



HAL
open science

Protéine 2C d'Entérovirus : protéine clé de la réplication virale et cible antivirale

Priscila El Kazzi, Carole Yaacoub, Ziad Fajloun, Patrice Vanelle, Etienne Decroly, Bruno Coutard, Karine Barral

► To cite this version:

Priscila El Kazzi, Carole Yaacoub, Ziad Fajloun, Patrice Vanelle, Etienne Decroly, et al.. Protéine 2C d'Entérovirus : protéine clé de la réplication virale et cible antivirale. *Virologie*, 2023, 27 (3), pp.173-188. 10.1684/vir.2023.1001 . hal-04504110

HAL Id: hal-04504110

<https://amu.hal.science/hal-04504110>

Submitted on 14 Mar 2024

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

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

Protéine 2C d'Entérovirus : protéine clé de la réplication virale et cible antivirale

Priscila El Kazzi¹, Carole Yaacoub^{2,3}, Ziad Fajloun^{3,4}, Patrice Vanelle⁵, Etienne Decoly¹, Bruno Coutard^{2#}, Karine Barral^{5#*}

¹ AFMB, CNRS UMR 7257, Aix-Marseille Université, Case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France.

² Unité des Virus Émergents (UVE), Aix-Marseille Université, IRD 190, Inserm 1207, Marseille, France

³ Laboratory of Applied Biotechnology (LBA3B), Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, EDST, Lebanese University, Tripoli 1300, Lebanon.

⁴ Department of Biology, Faculty of Sciences 3, Lebanese University, Michel Slayman Tripoli Campus Ras Maska, Tripoli 1352, Lebanon.

⁵ Aix-Marseille Université, CNRS, Institut de Chimie Radicalaire (ICR) UMR7273, Equipe Pharmaco-chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Les auteurs ont contribué de manière équivalente à la rédaction de la revue.

* Auteure de correspondance : karine.barral@univ-amu.fr

Résumé.

Les entérovirus (EV) comprennent de nombreux agents pathogènes humains de plus en plus préoccupants en matière de santé publique. Ces EV sont souvent associés à des manifestations cliniques bénignes, mais peuvent entraîner des complications graves telles que des encéphalites, des méningites, des pneumonies, des myocardites et des poliomyélites. Malgré d'importantes avancées, il n'existe pas de thérapie antivirale approuvée pour le traitement des infections à entérovirus. De par la grande diversité génotypique des EV, des molécules ciblant des protéines virales fortement conservées peuvent être envisagées pour le développement d'antiviraux *pan-EV*. À cet égard, l'ATPase/Hélicase 2C, qui est une protéine non structurale hautement conservée chez les EVs, possède des fonctions essentielles à la réplication virale, et s'avère donc une cible antivirale attractive. De récentes études fonctionnelles et structurales sur la protéine 2C ont permis l'identification de molécules démontrant une activité anti-EV *ex vivo* et associées à des mutations de résistance sur la séquence codante de la protéine 2C. Cette revue présente un état des lieux des connaissances actuelles sur la protéine 2C dans une perspective de cible antivirale et sur le mode d'action d'inhibiteurs spécifiques de cette cible thérapeutique.

Mots clés : Entérovirus, protéine 2C, inhibiteurs, antiviraux.

Introduction

Plusieurs dizaines d'entérovirus infectent l'espèce humaine et causent près de 3 milliards d'infections par an. Les virus appartenant au genre *Enterovirus* (famille *Picornaviridae*) incluent un ensemble de virus classés en 15 espèces : les entérovirus (EV) A à L et les rhinovirus (RV) A à C. Les EV infectieux chez l'homme sont regroupés au sein de sept espèces, EV-A, EV-B, EV-C, EV-D, RV-A, RV-B et RV-C. Ces espèces incluent, entre autres, les poliovirus (PV ; EV-C) agents pathogènes responsables de la poliomyélite, les coxsackievirus (CVA et CVB ; EV-A à EV-C) et les échovirus (E ; EV-B) [1]. Les infections à EV non poliovirus (EVNP) sont très courantes et souvent associées à des manifestations cliniques souvent bénignes (maladies respiratoires et gastro-intestinales légères, éruptions cutanées). Cependant, elles peuvent entraîner des complications graves telles que des encéphalites, des méningites, des pneumonies, des myocardites, des pancréatites et des poliomyélites, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans et les personnes dont le système immunitaire est affaibli [2],[3]. Ces dernières années, plusieurs EV ont émergé comme agents pathogènes de plus en plus préoccupants pour la santé publique. A titre d'exemple, les EV-A71 en Asie du Sud-Est [4] et EV-D68 en Amérique du Nord [5] sont à l'origine d'épidémies associées à de graves complications neurologiques. Depuis 2016, en France, l'augmentation de la circulation de ces deux virus a été associée à des manifestations neurologiques sévères. Les rhinovirus, quant à eux, sont l'une des causes les plus courantes de maladies respiratoires dans le monde. La plupart du temps, les infections à rhinovirus passent inaperçues, provoquant un léger syndrome grippal. Ils peuvent, toutefois, déclencher certaines maladies respiratoires graves telles que des bronchiolites chez les enfants et des pneumonies mortelles chez les personnes âgées et les adultes immunodéprimés [6],[7],[8],[9]. Concernant les coxsackievirus B (CV-B), ils peuvent être associés à des méningites aseptiques, ainsi que des septicémies néonatales [10].

Il existe une grande diversité génétique chez les entérovirus, qui peut être expliquée par de fréquents événements de recombinaison et par les propriétés mutagènes de la polymérase virale [11],[12],[13]. Bien que la vaccination ait presque éradiqué la poliomyélite dans le monde et que plusieurs vaccins contre EV-A71 sont sur le marché en Chine [4], il n'existe, à ce jour, aucun traitement antiviral efficace contre les EV humains, soulignant la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques à large spectre. Le risque associé aux EV est illustré par la résurgence récente d'infection à Poliovirus en Europe et en Israël, malgré une couverture vaccinale importante. Deux approches thérapeutiques ont été envisagées, l'une ciblant les facteurs hôtes responsables de la propagation virale et l'autre s'appuyant sur le développement d'antiviraux à action directe (AAD) ciblant les protéines virales [14].

Les EV sont des virus à capsidie icosaédrique de petite taille (30 nm de diamètre), non enveloppés, à génome ARN simple brin de polarité positive d'environ 7.2 à 8.5 kb. Leur génome, dépourvu de coiffe, possède une structure IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans sa région 5' et est polyadénylé à son extrémité 3' (Figure 1). L'ARN génomique est composé de deux « ORF » (Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert), nommés ORFu et ORF. L'ORFu code pour une protéine de 8 kDa impliquée dans la pathogénèse [15] et l'ORF code, lui, pour une longue polyprotéine de 250 kDa clivée par les protéases virales matures 2Apro,

3Cpro et 3CDpro en dix protéines (Figure 1) dont 3 protéines de capside (VP2/VP4, VP1 et VP3) et 7 protéines non-structurales de réplication (2A-2C et 3A-3D). À l'heure actuelle, les AAD décrits dans la littérature sont, soit dirigés contre les protéines structurales afin de bloquer l'infection virale à un stade précoce [16],[17], soit dirigés contre des cibles antivirales classiques, telles que la protéase 3C et la polymérase 3D, afin d'inhiber les mécanismes de réplication/transcription virale [16],[17]. Plusieurs inhibiteurs de ces protéines virales ont été identifiés et certains ont été testés dans des essais cliniques, principalement pour traiter les infections à rhinovirus, mais les essais ont échoué en raison de la faible efficacité ou de toxicité des molécules [18],[19],[20].

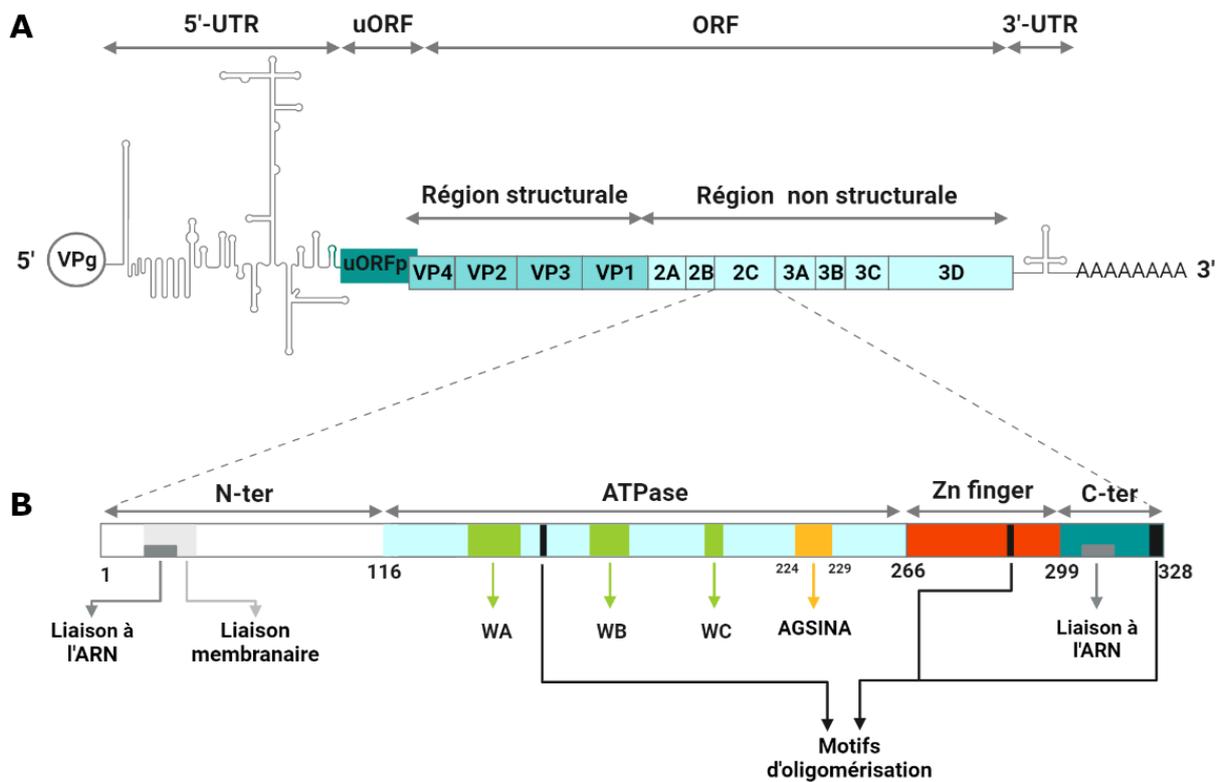


Figure 1. Représentation schématique du génome des EVs et architecture de la protéine 2C. **(A)** Organisation génomique et protéique des EVs. Le génome d'EV est composé de deux cadres de lecture ouverts (uORF et ORF) flanqués par deux régions non traduites, 5'UTR et 3'UTR. L'uORF chevauche le 5'UTR et l'ORF, et code pour une petite protéine de ~8 kDa (uORFp). L'ORF principal d'EV code pour quatre protéines structurales (VP1-VP4) et sept protéines non structurales (2A- 2C, 3A-3D). **(B)** Diagramme linéaire de l'organisation de la protéine 2C. La partie N-terminale (N-ter) de la protéine 2C présente une hélice amphipathique interagissant avec les membranes intracellulaires (gris clair). Le domaine ATPase (bleu clair) abrite les motifs conservés Walker A (WA), Walker B (WB) et Walker C (WC) (vert) caractéristiques des hélicases de la superfamille SF3/AAA+. Sur ce domaine est également souligné en orange la localisation de la séquence AGSINA. En aval du domaine ATPase se trouve le domaine doigt de zinc (rouge), une région riche en Cys impliquée dans la coordination du zinc qui adopte un pli caractéristique en doigt de zinc. L'hélice C-terminale amphipathique (C-ter) présente un motif d'oligomérisation (noir) qui médie l'interaction 2C-2C et l'auto-oligomérisation des protéines 2C en interagissant avec les deux autres motifs situés à l'interface

du domaine ATPase et du doigt Zn de le 2C adjacent. La protéine 2C a deux sites de liaison à l'ARN putatifs (gris foncé), le premier se trouve sur l'hélice amphipathique du N-ter et l'autre sur le C-ter.

La protéine 2C est hautement conservée parmi les Enterovirus et joue un rôle crucial dans presque toutes les étapes du cycle de vie du virus (Figure 1). Des études structurales et fonctionnelles récentes ont permis de mieux comprendre ses rôles pléiotropiques durant l'infection virale et, *de facto*, ont permis l'identification d'inhibiteurs spécifiques. La protéine 2C est, ainsi, considérée comme une cible attractive pour le développement d'AAD à large spectre pour traiter les infections par les EV [21].

Dans cette revue, nous présentons les connaissances actuelles sur la structure et les fonctions de la protéine 2C des EV, et nous décrivons les avancées concernant le développement d'inhibiteurs spécifiques de la protéine 2C et leur mode d'action.

Structure et fonctions de la protéine 2C dans le cycle viral des Entérovirus

Dans les années 1990 et 2000, de nombreuses fonctions biologiques de la protéine 2C dans le cycle viral ont été mises en exergue. Les études ont montré que cette protéine possède une activité ATPase/Hélicase [22],[23], et son implication dans le processus de réplication des ARN, la décapsidation virale [24],[25],[26],[27],[28], le réarrangement de la membrane de la cellule hôte [29],[30],[31], le recrutement de facteurs de l'hôte [32], l'encapsidation et la morphogenèse virale [33] ainsi que la perturbation de la réponse cellulaire antivirale [34],[35]. Une activité ribonucléase simple brin (sbRNase) non conventionnelle vient également d'être attribuée à la protéine 2C [36], cependant le rôle biologique de cette activité reste mal compris. Par ailleurs, la ligase cellulaire E3 TRIM7 qui joue un rôle antiviral contre les EV humains, a été décrite comme un acteur de l'ubiquitination de la Glutamine C-terminale de la protéine 2C, conduisant à sa dégradation par adressage au protéasome cellulaire [37],[38].

Par homologie de séquence, les protéines 2C d'EV ont été classées dans la catégorie des hélicases de la superfamille 3 (SF3). En 2015, les travaux de Xia *et al.* ont démontré l'activité catalytique hélicase associée à la protéine 2C, confirmant ainsi la prédiction d'analyses de séquence et le rôle central de la protéine 2C dans la réplication de l'ARN viral [39]. La protéine 2C possède, en plus de l'activité ARN-hélicase-ATP-dépendante, une activité chaperonne ATP-indépendante qui déstabilise les hélices de manière bidirectionnelle, facilite l'hybridation des brins et la formation de structures d'ARN complexes, et ce indépendamment de l'hydrolyse ATP. L'activité catalytique hélicase est portée par le domaine ATPase de la protéine 2C de EV-A71, alors que l'extrémité C-terminale est indispensable pour sa capacité à chaperonner les ARN.

Comme toutes les hélicases de la superfamille 3 (SF3), la protéine 2C requiert une organisation structurale multimérique afin d'acquérir son activité hélicase. La multimérisation de la protéine 2C recombinante de PV1 et E30 a déjà été observé [40],[41]. Compte tenu du lien existant entre oligomérisation et activité hélicase et/ou ATPase, l'interface de

multimérisation pourrait être une cible antivirale intéressante, comme cela a été récemment démontré pour la protéine 2C de EV-A71[42] et du virus de la fièvre aphteuse (virus du genre *Aphthovirus* de la famille des *Picornaviridae* [43]. La caractérisation structurale de la protéine 2C de deux EV, EV-A71 (PDB 5GQ1 et 5GRB) et PV-1 (PDB 5Z3Q), a permis de mieux comprendre l'organisation des différents domaines fonctionnels [44], [45]. La structure cristallographique de la partie soluble de la protéine 2C (116-329 aa) de EV-A71 a été résolue à 2,5 Å par Guan *et al.* en 2017. Pour ce faire, la région N-terminale (115 acides aminés) correspondant à une région prédite comme partiellement hélicoïdale et amphipatique a été déléetée. Il s'agit de la première structure à haute résolution de protéine 2C de la famille des *Picornaviridae*. D'un point de vue structurale, cette protéine 2C est constituée d'un domaine ATPase, d'un domaine de liaison au zinc atypique et riche en cystéines et d'un domaine hélicoïdal de nature amphipatique en C-terminale (Figure 2A). Le domaine ATPase de la protéine 2C possède la signature caractéristique de la superfamille AAA+ des ATPases et est formé des motifs Walker A et B conservés ainsi que du motif Walker C typique des hélicases de la SF3 (Figure 1B et 2A).

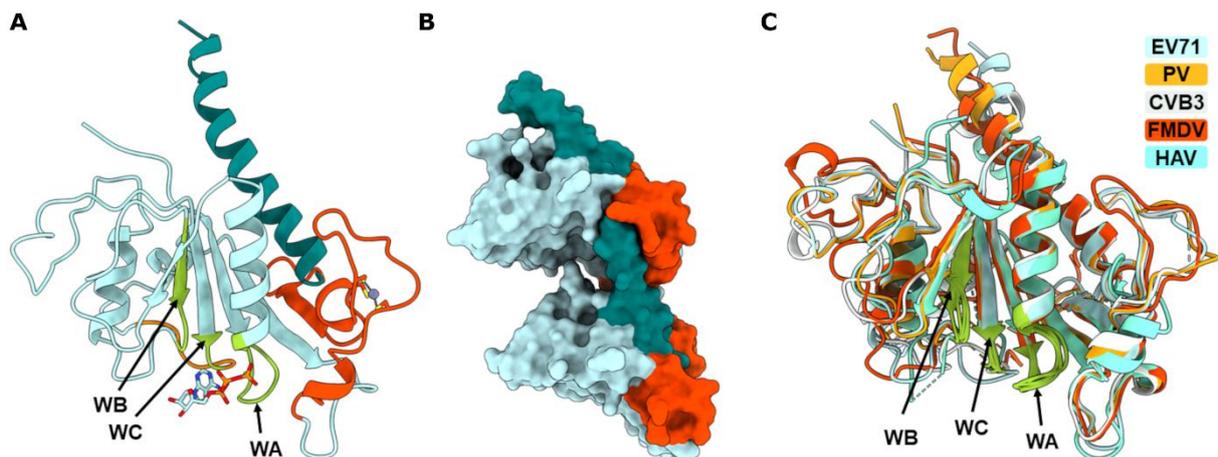


Figure 2. Structure globale de la protéine 2C. (A) Modèle en ruban de la structure cristalline de la protéine 2C- Δ 115 d'EV-A71 complexée avec de l'ATP- γ -S (PDB 5GRB). Les domaines ATPase, doigt de zinc et C-terminale sont surlignés en bleu clair, rouge et bleu canard, respectivement. Les motifs Walker A (WA), Walker B (WB) et Walker C (WC) du site catalytique du domaine ATPase sont surlignés en vert. (B) Aperçu du processus d'assemblage de deux protomères de la protéine 2C d'EV-A71 (PDB 5GRB). La polymérisation de la protéine 2C se produit par une interaction spécifique entre la partie C-terminale d'un protomère (bleu canard) et le domaine en doigt de zinc du protomère adjacent (rouge). (C) Superposition de la structure cristalline 2C de EV-A71 (PDB 5GRB, chaîne B) avec celle de la 2C de PV (PDB 5Z3Q, chaîne A), de CV-B3 (PDB 6T3W, chaîne A), de FMDV (PDB 7E6V, chaîne A) et de HAV (PDB 7XT3, chaîne A). Les motifs WA, WB et WC du domaine ATPase des différentes protéines 2C sont représentés en vert clair.

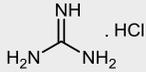
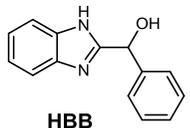
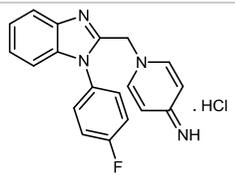
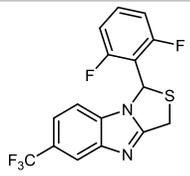
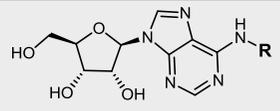
La résolution de la structure du domaine ATPase de la protéine 2C de plusieurs *Picornaviridae* a permis de mettre en évidence que ce domaine est très conservé, au-delà du genre *EV*, ce qui n'est pas le cas du domaine en doigts de zinc spécifique retrouvé

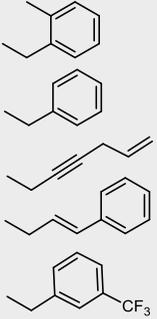
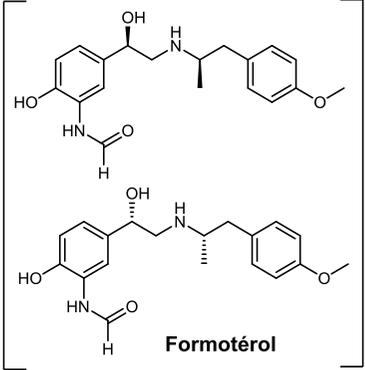
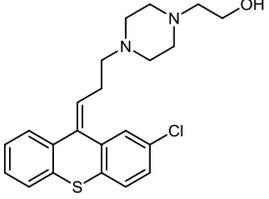
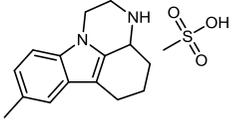
spécifiquement chez les *EV* (Figure 2C). Contrairement aux autres ATPases, l'extrémité C-terminale des protéines 2C forme une hélice qui participe à l'homo-oligomérisation par une interaction spécifique avec le protomère voisin au niveau d'une poche concave formée entre le site ATPase et le domaine en doigts de zinc (Figure 2B). Cette homo-oligomérisation est nécessaire à l'activité ATPase de la protéine 2C et la réplication de EV-A71, et permet la formation d'un site de fixation de l'ATP à l'interface entre deux protomères [46]. Cet assemblage conduit à la formation d'un hexamère qui a été modélisé dans les études structurales de la protéine 2C de EV-A71 et de PV, puis confirmé expérimentalement par des expériences de microscopie électronique réalisées avec une protéine recombinante chimérique 2C de CV-B3. Récemment, Hurdiss *et al.* ont identifié la présence d'un site adjacent au site de fixation de l'ATP dans la protéine 2C de CV-B3 [46]. Des mutations dans ce site sont en général délétères pour la réplication virale. De plus, des molécules synthétiques capables d'interagir avec les domaines d'oligomérisation inhibent à la fois l'activité ATPase de la protéine 2C et la réplication virale. Ces études confirment que l'inhibition des fonctions de la protéine 2C, en perturbant l'auto-oligomérisation 2C-2C ou en inhibant ses activités catalytiques, s'avère une stratégie pertinente d'inhibition de la réplication des EV.

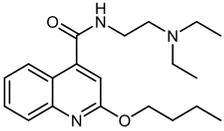
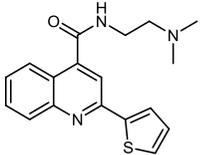
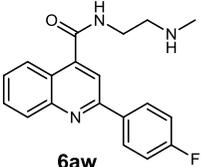
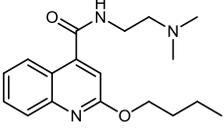
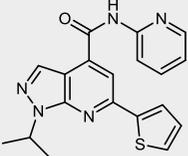
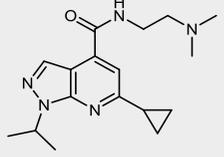
Antiviraux ciblant la protéine 2C des Entérovirus

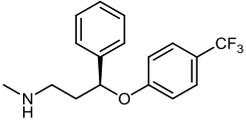
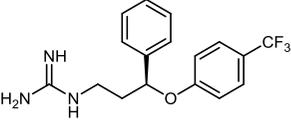
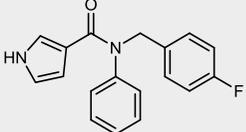
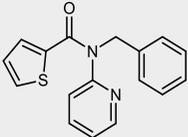
Une vingtaine de molécules démontrant une activité anti-EV *ex vivo* et associées à des mutations de résistance sur la séquence codante de la protéine 2C ont, jusqu'à présent, été identifiées (Table 1). Parmi ces molécules, on retrouve la Guanidine-HCl, le HBB, le MRL-1237, le TBZE-029, le Métrifudil, la N6-benzyladénosine et ses analogues, le Formotérol, le Zuclopenthixol, le mésylate de Pirlindole, la Dibucaïne et ses analogues, des dérivés de la pyrazolopyridine, la Fluoxétine et ses analogues, des dérivés de la N-benzylamide et le peptide 2CL. Les propriétés d'inhibition de chacune de ces molécules sont décrites dans les sous-chapitres suivants. Pour certaines d'entre elles, leur mode d'action n'est pas complètement élucidé. La Guanidine-HCl et la Fluoxétine, identifiées par une approche de repositionnement de médicaments, sont les inhibiteurs de la protéine 2C les plus étudiés.

Table 1. Structure chimique, propriétés anti-entérovirales et EV cibles des inhibiteurs de la protéine 2C.

Molécule	Entérovirus testés	Résidus de mutations de résistance	CE ₅₀ (μM)	IS	Références
 <p>Guanidine-HCl</p>	PV-1 EV-A71 RV-87 EV-D68 CV-B3 E-9	I142, A143, N179, M187, S225 I227, A233 I127, T173, M187, M193, S224 nd I127, T173, M187, M193, S224 A224, I227, A229 E64, A133	nd 305 91 91 (Fermon) nd nd	 12 40 40 nd	48, 50, 51 53, 54 54 54, 55 46, 57 52
 <p>HBB</p>	E-9 PV-1 CV-B3	I227, A229 nd A224, I227 et A229	nd 26 (Sabin 2) 70	 15 nd	59, 52 62 46, 57
 <p>MRL-1237</p>	PV-1 CV-B3	I120, F164 A224, I227 et A229	11 (Mahoney) 2.9 (Sabin 2) nd	51 190 nd	62 46
 <p>TBZE-029</p>	CV-B3	A224, I227 et A229	0.18	nd	57
					

<p>R =</p>  <p>Métrifudil</p> <p>N6-Benzyladénosine</p> <p>7</p> <p>6</p> <p>10</p>	<p>EV-A71</p> <p>EV-A71</p>	<p>E325</p> <p>H118, I324</p> <p>nd</p> <p>nd</p> <p>nd</p>	<p>1.3</p> <p>0.10</p> <p>4.3</p> <p>0.66</p> <p>0.068</p>	<p>> 38</p> <p>33000</p> <p>> 101</p> <p>645</p> <p>> 3456</p>	<p>64</p> <p>64</p> <p>65</p> <p>66</p> <p>67</p>
 <p>Formotérol</p>	<p>CV-B3</p> <p>EV-A71</p> <p>PV-1</p> <p>EV-D68</p> <p>RV-A2</p> <p>RV-B14</p>	<p>Nd</p>	<p>2.36</p> <p>0.83</p> <p>0.88</p> <p>0.51</p> <p>0.30</p> <p>0.34</p>	<p>nd</p>	<p>68</p>
 <p>Zuclopenthixol</p>	<p>CV-B3</p>	<p>A224, I227 et A229</p>	<p>nd</p>	<p></p>	<p>68</p>
 <p>mésylate de Pirlindole</p>	<p>CV-B3</p> <p>EV-D68</p>	<p>A224, I227 et A229</p>	<p>9.91</p> <p>9.24</p>	<p>nd</p>	<p>68</p>

 <p>Dibucaine</p>	CV-B3 EV-A71 EV-D68	A224, I227 et A229	1.60 7.59 3.03	nd	68
 <p>12a</p>	EV-D68	Nd	0.04	1057	70
 <p>6aw</p>	EV-D68 EV-A71 CV-B3	Nd	0.2 3.1 0.2	162 11 200	71
 <p>6i</p>	EV-A71	Nd	1.2	85	72
 <p>JX040</p>	EV-A71 CV-B3	Nd	0.5 0.8	>400 >250	74
 <p>7d</p>	EV-D68 EV-A71 CV-B3	D183, D323	0.1 0.1 0.2	2000 2000 625	75

 (S)-Fluoxétine	CV-B3 EV-D68 RV-A2 RV-B14	C179, F190, A224, I227, A229	0.42 0.67 7.95 6.3	71 42 3.6 4.5	77
 (S)-2b	CV-B3 EV-D68 RV-A2 RV-B14	C179, A224, I227 et A229	0.19 0.11 7.49 0.98	315 545 8 61	83
 12b	EV-A71 CV-B3 PV-1 CV-A24 EV-D68 RV-A2 RV-B14	Nd	0.49 0.0029 1.39 1.33 0.086 2.75 0.095	nd	84
 R523062	EV-D68 EV-A71	I227, Q322	4.1 18	29 7	85
YGRKKRRQRRRGSGREYNNRSAIGNTIEALFQ Peptide 2CL	EV-A71 CV-A16 CV-B3 E-11		1.35 2.16 2.29 0.38	>111 nd nd nd	42

EC50, concentration (inhibitrice du virus) efficace à 50% ; IS, indice de sélectivité (CC50 / EC50); nd, non déterminé.

Guanidine-HCl

La Guanidine-HCl est une molécule de faible poids moléculaire (Table 1), approuvée par la FDA pour le traitement du syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (LSEM) [47], mais qui n'est plus couramment utilisée en raison de sa toxicité (néphrotoxicité, hépatotoxicité, myélotoxicité et cardiotoxicité). La Guanidine-HCl inhibe la réplication de plusieurs EV en culture cellulaire, dont PV [48],[49],[50],[51], E-9 [52], EV-A71 [53],[54], RV-87 [54] et plusieurs souches de EV-D68 ($CE_{50} \sim 100 \mu\text{M}$) [54]. Malgré son faible pouvoir antiviral *ex vivo*, la Guanidine-HCl a montré une efficacité antivirale *in vivo* dans des modèles d'infection respiratoire et neurologique de EV-D68 [55]. En 1997, Barton et Flanagan [56] ont démontré que la Guanidine-HCl inhibe une ou des fonction(s) portée(s) par la protéine 2C qui est(ont) impliquée(s) dans l'initiation de la synthèse d'ARN à brin négatif, mais pas à brin positif, ni à l'élongation de l'ARN. De plus, plusieurs études ont rapporté que la Guanidine-HCl peut inhiber les activités ATPase [23], et hélicase de la protéine 2C de EV-A71 [53] et de CV-B3 [57]. Son mécanisme d'action antivirale a été particulièrement étudié chez PV. Ces études ont révélé que la résistance à la Guanidine-HCl se situe dans la région 2C (Figure 3A). Cette résistance est principalement attribuée à deux mutations, mutation de "classe N" (Asn mutée en position 179) ou de "classe M" (Met mutée en position 187), localisées dans une boucle adjacente au motif Walker B. Outre ces deux mutations principales, quelques mutations supplémentaires dans la protéine 2C de PV, aux positions 142, 143, 225, 227 et 233 confèrent une résistance à la Guanidine-HCl (Figure 3A).

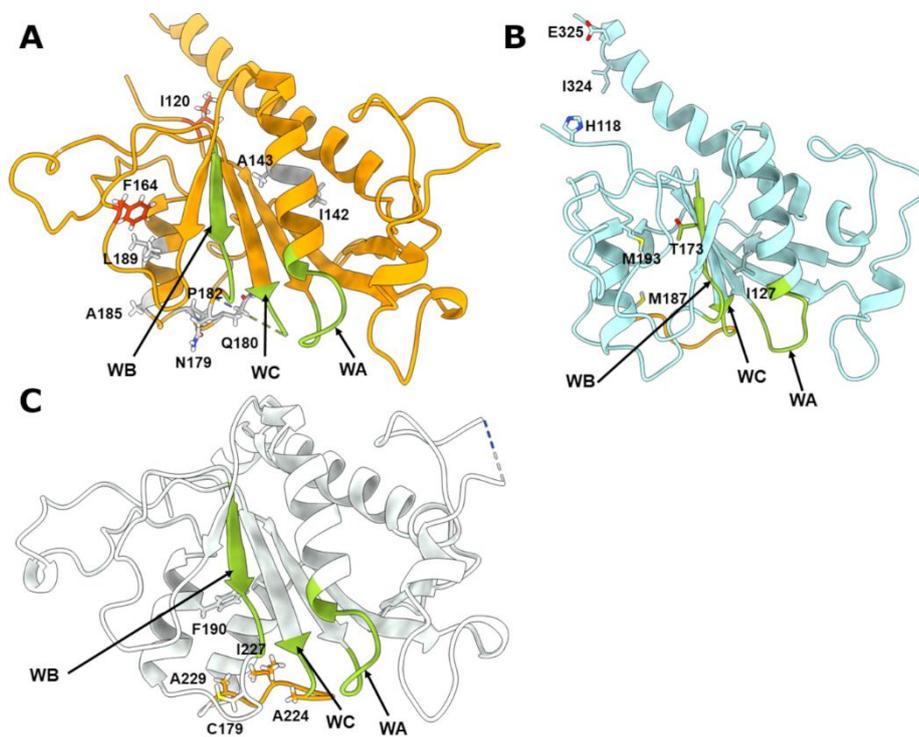


Figure 3. Cartographie des mutations de résistance et/ou de dépendance sur les différents motifs de la protéine 2C. (A) Les motifs de résistance et/ou de dépendance à la Guanidine-HCl ainsi qu'à MRL-1237 sont représentés sur la structure de la protéine 2C de PV (PDB 5Z3Q) en gris et en rouge, respectivement. (B) Les résidus de résistance à la Guanidine-HCl (I127, T173 motif WB ; M187 et M193), au Métrifudil (E325) et au N6-benzyladénosine (H118 et I324 partie clé de C-terminale pour l'hexamerisation) sont représentés sur la structure de la protéine 2C de EV-A71 (PDB 5GRB). (C) Les motifs de résistance à la Guanidine-HCl, au HBB, au MRL-1237, au TBZE-029, à la Dibucaine, au Pirlindole, au Zuclopenthixol, et à la Fluoxétine sont

représentés sur la structure de la protéine 2C de CV-B3 (PDB 6T3W). Les résidus A224, I227 et A229 de la boucle AGSINA (orange) sont des résidus de résistance communs aux différents inhibiteurs cités. Les résidus C179 et F190 concernent uniquement la Fluoxétine. (A-C) Les résidus des motifs WA, WB et WC du site catalytique du domaine ATPase sont surlignés en vert.

L'action de la Guanidine-HCl a été étudiée chez d'autres EV, des mutations aux positions 127, 173, 187, 193 et 224 de EV-A71 (Figure 3B), aux positions E64 et A133 de E-9, ainsi qu'aux positions A224, I227 et A229 de CV-B3 (immédiatement en aval du motif hélicase Walker C) (Figure 3C), lui confèrent une résistance. Il a été également démontré, sur protéine recombinante, que l'activité ATPase de la protéine 2C est inhibée par la Guanidine-HCl et que les mutations de résistance confèrent à l'activité ATPase une meilleure tolérance à la Guanidine-HCl. De manière remarquable, certaines mutations de résistance ont conduit à la genèse de souches résistantes dont la réplication *ex vivo* est conditionnée par la présence de Guanidine-HCl dans le milieu de culture [51]. Ce mécanisme de dépendance peut être expliqué par l'effet délétère de la mutation de résistance sur l'activité ATPase, en partie restaurée par la présence de Guanidine-HCl à des concentrations sub-millimolaires [46]. Les guanidines sont universellement présentes dans l'environnement biologique et peuvent se lier à la surface des protéines virales de remodelage de l'ARN pour modifier leurs conformations, leurs états électrostatiques et leurs interactions protéine-protéine ou protéine-ARN, inhibant ainsi ces activités de remodelage de l'ARN. Le développement de dérivés de la Guanidine-HCl moins toxiques et plus sélectifs pourrait permettre d'identifier de nouveaux AAD à large spectre contre les EV.

HBB, MRL-1237 et TBZE-029

Un autre composé, identifié depuis des décennies, et qui inhibe sélectivement la réplication virale de la plupart des EV est le HBB [*1H*-benzimidazol-2-yl(phényl)méthanol] (Table 1) [58]. L'analyse de la séquence de virus résistants à l'HBB et la caractérisation de E9 ont révélé que la sensibilité à l'HBB correspond à la protéine 2C, suite à l'identification de mutations aux positions I227 et A229 de la protéine ciblée [59],[60]. Trois mutations de la protéine 2C de CV-B3, A224V, I227V et A229V, situées en aval du motif Walker C [57],[61],[46], lui confèrent une résistance, ainsi qu'à deux de ses dérivés, MRL-1237 [62] et TBZE-029 [63], qui présentent un motif benzimidazole commun (Table 1), en dépit de leurs spectres antiviraux différents (Figure 3C). Une étude de Shimizu *et al.* [62] sur PV a montré que les mutations indépendantes F164Y et I120-Y pouvaient être responsables de la sensibilité réduite à MRL-1237 (Figure 3A). A ce stade, il est important de noter que certains loci où se trouvent les mutations de résistance au MRL-1237 sont proches ou identiques à ceux mentionnés pour la résistance à la Guanidine-HCl, et que certaines mutations peuvent induire des résistances croisées [62], suggérant la présence de « hot-spot » de mutations de résistance dans les domaines de multimérisation (Figure 3).

Métrifudil, N6-Benzyladénosine et dérivés

En 2008, les travaux de Arita *et al.* ont démontré que deux agonistes de récepteurs de l'adénosine, le Métrifudil et la N6-benzyladénosine, analogues de nucléosides, interagissent avec la protéine 2C et inhibent la réplication virale de EV-A71 [64] (Table 1). Les mutants de résistance de la protéine 2C de EV-A71 à ces deux inhibiteurs ont été identifiés en position E325G pour la résistance au Métrifudil et en positions H118Y et I324M pour la résistance à la N6-benzyladénosine (Figure 3B).

Le groupe de S. Mikhailov a reporté la synthèse de plusieurs séries d'analogues de la N6-benzyladénosine. Ainsi, le composé **7**, N6-(5-hexene-2-yne-1-yl) adénosine ($CE_{50} = 4.3 \pm 1.5 \mu M$, SI ~ 101) (Table 1) [65], ainsi que le composé **6**, N6-(trans-3-phenyl-2-propen-1-yl)adénosine ($CE_{50} = 0.66 \pm 0.12 \mu M$, SI ~ 645) (Table 1) [66], ont démontré une forte inhibition sélective sur un panel d'isolats cliniques de EV-A71 appartenant à différents génogroupes de EV-A71. Plus récemment, le composé **10**, N6-(3-trifluorométhylbenzyl) adénosine, analogue comportant un groupement trifluorométhyle sur le noyau benzénique de la N6-benzyladénosine, s'est avéré le candidat le plus prometteur *ex vivo* ($CE_{50} = 0.068 \pm 0.01 \mu M$, SI ~ 3456) [67].

Formotérol, Zuclopenthixol, Pirlindole, Dibucaïne et dérivés

En 2016, Ulferts *et al.* ont identifié, par le biais d'un criblage de médicaments en culture de cellules infectées par CV-B3, le Formotérol, le Zuclopenthixol, le mésylate de Pirlindole et la Dibucaïne comme nouveaux inhibiteurs de CV-B3 (Table 1) [68]. Le Formotérol, un bronchodilatateur connu pour son activité antivirale contre RV-B14 [69], inhibe la réplication de tous les EV et rhinovirus testés (EV-A71, CV-B3, EV-D68, PV-1, RV-A2 et RV-B14). Le Zuclopenthixol (antipsychotique), le mésylate de Pirlindole (antidépresseur) et la Dibucaïne (anesthésique local) exercent un effet inhibiteur en agissant au stade précoce de la réplication du génome de CV-B3. Le Pirlindole et la Dibucaïne inhibent EV-D68, la Dibucaïne inhibe également EV-A71, mais aucun d'entre eux n'inhibe les rhinovirus testés (RV-A2 et RV-B14) et PV-1. Des mutations (A224V, I227V et A229V) dans la séquence codante de la protéine 2C du coxsackievirus B3 (CV-B3) ont été identifiées pour conférer une résistance à la Dibucaïne, au Pirlindole et au Zuclopenthixol, ce qui suggère un lien avec l'inhibition d'une fonction de la protéine 2C, mais pas au Formotérol dont le mécanisme d'action reste à élucider (Figure 3C).

Compte tenu de la facilité de synthèse de la Dibucaïne, une étude de relation structure-activité (RAS) menée en 2019 a permis d'obtenir des analogues de quinoléine, tels que le composé **12a** ($CE_{50} < 1 \mu M$, IS > 5000) (Table 1), dont l'activité antivirale et l'indice de sélectivité contre cinq souches différentes de EV-D68 ont été considérablement améliorés [70]. Des travaux, réalisés en 2020 par la même équipe, ont permis d'obtenir des analogues quinoléine présentant une activité antivirale à large spectre (EVD-68, EVA-71 et CV-B3) et des propriétés pharmacocinétiques *in vitro* favorables [71]. Le meilleur représentant, le composé **6aw** (Table 1), présente des valeurs d' CE_{50} submicromolaires contre deux souches de EV-D68, deux souches de EV-A71 et une souche de CV-B3. Le composé **6aw** est stable dans les microsomes de souris ($t_{1/2} \sim 115$ min) et représente un antiviral à large spectre prometteur pour le traitement des EV. Parallèlement, une autre étude menée en 2020 par Tang *et al.* a permis d'identifier par RAS des analogues de la Dibucaïne présentant une activité antivirale et un indice de sélectivité cellulaire améliorés [72]. Le composé le plus efficace, **6i** (CE_{50} EV-A71 $\sim 1 \mu M$) (Table 1), présente une efficacité antivirale *in vivo* sans toxicité significative chez la souris infectée par EV-A71. Cependant, les propriétés pharmacocinétiques de ces composés n'ont pas été rapportées à ce jour.

Dérivés de la pyrazolopyridine

Un criblage phénotypique, réalisé en 2016 par Zuo *et al.*, a permis l'identification d'une série de dérivés de la pyrazolopyridine comme antiviraux contre CV-B3 [73]. Ces dérivés pyrazolopyridine présentent également une activité antivirale à large spectre contre EV-A71, PV-1, PV-3, ainsi que plusieurs coxsackievirus et échovirus ; ils réduisent considérablement la synthèse de l'ARN viral et

des protéines virales dans les cellules infectées. L'analyse de la séquence des mutants résistants à ces composés suggère que la protéine 2C est la cible virale.

Une étude RAS, réalisée en 2018, a conduit à la synthèse de nouveaux inhibiteurs de type pyrazolopyridine plus puissants et sélectifs, dont **JX040** (Table 1) qui a la plus forte activité antivirale contre les EV non poliovirus (CE_{50} EV-A71 = 0.5 μ M, CE_{50} CV-B3 = 0.8 μ M, CE_{50} PV-1 > 10 μ M) [74].

L'étude RAS la plus récente, menée en 2021, a identifié une série d'analogues de type pyrazolopyridine présentant une activité antivirale à large spectre contre EV-D68, EV-A71 et CV-B3 dans plusieurs lignées cellulaires, y compris les cellules RD et les cellules neuronales SH-SY5Y80 [75]. Le composé **7d** (CE_{50} EV-A71 = 0.1 μ M, CE_{50} CV-B3 = 0.2 μ M, CE_{50} EV-D68 = 0.1 μ M) (Table 1) a été utilisé comme sonde chimique pour des études mécanistiques qui ont révélé que la protéine virale 2C est la cible de cette série de composés. Les mutants de résistance de la protéine 2C de EV-D68 au composé **7d** ont été identifiés en position D183V et D323G. Bien que l'EV-D68 2C-D183V/D323G présente une sensibilité réduite au composé **7d**, l'essai de croissance par compétition a montré que sa capacité de réplication est compromise par rapport au virus sauvage. Une optimisation des propriétés pharmacocinétiques de ces composés pourrait conduire à de bons candidats pour des études *in vivo* sur des modèles animaux ainsi qu'à des sondes chimiques pour la validation *in vivo* des cibles médicamenteuses.

Fluoxétine et dérivés

L'un des médicaments repositionnés les plus étudiés ciblant la protéine 2C est la Fluoxétine (Prozac®) (Table 1), un antidépresseur inhibiteur sélectif de la capture de la sérotonine. En 2012, Zuo *et al.* rapportent l'action anti-entérovirale *in vitro* de la Fluoxétine [76], confirmée par une seconde étude qui identifie par ailleurs la protéine 2C comme cible de l'antidépresseur [61]. La Fluoxétine interfère dans la réplication de l'ARN viral et supprime de manière sélective la réplication de EV-B (CE_{50} CV-B3 = 3.36 μ M ; CE_{50} E-9 = 4.58 μ M) et de EV-D (CE_{50} EV-D68 = 1.35 μ M), mais pas des EV-A et de EV-C testés, ni de RV-A ou RV-B [61]. Le mécanisme d'action antiviral de la Fluoxétine a été étudié sur CV-B3, les acides aminés de la protéine 2C dont la substitution confère une résistance à la Fluoxétine se situent en positions A224, I227 et A229 (court motif 224AGSINA229 en C-terminale du motif Walker C, considéré comme un « hot-spot » de mutation de résistance). Ce motif AGSINA est conservé chez les EV-B et EV-D mais n'est pas présent chez d'autres EV [20],[61].

En 2019, Bauer *et al.* ont démontré, par des études mécanistiques, que la (*S*)-Fluoxétine (K_d = 9.5 μ M, CE_{50} = 0.42 μ M) se lie et inhibe la protéine 2C de CV-B3 avec une plus grande affinité que la (*R*)-Fluoxétine (K_d > 200 μ M) [77]. Cette stéréospécificité est valable pour l'inhibition de la réplication de EV-D68, RV-A2 et RV-B14. En revanche, ni le mélange racémique, ni la (*S*)-Fluoxétine ne sont actifs contre EV-A71 et PV-1 en culture de cellules infectées, aux concentrations où la (*S*)-Fluoxétine n'est pas toxique *ex vivo*.

La structure cristallographique aux rayons X de la protéine 2C de CV-B3 (117-329) en complexe avec la (*S*)-Fluoxétine a été récemment résolue (PDB ID : 6T3W) [46]. Cette structure a révélé que la (*S*)-Fluoxétine se lie à un site allostérique du domaine ATPase de la protéine 2C de CV-B3 (Figure 4A). Une étude biochimique plus poussée du mode d'action de la (*S*)-Fluoxétine démontre, de plus, qu'elle inhibe l'activité 2C ATPase, ce que corrobore les données structurales. En effet, l'analyse par cryo-microscopie électronique a affiné nos connaissances concernant le mécanisme de

la (*S*)-Fluoxétine et démontré qu'elle verrouille la protéine 2C dans un complexe hexamérique en forme d'anneau (Figure 4B). Cette contrainte structurale pourrait, soit affecter la fixation de l'ATP, soit limiter les changements conformationnels nécessaires à son hydrolyse, expliquant ainsi son mode d'action. Les mutations de résistance de la (*S*)-Fluoxétine sont positionnées à la fois sur le site de liaison de la (*S*)-Fluoxétine (C179F, C179Y et F190L) et sur la boucle 224-AGSINA-229 (A224V, I227V et A229V) (Figure 3C). Cette dernière n'interagit pas directement avec la (*S*)-Fluoxétine, mais il a été proposé que la boucle 224-AGSINA-229 stabilise la boucle contenant le motif Walker B dans une "conformation ouverte" permettant la liaison de la (*S*)-Fluoxétine.

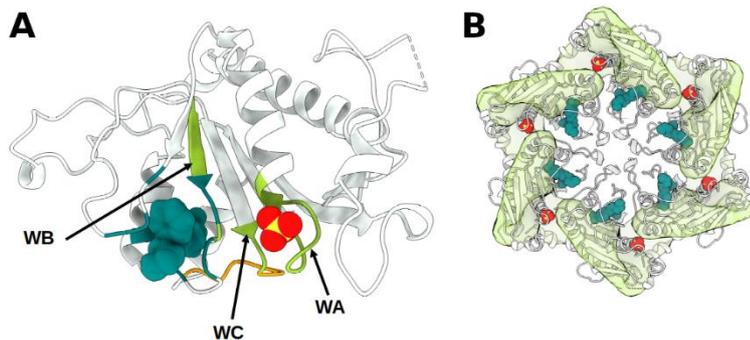


Figure 4. (A) Structure cristalline de CV-B3 2C- Δ 116 en complexe avec la (*S*)-Fluoxétine. Les motifs Walker A et Walker B et le motif C du domaine ATPase sont surlignés en vert. Une molécule de sulfate d'ammonium se fixe à la boucle du motif WA délimitant la région de liaison à l'ATP. La boucle surlignée en orange délimite la région de la séquence AGSINA. La (*S*)-Fluoxétine (molécule en bleu canard) se fixe à la poche allostérique WB et aux régions d'interaction directe avec la protéine 2C (surlignés de la même couleur que l'inhibiteur). (B) Positionnement des monomères de CV-B3 2C- Δ 116/(*S*)-Fluoxétine dans la carte cryo-EM de la construction hexamérique de la protéine 2C- Δ 116. Le site de fixation de la (*S*)-Fluoxétine ainsi que celui de l'ATP (marqué par la position du sulfate d'ammonium) sont représentés.

Malgré des résultats probants *ex vivo* et un mécanisme d'action élucidé, la Fluoxétine n'a malheureusement pas montré d'efficacité antivirale dans les modèles de souris infectées par EV-D68 [78],[55]. Elle a fait l'objet d'essais cliniques dans le traitement de patients présentant une AFM (Myélite flasque aiguë) prouvée ou présumée associée au virus EV-D68, mais s'est avérée inefficace [79],[80]. Toutefois, la Fluoxétine a été utilisée avec succès pour traiter un enfant immunodéprimé atteint d'une encéphalite entérovirale chronique [81], et une patiente atteinte d'une méningoencéphalite par infection chronique à E13 [82]. Ces exemples soulignent la nécessité de poursuivre le développement d'inhibiteurs dérivés de la Fluoxétine de plus forte efficacité et spécificité pour la protéine 2C, notamment dans le traitement de l'infection par EV-D68.

C'est dans cette optique qu'une étude RAS, décrite par Manganaro *et al.* a conduit à la synthèse d'un analogue de la Fluoxétine, le composé racémique **2b** (CE_{50} CV-B3 = 0.87 μ M, CE_{50} ED-68 = 0.56 μ M, CE_{50} EV-A71 = pas actif) (Table 1), dont le groupement méthylamine a été substitué par un groupement guanidine, qui montre une activité antivirale similaire à celle de la (*S*)-Fluoxétine [83]. Une séparation chirale a permis d'isoler l'énantiomère (*S*)-**2b** qui exerce une activité antivirale bien supérieure (CE_{50} CV-B3 = 0.19 μ M, CE_{50} ED-68 = 0.11 μ M) par rapport au mélange racémique et confirme l'importance de la configuration chirale. Les mutations de résistance

observées (positions A224V, I227V, A229V, C179F) indiquent que le composé **2b** interagit avec la protéine virale 2C de manière similaire à la (S)-Fluoxétine.

A ce stade, ni le mélange racémique, ni l'énantiomère (S) de la Fluoxétine et du composé **2b** ne sont actifs contre EV-A71 et PV-1 en culture cellulaire, ce qui soulève la limite du spectre antiviral de ces inhibiteurs contre les EV.

Dérivés de la N-benzylamide

Dans ce contexte, Bauer *et al.* ont optimisé de nouveaux antiviraux à partir d'un composé précédemment identifié par HTS [73] qui est structurellement apparenté à la Fluoxétine et qui cible la protéine 2C de EV-A71. La synthèse de plusieurs amides substituées, dérivés de la N-benzylamide, a permis d'identifier plusieurs inhibiteurs à plus large spectre que la Fluoxétine et qui inhibent des membres représentatifs de toutes les espèces humaines d'EV et de rhinovirus [84]. Le composé **12b** (Table 1), le plus actif, inhibe EV-A71, EV-D68, CV-B3, PV-1, CV-A24, RV-A2 et RV-B14 avec des valeurs de CE₅₀ allant de 0,0029 à 1,39 µM. La structure du complexe lié au composé **12b** permettrait l'identification de sa poche de fixation et l'élucidation de son mécanisme d'action.

Il est important de noter que la structure du composé **12b**, décrit par Bauer *et al.*, est structurellement proche d'un autre inhibiteur de la protéine 2C décrit par Ma *et al.* en 2020, le composé **R523062** (Table 1). Le composé **R523062** a été identifié par un criblage phénotypique à haut débit et inhibe de multiples souches de EV-D68 (CE₅₀ de 2.3 à 6.4 µM) et, moins efficacement, des souches de EV-A71 (CE₅₀ de 9.6 à 55.7 µM) [85]. Le virus mutant 2C-I227L/Q322R indique que ces mutations confèrent une résistance significative à **R523062**. L'analyse de l'interaction *in vitro* entre la protéine 2C de EV-D68 et le composé **R523062** a montré que ce dernier se lie directement à la protéine 2C sauvage et au mutant 2C-Q322R, mais pas à la protéine mutée 2C-I227L. cela confirme que la protéine 2C est la cible directe du **R523062** et que le résidu I227 est crucial pour la fixation de cet inhibiteur [85].

Peptide 2CL

Dans cette dernière étude publiée en 2021, Fang *et al.*, conçoivent un peptide, nommé **2CL** (Table 1), basé sur la structure de la protéine 2C de EV-A71 [42]. Ce peptide altère efficacement l'oligomérisation de la protéine 2C de EV-A71 et inhibe les activités ARN-hélicase des protéines 2C codées par EV-A71 et CV-A16 (EV-A), et montre une puissante efficacité antivirale contre EV-A71 (CE₅₀ = 1.50 µM) et CV-A16 (CE₅₀ = 2.16 µM), CV-B3 (CE₅₀ = 2.31 µM) et E11 (CE₅₀ = 0.37 µM)[42]. De plus, le traitement au **2CL** a permis d'obtenir une forte efficacité protectrice *in vivo* contre l'infection létale liée à EV-A71. Ces résultats démontrent que le fait de cibler l'activité hélicase de la protéine 2C avec un peptide de conception rationnelle est une stratégie antivirale prometteuse contre les EV, et que le peptide **2CL** est une cible importante pour le développement de candidat médicament à large spectre contre les EV.

Conclusion

Depuis les années 80, la protéine 2C a été identifiée comme cible pour le développement de molécules antivirales contre les entérovirus (EV). La protéine 2C est hautement conservée chez les entérovirus et, potentiellement, la moins permissive à l'apparition de mutations de résistance

n'affectant pas le fitness répliatif. En l'absence de données structurales, la compréhension des modes d'action est longtemps restée limitée à la caractérisation de mutations de résistance. Fait intrigant, de nombreux composés inhibant la réplication virale induisent des mutations de résistance croisées dans des régions relativement ciblées de la protéine 2C, et ce malgré une grande diversité structurale des composés sélectionnés. L'accumulation récente de données structurales et fonctionnelles ont aidé à mieux caractériser le rôle de la protéine dans le cycle viral, et ont, par ailleurs, permis d'identifier les mécanismes moléculaires d'inhibition de certaines de ces molécules antivirales et de comprendre les mécanismes de résistance associés. Il est maintenant démontré que les molécules antivirales induisant des mutations de résistance sur la séquence codante de la protéine 2C inhibent certaines de ses fonctions en se fixant directement à la surface de la protéine. A ce jour, au moins deux sites cibles d'antiviraux ont été caractérisés, à savoir un site allostérique auquel se fixe la Fluoxétine et l'interface d'assemblage de l'hexamère 2C. Compte tenu de leur forte conservation de séquences et des données publiées jusqu'à présent, ces deux sites devraient permettre de développer des molécules anti-EV ciblant un large spectre de virus, qui, combinées, pourraient limiter le risque d'émergence de mutations en population

Le développement futur de médicaments antiviraux ciblant la protéine 2C pourrait bénéficier de l'optimisation structurale de dérivés de la guanidine présentant de meilleurs effets inhibiteurs et une toxicité moindre. De la même manière, la Fluoxétine, longtemps utilisée pour traiter la dépression majeure et les troubles de l'anxiété, a plus récemment été utilisée comme traitement antiviral pour les enfants immunodéprimés atteints d'encéphalite chronique à EV [81], démontrant son potentiel pour une utilisation clinique en tant qu'inhibiteur des fonctions de la protéine 2C. Cependant, sa pharmacocinétique et les effets secondaires qu'elle induit restreignent son usage au traitement d'infections chroniques à EV [82]. Il est donc important de pouvoir continuer à optimiser des molécules à partir de la (S)-Fluoxétine, clarifier les mécanismes moléculaires déterminant l'efficacité des inhibiteurs, et évaluer le spectre d'efficacité sur un large panel d'EV, notamment dans des modèles *in vivo* pertinents.

Références bibliographiques

1. Simmonds P, Gorbalenya A, Harvala H, Hovi T, Knowles N, Lindberg A, Oberste M, Palmenberg A, Reuter G, Skern T, Tapparel C, Wolthers K, Woo P, and Zell R. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch Virol* 2020 ; 165 : 793–797.
2. Chapman N, and Kim K. Persistent coxsackievirus infection: Enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008 ; 323 : 275–292.
3. Huber S. Host immune responses to coxsackievirus B3. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008 ; 323 : 199–221.
4. Yi E, Shin Y, Kim J, Kim T, and Chang S. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 2017 ; 6 : 1–14.
5. Messacar K, Schreiner T, Maloney J, Wallace A, Ludke J, Oberste M, Nix W, Robinson C, Glodé M, Abzug M, and Dominguez S. cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *Lancet* 2015 ; 385 : 1662–1671.
6. Arden K, and Mackay I. Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Rev Med Virol* 2010 ; 20 : 156–76.
7. Almeida MB De, Zerbinati R, Tateno A, Cristina O, Renata R, Joaquim R, Cláudio P, and Luiz VF da SF. Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* 2010 ; 16 : 996–9.
8. Dougherty W, and Semler B. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev* 1993 ; 57 : 781–822.
9. Gern J. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J Virol* 2010 ; 84 : 7418–26.
10. Pons-Salort M, Parker E, and Grassly N. The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis* 2015 ; 28 : 479–87.
11. Lindberg A, Andersson P, Savolainen C, Mulders M, and Hovi T. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 1223–1235.
12. Norder H, Bjerregaard L, and Magnus L. Open reading frame sequence of an Asian enterovirus 73 strain reveals that the prototype from California is recombinant. *J Gen Virol* 2022 ; 83 : 1721–1728.
13. Domingo E, Martin V, Perales C, and C. E. Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008 ; 323 : 3–32.
14. Sarhan M, El-Bitar AMH, and Hotta H. Potent virucidal activity of honeybee “*Apis mellifera*” venom against Hepatitis C Virus. *Toxicon* 2020 ; 188 : 55–64.
15. Lulla V, Dinan A, Hosmillo M, Chaudhry Y, Sherry L, Irigoyen N, Nayak K, Stonehouse N, Zilbauer M, Goodfellow I, and Firth A. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat Microbiol* 2019 ; 4 : 280–292.

16. Bauer L, Lyoo H, Schaar H Van der, Strating J, and Jm van Kuppeveld F. Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections. *Curr Opin Virol* 2017 ; 24 : 1–8.
17. Tammaro C, Guida M, Appetecchia F, Biava M, Consalvi S, and Poce G. Direct-Acting Antivirals and Host-Targeting Approaches against Enterovirus B Infections: Recent Advances. *Pharmaceuticals* 2023 ; 16 .
18. Fleischer R, and Laessig K. Safety and efficacy evaluation of pleconaril for treatment of the common cold. *Clin Infect Dis* 2003 ; 37 : 1722.
19. Palma A De, Vliegen I, Clercq E De, and Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med Res Rev* 2008 ; 28 : 823–84.
20. Palma A De, Pürstinger G, Wimmer E, Patick A, Andries K, Rombaut B, Clercq E De, and Neyts J. Potential Use of Antiviral Agents in Polio Eradication. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14 : 545–51.
21. Wang S, Wang K, Zhao K, Hua S, and Du J. The Structure, Function, and Mechanisms of Action of Enterovirus Non-structural Protein 2C. *Front Microbiol* 2020 ; 14 : 615965.
22. Rodríguez P, and Carrasco L. Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 8105–10.
23. Xia H, Wang P, Wang G, Yang J, Sun X, Wu W, Qiu Y, Shu T, Zhao X, Yin L, Qin C, Hu Y, and Zhou X. Human Enterovirus Nonstructural Protein 2CATPase Functions as Both an RNA Helicase and ATP-Independent RNA Chaperone. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1005067.
24. Li J, and Baltimore D. An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *J Virol* 1990 ; 64 : 1102–7.
25. Vance L, Moscufo N, Chow M, and Heinz B. Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. *J Virol* 1997 ; 71 : 8759–65.
26. Verlinden Y, Cuconati A, Wimmer E, and Rombaut B. Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 2751–2754.
27. Wang X, Peng W, Ren J, Hu Z, Xu J, Lou Z, Li X, Yin W, Shen X, Porta C, Walter TS, Evans G, Axford D, Owen R, Rowlands DJ, Wang J, Stuart DI, Fry EE, and Rao Z. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat. Publ. Gr.* 2012 ; 19 .
28. Wang H, Xie G, and Duan Z. [Current research on picornavirus 3C protease]. *Bing Du Xue Bao* 2014 ; 30 : 579–86.
29. Teterina N, Gorbalenya A, Egger D, Bienz K, and Ehrenfeld E. Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* 1997 ; 71 : 8962–72..
30. Teterina N, Bienz K, Egger D, Gorbalenya A, and Ehrenfeld E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* 1997 ; 237 : 66–77.
31. Cho M, Teterina N, Egger D, Bienz K, and Ehrenfeld E. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 1994 ; 202 : 129–45.

32. Tang W, Yang S, Wu B, Jheng J, Chen Y, Shih C, Lin K, Lai H, Tang P, and Horng J. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 5888–98.
33. Liu Y, Wang C, Mueller S, Paul A, Wimmer E, and Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1001066.
34. Zheng Z, Li H, Zhang Z, Meng J, Mao D, Bai B, Lu B, Mao P, Hu Q, and Wang H. Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF- α -mediated activation of NF- κ B by suppressing I κ B kinase β phosphorylation. *J Immunol* 2011 ; 187 : 2202–12.
35. Li J, Li Y, Zhang S, Ma H, Liu X, Liang Z, Zhang W, Jing H, Du Y, Yang Y, Huo D, Chen L, and Wang Q. Analysis of an Imported Subgenotype C2 Strain of Human Enterovirus 71 in Beijing, China, 2015. *Front Microbiol.* 2018 ; 9 : 2337.
36. Chen P, Wojdyla J, Colasanti O, Li Z, Qin B, Wang M, Lohmann V, and Cui S. Biochemical and structural characterization of hepatitis A virus 2C reveals an unusual ribonuclease activity on single-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* 2022 ; 50 : 9470–9489.
37. Liang X, Xiao J, Li X, Liu Y, Lu Y, Wen Y, Li Z, Che X, Ma Y, Zhang X, Zhang Y, Jian D, Wang P, Xuan C, Yu G, Li L, and Zhang H. A C-terminal glutamine recognition mechanism revealed by E3 ligase TRIM7 structures. *Nat Chem Biol* 2022 ; 18 : 1214–1223.
38. Fan W, Mar K, Sari L, Gaszek I, Cheng Q, Evers B, Shelton J, Wight-Carter M, Siegwart D, Lin M, and Schoggins J. TRIM7 inhibits enterovirus replication and promotes emergence of a viral variant with increased pathogenicity. *Cell* 2021 ; 184 : 3410–3425.
39. Xia H, Wang P, Wang G, Yang J, Sun X, Wu W, Qiu Y, Shu T, Zhao X, Yin L, Qin C, Hu Y, and Zhou X. Human Enterovirus Nonstructural Protein 2CATPase Functions as Both an RNA Helicase and ATP-Independent RNA Chaperone. *PLoS Pathog* 2015 ; 28 .
40. Adams P, Kandiah E, Effantin G, Steven A, and Ehrenfeld E. Poliovirus 2C protein forms homo-oligomeric structures required for ATPase activity. *Biol Chem* 2009 ; 284 : 22012–22021.
41. Papageorgiou N, Coutard B, Lantez V, Gautron E, Chauvet O, Baronti C, Norder H, de Lamballerie X, Heresanu V, Ferté N, Veessler S, Gorbalenya AE CB. The 2C putative helicase of echovirus 30 adopts a hexameric ring-shaped structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010 ; 66 : 1116–20.
42. Fang Y, Wang C, Yang R, Bai P, Zhang X, Kong J, Yin L, Qiu Y, and Zhou X. Antiviral Peptides Targeting the Helicase Activity of Enterovirus Nonstructural Protein 2C. *J Virol* 2021 ; 95 : e02324-20.
43. Zhang C, Yang F, Wojdyla J, Qin B, Zhang W, Zheng M, Cao W, Wang M, Gao X, Zheng H, and Cui S. An anti-picornaviral strategy based on the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 2C protein. *Cell Rep* 2022 ; 40 : 111030.
44. Guan H, Tian J, Qin B, Wojdyla J, Wang B, Zhao Z, Wang M, and Cui S. Crystal structure of 2C helicase from enterovirus 71. *Sci Adv* 2017 ; 3 : e1602573.
45. Guan H, Tian J, Zhang C, Qin B, and Cui S. Crystal structure of a soluble fragment of poliovirus 2CATPase. *PLoS Pathog* 2018 ; 14 : e1007304.
46. Hurdiss D, Kazzi P El, Bauer L, Papageorgiou N, Ferron F, Donselaar T, Vliet A van,

- Shamorkina T, Snijder J, Canard B, Decroly E, Brancale A, Zeev-Ben-Mordehai T, Förster F, Kuppeveld F van, and Coutard B. Fluoxetine targets an allosteric site in the enterovirus 2C AAA+ ATPase and stabilizes a ring-shaped hexameric complex. *Sci Adv* 2022 ; 8 .
47. Lambert E. Defects of neuromuscular transmission in syndromes other than myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1966 ; 135 : 367–84.
 48. Pincus S, Diamond D, Emini E, and Wimmer E. Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol* 1986 ; 57 : 638–46.
 49. Tolskaya E, Romanova L, Kolesnikova M, Gmyl A, Gorbalenya A, and Agol V. Genetic studies on the poliovirus 2C protein, an NTPase. A plausible mechanism of guanidine effect on the 2C function and evidence for the importance of 2C oligomerization. *J Mol Biol* 1994 ; 236 : 1310–23.
 50. Pfister T, and Wimmer E. Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 : 6992–7001.
 51. Pincus S, Rohl H, and Wimmer E. Guanidine-dependent mutants of poliovirus: Identification of three classes with different growth requirements. *Virology* 1987 ; 157 : 83–8.
 52. Klein M, Hadaschik D, Zimmermann H, Eggers H, and Nelsen-Salz B. The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 895–901.
 53. Sadeghipour S, Bek EJ, and McMinn PC. Selection and characterisation of guanidine-resistant mutants of human enterovirus 71. *Virus Res.* 2012 ; 169 : 72–79.
 54. Smee D, Evans W, Nicolaou K, Tarbet E, and Day C. Susceptibilities of enterovirus D68, enterovirus 71, and rhinovirus 87 strains to various antiviral compounds. *Antivir. Res* 2016 ; 131 : 61–5.
 55. Hurst B, Evans W, Smee D, Van WA, and Tarbet E. Evaluation of antiviral therapies in respiratory and neurological disease models of Enterovirus D68 infection in mice. *Virology* 2019 ; 526 : 146–154.
 56. Barton D, and Flanagan J. Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol* 1997 ; 71 : 8482–9.
 57. Palma AM De, Heggermont W, Lanke K, Coutard B, Bergmann M, Monforte A-M, Canard B, Clercq E De, Chimirri A, Pürstinger G, Rohayem J, Kuppeveld F van, and Neyts J. The Thiazolobenzimidazole TBZE-029 Inhibits Enterovirus Replication by Targeting a Short Region Immediately Downstream from Motif C in the Nonstructural Protein 2C. *J. Virol.* 2008 ; 82 : 4720–4730.
 58. Eggers H, and Tamm I. Synergistic effect of 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine on picornavirus reproduction. *Nature* 1963 ; 199 : 199:513.
 59. Hadaschik D, Klein M, Zimmermann H, Eggers HJ, and Nelsen-Salz B. Dependence of Echovirus 9 on the Enterovirus RNA Replication Inhibitor 2-(α -Hydroxybenzyl)-Benzimidazole Maps to Nonstructural Protein 2C. *J. Virol.* 1999 ; 73 : 10536–10539.
 60. Klein M, Eggers H, and Nelsen-Salz B. Echovirus-9 protein 2C binds single-stranded RNA unspecifically. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 2481–2484.

61. Ulferts R, Linden L Van Der, Thibaut HJ, Lanke KHW, Leyssen P, Coutard B, Palma AM De, Canard B, Neyts J, and Kuppeveld FJM Van. Selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits replication of human enteroviruses B and D by targeting viral protein 2C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 ; 57 : 1952–1956.
62. Shimizu H, Agoh M, Agoh Y, Yoshida H, Yoshii K, Yoneyama T, Hagiwara A, and Miyamura T. Mutations in the 2C Region of Poliovirus Responsible for Altered Sensitivity to Benzimidazole Derivatives. *J. Virol.* 2000 ; 74 : 4146–4154.
63. Eggers H. Successful treatment of enterovirus-infected mice by 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine. *J Exp Med* 1976 ; 143 : 1367–81.
64. Arita M, Wakita T, and Shimizu H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J. Gen. Virol.* 2008 ; 89 : 2518–2530.
65. Tararov V, Tijsma A, Kolyachkina S, Oslovsky V, Neyts J, Drenichev M, Leyssen P, and Mikhailov S. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.048. Epub 2014 Nov 25. Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N(6)-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication. *Eur J Med Chem* 2015 ; 90 : 406–13.
66. Drenichev M, Oslovsky V, Sun L, Tijsma A, Kurochkin N, Tararov V, Chizhov A, Neyts J, Pannecouque C, Leyssen P, and Mikhailov S. Modification of the length and structure of the linker of N(6)-benzyladenosine modulates its selective antiviral activity against enterovirus 71. *Eur J Med Chem* 2016 ; 111 : 84–94.
67. Oslovsky V, Drenichev M, Sun L, Kurochkin N, Kunetsky V, Mirabelli C, Neyts J, Leyssen P, and Mikhailov S. Fluorination of Naturally Occurring N⁶-Benzyladenosine Remarkably Increased Its Antiviral Activity and Selectivity. *Molecules* 2017 ; 22 : 1219.
68. Ulferts R, Boer SM De, Linden L Van Der, Bauer L, Lyoo HR, Maté MJ, Lichièrre J, Canard B, Lelieveld D, Omta W, Egan D, Coutard B, and Kuppeveld FJM Van. Screening of a library of FDA-approved drugs identifies several enterovirus replication inhibitors that target viral protein 2C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016 ; 60 : 2627–2638.
69. Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, and Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Respir Investig* 2014 ; 52 : 251–60.
70. Musharrafieh R, Zhang J, Tuohy P, Kitamura N, Bellampalli S, Hu Y, Khanna R, and Wang J. Discovery of Quinoline Analogues as Potent Antivirals against Enterovirus D68 (EV-D68). *J Med Chem* 2019 ; 62 : 4074–4090.
71. Musharrafieh R, Kitamura N, Hu Y, and Wang J. Development of broad-spectrum enterovirus antivirals based on quinoline scaffold. *Bioorg Chem* 2020 ; 101 : 103981.
72. Tang Q, Xu Z, Jin M, Shu T, Chen Y, Feng L, Zhang Q, Lan K, Wu S, and Zhou H. Identification of dibucaine derivatives as novel potent enterovirus 2C helicase inhibitors: In vitro, in vivo, and combination therapy study. *Eur J Med Chem* 2020 ; 202 : 112310.
73. Zuo J, Kye S, Quinn KK, Cooper P, Damoiseaux R, and Krogstad P. Discovery of structurally diverse small-molecule compounds with broad antiviral activity against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016 ; 60 : 1615–1626.
74. Xing Y, Zuo J, Krogstad P, and Jung ME. Synthesis and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of Novel Pyrazolopyridine Derivatives as Inhibitors of Enterovirus Replication. *J. Med. Chem* 2018 ; 61 : 1688–1703.

75. Hu Y, Kitamura N, Musharrafieh R, and Wang J. Discovery of Potent and Broad-Spectrum Pyrazolopyridine-Containing Antivirals against Enteroviruses D68, A71, and Coxsackievirus B3 by Targeting the Viral 2C Protein. *J. Med. Chem.* 2021 ; 64 : 8755–8774.
76. Zuo J, Quinn K, Kye S, Cooper P, Damoiseaux R, and Krogstad P. Fluoxetine is a potent inhibitor of coxsackievirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 ; 56 : 4838–44.
77. Bauer L, Manganaro R, Zonsics B, Strating JRPM, Kazzi P El, Lorenzo Lopez, Moira Ulferts R, Hoey C van, Maté MJ, Langer T, Coutard B, Brancale A, and Kuppeveld FJM van. Fluoxetine Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Viral 2C Protein in a Stereospecific Manner. *ACS Infect Dis* 2019 ; 5 : 1609–1623.
78. Hixon A, Clarke P, and Tyler K. Evaluating Treatment Efficacy in a Mouse Model of Enterovirus D68-Associated Paralytic Myelitis. *J Infect Dis.* 2017 ; 216 : 1245–1253.
79. Tyler KL. Rationale for the evaluation of fluoxetine in the treatment of enterovirus D68-associated acute flaccid myelitis. *JAMA Neurol* 2015 ; 72 : 493–4..
80. Messacar K, Sillau S, Hopkins S, Otten C, Wilson-Murphy M, Wong B, Santoro J, Treister A, Bains H, Torres A, Zabrocki L, Glanternik J, Hurst A, Martin J, Schreiner T, Makhani N, DeBiasi R, Kruer M, Tremoulet A, Van HK, Desai J, Benson L, Gorman M, Abzug M, Tyler K, and Dominguez S. Safety, tolerability, and efficacy of fluoxetine as an antiviral for acute flaccid myelitis. *Neurology* 2019 ; 92 : e2118–e2126.
81. Gofshteyn J, Cárdenas A, and Bearden D. Treatment of Chronic Enterovirus Encephalitis With Fluoxetine in a Patient With X-Linked Agammaglobulinemia. *Pediatr Neurol* 2016 ; 64 : 94–98.
82. Vermeersch G, Laenen L, Lens G, Elst K Van der, Thal D, Jentjens S, Demaerel P, Nieuwenhuysse T Van, Wollants E, Boeckx N, Verhaert N, Dubois B, Kuppeveld F, and Woei-A-Jin F. Antiviral treatment with fluoxetine for rituximab-associated chronic echovirus 13 meningoencephalitis and myofasciitis. *Eur J Neurol.* 2022 ; 29 : 3117–3123.
83. Manganaro R, Zonsics B, Bauer L, Lopez, Moira Lorenzo Donselaar T, Zwaagstra M, Saporito F, Ferla S, Strating J, Coutard B, Hurdiss D, Kuppeveld F, and Brancale A. Synthesis and antiviral effect of novel fluoxetine analogues as enterovirus 2C inhibitors. *Antivir. Res* 2020 ; 178 : 104781.
84. Bauer L, Manganaro R, Zonsics B, Hurdiss D, Zwaagstra M, Donselaar T, Welter N, Kleef R van, Lopez M, Bevilacqua F, Raman T, Ferla S, Bassetto M, Neyts J, Strating J, Westerink R, Brancale A, and Van KF. Rational design of highly potent broad-spectrum enterovirus inhibitors targeting the nonstructural protein 2C. *PLoS Biol* 2020 ; 18 : e3000904.
85. Ma C, Hu Y, Zhang J, and Wang J. Pharmacological Characterization of the Mechanism of Action of R523062, a Promising Antiviral for Enterovirus D68. *ACS Infect Dis* 2020 ; 6 : 2260–2270.