

Proposition de sujet de stage de M2 - Janvier 2027 (*Internship project*)

Directeur du stage - Encadrement (tutor - supervisor) :

Nom/prénom/fonction : Sébastien Hantz, PU-PH

Nom/prénom/fonction : Sarah Mafi, AHU

Laboratoire (laboratory) : INSERM U1092, RESINFIT

Adresse (address) : Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), Université de Limoges, Limoges, France

Titre du stage (Title) : Caractérisation de peptides antiviraux ciblant le cytomégalovirus humain : spectre d'activité et mécanismes d'action

Description du sujet (project presentation):

Le cytomégalovirus humain (CMVH), appartenant à la famille des *Herpesviridae*, est responsable d'infections sévères chez les patients immunodéprimés, notamment les receveurs de greffes d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques, et constitue une cause majeure d'infection congénitale. La prise en charge thérapeutique repose sur un nombre limité d'antiviraux ciblant principalement la réplication de l'ADN viral ou, plus récemment, le complexe terminase. Leur utilisation est toutefois limitée par leur toxicité et par l'émergence de résistances. L'identification de nouvelles cibles virales et le développement d'antiviraux présentant des mécanismes d'action distincts constituent ainsi des axes importants de recherche.

Le complexe terminase du CMVH, composé des protéines pUL56, pUL89 et pUL51, joue un rôle essentiel dans le clivage et l'encapsidation de l'ADN viral et constitue une cible antivirale particulièrement intéressante. Plusieurs domaines de pUL56 impliqués dans l'interaction et l'assemblage de ce complexe ont récemment été identifiés [1,2].

Notre équipe développe des peptides antiviraux ciblant ces interactions protéine-protéine essentielles au CMVH. Un premier peptide, PT-PD17, dérivé d'un domaine de pUL56 impliqué dans l'interaction pUL56-pUL89, a montré une activité antivirale *in vitro*, apportant une première preuve de concept de cette stratégie [3]. L'identification récente de nouveaux domaines fonctionnels de pUL56 a permis de développer de nouveaux peptides candidats, actuellement en cours d'évaluation [2].

L'objectif de ce projet de stage sera de caractériser l'activité antivirale de différents peptides anti-CMVH et de mieux comprendre leur mécanisme d'action, en combinant des approches virologiques, moléculaires et d'étude des interactions protéiques.

Dans un premier temps, les expériences seront conduites avec la souche de référence AD169-GFP à l'aide d'essais antiviraux en plaques 48 puits, avec quantification automatisée de l'effet cytopathique par microscopie en présence de différentes concentrations de peptides. La cytotoxicité des peptides sera évaluée en parallèle. Les peptides présentant une activité antivirale à des concentrations non cytotoxiques seront ensuite évalués sur des souches cliniques de CMVH sensibles ou résistantes aux antiviraux actuellement disponibles. Cette approche permettra d'étudier leur spectre d'activité et notamment le maintien de leur activité sur des virus résistants. Selon l'avancement du projet, les peptides sélectionnés pourront également être évalués dans un modèle cellulaire placentaire afin d'étudier leur activité antivirale dans ce modèle.

Par ailleurs, une méthode d'évaluation de l'activité antivirale en plaques 96 puits fondée sur la quantification de la fluorescence de la souche AD169-GFP sera développée et optimisée. L'objectif sera de disposer d'une méthode plus standardisée et reproductible pour l'évaluation de l'activité antivirale. Les résultats seront comparés à ceux obtenus avec la méthode de référence en plaques 48 puits fondée sur la quantification automatisée de l'effet cytopathique.

Pour les peptides sélectionnés, l'effet antiviral sera également caractérisé par des approches moléculaires. L'expression de gènes viraux, notamment IE et UL55, sera suivie par RT-qPCR à différents temps post-infection afin d'évaluer l'impact des peptides sur la cinétique de l'expression virale. En collaboration avec une équipe de pharmacologie, les peptides seront quantifiés dans les surnageants de culture cellulaire par LC-MS/MS afin d'étudier l'évolution de leur concentration au cours des essais antiviraux et de la mettre en relation avec l'activité observée.

Un second axe du projet portera sur la caractérisation du mécanisme d'action des peptides. Le système NanoBiT® Protein-Protein Interaction (PPI) de Promega sera utilisé afin d'évaluer leur capacité à perturber les interactions protéine-protéine au sein du complexe terminase du CMVH, notamment l'interaction pUL56-pUL89. Cette approche, déjà utilisée pour caractériser les interactions entre les différentes sous-unités du complexe terminase [2], permettra de déterminer si l'activité antivirale des peptides est associée à une perturbation de son assemblage.

Enfin, la localisation subcellulaire des peptides sera étudiée par microscopie confocale à l'aide de peptides couplés à la rhodamine, afin d'évaluer leur internalisation cellulaire et leur localisation cytoplasmique et/ou nucléaire. Cette approche permettra de déterminer si leur distribution intracellulaire est compatible avec l'accès à leur cible virale [3].

Ce projet permettra ainsi d'associer la caractérisation de l'activité antivirale à l'étude du mécanisme d'action de nouveaux peptides anti-CMVH. Il contribuera à l'identification et à la caractérisation de nouveaux candidats antiviraux ciblant le complexe terminase et susceptibles de conserver une activité vis-à-vis de souches de CMVH résistantes aux traitements actuellement disponibles.

Références associées au projet (references):

1. Ligat G, Jacquet C, Chou S, Couvreur A, Alain S, Hantz S. Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. Sci Rep. 2017 Aug 18;7(1):8796. doi: 10.1038/s41598-017-09469-7.
2. Gourin C, Lefèvre C, Flores T, Couvreur A, Alain S, Ligat G, Hantz S. Key domains involved in the interaction and assembly of the HCMV terminase complex. Sci Rep. 2025 Nov 20;15(1):44943. doi: 10.1038/s41598-025-28915-5.
3. Mafi S, Poyet JL, Alain S, Ligat G, Hantz S. First evidence of efficacy of peptides targeting the pUL56-pUL89 interaction domain of the human cytomegalovirus terminase complex. Antiviral Res. 2025 Oct;242:106259. doi: 10.1016/j.antiviral.2025.106259. Epub 2025 Aug 14. PMID: 40816464.

Principales techniques utilisées (main techniques used):

- Culture cellulaire
- Essais antiviraux en plaques 48 puits avec quantification automatisée de l'effet cytopathique par microscopie
- Mise au point d'un essai antiviral par fluorescence en plaques 96 puits
- RT-qPCR
- Quantification des peptides dans les surnageants de culture cellulaire par LC-MS/MS (en collaboration avec une équipe de pharmacologie)
- Étude des interactions protéine-protéine par NanoBiT® PPI (Promega)
- Étude de la localisation subcellulaire des peptides couplés à la rhodamine par microscopie confocale

Nature de la gratification* (*bonus, if applicable*): 596 euros par mois

*Les stages d'une durée de 6 mois font l'objet d'une gratification minimale équivalente à 15% du plafond de la sécurité sociale. Vous trouverez un simulateur à l'adresse suivante (if applicable, cost estimation can be calculated at the following address): <https://www.service-public.fr/simulateur/calcul/gratification-stagiaire>

Merci de renvoyer vos propositions de stage à l'adresse suivante avant le 30 octobre 2026 (please send your proposal to the following address) :

- sarah.mafi@unilim.fr ; sebastien.hantz@unilim.fr