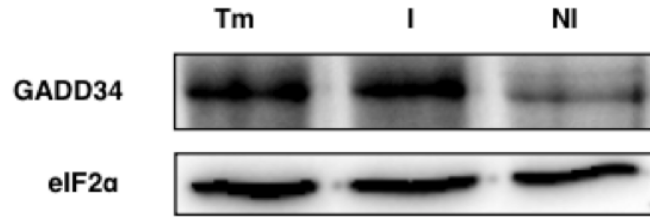


Figure 26 : Détection de GADD34 par western blot après immunoprécipitation sur cellules 293T infectées par le virus MV-Luc

Tm : Cellules traitées à la tunicamycine (témoin positif) ; I : cellules infectées par MV-Luc à MOI = 0,5 ; NI : cellules non infectées, ici eIF2α correspond à eIF2α totale

E. Etudes de l'effet antivirale de la sephin1 en conditions *in vivo*

1. Etude chez le lapin

Au cours de l'infection expérimentale, seulement trois lapins (deux non traités et un traité) ont développé des signes cliniques à partir du 5^{ème} jour post infection. Ces signes ont été dans un premier temps l'apparition de plusieurs foyers de congestion sur les deux oreilles débutant au point d'inoculation, puis d'une conjonctivite avec chassie et enfin, d'une détresse respiratoire couplée à une nette détérioration de l'état général. Les autres lapins n'ont présenté aucun signe clinique. Cependant, ils ont tous été testés positifs en PCR quantitative pour le MYXV, témoignant ainsi d'une infection effective et d'une excrétion virale par voie conjonctivale.

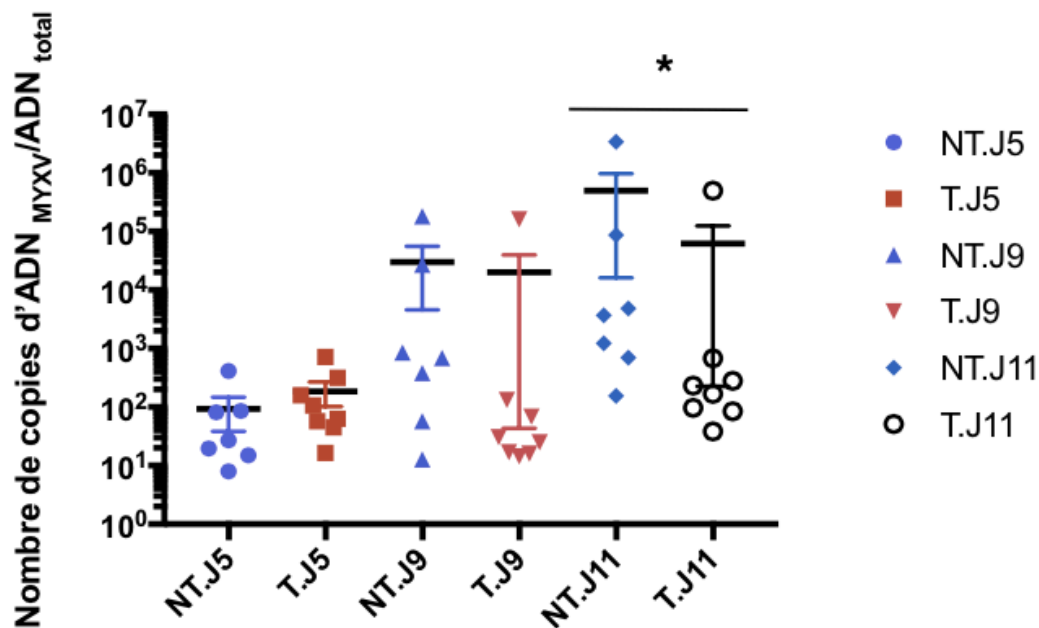


Figure 27 : Evolution de l'excrétion virale de lapins infectés par le MYXV en fonction du temps
 NT : non traités ; T : traités ; J : jour post-infection (Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne) * : p-value < 0,05

D'après la Figure 27, il n'y a pas de différence significative de charge virale excrétée entre les lapins traités et non traités à 5 et 9 jours post-infection. En revanche, à 11 jours post infection, la réalisation d'un test de Mann-Whitney a permis la mise en évidence d'une différence significative entre les deux groupes, cela témoigne d'un effet antiviral de la sephin1 en condition *in vivo*. Cette expérience doit cependant être répétée en réalisant un nouvel essai avec un protocole d'infection optimisé.

Concernant la toxicité en conditions *in vivo* de la molécule, elle n'a pas été investiguée de manière approfondie (autopsie, analyses biochimiques...) : il nous est donc impossible de conclure de manière formelle à ce sujet. Mais d'un point de vue clinique, les animaux n'ont pas semblé présenter de signes de toxicité aiguë pendant toute la durée du traitement.

2. Etude chez la souris

Aucune différence significative de variation de poids n'est observée entre les différents groupes (Fig. 28A). Un test d'Agostino et Pearson a permis de vérifier la normalité des données des deux groupes de souris « infectées non traitées » et « infectées traitées à 10mg/kg de sephin1 ». La réalisation d'un test de Student n'a révélé aucune différence significative de charge virale entre ces différents groupes (Fig. 28B).

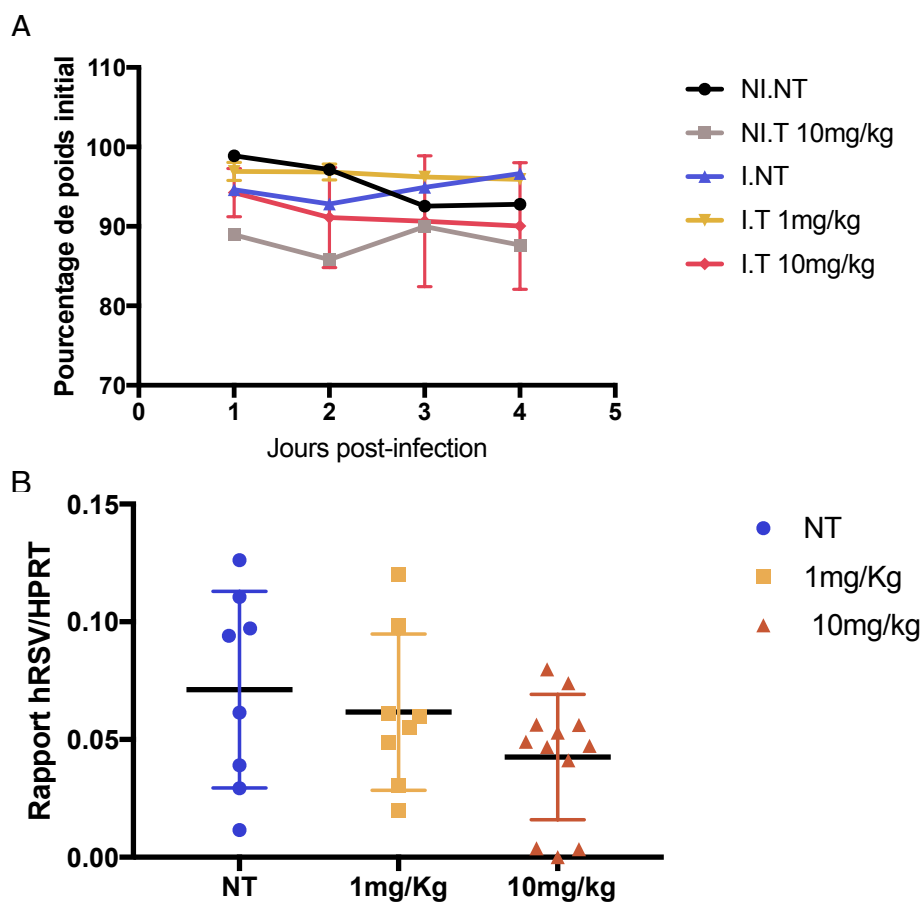


Figure 28 : Etude de la charge virale en fonction des concentrations de sephin1 en conditions *in vivo*

A : NI.NT : souris non infectées et non traitées (DMSO) ; NI.T : souris non infectées et traitées avec 10mg/kg de sephin1 SID ; I.NT : souris infectées et traitées avec 1ou 10mg/kg de sephin1 SID

B : NT : souris non traitées (DMSO) ; 1mg/kg : souris traitées à 1mg/kg SID de séphin1 ; 10mg/kg : souris traitées à 10mg/kg SID de sephin1

(Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne)

IV. Discussion

Des résultats *in vitro* encourageants

L'étude des propriétés antivirales de la sephin1 sur culture cellulaire démontre un effet dépendant des virus testés, comme cela était attendu. Les réplifications des virus influenza A, West Nile et du virus de l'encéphalite japonaise n'ont pas été inhibées par le traitement à la sephin1.

Concernant les virus influenza A, nous avons vu que la protéine NS1 était une puissante inhibitrice de la PKR, à tel point qu'aucune différence n'a été observée entre le taux d'eIF2 α phosphorylé dans des cellules infectées et des cellules non infectées (Li et al. 2006; Min et al. 2007). De plus, les virus influenza A n'entraînent pas d'activation de PERK via la production d'un stress du réticulum endoplasmique comme le font certains virus (Landeras-Bueno et al. 2016). Ceci explique très probablement l'inefficacité de la sephin1 à contrer la réplication de ce virus, du fait d'un taux d'eIF2 α phosphorylé extrêmement faible dans les cellules infectées.

Des résultats similaires ont été observés avec la souche IT88 du virus West Nile. Nous avons vu que le virus West Nile était un faible activateur de la PKR mais que certaines souches virulentes, comme la souche NY99, étaient cependant capables d'entraîner une phosphorylation importante d'eIF2 α via l'activation de PERK (Ambrose, Mackenzie 2011; Medigeshi et al. 2007; Elbahesh, Scherbik, Brinton 2011). Il est ainsi possible que les souches virales testées n'entraînent pas l'activation de PERK. Cela serait vérifiable en comparant le niveau de phosphorylation d'eIF2 α dans des cellules infectées et dans des cellules non infectées. Tester la sephin1 sur la souche NY99 du virus West Nile, qui entraîne une activation importante de PERK, serait également intéressant. Une autre hypothèse pour expliquer l'absence d'inhibition de la réplication virale serait les faibles concentrations de sephin1 utilisées. En effet, la concentration la plus élevée testée pour le virus West Nile était de 7 μ M du fait de l'observation d'une toxicité cellulaire alors que nous avons vu que pour le virus hRSV, une activité antivirale était observée uniquement à partir d'une concentration à 25 μ M en sephin1. Enfin, concernant la toxicité de la molécule, les observations rapportées sont assez surprenantes. En effet, les cellules utilisées étaient des cellules 293T également utilisées pour les

expérimentations avec le virus de la rougeole dans notre laboratoire et chez nos collaborateurs de l'Institut Pasteur (Pierre Olivier Vidalain) et aucune toxicité de la sephin1 n'a été observée, même à des concentrations de 50µM. Nous n'avons pas d'hypothèse pour expliquer la différence de toxicité observée sur la lignée 293T entre les différents laboratoires.

Les essais réalisés avec le virus de l'encéphalite japonaise montrent là aussi une absence d'activité antivirale de la sephin1. Nous avons vu précédemment que la protéine NS2A du virus de l'encéphalite japonaise était capable de bloquer très précocement la phosphorylation d'eIF2α par la PKR. Il a cependant été rapporté qu'à partir de 24h post-infection, le taux de phosphorylation d'eIF2α était plus élevé dans les cellules infectées que dans les cellules témoins, laissant un espoir à l'obtention d'une activité antivirale après 24h post-infection (Tu et al. 2012). Il faudrait, pour conclure à ce sujet, refaire l'infection expérimentale et traiter plus longtemps. Le fait que la phosphorylation d'eIF2α se fasse, mais de manière tardive, peut être un avantage pour deux raisons. Premièrement, la sephin1 serait ainsi peut être plus efficace dans les stades tardifs de l'infection, ce qui est souvent le cas lors de mise en place de thérapie antivirale, le stade de l'infection étant souvent avancé. Deuxièmement, la phosphorylation d'eIF2α étant assez tardive, du fait du blocage par NS2A, cela laisse la possibilité d'une production d'IFN-I et d'effecteurs antiviraux, bien que cela puisse être limité de par la capacité du virus JEV à inhiber l'induction d'IFN-β (Chang et al. 2013).

Tous les virus cités précédemment ont en commun la capacité d'inhiber la PKR. Pour certains, nous avons vu que d'autres raisons pouvaient expliquer l'absence d'effet antiviral de la sephin1, mais la présence d'inhibiteur de la PKR reste l'hypothèse principale pour expliquer les résultats obtenus.

Les résultats *in vitro* obtenus par l'étude des propriétés antivirales de la sephin1 suggèrent un effet antiviral de cette molécule contre les virus MYXV, MV et hRSV. En effet, une diminution de la réplication virale a été notée pour ces trois virus en présence de sephin1, avec une viabilité cellulaire correcte. Il convient cependant de rester prudent concernant ces résultats, notamment vis à vis des résultats obtenus avec les virus MV et hRSV. En effet, les souches de virus testées étaient,

pour ces deux virus, des souches modifiées de façon à exprimer une activité luciférase, ce qui n'équivaut pas à l'étude de souches sauvages. De plus, pour le virus de la rougeole, la souche modifiée était à l'origine une souche vaccinale, donc présentant déjà une virulence atténuée.

Nous avons vu que pour certains virus, aucun effet n'avait été observé. Pour les virus avec lesquels une activité antivirale de la sephin1 est suggérée, nous avons étudié le mode d'action de cette molécule, afin de confirmer ou non son activité inhibitrice sur GADD34.

La sephin1 : une activité inhibitrice de GADD34 pas si évidente

Si l'on doit extraire deux grandes tendances des résultats obtenus par l'étude de l'effet de la sephin1 sur la phosphorylation d'eIF2 α , que ce soit pour le virus de la rougeole ou le virus MYXV, c'est la présence d'une augmentation d'eIF2 α -P dans des cellules non infectées ayant reçu de la sephin1 et l'absence d'augmentation franche d'eIF2 α -P dans les cellules infectées traitées – en comparaison avec les cellules infectées non traitées. L'augmentation d'eIF2 α -P dans les cellules traitées non infectées signe la présence d'un stress basal des cellules en culture dont le taux plus élevé d'eIF2 α -P dans les cellules traitées peut être expliqué par l'accumulation d'eIF2 α -P du fait du traitement à la sephin1. Pour les cellules infectées, l'absence d'augmentation franche de la phosphorylation d'eIF2 α dans les cellules traitées pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses. La première serait basée sur la capacité des deux virus étudiés à contrer l'action de la PKR : le virus de la rougeole, probablement via la protéine C, et le virus de la myxomatose, via les protéines M156 et M029. Si cette hypothèse était vérifiée, il serait alors difficile d'expliquer l'activité antivirale de la sephin1 par l'inhibition de GADD34. En effet, dans les conditions d'un faible taux d'eIF2 α -P en raison d'une non activation de la PKR, l'activité de GADD34 devrait être nulle ou du moins sans conséquence du fait de l'absence d'eIF2 α -P à déphosphoryler. Dans de telles conditions, l'inhibition de GADD34 par la sephin1 ne devrait également pas avoir de répercussion sur la synthèse protéique et donc sur le cycle viral. La deuxième hypothèse serait l'insuffisance de ligands viraux pour activer la PKR du fait d'une réponse antivirale importante. Dans cette hypothèse, l'inhibition

de GADD34 entrainerait un arrêt massif de la réplication virale, du moins pour certaines cellules, avec pour conséquence une diminution des ARN viraux activateurs de la PKR. Ceci expliquerait une diminution paradoxale du taux d'eIF2 α -P après inhibition GADD34 par la sephin1. Enfin, on ne peut pas exclure que l'activité antivirale de la sephin1 ne passe pas par l'inhibition de GADD34. Il convient cependant d'être prudent, puisque les résultats d'analyse de la phosphorylation d'eIF2 α obtenus diffèrent en fonction des virus étudiés ; l'utilisation d'un autre anticorps anti-eIF2 α -P permettrait de valider sa détection et de s'assurer que c'est bien eIF2 α -P qui a été étudiée au cours de ces expériences. L'action de la sephin1 sur la déphosphorylation d'eIF2 α a été, de plus, récemment remise en cause, ce qui pourrait être compatible avec l'intervention d'un autre mécanisme d'action antivirale indépendant de la phosphorylation d'eIF2 α (Crespillo-Casado et al. 2017). De façon à investiguer davantage ce sujet, il serait intéressant de tester l'effet antiviral de la sephin1 sur des cellules exprimant une mutation de eIF2 α ayant pour conséquence une perte de sa capacité à être phosphorylé. Ainsi, si l'effet antiviral se faisait bien via le blocage de la déphosphorylation d'eIF2 α , aucun effet antiviral ne devrait être observé suite à l'infection et au traitement de ces cellules avec de la sephin1.

Une surexpression de GADD34 a été observée dans les cellules infectées avec le virus de la souche Schwartz du virus de la rougeole. Le fait que GADD34 soit induite uniquement dans les cellules infectées est un point intéressant, à condition que la sephin1 soit bien sélective de GADD34. En effet, on peut imaginer que seules les cellules infectées surexpriment la cible de la sephin1, et par conséquent cette dernière impactera ces cellules uniquement et non les cellules saines. Il convient cependant de rester prudent dans nos conclusions, puisqu'à l'échelle de l'organisme, rien ne dit que les cellules non infectées ne présentent pas également une induction de GADD34, du fait des cytokines produites par les cellules infectées. Dans ce cas, l'hypothèse d'une molécule spécifique des cellules infectées par le virus n'est pas une certitude, avec la possibilité d'une inhibition de la synthèse protéique de cellules non infectées. En effet, d'après l'étude récente publiée par Alexandre Dalet et son équipe en 2017, GADD34 pourrait être induite indépendamment de la phosphorylation d'eIF2 α , via IRF3 et peut être IRF7 (Dalet et al. 2017). Or, IRF7 peut

être induit par les IFN-I qui agissent par voie paracrine. Ainsi, il est tout à fait probable que des cellules non infectées réceptives aux IFN-I surexpriment GADD34 via l'induction d'IRF7. Il serait alors intéressant de refaire les expériences visant à détecter GADD34 sur cellules non infectées, mais traitées aux interférons.

La sephin1 : des propriétés antivirales *in vivo* à conforter

Malgré l'apparition de quelques imprévus au cours des expériences réalisées en conditions *in vivo*, il semble qu'un effet antiviral de la sephin1 soit confirmé. Tout d'abord, concernant l'infection expérimentale réalisée sur les lapins, il convient de préciser qu'initialement l'inoculum viral devait être de 50pfu/lapin, mais que du fait d'une diminution importante du titre viral de la suspension depuis le dernier titrage, il s'est avéré que les lapins ont été inoculés avec seulement 5pfu/lapin, expliquant ainsi l'absence de signe clinique observé chez la majorité d'entre eux. Le fait que seulement trois lapins sur les quinze aient développé des signes cliniques s'explique très probablement par la sous-exposition des animaux au virus — alors que l'objectif était d'obtenir 100% d'animaux en phase symptomatique. Cependant, tous les écouvillons conjonctivaux analysés étaient positifs en PCR quantitative, signifiant là que tous les lapins ont bien été infectés, puisque tous excrétaient le virus par voie conjonctivale à 11 jours post-infection, avec une différence significative de charge virale excrétée entre les groupes traités et non traités. Du fait d'une sous exposition virale, on obtient ainsi un tableau clinique hétérogène. De plus, l'objectif de la stratégie thérapeutique d'une molécule antivirale est d'être utilisée en phase symptomatique et il n'est bien sûr pas possible d'extrapoler nos résultats à des lapins en phase clinique, n'ayant pu observer que trois animaux en phase symptomatique. Il conviendrait ainsi de refaire l'infection expérimentale avec une dose infectieuse de 50pfu/lapin, voire même tester des posologies plus élevées de sephin1, aucun signe de toxicité aiguë n'ayant été observé.

Le deuxième biais de notre étude est l'administration du traitement dès le jour de l'infection. En effet, l'utilisation d'un antiviral se fait le plus souvent une fois l'infection diagnostiquée, donc pendant la phase symptomatique. Cependant, la stratégie que nous avons suivie apparaît la plus sensible pour mettre en évidence un

effet antiviral potentiel et ainsi savoir s'il est intéressant de poursuivre par d'autres études.

Enfin, une des limites dans l'utilisation de certaines molécules à activité antivirale en conditions *in vivo* est la composante pharmacocinétique. Certaines molécules peuvent présenter une efficacité avérée en conditions *in vitro*, mais non confirmée en conditions *in vivo*. Des contraintes concernant la stabilité de la molécule — comme son absorption ou les biotransformations hépatiques éventuelles — sont autant d'incertitudes pouvant expliquer un échec thérapeutique, du fait d'une absence, ou du moins, d'une quantité insuffisante de principe actif au niveau de la cible. Dans notre cas, la mise en évidence d'une activité antivirale en conditions *in vivo* laisse penser que la forme de sephin1 utilisée pour notre étude a pu atteindre sa cible thérapeutique, ce qui n'était pas une certitude au départ. En effet, il est nécessaire de préciser que les paramètres pharmacocinétiques de la sephin1 rapportés dans la littérature ont été évalués uniquement chez la souris et le rat, soit avec de l'acétate de sephin1 soluble dans l'eau ou soit avec de la sephin1 base soluble dans du DMSO. Dans cette étude *in vivo*, nous disposions uniquement de sephin1 base. Il est donc possible que la forme de sephin1 utilisée dans notre étude présente des paramètres pharmacocinétiques potentiellement différents de certaines données rapportées dans la littérature. A l'avenir, l'utilisation de la forme soluble dans l'eau permettrait une administration plus aisée.

Concernant l'étude de l'effet antiviral de la sephin1 sur les souris infectées par le hRSV, les résultats sont moins satisfaisants. Le hRSV est connu pour ne pas entraîner de signes cliniques chez la souris (Bem, Domachowske, Rosenberg 2011). En revanche, la réplication du virus dans les poumons a pu être étudiée. Aucun effet antiviral n'a été observé chez la souris. Cependant, le groupe traité à 10mg/kg présente la moyenne de réplication virale la plus faible : l'espoir est donc permis d'observer un effet antiviral pour des posologies plus élevées, mais le problème de la toxicité se pose. En effet, il était initialement prévu de faire un groupe de souris traitées à 100mg/kg, mais devant la survenue d'une toxicité suraigüe, le protocole a été revu et réalisé à la façon décrite dans la partie « matériels et méthodes ». Les souris ayant reçu une dose de 100mg/kg ont présenté une toxicité suraigüe

caractérisée par l'apparition d'une agitation, puis de crises convulsives suivies d'un arrêt cardio-respiratoire. Les raisons de la toxicité aigüe sont pour le moment inconnues.

Il convient également de rappeler les limites du modèle murin pour l'étude du virus hRSV. Il existe des différences certaines entre les réponses immunitaires innées et adaptatives de l'homme et de la souris, à commencer par le profil de cytokines et la présence de certains PRR (Mestas, Hughes 2004). De plus, la souris possède dans son sang environ 75 à 90% de lymphocytes et 10 à 25% de neutrophiles, contre 30 à 50% de lymphocytes et 50 à 70% de neutrophiles pour l'homme (Doeing, Borowicz, Crockett 2003). Enfin, l'anatomie des poumons de la souris diffère légèrement de l'anatomie de ceux de l'homme, notamment par des bronchioles en moins grand nombre, une ramification de l'arbre respiratoire moins importante et un calibre des voies respiratoires proportionnellement plus important que chez l'homme (Irvin, Bates 2003). Enfin, comme cela a été vu précédemment, le virus hRSV n'induit pas de tableau clinique vrai chez la souris contrairement à l'homme, ce qui est là encore, une limite à l'extrapolation de résultats à l'homme, qui peut présenter un tableau clinique dominé par l'inflammation avec une infiltration neutrophilique.

Conclusion

Nous avons pu montrer que la sephin1 présentait bien des propriétés antivirales en conditions *in vitro* à l'encontre de certains virus appartenant à des familles virales différentes, suggérant ainsi l'intérêt potentiel de cette molécule, notamment par son spectre antiviral assez large. Les expériences réalisées afin de comprendre si l'activité antivirale de la sephin1 se faisait bien par un blocage de la déphosphorylation d'eIF2 α sont malheureusement peu concluantes, ce qui est essentiellement dû à un faible niveau de phosphorylation d'eIF2 α détecté, rendant les résultats moins reproductibles. Ainsi, d'autres expériences sont prévues au sein de l'équipe de virologie, afin de pouvoir répondre à cette question. Nous avons pu montrer également que GADD34, cible de la sephin1, était surexprimée dans les cellules infectées par le virus de la rougeole, suggérant ainsi une plus grande spécificité de l'activité de la molécule pour les cellules infectées. Là encore, d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer ce résultat. Les études *in vivo* réalisées sont encourageantes, puisque des différences significatives de charge virale sont observées chez les lapins, montrant ainsi que la molécule est correctement absorbée et diffuse correctement sur le site d'infection. Néanmoins, il serait intéressant de la tester à des posologies plus élevées sur des animaux présentant un tableau clinique, si la molécule ne présente pas de toxicité à des posologies plus élevées. En effet, la toxicité de la molécule observée chez la souris semble être la principale limite de cette molécule, empêchant l'augmentation des doses pour espérer un effet antiviral plus marqué. Il serait également intéressant de tester l'effet synergique de la sephin1 avec d'autres antiviraux, utilisant des mécanismes d'action différents. Le nitazoxanide, une molécule actuellement en essai clinique de phase 3 pour traiter les infections à virus Influenza chez l'homme, serait probablement très approprié par son mécanisme d'action complémentaire avec celui de la sephin1 (Koszalka, Tilmanis, Hurt 2017). En effet le nitazoxanide, par activation de la PKR en induisant sa phosphorylation, agit en amont de la sephin1 et pourrait ainsi renforcer l'effet antiviral observé sur certains virus, voire même permettre un effet antiviral de la sephin1 pour les virus bloquant l'activation de la PKR de manière importante.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, VOLMER Romain, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de FUSADE-BOYER Maxime intitulée « **Etude des propriétés antivirales d'un modulateur de la protéine Kinase R** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.




Fait à Toulouse, le 20 octobre 2017
Docteur VOLMER Romain
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

Vu :
Le Président du jury :
Professeur PASQUIER Christophe



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRÉ-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

ALBERTINI, Aurélie A. V., WERNIMONT, Amy K., MUZIOL, Tadeusz, RAVELLI, Raimond B. G., CLAPIER, Cedric R., SCHOEHN, Guy, WEISSENHORN, Winfried et RUIGROK, Rob W. H., 2006. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science (New York, N.Y.)*. 21 juillet 2006. Vol. 313, n° 5785, pp. 360-363.

ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. et FLAVELL, R. A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 18 octobre 2001. Vol. 413, n° 6857, pp. 732-738.

ALLEN, Irving C., SCULL, Margaret A., MOORE, Chris B., HOLL, Eda K., MCELVANIA-TEKIPPE, Erin, TAXMAN, Debra J., GUTHRIE, Elizabeth H., PICKLES, Raymond J. et TING, Jenny P.-Y., 2009. The NLRP3 Inflammasome Mediates in vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*. 17 avril 2009. Vol. 30, n° 4, pp. 556-565.

AMBROSE, Rebecca L. et MACKENZIE, Jason M., 2011. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *Journal of Virology*. mars 2011. Vol. 85, n° 6, pp. 2723-2732.

BALACHANDRAN, S., ROBERTS, P. C., BROWN, L. E., TRUONG, H., PATTNAIK, A. K., ARCHER, D. R. et BARBER, G. N., 2000. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*. juillet 2000. Vol. 13, n° 1, pp. 129-141.

BEM, R. A., DOMACHOWSKIE, J. B. et ROSENBERG, H. F., 2011. Animal models of human respiratory syncytial virus disease. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1 août 2011. Vol. 301, n° 2, pp. L148-L156.

BOONYARATANAKORNKIT, Jim, BARTLETT, Emmalene, SCHOMACKER, Henrick, SURMAN, Sonja, AKIRA, Shizuo, BAE, Yong-Soo, COLLINS, Peter, MURPHY, Brian et SCHMIDT, Alexander, 2011. The C Proteins of Human Parainfluenza Virus Type 1 Limit Double-Stranded RNA Accumulation That Would Otherwise Trigger Activation of MDA5 and Protein Kinase R. *Journal of Virology*. février 2011. Vol. 85, n° 4, pp. 1495-1506.

BRINTON, Margo A., 2002. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Review of Microbiology*. 2002. Vol. 56, pp. 371-402.

BRUSH, Matthew H., WEISER, Douglas C. et SHENOLIKAR, Shirish, 2003. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 α to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *Molecular and Cellular Biology*. février 2003. Vol. 23, n° 4, pp. 1292-1303.

CHANG, Ruey-Yi, HSU, Ta-Wen, CHEN, Yen-Lin, LIU, Shu-Fan, TSAI, Yi-Jer, LIN, Yun-Tong, CHEN, Yi-Shiuan et FAN, Yi-Hsin, 2013. Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. *Veterinary Microbiology*. 27 septembre 2013. Vol. 166, n° 1-2, pp. 11-21.

CHESHIRE, J. L., WILLIAMS, B. R. et BALDWIN, A. S., 1999. Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 19 février 1999. Vol. 274, n° 8, pp. 4801-4806.

CHIU, Yu-Hsin, MACMILLAN, John B. et CHEN, Zhijian J., 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 7 août 2009. Vol. 138, n° 3, pp. 576-591.

CHOU, J et ROIZMAN, B, 1994. Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 7 juin 1994. Vol. 91, n° 12, pp. 5247-5251.

CHRISTINE HOLLANDER, M, POOLA-KELLA, Silpa et FORNACE, Albert J, 2003. Gadd34 functional domains involved in growth suppression and apoptosis. *Oncogene*. 19 juin 2003. Vol. 22, n° 25, pp. 3827-3832.

CLAVARINO, Giovanna, CLÁUDIO, Nuno, COUDERC, Thérèse, DALET, Alexandre, JUDITH, Delphine, CAMOSSETO, Voahirana, SCHMIDT, Enrico K., WENGER, Till, LECUIT, Marc, GATTI, Evelina et PIERRE, Philippe, 2012. Induction of GADD34 Is Necessary for dsRNA-Dependent Interferon- β Production and Participates in the Control of Chikungunya Virus Infection. *PLoS Pathogens*. mai 2012. Vol. 8, n° 5.

CLAVARINO, Giovanna, CLÁUDIO, Nuno, DALET, Alexandre, TERAWAKI, Seigo, COUDERC, Thérèse, CHASSON, Lionel, CEPPI, Maurizio, SCHMIDT, Enrico K., WENGER, Till, LECUIT, Marc, GATTI, Evelina et PIERRE, Philippe, 2012. Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acid-stimulated dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21 février 2012. Vol. 109, n° 8, pp. 3006-3011.

CLEMENS, M. J., HERSHEY, J. W., HOVANESSIAN, A. C., JACOBS, B. C., KATZE, M. G., KAUFMAN, R. J., LENGYEL, P., SAMUEL, C. E., SEN, G. C. et WILLIAMS, B. R., 1993. PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase

induced by interferon. *Journal of Interferon Research*. juin 1993. Vol. 13, n° 3, pp. 241.

COLBY, C., JURALE, C. et KATES, J. R., 1971. Mechanism of synthesis of vaccinia virus double-stranded ribonucleic acid in vivo and in vitro. *Journal of Virology*. janvier 1971. Vol. 7, n° 1, pp. 71-76.

COLE, James L., 2007. Activation of PKR: an open and shut case? *Trends in Biochemical Sciences*. février 2007. Vol. 32, n° 2, pp. 57-62.

CONNOR, John H., WEISER, Douglas C., LI, Shi, HALLENBECK, John M. et SHENOLIKAR, Shirish, 2001. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase 1 and Inhibitor 1. *Molecular and Cellular Biology*. octobre 2001. Vol. 21, n° 20, pp. 6841-6850.

CRESPILLO-CASADO, Ana, CHAMBERS, Joseph E., FISCHER, Peter M., MARCINIAK, Stefan J. et RON, David, 2017. PPP1R15A-mediated dephosphorylation of eIF2 α is unaffected by Sephin1 or Guanabenz. *eLife*. 27 avril 2017. Vol. 6.

DALET, Alexandre, ARGÜELLO, Rafael J., COMBES, Alexis, SPINELLI, Lionel, JAEGER, Sebastien, FALLET, Mathieu, MANH, Thien-Phong Vu, MENDES, Andreia, PEREGO, Jessica, REVERENDO, Marisa, CAMOSSETO, Voahirana, DALOD, Marc, WEIL, Tobias, SANTOS, Manuel A., GATTI, Evelina et PIERRE, Philippe, 2017. Protein synthesis inhibition and GADD34 control IFN- β heterogeneous expression in response to dsRNA. *The EMBO Journal*. 18 janvier 2017. pp. e201695000.

DAR, Arvin C., DEVER, Thomas E. et SICHERI, Frank, 2005. Higher-Order Substrate Recognition of eIF2 Mathieu, MANH, Thien-Phong Vu, MENDES, AndCell. 23 septembre 2005. Vol. 122, n° 6, pp. 887-900.

DAS, Indrajit, KRZYZOSIAK, Agnieszka, SCHNEIDER, Kim, WRABETZ, Lawrence, D'ANTONIO, Maurizio, BARRY, Nicholas, SIGURDARDOTTIR, Anna et BERTOLOTTI, Anne, 2015. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*. 2015. Vol. 348, n° 6231, pp. 239–242.

DAUBER, Bianca, MARTÍNEZ-SOBRIDO, Luis, SCHNEIDER, Jana, HAI, Rong, WAIBLER, Zoe, KALINKE, Ulrich, GARCÍA-SASTRE, Adolfo et WOLFF, Thorsten, 2009. Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR. *PLoS pathogens*. juin 2009. Vol. 5, n° 6, pp. e1000473.

DAUBER, Bianca et WOLFF, Thorsten, 2009. Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures. *Viruses*. 27 octobre 2009. Vol. 1, n° 3, pp. 523-544.

DAVIS, William G., BLACKWELL, Jerry L., SHI, Pei-Yong et BRINTON, Margo A., 2007. Interaction between the Cellular Protein eEF1A and the 3n, 2009. Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral NA Synthesis. *Journal of*

Virology. 15 septembre 2007. Vol. 81, n° 18, pp. 10172-10187.

DER, Sandy D., YANG, Yi-Li, WEISSMANN, Charles et WILLIAMS, Bryan R. G., 1997. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1 avril 1997. Vol. 94, n° 7, pp. 3279-3283.

DEY, Madhusudan, CAO, Chune, DAR, Arvin C., TAMURA, Tomohiko, OZATO, Keiko, SICHERI, Frank et DEVER, Thomas E., 2005. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell*. 23 septembre 2005. Vol. 122, n° 6, pp. 901-913.

DIEBOLD, Sandra S., KAISHO, Tsuneyasu, HEMMI, Hiroaki, AKIRA, Shizuo et REIS E SOUSA, Caetano, 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*. 5 mars 2004. Vol. 303, n° 5663, pp. 1529-1531. DOI 10.1126/science.1093616.

DIEBOLD, Sandra S., MONTOYA, Maria, UNGER, Hermann, ALEXOPOULOU, Lena, ROY, Polly, HASWELL, Linsey E., AL-SHAMKHANI, Aymen, FLAVELL, Richard, BORROW, Persephone et SOUSA, Caetano Reis e, 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. 17 juillet 2003. Vol. 424, n° 6946, pp. 324-328.

DOEING, Diana C., BOROWICZ, Jessica L. et CROCKETT, Elahé T., 2003. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC clinical pathology*. 12 septembre 2003. Vol. 3, n° 1, pp. 3.

DONG, Hongping, ZHANG, Bo et SHI, Pei-Yong, 2008. Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein. *Virology*. 10 novembre 2008. Vol. 381, n° 1, pp. 123-135.

DONNELLY, Neysan, GORMAN, Adrienne M., GUPTA, Sanjeev et SAMALI, Afshin, 2013. The eIF2 α genomic RNA and their interactions with v*Cellular and molecular life sciences: CMLS*. octobre 2013. Vol. 70, n° 19, pp. 3493-3511.

EHL, Stephan, BISCHOFF, Ruth, OSTLER, Tobias, VALLBRACHT, Simone, SCHULTE-MÖNTING, Jürgen, POLTORAK, Alexander et FREUDENBERG, Marina, 2004. The role of Toll-like receptor 4 versus interleukin-12 in immunity to respiratory syncytial virus. *European Journal of Immunology*. avril 2004. Vol. 34, n° 4, pp. 1146-1153.

ELBAHESH, H., SCHERBIK, S. V. et BRINTON, M. A., 2011. West Nile virus infection does not induce PKR activation in rodent cells. *Virology*. 5 décembre 2011. Vol. 421, n° 1, pp. 51-60.

FENG, Zongdi, CERVENY, Melissa, YAN, Zhipeng et HE, Bin, 2007. The VP35 Protein of Ebola Virus Inhibits the Antiviral Effect Mediated by Double-Stranded RNA-

Dependent Protein Kinase PKR. *Journal of Virology*. janvier 2007. Vol. 81, n° 1, pp. 182-192.

FRIEDMAN, R. M., METZ, D. H., ESTEBAN, R. M., TOVELL, D. R., BALL, L. A. et KERR, I. M., 1972. Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *Journal of Virology*. décembre 1972. Vol. 10, n° 6, pp. 1184-1198.

GALABRU, J. et HOVANESSIAN, A., 1987. Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry*. 15 novembre 1987. Vol. 262, n° 32, pp. 15538-15544.

GARAIGORTA, Urtzi et CHISARI, Francis V., 2009. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host & Microbe*. 17 décembre 2009. Vol. 6, n° 6, pp. 513-522.

GILLESPIE, Leah K., HOENEN, Antje, MORGAN, Gary et MACKENZIE, Jason M., 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of Virology*. octobre 2010. Vol. 84, n° 20, pp. 10438-10447.

GOH, K. C., DEVEER, M. J. et WILLIAMS, B. R., 2000. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *The EMBO journal*. 15 août 2000. Vol. 19, n° 16, pp. 4292-4297.

GONZÁLEZ-NAVAJAS, José M., LEE, Jongdae, DAVID, Michael et RAZ, Eyal, 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews. Immunology*. 6 janvier 2012. Vol. 12, n° 2, pp. 125-135.

GOSWAMI, Ramansu, MAJUMDAR, Tanmay, DHAR, Jayeeta, CHATTOPADHYAY, Saurabh, BANDYOPADHYAY, Sudip K., VERBOVETSKAYA, Valentina, SEN, Ganes C. et BARIK, Sailen, 2013. Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell Research*. août 2013. Vol. 23, n° 8, pp. 1025-1042.

GOWEN, Brian B., HOOPEES, Justin D., WONG, Min-Hui, JUNG, Kie-Hoon, ISAKSON, Kevin C., ALEXOPOULOU, Lena, FLAVELL, Richard A. et SIDWELL, Robert W., 2006. TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 novembre 2006. Vol. 177, n° 9, pp. 6301-6307.

HABJAN, Matthias, ANDERSSON, Ida, KLINGSTRÖM, Jonas, SCHÜMANN, Michael, MARTIN, Arnold, ZIMMERMANN, Petra, WAGNER, Valentina, PICHLMAIR, Andreas, SCHNEIDER, Urs, MÜHLBERGER, Eike, MIRAZIMI, Ali et WEBER, Friedemann, 2008. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PloS One*. 30 avril 2008. Vol. 3, n° 4, pp. e2032.

HABJAN, Matthias, PICHLMAIR, Andreas, ELLIOTT, Richard M., OVERBY, Anna K.,

GLATTER, Timo, GSTAIGER, Matthias, SUPERTI-FURGA, Giulio, UNGER, Hermann et WEBER, Friedemann, 2009. NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Journal of Virology*. mai 2009. Vol. 83, n° 9, pp. 4365-4375.

HAKKI, Morgan et GEBALLE, Adam P., 2005. Double-Stranded RNA Binding by Human Cytomegalovirus pTRS1. *Journal of Virology*. 15 juin 2005. Vol. 79, n° 12, pp. 7311-7318.

HAKKI, Morgan, MARSHALL, Emily E., DE NIRO, Katherine L. et GEBALLE, Adam P., 2006. Binding and Nuclear Relocalization of Protein Kinase R by Human Cytomegalovirus TRS1. *Journal of Virology*. décembre 2006. Vol. 80, n° 23, pp. 11817-11826.

HALLER, Otto et KOCHS, Georg, 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. octobre 2002. Vol. 3, n° 10, pp. 710-717.

HATA, N., SATO, M., TAKAOKA, A., ASAGIRI, M., TANAKA, N. et TANIGUCHI, T., 2001. Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 13 juillet 2001. Vol. 285, n° 2, pp. 518-525.

HOCHREIN, Hubertus, SCHLATTER, Beatrix, O8nicationsA, N. et TANIGUCHI, T., 2001. Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. 2009. NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 3 août 2004. Vol. 101, n° 31, pp. 11416-11421.

HÖLZER, Martin, KRÄHLING, Verena, AMMAN, Fabian, BARTH, Emanuel, BERNHART, Stephan H., CARMELO, Victor A. O., COLLATZ, Maximilian, DOOSE, Gero, EGGENHOFER, Florian, EWALD, Jan, FALLMANN, Jörg, FELDHAHN, Lasse M., FRICKE, Markus, GEBAUER, Juliane, GRUBER, Andreas J., HUFESKY, Franziska, INDRISCHEK, Henrike, KANTON, Sabina, LINDE, Jörg, MOSTAJO, Nelly, OCHSENREITER, Roman, RIEGE, Konstantin, RIVAROLA-DUARTE, Lorena, SAHYOUN, Abdullah H., SAUNDERS, Sita J., SEEMANN, Stefan E., TANZER, Andrea, VOGEL, Bertram, WEHNER, Stefanie, WOLFINGER, Michael T., BACKOFEN, Rolf, GORODKIN, Jan, GROSSE, Ivo, HOFACKER, Ivo, HOFFMANN, Steve, KALETA, Christoph, STADLER, Peter F., BECKER, Stephan et MARZ, Manja, 2016. Differential transcriptional responses to Ebola and Marburg virus infection in bat and human cells. *Scientific Reports*. 7 octobre 2016. Vol. 6, pp. srep34589. DOI 10.1038/srep34589.

HONDA, Kenya, TAKAOKA, Akinori et TANIGUCHI, Tadatsugu, 2006. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. septembre 2006. Vol. 25, n° 3, pp. 349-360.

HORNUNG, Veit, ELLEGAST, Jana, KIM, Sarah, BRZÓZKA, Krzysztof, JUNG,

Andreas, KATO, Hiroki, POECK, Hendrik, AKIRA, Shizuo, CONZELMANN, Karl-Klaus, SCHLEE, Martin, ENDRES, Stefan et HARTMANN, Gunther, 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (New York, N.Y.)*. 10 novembre 2006. Vol. 314, n° 5801, pp. 994-997.

HORNUNG, Veit, SCHLENDER, Jörg, GUENTHNER-BILLER, Margit, ROTHENFUSSER, Simon, ENDRES, Stefan, CONZELMANN, Karl-Klaus et HARTMANN, Gunther, 2004. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *Journal of Immunology*. 15 novembre 2004. Vol. 173, n° 10, pp. 5935-5943.

I, Kim, CW, Liu et JD, Puglisi, 2006. Specific recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA binding domains (dsRBD1-dsRBD2) of PKR. *Journal of molecular biology*. avril 2006. Vol. 358, n° 2, pp. 430-442.

IKEGAMI, Tetsuro, NARAYANAN, Krishna, WON, Sungyong, KAMITANI, Wataru, PETERS, C. J. et MAKINO, Shinji, 2009. Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF2alpha phosphorylation. *PLoS pathogens*. février 2009. Vol. 5, n° 2, pp. e1000287.

IRVIN, Charles G et BATES, Jason HT, 2003. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respiratory Research*. 2003. Vol. 4, n° 1, pp. 4.

ITO, Sachiko, TANAKA, Yuriko, OSHINO, Reina, AIBA, Keiko, THANASEGARAN, Suganya, NISHIO, Naomi et ISOBE, Ken-ichi, 2015. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Scientific Reports*. 9 février 2015. Vol. 5, pp. 8327.

ITO, Takahiko, YANG, Mingli et MAY, W. Stratford, 1999. RAX, a Cellular Activator for Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase during Stress Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 28 mai 1999. Vol. 274, n° 22, pp. 15427-15432.

IWASAKI, Akiko et MEDZHITOV, Ruslan, 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. octobre 2004. Vol. 5, n° 10, pp. 987-995.

JACOBS, B. L. et LANGLAND, J. O., 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. 15 mai 1996. Vol. 219, n° 2, pp. 339-349.

JACQUEMONT, B. et ROIZMAN, B., 1975. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *Journal of Virology*. avril 1975. Vol. 15, n° 4, pp. 707-713.

JOUSSE, Céline, OYADOMARI, Seiichi, NOVOA, Isabel, LU, Phoebe, ZHANG, Yuhong, HARDING, Heather P. et RON, David, 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2α phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *The Journal of Cell Biology*. 24 novembre 2003. Vol. 163, n° 4, pp. 767-775.

KANNEGANTI, Thirumala-Devi, 2010. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature reviews. Immunology*. octobre 2010. Vol. 10, n° 10, pp. 688-698.

KATO, Hiroki, TAKEUCHI, Osamu, MIKAMO-SATOH, Eriko, HIRAI, Reiko, KAWAI, Tomoji, MATSUSHITA, Kazufumi, HIIRAGI, Akane, DERMODY, Terence S., FUJITA, Takashi et AKIRA, Shizuo, 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine*. 7 juillet 2008. Vol. 205, n° 7, pp. 1601-1610.

KAWAI, Taro et AKIRA, Shizuo, 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*. février 2006. Vol. 7, n° 2, pp. 131-137.

KEEFFE, Emmet B et ROSSIGNOL, Jean-François, 2009. Treatment of chronic viral hepatitis with nitazoxanide and second generation thiazolidines. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 21 avril 2009. Vol. 15, n° 15, pp. 1805-1808.

KOCHS, G. et HALLER, O., 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2 mars 1999. Vol. 96, n° 5, pp. 2082-2086.

KOSZALKA, Paulina, TILMANIS, Danielle et HURT, Aeron C., 2017. Influenza antivirals currently in late phase clinical trial. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. mai 2017. Vol. 11, n° 3, pp. 240-246.

KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J. et FINBERG, R. W., 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*. novembre 2000. Vol. 1, n° 5, pp. 398-401.

LANDERAS-BUENO, Sara, FERNÁNDEZ, Yolanda, FALCÓN, Ana, OLIVEROS, Juan Carlos et ORTÍN, Juan, 2016. Chemical Genomics Identifies the PERK-Mediated Unfolded Protein Stress Response as a Cellular Target for Influenza Virus Inhibition. *mBio*. 4 mai 2016. Vol. 7, n° 2, pp. e00085-16.

LANDIS, Heinrich, SIMON-JÖDICKE, Angela, KLÖTI, Andreas, PAOLO, Claudio Di, SCHNORR, Jens-Jörg, SCHNEIDER-SCHAULIES, Sibylle, HEFTI, Hans Peter et PAVLOVIC, Jovan, 1998. Human MxA Protein Confers Resistance to Semliki Forest Virus and Inhibits the Amplification of a Semliki Forest Virus-Based Replicon in the Absence of Viral Structural Proteins. *Journal of Virology*. 1 février 1998. Vol. 72, n° 2, pp. 1516-1522.

LE GOFFIC, Ronan, BALLOY, Viviane, LAGRANDERIE, Micheline, ALEXOPOULOU, Lena, ESCRIOU, Nicolas, FLAVELL, Richard, CHIGNARD, Michel

et SI-TAHAR, Mustapha, 2006. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS pathogens*. juin 2006. Vol. 2, n° 6, pp. e53.

LEBLEU, B, SEN, G C, SHAILA, S, CABRER, B et LENGYEL, P, 1976. Interferon, double-stranded RNA, and protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. septembre 1976. Vol. 73, n° 9, pp. 3107-3111.

LEE, Heung Kyu, LUND, Jennifer M., RAMANATHAN, Balaji, MIZUSHIMA, Noboru et IWASAKI, Akiko, 2007. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*. 9 mars 2007. Vol. 315, n° 5817, pp. 1398-1401.

LEE, T. G., TOMITA, J., HOVANESSIAN, A. G. et KATZE, M. G., 1992. Characterization and regulation of the 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 15 juillet 1992. Vol. 267, n° 20, pp. 14238-14243.

LEE, Yun-Young, CEVALLOS, Randal C. et JAN, Eric, 2009. An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 α Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 13 mars 2009. Vol. 284, n° 11, pp. 6661-6673.

LEPPERT, M., RITTENHOUSE, L., PERRAULT, J., SUMMERS, D. F. et KOLAKOFSKY, D., 1979. Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. *Cell*. novembre 1979. Vol. 18, n° 3, pp. 735-747.

LI, Shoudong, MIN, Ji-Young, KRUG, Robert M. et SEN, Ganes C., 2006. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*. 25 mai 2006. Vol. 349, n° 1, pp. 13-21.

LI, Xiao-Ling, BLACKFORD, John A. et HASSEL, Bret A., 1998. RNase L Mediates the Antiviral Effect of Interferon through a Selective Reduction in Viral RNA during Encephalomyocarditis Virus Infection. *Journal of Virology*. avril 1998. Vol. 72, n° 4, pp. 2752-2759.

LINDQUIST, Michael E., MAINOU, Bernardo A., DERMODY, Terence S. et CROWE, James E., 2011. Activation of protein kinase R is required for induction of stress granules by respiratory syncytial virus but dispensable for viral replication. *Virology*. 25 avril 2011. Vol. 413, n° 1, pp. 103-110.

LIU, Yiliu, OLAGNIER, David et LIN, Rongtuan, 2017. Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Frontiers in Immunology*. 3 janvier 2017. Vol. 7.

LIZUNDIA, Regina, SAUTER, Kay-Sara, TAYLOR, Geraldine et WERLING, Dirk, 2008. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate*

Immunity. août 2008. Vol. 14, n° 4, pp. 223-231.

LUND, Jennifer, SATO, Ayuko, AKIRA, Shizuo, MEDZHITOV, Ruslan et IWASAKI, Akiko, 2003. Toll-like Receptor 9-mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 4 août 2003. Vol. 198, n° 3, pp. 513-520.

LUSSIGNOL, Marion, QUEVAL, Christophe, BERNET-CAMARD, Marie-Françoise, COTTE-LAFFITTE, Jacqueline, BEAU, Isabelle, CODOGNO, Patrice et ESCLATINE, Audrey, 2013. The Herpes Simplex Virus 1 Us11 Protein Inhibits Autophagy through Its Interaction with the Protein Kinase PKR. *Journal of Virology*. janvier 2013. Vol. 87, n° 2, pp. 859-871.

LUTHRA, Priya, RAMANAN, Parameshwaran, MIRE, Chad E., WEISEND, Carla, TSUDA, Yoshimi, YEN, Benjamin, LIU, Gai, LEUNG, Daisy W., GEISBERT, Thomas W., EBIHARA, Hideki, AMARASINGHE, Gaya K. et BASLER, Christopher F., 2013. Mutual Antagonism between the Ebola Virus VP35 Protein and the RIG-I Activator PACT Determines Infection Outcome. *Cell host & microbe*. 17 juillet 2013. Vol. 14, n° 1.

MA, Yanjun et HENDERSHOT, Linda M., 2003. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 12 septembre 2003. Vol. 278, n° 37, pp. 34864-34873.

MACKENZIE, Jason, 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. novembre 2005. Vol. 6, n° 11, pp. 967-977.

MALATHI, Krishnamurthy, DONG, Beihua, GALE, Michael et SILVERMAN, Robert H., 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 16 août 2007. Vol. 448, n° 7155, pp. 816-819.

MALATHI, Krishnamurthy, SAITO, Takeshi, CROCHET, Nannette, BARTON, David J., GALE, Michael et SILVERMAN, Robert H., 2010. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA (New York, N.Y.)*. novembre 2010. Vol. 16, n° 11, pp. 2108-2119.

MARCINIAK, Stefan J., YUN, Chi Y., OYADOMARI, Seiichi, NOVOA, Isabel, ZHANG, Yuhong, JUNGREIS, Rivka, NAGATA, Kazuhiro, HARDING, Heather P. et RON, David, 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development*. 15 décembre 2004. Vol. 18, n° 24, pp. 3066-3077.

MARR, Nico et TURVEY, Stuart E., 2012. Role of human TLR4 in respiratory syncytial virus-induced NF- κ B activation, viral entry and replication. *Innate Immunity*. décembre 2012. Vol. 18, n° 6, pp. 856-865.

MATSUMOTO, Misako, FUNAMI, Kenji, TANABE, Masako, OSHIUMI, Hiroyuki,

SHINGAI, Masashi, SETO, Yoshiyuki, YAMAMOTO, Akitsugu et SEYA, Tsukasa, 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 15 septembre 2003. Vol. 171, n° 6, pp. 3154-3162.

MAYO, Christopher B., WONG, C. Jason, LOPEZ, Prisma E., LARY, Jeffrey W. et COLE, James L., 2016. Activation of PKR by short stem-loop RNAs containing single-stranded arms. *RNA (New York, N.Y.)*. juillet 2016. Vol. 22, n° 7, pp. 1065-1075.

MEDIGESHI, Guruprasad R., LANCASTER, Alissa M., HIRSCH, Alec J., BRIESE, Thomas, LIPKIN, W. Ian, DEFILIPPIS, Victor, FRÜH, Klaus, MASON, Peter W., NIKOLICH-ZUGICH, Janko et NELSON, Jay A., 2007. West Nile Virus Infection Activates the Unfolded Protein Response, Leading to CHOP Induction and Apoptosis. *Journal of Virology*. octobre 2007. Vol. 81, n° 20, pp. 10849-10860.

MELCHJORSEN, Jesper, RINTAHAKA, Johanna, SOBY, Stine, HORAN, Kristy A., POLTAJAINEN, Alina, OSTERGAARD, Lars, PALUDAN, Soren R. et MATIKAINEN, Sampsa, 2010. Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways. *Journal of Virology*. novembre 2010. Vol. 84, n° 21, pp. 11350-11358.

MESMAN, Annelies W., ZIJLSTRA-WILLEMS, Esther M., KAPTEIN, Tanja M., DE SWART, Rik L., DAVIS, Meredith E., LUDLOW, Martin, DUPREX, W. Paul, GACK, Michaela U., GRINGHUIS, Sonja I. et GEIJTENBEEK, Teunis B.H., 2014. Measles Virus Suppresses RIG-I-like Receptor Activation in Dendritic Cells via DC-SIGN-Mediated Inhibition of PP1 Phosphatases. *Cell Host & Microbe*. juillet 2014. Vol. 16, n° 1, pp. 31-42.

MESTAS, Javier et HUGHES, Christopher C. W., 2004. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*. 1 mars 2004. Vol. 172, n° 5, pp. 2731-2738.

METZ, D. H. et ESTEBAN, M., 1972. Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. *Nature*. 18 août 1972. Vol. 238, n° 5364, pp. 385-388.

MEURS, E., CHONG, K., GALABRU, J., THOMAS, N. S., KERR, I. M., WILLIAMS, B. R. et HOVANESSIAN, A. G., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. 27 juillet 1990. Vol. 62, n° 2, pp. 379-390.

MIN, Ji-Young, LI, Shoudong, SEN, Ganes C. et KRUG, Robert M., 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*. 20 juin 2007. Vol. 363, n° 1, pp. 236-243.

MOHR, Ian, 2005. To replicate or not to replicate: achieving selective oncolytic virus replication in cancer cells through translational control. *Oncogene*. 21 novembre 2005. Vol. 24, n° 52, pp. 7697-7709.

NALLAGATLA, Subba Rao, HWANG, Jungwook, TORONEY, Rebecca, ZHENG, Xiaofeng, CAMERON, Craig E. et BEVILACQUA, Philip C., 2007. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science (New York, N.Y.)*. 30 novembre 2007. Vol. 318, n° 5855, pp. 1455-1458.

OKUMURA, Atsushi, PITHA, Paula M., YOSHIMURA, Akihiko et HARTY, Ronald N., 2010. Interaction between Ebola Virus Glycoprotein and Host Toll-Like Receptor 4 Leads to Induction of Proinflammatory Cytokines and SOCS1. *Journal of Virology*. janvier 2010. Vol. 84, n° 1, pp. 27-33.

PATEL, R C et SEN, G C, 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *The EMBO Journal*. 3 août 1998. Vol. 17, n° 15, pp. 4379-4390.

PATHAK, V. K., SCHINDLER, D. et HERSHEY, J. W., 1988. Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases. *Molecular and Cellular Biology*. 1 février 1988. Vol. 8, n° 2, pp. 993-995.

PAVITT, Graham D. et RON, David, 2012. New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1 juin 2012. Vol. 4, n° 6.

PAVLOVIC, J., HALLER, O. et STAEHELI, P., 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of Virology*. avril 1992. Vol. 66, n° 4, pp. 2564-2569.

PENG, Chen, HALLER, Sherry L., RAHMAN, Masmudur M., MCFADDEN, Grant et ROTHENBURG, Stefan, 2016. Myxoma virus M156 is a specific inhibitor of rabbit PKR but contains a loss-of-function mutation in Australian virus isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5 avril 2016. Vol. 113, n° 14, pp. 3855-3860.

PETERS, Gregory A., HARTMANN, Rune, QIN, Jun et SEN, Ganes C., 2001. Modular Structure of PACT: Distinct Domains for Binding and Activating PKR. *Molecular and Cellular Biology*. mars 2001. Vol. 21, n° 6, pp. 1908-1920.

PETERS, Gregory A., KHOO, David, MOHR, Ian et SEN, Ganes C., 2002. Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *Journal of Virology*. novembre 2002. Vol. 76, n° 21, pp. 11054-11064.

PETTERSSON, U. et PHILIPSON, L., 1974. Synthesis of complementary RNA sequences during productive adenovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. décembre 1974. Vol. 71, n° 12, pp. 4887-4891.

PICHLMAIR, Andreas, SCHULZ, Oliver, TAN, Choon Ping, NÄSLUND, Tanja I., LILJESTRÖM, Peter, WEBER, Friedemann et REIS E SOUSA, Caetano, 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, N.Y.)*. 10 novembre 2006. Vol. 314, n° 5801, pp. 997-1001.

PLUMET, Sébastien, HERSCHKE, Florence, BOURHIS, Jean-Marie, VALENTIN, Hélène, LONGHI, Sonia et GERLIER, Denis, 2007. Cytosolic 5'-Triphosphate Ended Viral Leader Transcript of Measles Virus as Activator of the RIG I-Mediated Interferon Response. *PLoS ONE*. 14 mars 2007. Vol. 2, n° 3.

RAHMAN, Masmudur M., LIU, Jia, CHAN, Winnie M., ROTHENBURG, Stefan et MCFADDEN, Grant, 2013. Myxoma Virus Protein M029 Is a Dual Function Immunomodulator that Inhibits PKR and Also Conscripts RHA/DHX9 to Promote Expanded Host Tropism and Viral Replication. *PLoS Pathogens*. juillet 2013. Vol. 9, n° 7.

RAJSBAUM, Ricardo, ALBRECHT, Randy A., WANG, May K., MAHARAJ, Natalya P., VERSTEEG, Gijs A., NISTAL-VILLÁN, Estanislao, GARCÍA-SASTRE, Adolfo et GACK, Michaela U., 2012. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein. *PLoS pathogens*. 2012. Vol. 8, n° 11, pp. e1003059.

RAMEIX-WELTI, Marie-Anne, LE GOFFIC, Ronan, HERVÉ, Pierre-Louis, SOURIMANT, Julien, RÉMOT, Aude, RIFFAULT, Sabine, YU, Qin, GALLOUX, Marie, GAULT, Elyanne et ELÉOUËT, Jean-François, 2014. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nature Communications*. 3 octobre 2014. Vol. 5, pp. 5104.

REY-JURADO, Emma et KALERGIS, Alexis M., 2017. Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia—Implications for Vaccine Design. *International Journal of Molecular Sciences*. 4 mars 2017. Vol. 18, n° 3.

ROBERT, Francis, KAPP, Lee D., KHAN, Shakila N., ACKER, Michael G., KOLITZ, Sarah, KAZEMI, Shirin, KAUFMAN, Randal J., MERRICK, William C., KOROMILAS, Antonis E., LORSCH, Jon R. et PELLETIER, Jerry, 2006. Initiation of Protein Synthesis by Hepatitis C Virus Is Refractory to Reduced eIF2 · GTP · Met-tRNA^{iMet} Ternary Complex Availability. *Molecular Biology of the Cell*. 1 novembre 2006. Vol. 17, n° 11, pp. 4632-4644.

ROBERTS, Walden K., HOVANESSIAN, Ara, BROWN, Ronald E., CLEMENS, Michael J. et KERR, Ian M., 1976. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature*. 2 décembre 1976. Vol. 264, n° 5585, pp. 477-480.

ROJAS, Margarito, VASCONCELOS, Gabriel et DEVER, Thomas E., 2015. An eIF2 α -binding motif in protein phosphatase 1 subunit GADD34 and its viral orthologs is required to promote dephosphorylation of eIF2 α . *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. 7 juillet 2015. Vol. 112, n° 27, pp. E3466-E3475.

ROMANO, P. R., ZHANG, F., TAN, S. L., GARCIA-BARRIO, M. T., KATZE, M. G., DEVER, T. E. et HINNEBUSCH, A. G., 1998. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Molecular and Cellular Biology*. décembre 1998. Vol. 18, n° 12, pp. 7304-7316.

RUVOLO, P. P., GAO, F., BLALOCK, W. L., DENG, X. et MAY, W. S., 2001. Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX. *The Journal of Biological Chemistry*. 13 avril 2001. Vol. 276, n° 15, pp. 11754-11758.

SADLER, Anthony J. et WILLIAMS, Bryan R. G., 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews. Immunology*. juillet 2008. Vol. 8, n° 7, pp. 559-568.

SAGHAZADEH, Amene et REZAEI, Nima, 2017. Implications of Toll-like receptors in Ebola infection. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. avril 2017. Vol. 21, n° 4, pp. 415-425.

SAITO, Takeshi, HIRAI, Reiko, LOO, Yueh-Ming, OWEN, David, JOHNSON, Cynthia L., SINHA, Sangita C., AKIRA, Shizuo, FUJITA, Takashi et GALE, Michael, 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9 janvier 2007. Vol. 104, n° 2, pp. 582-587.

SAMANTA, Mrinal, IWAKIRI, Dai, KANDA, Teru, IMAIZUMI, Tadaatsu et TAKADA, Kenzo, 2006. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *The EMBO Journal*. 20 septembre 2006. Vol. 25, n° 18, pp. 4207-4214.

SAMUEL, C. E., 1993. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *The Journal of Biological Chemistry*. 15 avril 1993. Vol. 268, n° 11, pp. 7603-7606.

SANCHEZ, A., KILEY, M. P., HOLLOWAY, B. P. et AUPERIN, D. D., 1993. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Research*. septembre 1993. Vol. 29, n° 3, pp. 215-240.

SANTIAGO, Felix W., COVALEDA, Lina M., SANCHEZ-APARICIO, Maria T., SILVAS, Jesus A., DIAZ-VIZARRETA, Ana C., PATEL, Jenish R., POPOV, Vsevolod, YU, Xue-jie, GARCÍA-SASTRE, Adolfo et AGUILAR, Patricia V., 2014. Hijacking of RIG-I signaling proteins into virus-induced cytoplasmic structures correlates with the inhibition of type I interferon responses. *Journal of Virology*. avril 2014. Vol. 88, n° 8, pp. 4572-4585.

SCHLEE, M., BARCHET, W., HORNING, V. et HARTMANN, G., 2007. Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2007. Vol. 316, pp. 207-230.

SCHMIDT, Andreas, SCHWERD, Tobias, HAMM, Wolfgang, HELLMUTH, Johannes C., CUI, Sheng, WENZEL, Michael, HOFFMANN, Franziska S., MICHALLET, Marie-Cecile, BESCH, Robert, HOPFNER, Karl-Peter, ENDRES, Stefan et ROTHENFUSSER, Simon, 2009. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21 juillet 2009. Vol. 106, n° 29, pp. 12067-12072.

SCHNEIDER, Robert J. et MOHR, Ian, 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences*. mars 2003. Vol. 28, n° 3, pp. 130-136.

SCHNEIDER-SCHAULIES, S., SCHNEIDER-SCHAULIES, J., SCHUSTER, A., BAYER, M., PAVLOVIC, J. et TER MEULEN, V., 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *Journal of Virology*. novembre 1994. Vol. 68, n° 11, pp. 6910-6917.

SCHÜMANN, Michael, GANTKE, Thorsten et MÜHLBERGER, Elke, 2009. Ebola virus VP35 antagonizes PKR activity through its C-terminal interferon inhibitory domain. *Journal of Virology*. septembre 2009. Vol. 83, n° 17, pp. 8993-8997.

SHIGEMI, Zenpei, MANABE, Kazuki, HARA, Naoko, BABA, Yusuke, HOSOKAWA, Kohei, KAGAWA, Hiroki, WATANABE, Tadashi et FUJIMURO, Masahiro, 2017. Methylseleninic acid and sodium selenite induce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR activation in PEL cells. *Chemico-Biological Interactions*. 25 mars 2017. Vol. 266, pp. 28-37.

SONG, Byeong Doo et SCHMID, Sandra L., 2003. A Molecular Motor or a Regulator? Dynamin's in a Class of Its Own. *Biochemistry*. 1 février 2003. Vol. 42, n° 6, pp. 1369-1376.

SPARRER, Konstantin M. J., PFALLER, Christian K. et CONZELMANN, Karl-Klaus, 2012. Measles Virus C Protein Interferes with Beta Interferon Transcription in the Nucleus. *Journal of Virology*. 15 janvier 2012. Vol. 86, n° 2, pp. 796-805.

STARCK, Shelley R., TSAI, Jordan C., CHEN, Keling, SHODIYA, Michael, WANG, Lei, YAHIRO, KinnoSuke, MARTINS-GREEN, Manuela, SHASTRI, Nilabh et WALTER, Peter, 2016. Translation from the 5ce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR actiScience (New York, N.Y.). 29 janvier 2016. Vol. 351, n° 6272, pp. aad3867.

SW, Way, JR, Podojil, BL, Clayton, A, Zaremba, TL, Collins, RB, Kunjamma, AP, Robinson, P, Brugarolas, RH, Miller, SD, Miller, B, Popko, SW, Way, JR, Podojil, BL, Clayton, A, Zaremba, TL, Collins, RB, Kunjamma, AP, Robinson, P, Brugarolas, RH, Miller, SD, Miller et B, Popko, 2015. Pharmaceutical integrated stress response

enhancement protects oligodendrocytes and provides a potential multiple sclerosis therapeutic. *Nature Communications*. mars 2015. Vol. 6.

TAKEUCHI, Kenji, KOMATSU, Takayuki, KITAGAWA, Yoshinori, SADA, Kiyonao et GOTOH, Bin, 2008. Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA. *Journal of Virology*. octobre 2008. Vol. 82, n° 20, pp. 10102-10110.

TORIBIO, René, DÍAZ-LÓPEZ, Irene, BOSKOVIC, Jasminka et VENTOSO, Iván, 2016. An RNA trapping mechanism in Alphavirus mRNA promotes ribosome stalling and translation initiation. *Nucleic Acids Research*. 19 mai 2016. Vol. 44, n° 9, pp. 4368-4380.

TOTH, Ann M., DEVAUX, Patricia, CATTANEO, Roberto et SAMUEL, Charles E., 2009. Protein Kinase PKR Mediates the Apoptosis Induction and Growth Restriction Phenotypes of C Protein-Deficient Measles Virus. *Journal of Virology*. 15 janvier 2009. Vol. 83, n° 2, pp. 961-968.

TRIBOUILLARD-TANVIER, Déborah, DOS REIS, Suzana, GUG, Fabienne, VOISSET, Cécile, BÉRINGUE, Vincent, SABATE, Raimon, KIKOVSKA, Ema, TALAREK, Nicolas, BACH, Stéphane, HUANG, Chenhui, DESBAN, Nathalie, SAUPE, Sven J., SUPATTAPONE, Surachai, THURET, Jean-Yves, CHÉDIN, Stéphane, VILETTE, Didier, GALONS, Hervé, SANYAL, Suparna et BLONDEL, Marc, 2008. Protein Folding Activity of Ribosomal RNA Is a Selective Target of Two Unrelated Antiprion Drugs. *PLoS ONE*. 14 mai 2008. Vol. 3, n° 5.

TSAYTLER, Pavel, HARDING, Heather P., RON, David et BERTOLOTTI, Anne, 2011. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science (New York, N.Y.)*. 1 avril 2011. Vol. 332, n° 6025, pp. 91-94.

TU, Yu-Chun, YU, Chia-Yi, LIANG, Jian-Jong, LIN, Elong, LIAO, Ching-Len et LIN, Yi-Ling, 2012. Blocking Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase PKR by Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 2A. *Journal of Virology*. 1 octobre 2012. Vol. 86, n° 19, pp. 10347-10358.

VENTOSO, Iván, SANZ, Miguel Angel, MOLINA, Susana, BERLANGA, Juan José, CARRASCO, Luis et ESTEBAN, Mariano, 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes & Development*. 1 janvier 2006. Vol. 20, n° 1, pp. 87-100.

WANG, Lijun, POPKO, Brian, TIXIER, Emily et ROOS, Raymond P., 2014. Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. novembre 2014. Vol. 71, pp. 317-324.

WANG, Tian, TOWN, Terrence, ALEXOPOULOU, Lena, ANDERSON, John F., FIKRIG, Erol et FLAVELL, Richard A., 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile

virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine*. décembre 2004. Vol. 10, n° 12, pp. 1366-1373.

WEBER, Friedemann, WAGNER, Valentina, RASMUSSEN, Simon B., HARTMANN, Rune et PALUDAN, Søren R., 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*. mai 2006. Vol. 80, n° 10, pp. 5059-5064.

WELSCH, Sonja, MILLER, Sven, ROMERO-BREY, Ines, MERZ, Andreas, BLECK, Christopher K. E., WALTHER, Paul, FULLER, Stephen D., ANTONY, Claude, KRIJNSE-LOCKER, Jacomine et BARTENSCHLAGER, Ralf, 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*. 23 avril 2009. Vol. 5, n° 4, pp. 365-375.

WENGLER, Gerd et WENGLER, Gisela, 1993. The NS 3 Nonstructural Protein of Flaviviruses Contains an RNA Triphosphatase Activity. *Virology*. novembre 1993. Vol. 197, n° 1, pp. 265-273.

WILKINS, Courtney et GALE, Michael, 2010. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Current Opinion in Immunology*. février 2010. Vol. 22, n° 1, pp. 41-47.

WRESCHNER, D H, JAMES, T C, SILVERMAN, R H et KERR, I M, 1981. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Research*. 10 avril 1981. Vol. 9, n° 7, pp. 1571-1581.

YOUSSEF, Osama A., SAFRAN, Sarah A., NAKAMURA, Takahisa, NIX, David A., HOTAMISLIGIL, Gökhan S. et BASS, Brenda L., 2015. Potential role for snoRNAs in PKR activation during metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21 avril 2015. Vol. 112, n° 16, pp. 5023-5028.

ZHANG, Fuquan, MOON, Alice, CHILDS, Kay, GOODBOURN, Stephen et DIXON, Linda K., 2010. The African Swine Fever Virus DP71L Protein Recruits the Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit To Dephosphorylate eIF2 α and Inhibits CHOP Induction but Is Dispensable for These Activities during Virus Infection. *Journal of Virology*. 15 octobre 2010. Vol. 84, n° 20, pp. 10681-10689.

ZHAO, H., DE, B. P., DAS, T. et BANERJEE, A. K., 1996. Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology*. 15 juin 1996. Vol. 220, n° 2, pp. 330-338.

Toulouse 2017

Titre : Etudes des propriétés antivirales d'un modulateur de la protéine kinase R

Nom : FUSADE-BOYER

Prénom : Maxime

Résumé : Les infections virales déclenchent l'activation de différents mécanismes de l'immunité innée, la voie PKR - eIF2 α - GADD34 étant l'un d'entre eux. Notre étude vise à étudier les propriétés antivirales d'un inhibiteur de GADD34, la sephin1, qui bloquerait la déphosphorylation d'eIF2 α et ainsi prolongerait l'inhibition de la traduction des protéines virales induite par la PKR. Nous avons pour cela testé l'effet antiviral de la sephin1 sur plusieurs virus de familles différentes en conditions *in vitro* ainsi que sur le virus de la myxomatose (MYXV) et le virus respiratoire syncytial humain (hRSV) en conditions *in vivo*. Nous avons pu mettre en évidence une activité antivirale de la sephin1 vis à vis de plusieurs virus en culture cellulaire. Les résultats *in vivo* obtenus ne permettent pas la mise en évidence d'un effet antiviral aux posologies testées contre le virus hRSV mais une diminution significative de l'excrétion virale est observée avec le MYXV.

Mots clefs : Immunité innée ; PKR ; GADD34 ; sephin1 ; antiviral

Title : Study of the antiviral properties of a modulator of protein kinase R signalling

Abstract : Viral infections lead to the activation of different mechanisms from the innate immune system and the PKR-eIF2 α - GADD34 pathway is one of them. The aim of our study was to determine the antiviral properties of sephin1, a GADD34 inhibitor. This inhibitor blocks the dephosphorylation of eIF2 α induced by GADD34 and we hypothesized that sephin1 would re-inforce the viral protein translation arrest induced by PKR activation. We studied sephin1 antiviral activity against different viruses from different families *in vitro* and also *in vivo* for the Myxoma virus (MYXV) and the human respiratory syncytial virus (hRSV). Our results demonstrate the antiviral properties of sephin1 towards different viruses in cell culture. The results from *in vivo* studies do not show an antiviral activity of sephin1 at the dosage used against hRSV but a small reduction of viral excretion is observed in MYXV infected rabbits treated with sephin1.

Key words : innate immune system ; PKR ; GADD34 ; sephin1 ; antiviral