

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Pour obtention du grade de :
Docteur de L'Université de Lille

Soutenue le 9 décembre 2021

Étude des mécanismes d'action de nouveaux inhibiteurs de coronavirus humains

Dans le laboratoire : Centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL)
Inserm U1019, CNRS UMR 9017 Institut Pasteur de Lille
Équipe Virologie Moléculaire et Cellulaire dirigée par le Dr Jean DUBUISSON

Présentée par : **Thomas MEUNIER**

Directrice de thèse : **Karin SERON**

Composition du jury :

Pr Thierry HENNEBELLE	Président
Pr Sevser SAHPAZ	Examinatrice
Pr Sophie LE PODER	Rapportrice
Dr Chaker EL KALAMOUNI	Rapporteur
Dr François HELLE	Examineur
Dr Karin SERON	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de ce jury, le Pr Sevser Sahpaz, le Pr Sophie Le Poder, le Dr Chaker El Kalamouni, le Dr François Helle et le Pr Thierry Hennebelle pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'évaluation de mon travail.

Je remercie l'INSERM et la région Hauts-de-France d'avoir financé mes trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement Jean Dubuisson pour m'avoir accepté dans son laboratoire pour préparer cette thèse.

Merci infiniment à Karin Séron, ma tutrice de thèse, pour m'avoir guidé et formé au cours de ces trois années, merci pour ta grande patience, ton aide, tes conseils et aussi pour m'avoir offert une bouillote pour que je puisse survivre à mon premier hiver dans le Nord.

Merci à tous les membres de laboratoire MCV pour leur convivialité et ces 3 ans passés ensemble.

Merci à Sandrine Belouzard pour son aide technique et théorique pendant mes travaux de thèse pour m'avoir formé à plusieurs techniques utilisées dans mes projets, mais aussi pour ses pains d'épices retrouvés avec plaisir à chaque Noël.

Merci à Simon Bordage pour son aide et ses conseils dans la partie phytochimie de mes travaux et pour sa collaboration à mon projet de thèse.

Merci à Valérie Conseil pour sa confiance et m'avoir permis de donner des cours de virologie à ses élèves de 3^e année de licence biotechnologie.

Merci à Adeline Danneels pour son aide technique et son expertise ainsi que pour sa recette de salade à la tomate.

Merci à Nathan François et Lowiese Desmarets pour leur aide et leur participation aux expériences qui ont servi à réaliser cette publication.

Merci à Yves Rouillé, Thibaut Vausselin, Nathalie Callens et Muriel Lavie pour leurs conseils techniques, leur savoir faire expérimental et leur bonne humeur au laboratoire.

Merci à Kevin Hervouet pour m'avoir hébergé lors de mon arrivée à Lille, pour sa joie de vivre et l'organisation de la sortie paintball.

Merci à Cécile-Marie et El Moukhtar Aliouat pour leur aide précieuse lors de mon emménagement et de mon installation à Lille.

Merci à mes collaborateurs, Olivier Lambert, Valentin Sencio, Marion Decossas et François Trottein qui ont participé à la réalisation des travaux présentés et détaillés dans cette thèse.

Merci à tous les étudiants du laboratoire, Dylan, Kevin, Imelda, Esther, Anabelle, Malak, Cyrine, Karoline, Maliki, Nadjet, Rehab pour la bonne entente au laboratoire et les rigolades lors des pauses café et repas.

Merci à Steve Curto du service de santé au travail au GHT Val Rhône, pour ses informations en temps réel sur la gestion de la crise sanitaire dans les hôpitaux du Rhône-Alpes-Isère et la gestion des symptômes de COVID-long qui ont servi à l'argumentation de cette thèse.

Merci à Maliki Ankavay pour m'avoir fait découvrir des sorties danse à Lille avant son départ du laboratoire.

Merci à Isabelle Aslani qui a lutté pour que j'obtienne ma prolongation « COVID-19 ».

Merci à tous ceux qui ont su flatter ma gourmandise : pour leurs pâtisseries orientales Malak et Cyrine, laquelle avait aussi du talent pour la citronnade, Esther pour sa recette de gâteau chocolat à la courgette, Karin pour ses cookies aux flocons d'avoine, sans oublier Yves, Nathan, Adeline et Dylan pour les nombreuses sorties « apéros » et tous ceux qui ont apporté un petit quelque chose à partager.

Merci à France Imbert pour son aide lors de la relecture de ma thèse.

Résumé

Les coronavirus sont des virus ARN enveloppés qui infectent les mammifères et les oiseaux. Chez l'homme, quatre coronavirus causent des maladies bénignes comme des rhumes et rhinites, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1. Au cours des deux dernières décennies, trois nouveaux coronavirus hautement pathogènes ont été identifiés, le SARS-CoV (« Severe Acute Respiratory Syndrome ») en 2003, le MERS-CoV (« Middle East Respiratory Syndrome ») en 2012 et récemment le SARS-CoV-2 en décembre 2019. La pandémie mondiale du COVID-19 a mis en évidence le manque d'antiviraux ciblant les coronavirus. Bien que de nombreux vaccins efficaces soient développés pour contrer la pandémie de COVID-19 due au SARS-CoV-2, il n'y a toujours aucun antiviral spécifique commercialisé contre ce virus et les traitements actuels consistent à traiter uniquement les symptômes.

L'équipe du Dr Karin SERON du laboratoire de Virologie Moléculaire et Cellulaire du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille s'est spécialisée dans l'identification d'antiviraux d'origine naturelle. En effet les plantes sont une source importante de molécules thérapeutiques et de nombreuses plantes sont encore utilisées aujourd'hui en médecine traditionnelle. L'objectif de ma thèse a été d'utiliser les connaissances et techniques développées par le laboratoire pour identifier des antiviraux naturels contre les coronavirus humains hautement pathogènes et de comprendre leurs mécanismes d'action. Mon premier projet a été réalisé en collaboration avec le groupe de Dr Simon Bordage du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille dirigé par le Pr Sevser Sahpaz. Suite au criblage d'extraits de plantes, utilisées en médecine traditionnelle ivoirienne, contre le coronavirus HCoV-229E, nous avons sélectionné l'extrait de *Mallotus oppositifolius* qui était le plus actif. Après un fractionnement bioguidé, le principe actif a été isolé et identifié. Il s'agit du phéophorbide a (Pba). Le Pba inhibe HCoV-229E mais aussi les coronavirus hautement pathogènes MERS-CoV et SARS-CoV-2 ($IC_{50} = 0,18 \mu M$) ainsi que d'autres virus enveloppés par un mécanisme de photo-inactivation dynamique. Nous avons montré que le Pba cible la membrane virale et inhibe l'étape de fusion. Le Pba est le premier antiviral naturel possédant une activité virucide photo-dépendante décrite contre le SARS-CoV-2. Cette molécule pourrait potentiellement être utilisée en thérapie clinique ou comme désinfectant de surface. Mon deuxième projet porte sur une anthocyanidine, la delphinidine, déjà décrite par notre laboratoire comme antiviral contre le virus de l'hépatite C. Nous avons montré que la delphinidine inhibe de façon dose-dépendante l'entrée des coronavirus HCoV-229E, MERS-CoV et SARS-CoV-2 dans les cellules ($IC_{50} = 16-20 \mu M$). Nos résultats montrent que la delphinidine cible les sites de glycosylation de la protéine de surface S. Grâce à une collaboration avec le laboratoire de Chimie Bio-organique et Médicinale de Strasbourg, dirigé le Dr Mourad Elhabiri, nous avons criblé des dérivés de la delphinidine afin d'identifier des molécules plus actives. Nous avons ainsi identifié un composé actif contre le HCoV-229E à une concentration très faible ($IC_{50} = 0,06 \mu M$) mais qui semble avoir un mécanisme d'action différent de la delphinidine. En effet, il est actif à l'étape de réplication.

En conclusion, au cours de ma thèse j'ai pu identifier de nouveaux antiviraux naturels contre les coronavirus humains et notamment le SARS-CoV-2 ayant des mécanismes d'action inédits. Ces travaux pourront servir de base à l'obtention de molécules pouvant être utilisées, dans l'avenir, pour le traitement des maladies à coronavirus.

Abstract

Mechanism of action of novel inhibitors against human coronaviruses

Coronaviruses are enveloped RNA viruses infecting mammals and birds. Four coronaviruses causing mild diseases, like common cold, have been described in human, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 and HCoV-HKU1. During the last two decades, three new, highly pathogenic coronaviruses have been identified the SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome) in 2003, the MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome) in 2012 and recently the SARS-CoV-2 in December 2019. The COVID-19 global outbreak caused by SARS-CoV-2, highlighted the lack of specific antiviral available against this family of virus. The team of Dr Karin SERON from the Cellular and Molecular Virology laboratory of the Center for Infection and Immunity of Lille, is specialized in the identification of antiviral compounds from natural origin. Indeed, plants are a source of natural therapeutic compounds and many plants are still being used in traditional medicine. The aim of my thesis was to identify natural antiviral agents against highly pathogenic human coronaviruses with the help of the knowledge and tools developed by the laboratory. My first project was carried out in collaboration with the group of Dr Simon Bordage from the Pharmacognosy laboratory of the Faculty of Pharmacy of Lille directed by Pr Sevser Sahpaz. Plant extracts from Ivorian plants used in traditional medicine were tested against the coronavirus HCoV-229E and we selected the most active, the *Mallotus oppositifolius* extract. After bio-guided fractionation, the active compound was isolated and characterized, the pheophorbide a (Pba). Pba is able to inhibit the infection of HCoV-229E and highly pathogenic coronaviruses MERS-CoV and SARS-CoV-2 ($IC_{50} = 0.18 \mu\text{M}$) as well as other enveloped viruses using a photo-dynamic inactivation mechanism. Pba targets the viral envelop and inhibits the fusion step. Pba is the first described natural antiviral against SARS-CoV-2 with direct photosensitive virucidal activity. This molecule could potentially be used in therapy or as disinfectant. My second project was about an anthocyanidin, the delphinidin, identified in the laboratory for its antiviral activity against hepatitis C virus. We showed that delphinidin is an entry inhibitor of coronaviruses in a dose-dependent manner for HCoV-229E, MERS-CoV and SARS-CoV-2 ($IC_{50} = 16\text{-}20 \mu\text{M}$). Our results show that delphinidin targets the glycosylation sites on the surface protein S. Thanks to a collaboration with the laboratory of Medicinal and Bioorganic Chemistry of Strasbourg, led by Dr Mourad Elhabiri, delphinidin synthetic derivatives were screened in order to identify compounds with higher antiviral capacities. We thereby identify an active compound against HCoV-229E with a lower IC_{50} than delphinidin ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{M}$). Surprisingly, its mechanism of action seems to be different than delphinidin with an activity at the replication step.

In conclusion, during my thesis I was able to identify new natural antivirals against human coronaviruses, and in particular SARS-CoV-2, with novel mechanisms of action. This work may serve as a basis for obtaining molecules that can be used in the future for the treatment of coronavirus diseases.

Liste des abréviations

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKI : Insuffisance rénale aiguë

ALT : Alanine aminotransférase

APN : Amino peptidase N

ARDS : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

BCV et BCoV : Coronavirus bovin

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CoV : Coronavirus

COVID-19 : Maladie à coronavirus 2019

DENV : Virus de la dengue

DMV : Vésicule à double membrane

DPP4 : Dipeptidyl peptidase 4

EMA : Agence européenne du médicament

EGC : Epigallocatechine

EGCG : Epigallocatechine gallate

ERGIC : Compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique - Golgi

FDA : Agence des produits alimentaires et médicamenteux

FIPV : virus de la péritonite infectieuse féline

HCoV : Coronavirus humain

HSV : Virus de l'herpes simplex

IBV : Virus de la bronchite infectieuse aviaire

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

JUNV : Virus Junin

LDH : Lactate déhydrogénase

MARV : Virus de Marburg

MERS : Syndrome respiratoire du Moyen-Orient

MHV : Virus de l'hépatite murine

NSP : Protéine non structurale

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORF : Phase ouverte de lecture

Pba : Phéophorbide a

PEDV : Virus de la diarrhée épidémique porcine

PFA : Paraformaldehyde

PTD : Thérapie photodynamique

PTI : Inactivation photodynamique

PyroPba : Pyrophéophorbide a

RBD : Région du domaine d'attachement

RdRp : Polymérase ARN dépendante de l'ARN

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Forme réactive de l'oxygène

RTC : Complexe de réplication et transcription

SARS : Syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère

sgRNA : ARN sous génomique

TCRV : Virus Tacaribe

TGEV : Virus de la gastro-entérite transmissible

TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TRS : Séquence de régulation de la transcription

UTR : Région non traduite

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLP : Particule pseudovirale

VOC : Variant préoccupant

VOI : Variant d'intérêt

VSV : Virus de la stomatite virale

YFV : Virus de la fièvre jaune

Abbreviations

ACE2: Angiotensin-converting enzyme 2

ADN: Deoxyribonucleic acid

AKI: Acute kidney injury

ALT: Alanine aminotransferase

APN: Amino peptidase N

ARDS: Acute respiratory distress syndrome

ARN: Ribonucleic acid

ARNm: Messenger RNA

AST: Aspartate aminotransferase

ATP: Adenosine triphosphate

BCV et BCoV: Bovin coronavirus

CMH: Major histocompatibility complex

CoV: Coronavirus

COVID-19: Coronavirus disease 2019

DENV: Dengue virus

DPP4: Dipeptidyl peptidase 4

DMV: Double membrane vesicle

EMA: European Medicin Agency

EGC: Epigallocatechin

EGCG: Epigallocatechin gallate

ERGIC: Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment

FDA: Food and drugs administration

FIPV: Feline infectious peritonitis virus

HCoV: Human coronavirus

HIV: Human immunodeficiency virus

HSV: Herpes simplex virus

IBV: Infectious bronchitis virus

IFN: Interferon

Ig: Immunoglobulin

IL: interleukin

JUNV: Junin virus

LDH: Lactate dehydrogenase

MARV: Marburg virus

MERS: Middle-East respiratory syndrome

MHV: Murine hepatitis virus

NSP: Non structural protein

OMS: World health organisation

ORF: Open reading frame

Pba: Pheophorbide a

PEDV: Porcine epidemic diarrhea virus

PFA: Paraformaldehyde

PTD: Photodynamique therapy

PTI: Photodynamique inactivation

PyroPba : Pyropheophorbide a

RBD: Receptor binding domain

RdRp: RNA dependant RNA polymerase

RMN: Nuclear magnetic resonance

ROS: Reactive oxygen species

RTC: Replication and transcription complex

SARS: Severe acute respiratory syndrome

sgRNA: Subgenomic RNA

TCRV: Tacaribe virus

TGEV: Transmissible gastroenteritis virus

TMPRSS2: Transmembrane protease serine 2

TNF: Tumor necrosis factor

TRS: Transcription regulation sequence

UTR: Untranslated region

VHB: Hepatitis B virus

VHC: Hepatitis C virus

VLP: Virus-like particles

VOC: Variant of concern

VOI: Variant of interest

VSV: Viral stomatitis virus

YFV: Yellow fever virus

Table des matières

I – INTRODUCTION	17
1 - Les coronavirus	17
1.1 Généralités	17
1.2 Les coronavirus humains hautement pathogènes.....	18
1.2.1 Epidémiologie du SARS-CoV	19
1.2.2 Epidémiologie du MERS-CoV.....	19
1.2.3 Epidémiologie du SARS-CoV-2.....	21
1.3 Transmission inter-espèce	23
2 – Biologie des coronavirus	25
2.1 Le génome	25
2.2 Les protéines de structure	27
2.2.1 La protéine S.....	27
2.2.2 La protéine E.....	28
2.2.3 La protéine M	28
2.2.4 La protéine N	29
2.3 Les protéines non structurales.....	29
2.4 Les protéines accessoires	31
2.5 Le cycle viral	33
2.5.1 L'entrée	33
2.5.2 La réplication	35
2.5.3 L'assemblage et la sécrétion des particules.....	36
2.6 Modèles d'études.....	36
3 - La pathologie	39
3.1 La transmission inter-humaine.....	39
3.2 Les symptômes.....	41
3.3 Les complications de la COVID-19.....	49
3.4 Méthodes de dépistage.....	51
4 – Vaccins et traitements	55
4.1 Les vaccins	55
4.1.1 Les différentes catégories de vaccins.....	55
a) Les vaccins à vecteur viraux	56
b) Les vaccins nucléotidiques	57
c) Les vaccins à virus entier	58
d) Autres types de vaccins.....	59
4.1.2 Les variants.....	61
4.1.3 Efficacité des vaccins par rapport aux variants.....	63

4.2 Les traitements utilisés en thérapie clinique	65
4.3 Les stratégies d'identification des antiviraux.....	67
4.4 Le repositionnement de médicaments existants.....	69
4.5 Les antiviraux spécifiques des coronavirus	73
4.5.1 Les inhibiteurs d'entrée	73
a) Les anticorps monoclonaux.....	73
b) Les antiviraux à action directe	74
c) Les antiviraux à cible cellulaire.....	75
4.5.2 Les inhibiteurs de la réplication	76
a) Les antiviraux à action directe	76
b) Les antiviraux à cible cellulaire	78
5 - Les plantes comme sources de médicaments	79
5.1 La médecine traditionnelle	79
5.2 Les molécules naturelles dans les médicaments	79
5.3 Les stratégies pour identifier des molécules naturelles	80
5.3.1 L'ethnopharmacologie	80
5.3.2 L'expérience du laboratoire sur le VHC.....	80
5.3.3 Le fractionnement bioguidé	81
5.4 Les molécules naturelles contre les coronavirus	83
5.4.1 Les molécules naturelles à action directe.....	83
5.4.2 Les molécules naturelles à cible cellulaire	84
6 - LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE.....	87
6.1 Les photosensibilisateurs	87
6.2 Les applications de la PTD	89
6.3 L'inactivation photodynamique (PDI)	91
6.4 Les photosensibilisateurs naturels	92
6.4.1 Les différentes molécules.....	92
6.3.2 Le phéophorbide a (Pba).....	93
II - CONTEXTE ET OBJECTIFS	96
Projet 1 : Identification du principe actif de l'extrait de <i>Mallotus oppositifolius</i> et caractérisation de son mécanisme d'action	96
Projet 2 Caractérisation du mécanisme d'action de la delphinidine contre les coronavirus.....	97
III - LES TRAVAUX DE THESE.....	98
A- Projet 1 : Identification du principe actif de l'extrait de <i>Mallotus oppositifolius</i> et caractérisation de son mécanisme d'action	98
Résumé.....	99
Résultats.....	101

1 - Identification du Pba	101
2 - Le Pba est actif contre plusieurs coronavirus	101
3 - Le Pba inhibe les coronavirus à l'étape d'entrée en ciblant la particule virale	103
4 - Le Pba est un inhibiteur de la fusion	105
5 - L'activité du Pba dépend du temps d'exposition à la lumière et cible les membranes lipidiques	107
6 - Le Pba a un effet antiviral contre plusieurs virus enveloppés	111
8 - Le Pba inhibe la réplication du SARS-CoV-2 et du MERS-CoV dans un modèle de cellule épithéliale pulmonaire primaire humaine.....	113
9 - Le Pba est non toxique pour les souris mais ne permet pas une protection contre l'infection.....	115
Discussion et conclusion	115
B- Projet 2 : Caractérisation du mécanisme d'action de la delphinidine contre les coronavirus.....	119
Résumé.....	119
Résultats.....	121
1 - La delphinidine est le composé le plus actif contre HCoV-229E-Luc et inhibe la voie endosomale.....	121
2 - La delphinidine joue un rôle sur l'étape d'entrée et semble cibler la particule virale.....	123
3 - La delphinidine cible l'asparagine glycosylée Asn1035 de la protéine S du HCoV-229E.....	127
4 - La delphinidine est capable d'inhiber les coronavirus hautement pathogènes...	129
5 - Des dérivés obtenus par modification chimique sont plus actifs que la delphinidine contre le coronavirus HCoV-229E	133
Conclusions.....	135
IV - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	136
V - BIBLIOGRAPHIE	139
VI - ANNEXE.....	173

Liste des figures

FIGURE 1 : TAXONOMIE DES <i>CORONAVIRIDAE</i>	16
FIGURE 2 : CHRONOLOGIE DE L'IDENTIFICATION DES CORONAVIRUS.....	18
FIGURE 3 : CAS DE MERS-CoV IDENTIFIES PAR L'OMS	20
FIGURE 4 : ARBRE PHYLOGENIQUE BASE SUR LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE COMPLETE DES CORONAVIRUS	22
FIGURE 5 : TRANSMISSION INTER-ESPECE DES DIFFERENTS CORONAVIRUS	24
FIGURE 6 : GENOMES DES CORONAVIRUS SARS-CoV-2, SARS-CoV ET MERS-CoV.....	25
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PARTICULE VIRALE DU SARS-CoV-2.....	26
FIGURE 8 : ENSEMBLE DES NSP CONTENUE DANS LES POLYPROTEINES PP1A ET PP1AB	30
FIGURE 9 : FONCTIONS CONNUES DES PROTEINES ACCESSOIRES DU SARS-CoV-2	31
FIGURE 10 : CYCLE DE REPLICATION DES CORONAVIRUS	32
FIGURE 11 : MECANISME DE FUSION	34
FIGURE 12 : REPLICATION ET TRANSCRIPTION DISCONTINUE DES CORONAVIRUS.....	34
FIGURE 13 : PERIODE DE CONTAGION EN FONCTION DU TEMPS	40
FIGURE 14 : PROGRESSION DE LA MALADIE DE LA COVID-19 EN FONCTION DU TEMPS.....	40
FIGURE 15 : CONSEQUENCE DE LA COVID-19 EN FONCTION DE L'AGE DES PATIENTS	42
FIGURE 16 : COMPORTEMENT DE L'IMMUNITE INNEE AU COURS DE LA COVID-19 POUR LES ETATS BENIN, MODERE ET SEVERE	44
FIGURE 17 : VOIE D'ENTREE HYPOTHETIQUE DU VIRUS SARS-CoV-2 JUSQU'AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL..	48
FIGURE 18 : EFFET LONG TERME DE LA COVID-19.....	50
FIGURE 20 : DIFFERENTS INDICATEURS D'UNE INFECTION AU SARS-CoV-2 AU COURS DU TEMPS	52
FIGURE 22 : CAPTURE D'ECRAN DU SITE NEXTSTRAIN AU 10 SEPTEMBRE 2021.....	60
FIGURE 23 : LISTE DES MUTATIONS PRESENTES SUR LA PROTEINE S DES QUATRE VARIANTS VOC	62
FIGURE 24 : REDUCTION DE L'EFFICACITE DE LA NEUTRALISATION DE PSEUDOPARTICLES	63
FIGURE 25 : STRATEGIES D'IDENTIFICATION DES ANTIVIRAUX.	66
FIGURE 26 : TEMPORALITE DE LA PATHOLOGIE DE LA COVID-19 POUR L'ADMINISTRATION D'ANTIVIRAUX ET D'IMMUNOMODULATEURS	68
FIGURE 27 : « THE COVID-19 DRUG AND GENE SET LIBRARY ».....	70
FIGURE 28 : STRATEGIE D'IDENTIFICATION DE COMPOSE ANTIVIRAL A PARTIR DE PLANTE	82
FIGURE 29 : EVOLUTION DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE DE 1900 A 2000	86
FIGURE 30 : PRINCIPE DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PTD)	86
FIGURE 31 : MECANISME D'OXYDATION PAR PHOTOACTIVATION	88
FIGURE 32 : EXEMPLE DE PHOTOSENSIBILISATEURS AVEC GROUPEMENT TETRAPYRROLE	90
FIGURE 33 : EXEMPLE DE PHOTOSENSIBILISATEURS SANS GROUPEMENT TETRAPYRROLE.....	90
FIGURE 34 : DEGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE	94
FIGURE 35 : STRUCTURE CHIMIQUE DU PHEOPHORBIDE A (PBA).....	94

Liste des tableaux

TABLE 1 : MODELES ET OUTILS UTILISES DANS L'ETUDE DES CORONAVIRUS.....	38
TABLE 2 : COMPARAISON DES SYMPTOMES CLINIQUES ENTRE LES PATHOLOGIES CAUSEES PAR LE SARS-CoV-2, SARS-CoV ET MERS-CoV	46
TABLE 3 : LISTE DES VARIANTS VOC ET VOI PAR L'OMS.	62

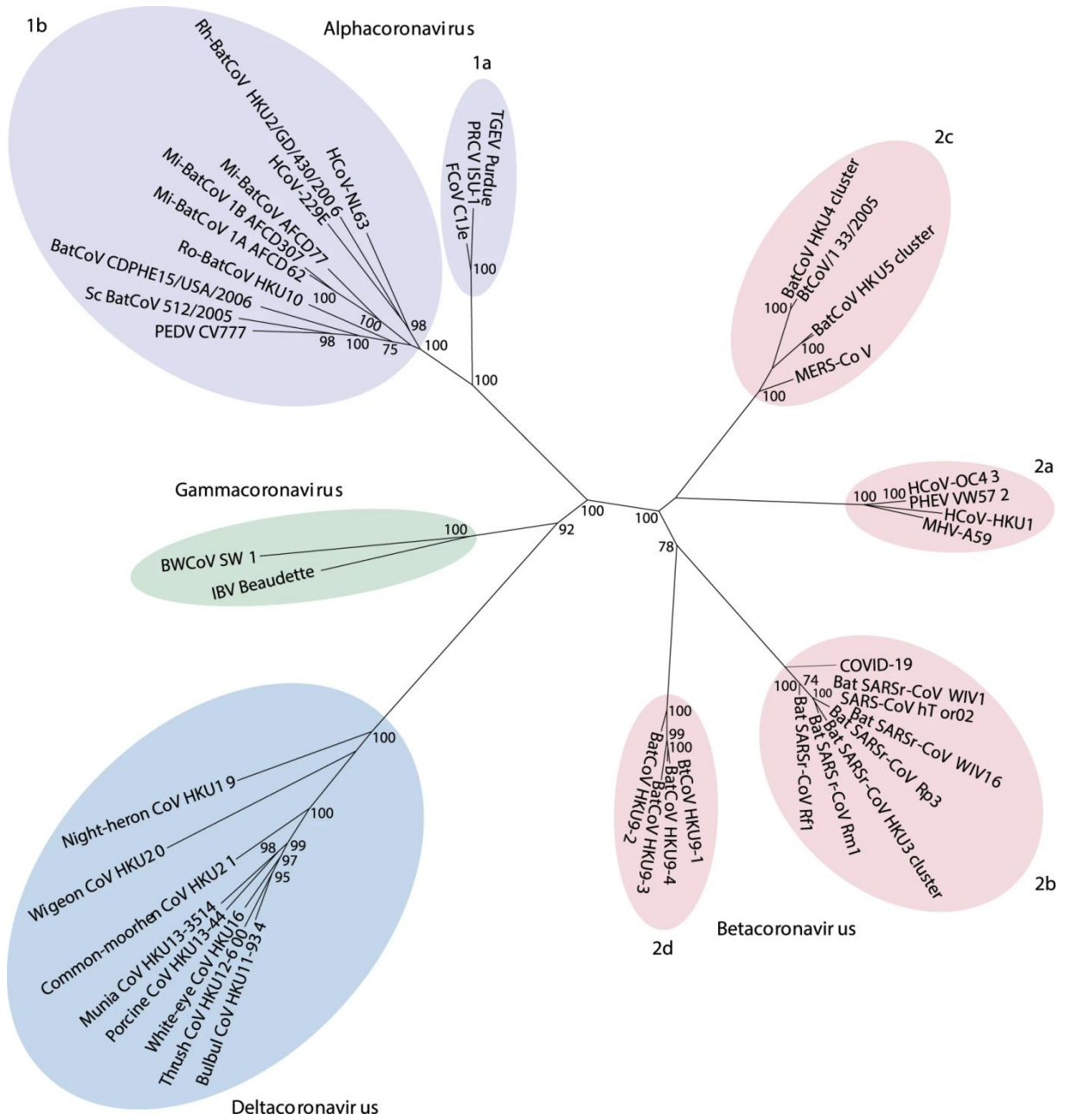


Figure 1 : Taxonomie des *Coronaviridae* (Platto, Xue, et Carafoli 2020).

I – INTRODUCTION

1 - Les coronavirus

1.1 Généralités

Les coronavirus sont des virus enveloppés à génome à ARN simple brin de polarité positive appartenant à l'ordre des *Nidovirales*. Ils sont regroupés dans la famille des *Coronaviridae* et la sous-famille des *Coronavirinae*. Il existe quatre genres de coronavirus, *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus* et *deltacoronavirus* (Figure 1). Les coronavirus infectent de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux (Ghosh et Malik 2020).

Les coronavirus infectent de nombreux animaux sauvages ou domestiques. Parmi les animaux d'élevage, les coronavirus causent des maladies diverses qui ont un fort impact économique en raison de leur capacité à perturber les productions. Les plus connus sont : le virus de la bronchite infectieuse aviaire (« infectious bronchitis virus », IBV), qui est le premier coronavirus identifié, un *gammacoronavirus* causant des bronchites chez les poulets, le virus de la diarrhée épidémique porcine (« porcine epidemic diarrhea coronavirus », PEDV) et le virus de la gastro-entérite transmissible (« transmissible gastroenteritis coronavirus », TGEV) deux *alphacoronavirus* du porc, le coronavirus bovin (« bovine coronavirus », BCV ou BCoV) un *betacoronavirus* causant des atteintes gastro-intestinales et respiratoire chez les bovins, le virus de la péritonite infectieuse féline (« Feline infectious peritonitis virus », FIPV) un *alphacoronavirus* causant une maladie mortel chez le chat. Enfin, le virus de l'hépatite murine (« mouse hepatitis virus », MHV) un *betacoronavirus* causant des hépatites chez les souris, est un virus qui a été très étudié et a servi de modèle (Poudel et al. 2020). Nous allons ici plus nous intéresser aux coronavirus pathogènes chez l'homme.

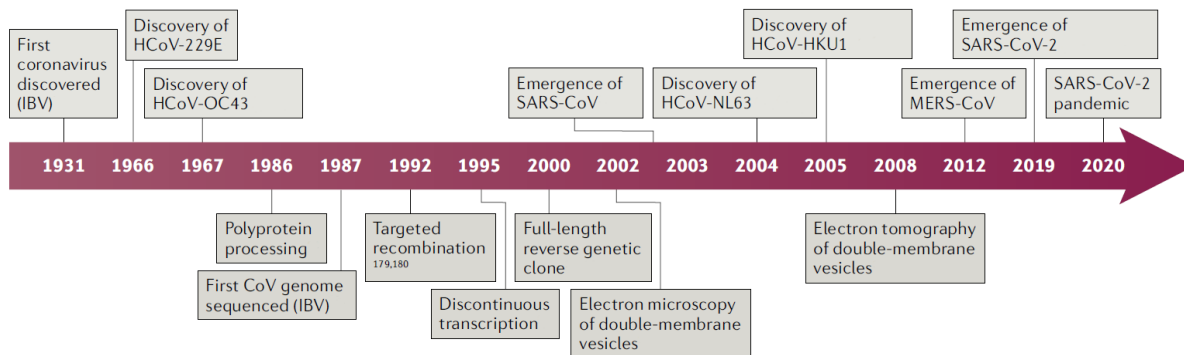


Figure 2 : Chronologie de l'identification des coronavirus (V'kovski et al. 2021).

Chez l'homme, il existe quatre coronavirus causant une pathologie bénigne équivalente au rhume commun avec une légère fièvre de quelques jours, et une atteinte des parties respiratoires hautes. Toutefois, chez les individus immunodéprimés, la maladie peut évoluer vers des pathologies plus graves. Ces coronavirus bénins ont une distribution mondiale. Les deux premiers à avoir été identifiés dans les années 1960 sont *l'alphacoronavirus* HCoV-229E et le betacoronavirus HCoV-OC43. Deux autres ont été identifiés plus récemment, les betacoronavirus HCoV-NL63 et HCoV-HKU1, découverts en 2004 et 2005 (van der Hoek et al. 2004; Woo et al. 2005) suite à la première épidémie mondiale de coronavirus « hautement pathogène » (Figure 2).

1.2 Les coronavirus humains hautement pathogènes

On distingue ces coronavirus humains causant des pathologies bénignes à trois autres coronavirus humains causant des pathologies beaucoup plus graves et qui seront décrits dans les paragraphes suivants. Il s'agit du coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (« severe acute respiratory syndrome » ou SARS-CoV), du coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (« Middle-East respiratory syndrome » ou MERS-CoV) et du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (« severe acute respiratory syndrome 2 » ou SARS-CoV-2). Tous les coronavirus humains seraient d'origine zoonotique, dont une majorité aurait comme hôte naturel la chauve-souris (Cui, Li, et Shi 2019). (Voir 1.3 Transmission inter-espèce)

1.2.1 Epidémiologie du SARS-CoV

Le premier coronavirus hautement pathogène à être apparu est le *betacoronavirus* SARS-CoV identifié en 2002 en Chine dans la région du Guangdong (Peiris, Guan, et Yuen 2004). Ce virus s'est ensuite propagé dans différentes parties du monde. C'est un virus respiratoire qui infecte les parties basses des poumons, déclenchant fièvre, malaise, lymphopénie et pneumonie. Le virus est transmis à l'homme par un mammifère qui joue le rôle d'hôte intermédiaire, la civette palmiste, un animal vendu vivant sur les marchés, créant ainsi un contact proche entre l'homme et l'animal. L'épidémie a pu être stoppée en 2004 grâce à des mesures de préventions et au confinement des personnes contaminées. Les chiffres de l'OMS font état de 8098 personnes atteintes pour 774 décès, soit un taux de mortalité d'environ 10% (Hui 2004).

1.2.2 Epidémiologie du MERS-CoV

La deuxième épidémie à coronavirus a commencé en 2012 au Moyen-Orient, et elle est toujours en cours. Elle est causée par le deuxième *betacoronavirus* hautement pathogène identifié chez l'homme, le MERS-CoV (de Groot et al. 2013; Zaki et al. 2012). Le tableau clinique ressemble à celui du SARS-CoV. Toutefois, il a été observé que le MERS-CoV peut causer non seulement de graves pneumonies, mais aussi la défaillance sévère d'autres organes comme les reins. Le MERS-CoV est transmis à l'homme par le dromadaire qui sert d'hôte intermédiaire. La transmission inter-humaine s'effectue ensuite par contact proche avec une personne contaminée. Bien que le virus ait été identifié en 2012, le pic de propagation de l'épidémie a eu lieu en 2014 (Figure 3). La propagation vers d'autres pays s'est faite suite au retour de voyage depuis le Moyen-Orient, notamment après le pèlerinage à La Mecque. Une explosion de cas en Corée du Sud s'est produite suite au retour d'un seul voyageur qui a été à l'origine de 185 cas (Kim et al. 2017). En France, un voyageur de retour du Moyen-Orient a été hospitalisé à Lille puis diagnostiqué positif au MERS-CoV. Il a contaminé un autre patient se trouvant dans la même chambre, et ce dernier n'a pas survécu. Ce fut les deux seuls cas de MERS-CoV reportés en France. L'épidémie de MERS-CoV est toujours en cours bien qu'elle soit contenue au Moyen-Orient et compte 2574 cas d'infection pour 886 décès soit un taux de mortalité de 34,4% (Hui et al. 2018).

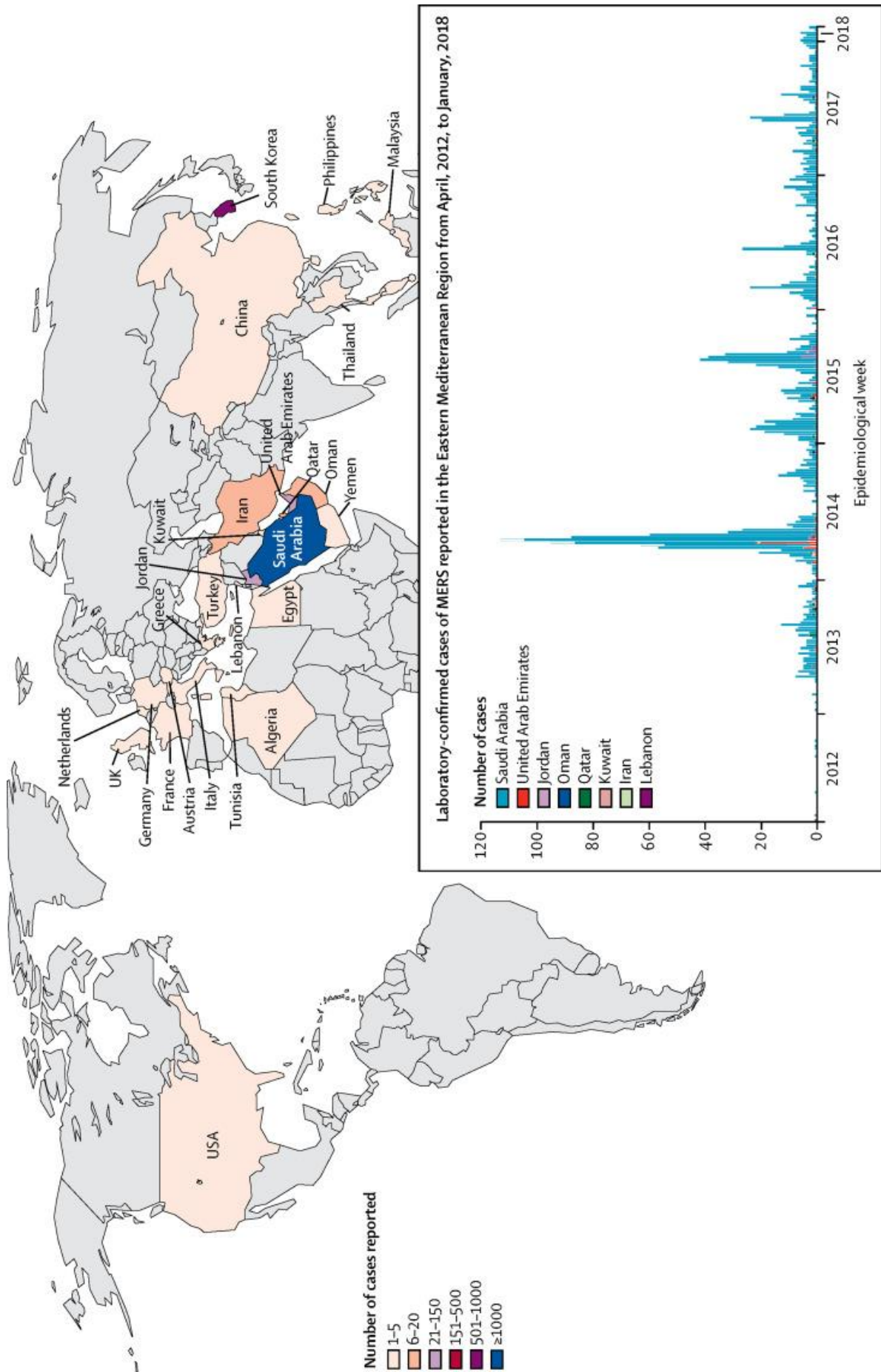


Figure 3 : Cas de MERS-CoV identifiés par l'OMS (Hui et al. 2018)

1.2.3 Épidémiologie du SARS-CoV-2

La troisième et plus récente épidémie de coronavirus est celle de COVID-19 causée par le SARS-CoV-2, anciennement 2019-nCoV, identifié en 2019 en Chine dans la ville de Wuhan (Zhou et al. 2020). En décembre 2019 plusieurs patients présentant une pneumonie aigüe ont été hospitalisés dans la région du Hubei. Grâce au séquençage haut débit, le nouveau pathogène a été rapidement identifié comme étant un nouveau *betacoronavirus*, nommé alors 2019-nCoV et comportant 80% d'identité avec le virus SARS-CoV. Ce virus s'est rapidement propagé à travers le monde et s'est transformé en une pandémie mondiale qui compte plus de 233 millions de cas recensés et plus de 4,7 millions de morts (Octobre 2021).

Des efforts pour rechercher l'hôte intermédiaire ont immédiatement commencé, ciblant dans un premier temps les animaux présents dans la région autour de Wuhan et particulièrement les animaux vivants retrouvés dans le « marché humide » de Wuhan. C'est ainsi que le pangolin, petit mammifère braconné vendu dans la région, a été suspecté comme hôte intermédiaire du SARS-CoV-2 (Xiao et al. 2020). Cependant ces informations étaient fondées sur la comparaison d'homologie entre les régions codant la protéine E et une partie de la protéine S du virus ; des études phylogéniques sur le génome complet ont montré que le coronavirus du pangolin était plus éloigné du SARS-CoV-2 de l'homme (90.3% d'homologie), que le coronavirus de la chauve-souris, BatCoV RaTG13 (96.2% d'homologie) (Figure 4). Il est donc improbable que l'hôte intermédiaire entre la chauve-souris et l'homme soit le pangolin (Yuan, Jiang, et Li 2020). A ce jour, malgré les efforts pour rechercher l'hôte intermédiaire, une transmission directe de la chauve-souris à l'homme reste une hypothèse possible bien que cela n'ait jamais été observé chez les coronavirus.

Une autre hypothèse qui fait actuellement polémique serait l'échappement du SARS-CoV-2 depuis le laboratoire de Wuhan, spécialisé dans les coronavirus et dont les équipes avaient étudié les populations de chauve-souris du Yunnan et du Guanxi, réservoir important des coronavirus de type SARS-CoV-Like. L'accident de transmission aurait pu se produire en prélevant des échantillons de sang pour analyse. Plusieurs enquêtes dont une par l'OMS ont été menées pour rechercher d'éventuels signes d'accidents de laboratoire qui auraient pu entraîner ainsi la fuite du virus, mais aucune preuve n'a permis de trancher sur la question.

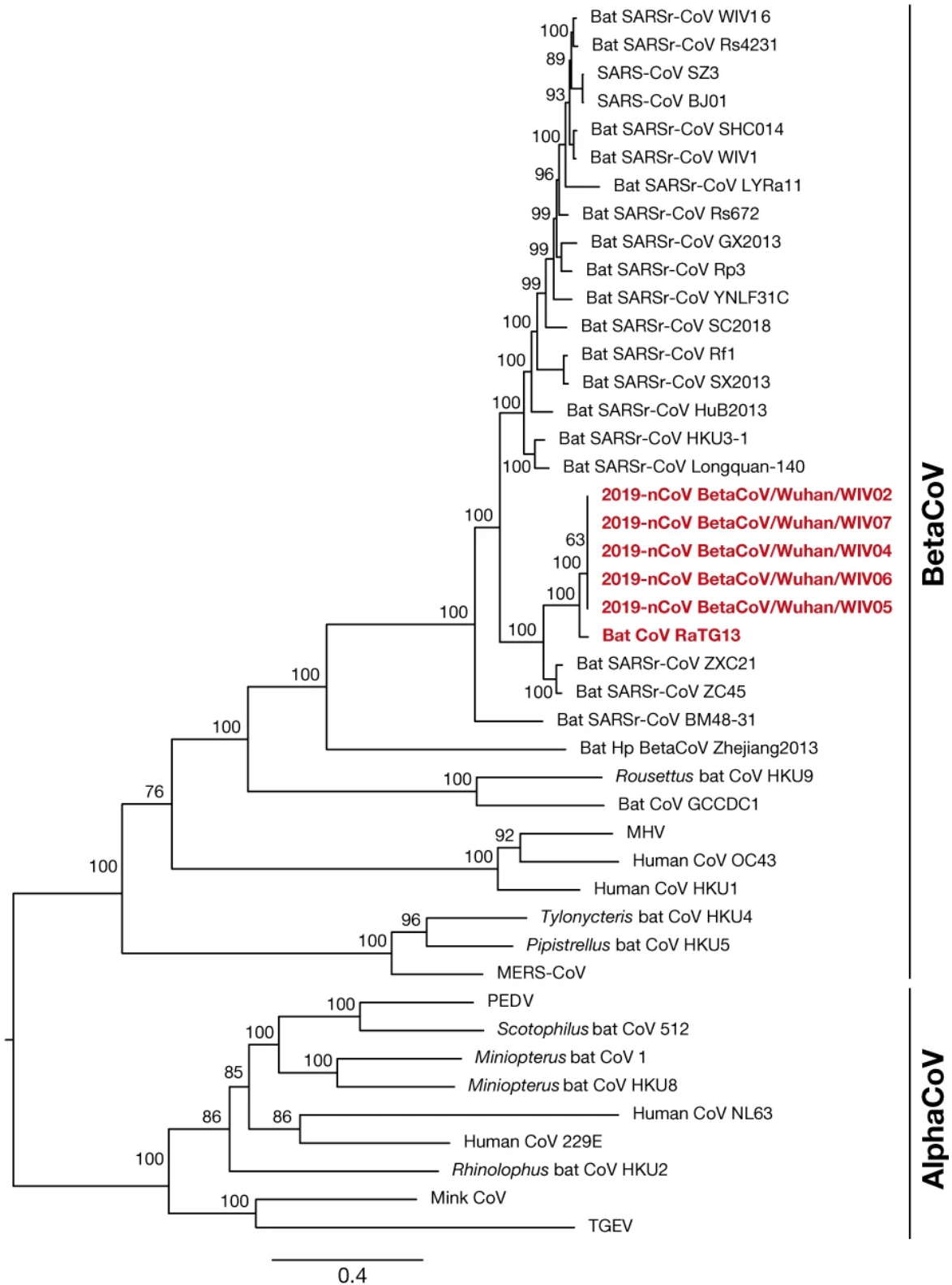


Figure 4 : Arbre phylogénique basé sur la séquence nucléotidique complète des coronavirus (Zhou et al. 2020)

1.3 Transmission inter-espèce

La transmission inter-espèce d'une maladie correspond au franchissement de la barrière d'espèce par l'agent infectieux à l'origine de cette maladie. Derrière cette notion de barrière d'espèces, on retrouve la capacité pour un pathogène, ici un virus, à pouvoir infecter sa cellule cible, c'est à dire être capable de reconnaître le récepteur cellulaire d'une autre espèce, puis sa capacité à pouvoir se répliquer dans la cellule cible, c'est-à-dire être capable d'inhiber suffisamment l'immunité innée intra-cellulaire pour pouvoir contrôler la machinerie cellulaire à son avantage.

Le passage d'une maladie de l'animal à l'homme est une zoonose, on parle alors de maladie zoonotique. Cette transmission se fait via un hôte intermédiaire, dans lequel le virus a pu évoluer pour devenir peu à peu compatible avec une nouvelle espèce plus proche, comme l'homme, dans le cas d'une zoonose. Cet hôte intermédiaire a, lui, été infecté à partir de l'hôte réservoir. Le réservoir est une espèce animale dans laquelle le virus va persister dans l'environnement, souvent sans causer de pathologie grave chez son hôte. Une fois le saut d'espèce effectué, chaque virus évolue différemment à cause de la pression de sélection dans chaque espèce hôte, mais conserve suffisamment de similitudes, ce qui nous permet de retracer son origine par des études phylogéniques.

Tous les coronavirus infectant l'homme sont issus d'une transmission inter-espèce. Pour les coronavirus hautement pathogènes, les réservoirs sont les chauves-souris (figure 5), elles n'ont aucun symptôme malgré une faible quantité d'anticorps dans le sang et une charge virale élevée. La maladie est ensuite transmise à d'autres espèces suite à l'acquisition de mutation par le virus. Une fois dans l'hôte intermédiaire, le virus peut déclencher une pathologie. Le MERS-CoV, par exemple, déclenche un rhume chez les dromadaires adultes mais est mortelle chez les jeunes dromadaires. L'identification de l'hôte intermédiaire est un élément clé dans la prévention de la maladie chez l'homme. Comme mentionné précédemment, la recherche de cette hôte intermédiaire pour le SARS-CoV-2 est toujours en cours. A ce jour aucune zoonose passant directement des chauves-souris à l'homme n'a été décrite pour les coronavirus (Chan et al. 2013). Cependant nous savons que la contamination directe entre les chauves-souris et l'homme est possible (N. Wang et al. 2018). De plus les virus « SARS-CoV-2-Like » présents chez la chauve-souris sont capables de reconnaître le récepteur ACE2 humain (Boni et al. 2020), cela est un argument soutenant l'hypothèse d'un saut direct depuis la chauve-souris à l'homme.

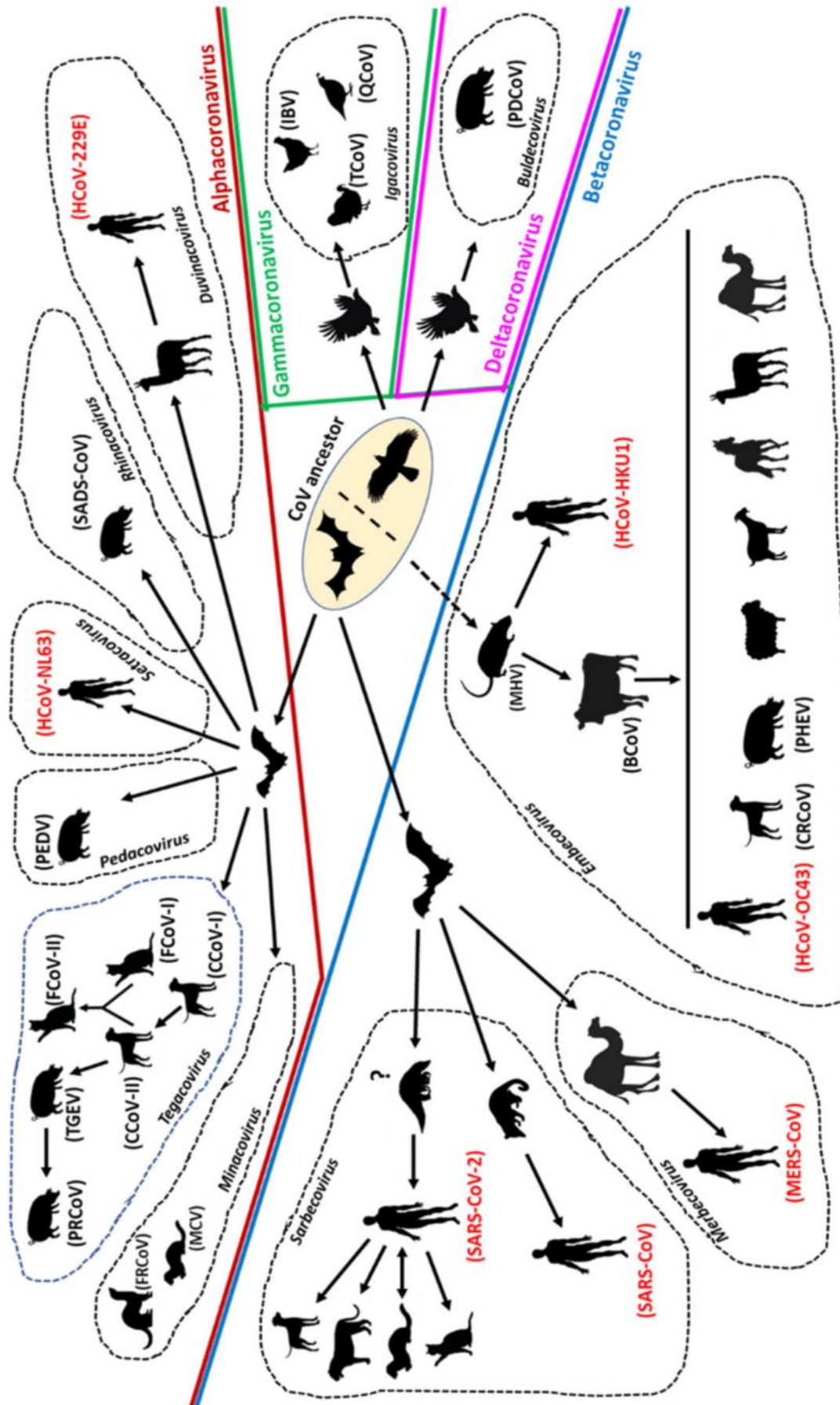


Figure 5 : Transmission inter-espèce des différents coronavirus (Ghosh et Malik 2020)

2 – Biologie des coronavirus

2.1 Le génome

Les coronavirus sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre. Ils possèdent un génome ARN simple brin de polarité positive qui est le plus grand de tous les virus à ARN allant de 26 à 31.7 kb. Le génome à ARN est flanqué de régions non traduites (« untranslated region » UTR) contenant des structures secondaires nécessaires à la réplication de l'ARN viral et à la traduction. Le génome comprend deux grandes phases ouvertes de lecture (« open reading frame », ORF) codant pour deux polyprotéines nommées ORF1a et ORF1b qui correspondent aux deux tiers du génome. Ces ORFs codent pour les protéines non structurales (« non structural protein » ou nsp) impliquées dans le complexe de réplication. Cette région du génome est conservée parmi les coronavirus (V'kovski et al. 2021). Le reste du génome contient plusieurs ORF impliquées dans la synthèse des protéines structurales et des protéines accessoires. Ces dernières sont spécifiques à chaque coronavirus, et sont impliquées dans l'interaction virus-hôte et la régulation du système immunitaire

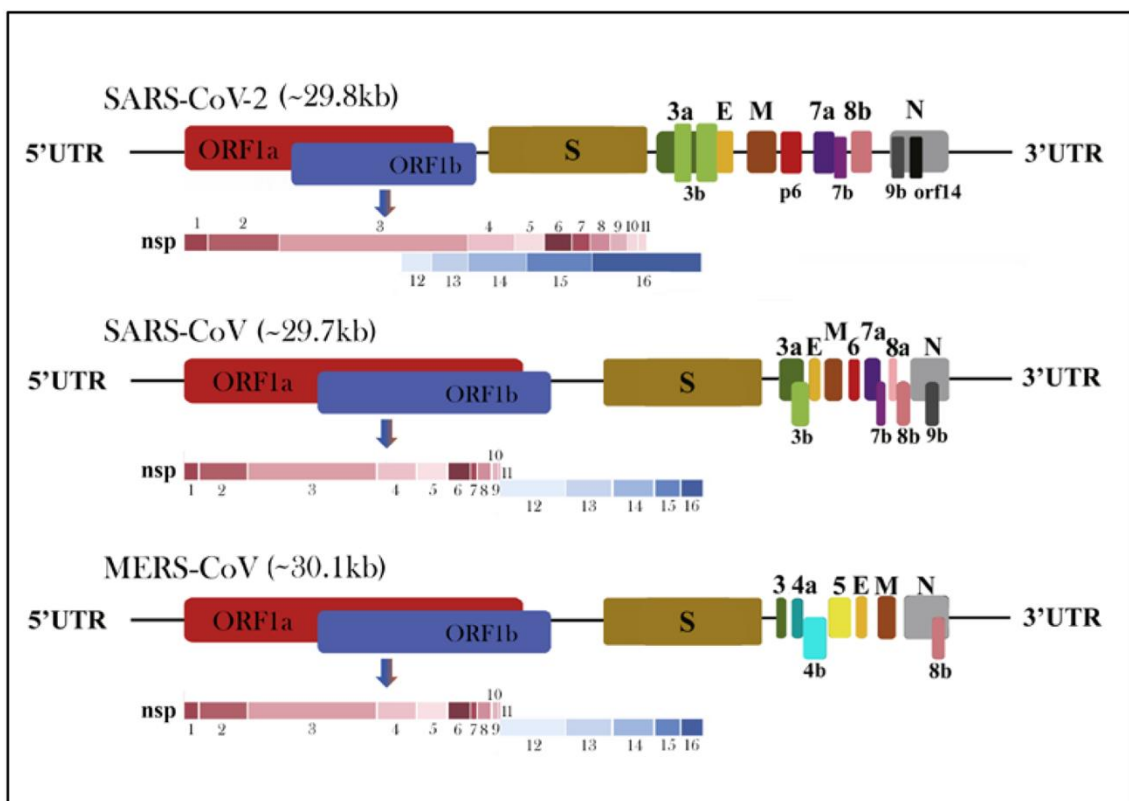


Figure 6 : Génomes des coronavirus SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV (Hozhabri et al. 2020).

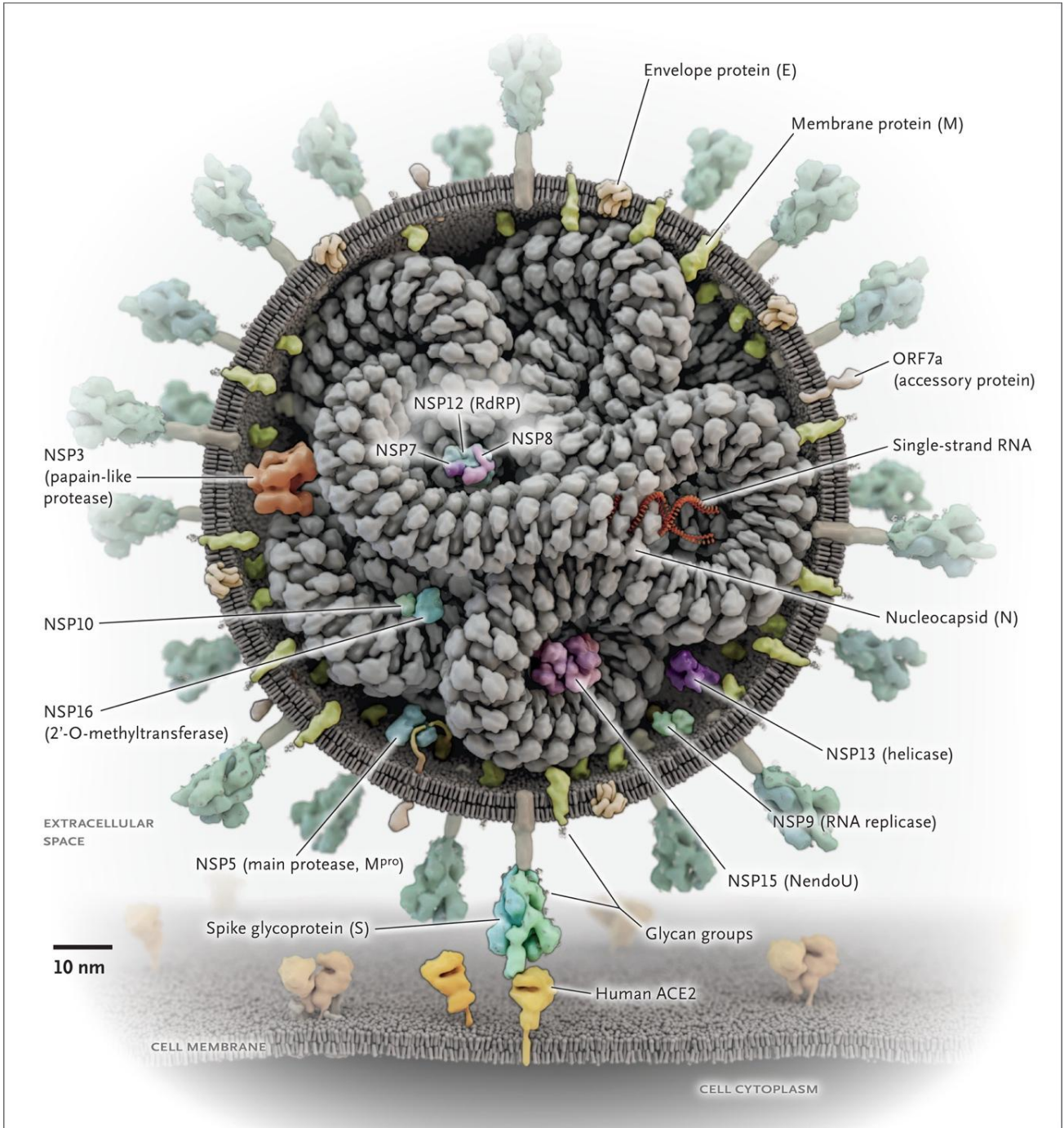


Figure 7 : Représentation schématique de la particule virale du SARS-CoV-2 (Parks et Smith 2020)

2.2 Les protéines de structure

La particule virale est formée de quatre protéines structurales. Les protéines de surface S ou « Spike », la protéine d'enveloppe E, la protéine de matrice M, et les protéines de capsid N (Figure 7).

2.2.1 La protéine S

La protéine de surface S ou « Spike » est une glycoprotéine transmembranaire ancrée dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale appartenant à la famille des protéines de fusion de classe 1 (V'kovski et al. 2021). Elle est composée de 1162 à 1452 acides aminés pour 128 à 160kDa, elle possède aussi de nombreux sites de N-glycosylation (entre 21 à 35) (Millet et Whittaker 2015). Trois monomères de protéines S vont s'assembler en homotrimère formant ainsi la protrusion caractéristique en forme de couronne (« corona » en latin) donnant leur nom au coronavirus (Masters 2006). La protéine S est divisée en deux sous-domaines, le domaine S1 qui contient le domaine de reconnaissance et d'attachement au récepteur cellulaire ou « receptor binding domain » (RBD), et le domaine S2 qui contient le peptide de fusion et les deux domaines « heptad repeat » (HR) permettant le repliement de la protéine S pour la fusion.

La protéine S peut être clivée par des protéases cellulaires au niveau de deux sites de clivage. Le premier se situe entre le domaine S1 et S2, il est nommé S1/S2. Il est clivé majoritairement lors de la maturation du virion par les protéases cellulaires présentes dans le réticulum endoplasmique. Une fois clivés, les domaines S1 et S2 restent associés par des liaisons hydrophobes. Ce clivage n'est pas toujours nécessaire pour la formation et le relargage du virus ; il est alors supposé que le clivage S1/S2 a lieu lors de l'entrée virale, en même temps que le clivage S2' (Belouzard, Chu, et Whittaker 2009; Millet et Whittaker 2015). Le deuxième site se situe dans le domaine S2 proche du site S1/S2 et est nommé S2'. Ce site est clivé par des protéases cellulaires lors de l'entrée du virus pour déclencher la fusion, comme par exemple par la protéase cellulaire membranaire TMPRSS2, mais aussi par des protéases endosomales comme les cathepsines et la furine (Belouzard et al. 2012; Hoffmann et al. 2020; Matsuyama et al. 2010).

La protéine S est spécifique de chaque coronavirus et va donc reconnaître des récepteurs cellulaires également spécifiques. Les coronavirus SARS-CoV et SARS-CoV-2 utilisent la protéine de surface « angiotensin convertase enzyme-2 » (ACE2 ou CD147) comme récepteur cellulaire. ACE2 est présente à la surface des cellules endothéliales des veines et artères, dans les muscles, l'intestin, les cellules épithéliales alvéolaires de type I et type II, dans les épithéliums oraux et nasopharyngés, mais aussi sur les pneumocytes de type 2 et 1 et macrophages pulmonaires (Hamming et al. 2004; Hoffmann et al. 2020; Li et al. 2003; Shieh et al. 2005; Zhou et al. 2020). Toutefois, il a été observé que les pneumocytes de type 2 bien que possédant ACE2 et présents dans les tissus infectés, ne sont pas infectés par le SARS-CoV, contrairement aux pneumocytes de type 1 qui semblent permissifs à l'infection bien qu'ils expriment ACE2 à un niveau beaucoup plus faible (Chu et al. 2020; Matsuyama et al. 2010). Le MERS-CoV utilise la protéine « dipeptidyl peptidase-4 » (DPP4) qui est une protéine transmembranaire de type II présente dans les cellules non ciliées des voies respiratoires et les macrophages. Elle est aussi exprimée dans le rein et l'intestin (Millet et Whittaker 2014; Raj et al. 2013) Le coronavirus HCoV-229E utilise la protéine « aminopeptidase N » (APN ou CD13) présente dans les poumons, les reins, les intestins, et à la surface des macrophages (Yeager et al. 1992).

2.2.2 La protéine E

La protéine d'enveloppe E est une petite protéine de 8,4 à 12 kDa qui permet de structurer l'enveloppe lipidique. Elle est présente à la surface virale en très petite quantité comparée aux trois autres protéines structurales (Masters 2006).

2.2.3 La protéine M

La glycoprotéine de matrice M a une taille de 25 à 30 kDa. C'est la protéine structurale la plus abondante et elle permet de donner sa forme à la particule virale. C'est une protéine possédant 3 domaines transmembranaires avec la partie N-terminale à l'extérieur de la particule virale. Elle joue un rôle pour l'initiation de l'assemblage, en formant des dimères M-M dans la membrane du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique – Golgi (ERGIC) et en s'associant avec la protéine S et N (Masters 2006; Neuman et al. 2011; Perrier et al. 2019).

2.2.4 La protéine N

La protéine de nucléocapside N est la protéine formant la nucléocapside hélicoïdale des coronavirus. D'une taille de 43 à 50 kDa, elle se fixe sur le génome ARN en « collier de perles » pour compacter le génome viral (Masters 2006).

2.3 Les protéines non structurales

Parmi les protéines non structurales (nsp), on retrouve 15 à 16 protéines impliquées dans la formation du complexe de réplication associé à l'ARN polymérase ARN dépendante, issues du clivage des premières polyprotéines pp1a et pp1ab, codé respectivement par les ORF1a et ORF1ab, synthétisées lors de l'entrée du virus dans la cellule (Figure 8). Pp1a est 1.4 à 2.2 fois plus exprimée que pp1ab qui est issue d'un changement de cadre de lecture du ribosome de -1. Ces polyprotéines contiennent les protéines non structurales. Nsp1 à 11 sont contenues dans pp1a, nsp1 à 10 et nsp12 à 16 dans pp1ab. Nsp1 est la première protéine à être synthétisée et a pour rôle de moduler la traduction cellulaire en faveur du virus. Les protéines clés pour l'infection virale sont la protéase PLpro (« papain like protease ») contenue dans nsp3 et la 3CLpro (« chemotrypsine like protease ») codé par nsp5. Ces protéines présentes sous forme de domaine dans les polyprotéines vont autocliver les polyprotéines pour libérer les différentes nsp qui formeront le complexe de réplication. Parmi ces nsp, nsp12, est l'ARN polymérase ARN dépendante (« RNA dependant RNA polymerase », RdRp). Elle utilise nsp7 et nsp8 comme cofacteurs (Belouzard et al. 2012; Y. Chen, Liu, et Guo 2020; V'kovski et al. 2021).

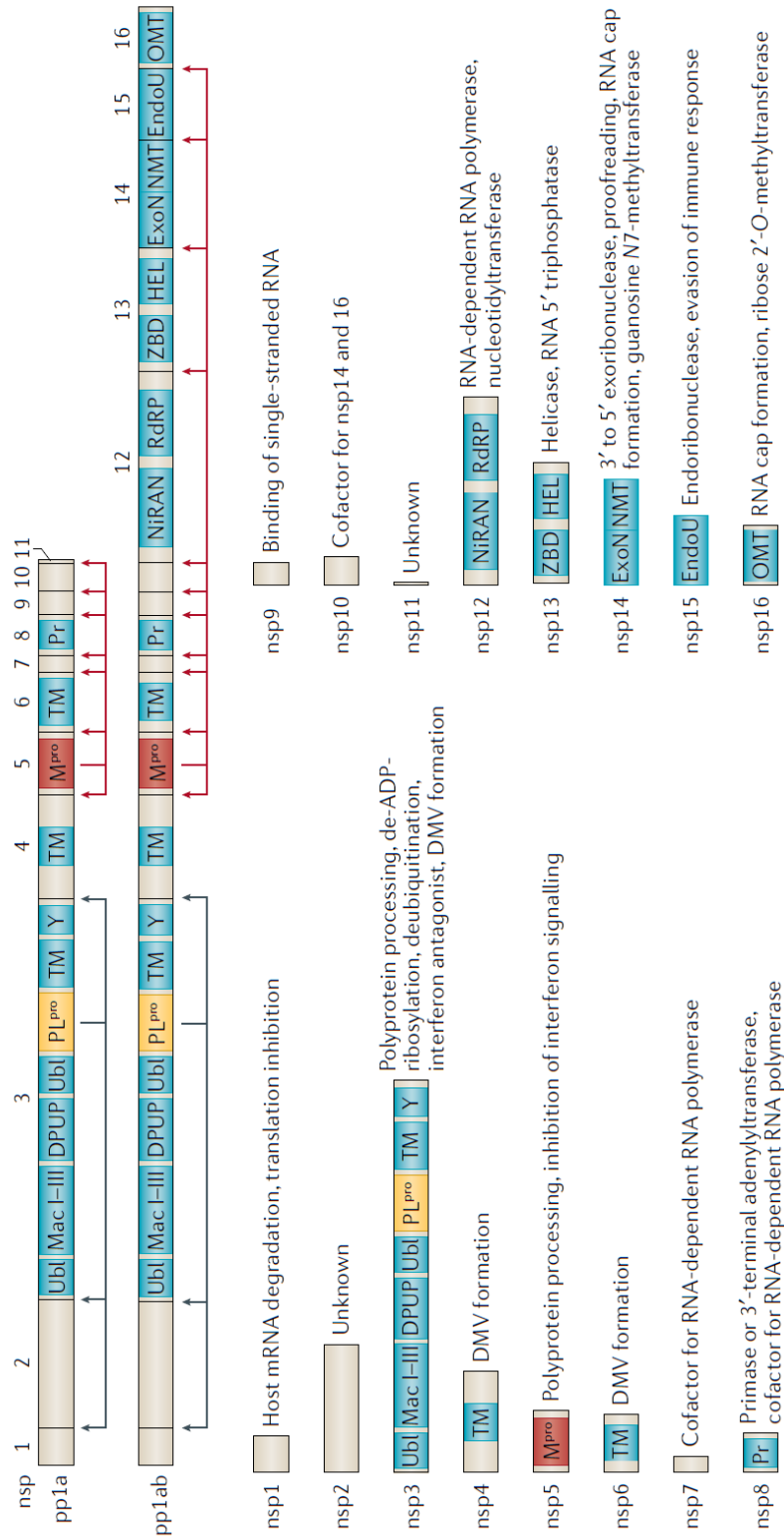


Figure 8 : Ensemble des nsp contenue dans les polyprotéines pp1a et pp1ab (V'kovski et al. 2021).

2.4 Les protéines accessoires

Les protéines accessoires ne sont pas contenues dans les polyprotéines pp1a et pp1a2. Elles se retrouvent en 3' du génome, proche de la région 3'UTR du génome des coronavirus et sont peu conservées d'un genre à l'autre (Figure 9). De plus le nombre de protéines accessoires présentes dans chaque virus peut varier. Elles sont codées par des ORF nommées ORF3 jusqu'à ORF10 et participent dans plusieurs interactions hôtes-pathogènes afin de faciliter l'infection. Les différentes protéines sont nommées d'après le nom de leurs régions codantes. Ces protéines sont non nécessaires à la réplication *in vitro*, mais en leur absence la réplication naturelle dans l'hôte spécifique de virus est grandement diminuée, voire impossible et la pathologie qui en résulte est amoindrie. La fonctionnalité de toutes les protéines accessoires n'est pas encore élucidée et peut varier selon les coronavirus. L'ORF3a a été identifié chez le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV pour déclencher l'apoptose par l'activation de la voie caspase-3. Pour le SARS-CoV-2, l'ORF3b, l'ORF6, l'ORF7a, l'ORF8 et l'ORF9b sont capables d'inhiber la production d'interférons de type I (IFN-I) en inhibant plusieurs voies de signalisation comme la voie JAK-STAT et MAVS (Figure 9). L'ORF8 est une protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire, hautement immunogène et capable de se lier au complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH-I) entraînant sa dégradation, elle est supposée jouer un rôle d'évasion de l'immunité innée et stimuler la réponse inflammatoire de l'hôte (Redondo et al. 2021; V'kovski et al. 2021).

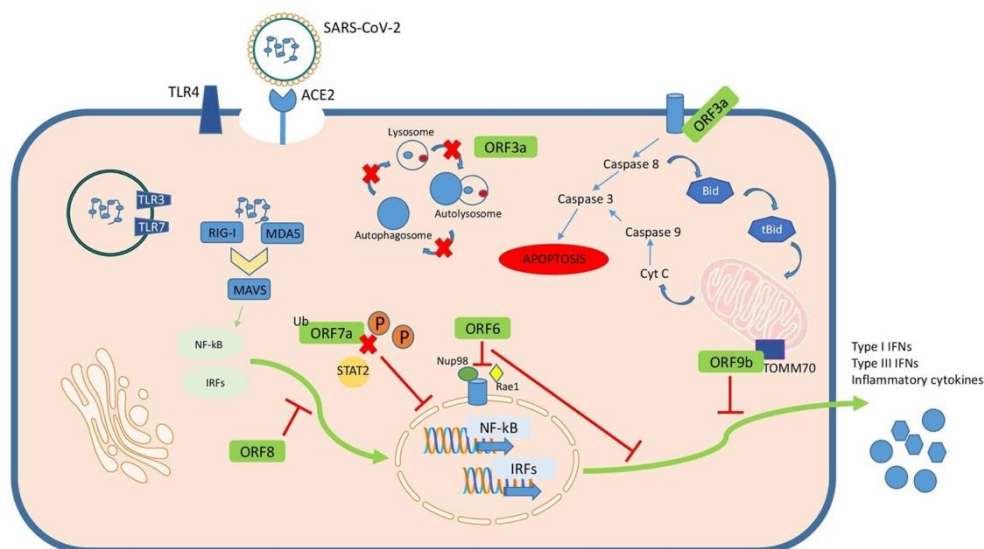
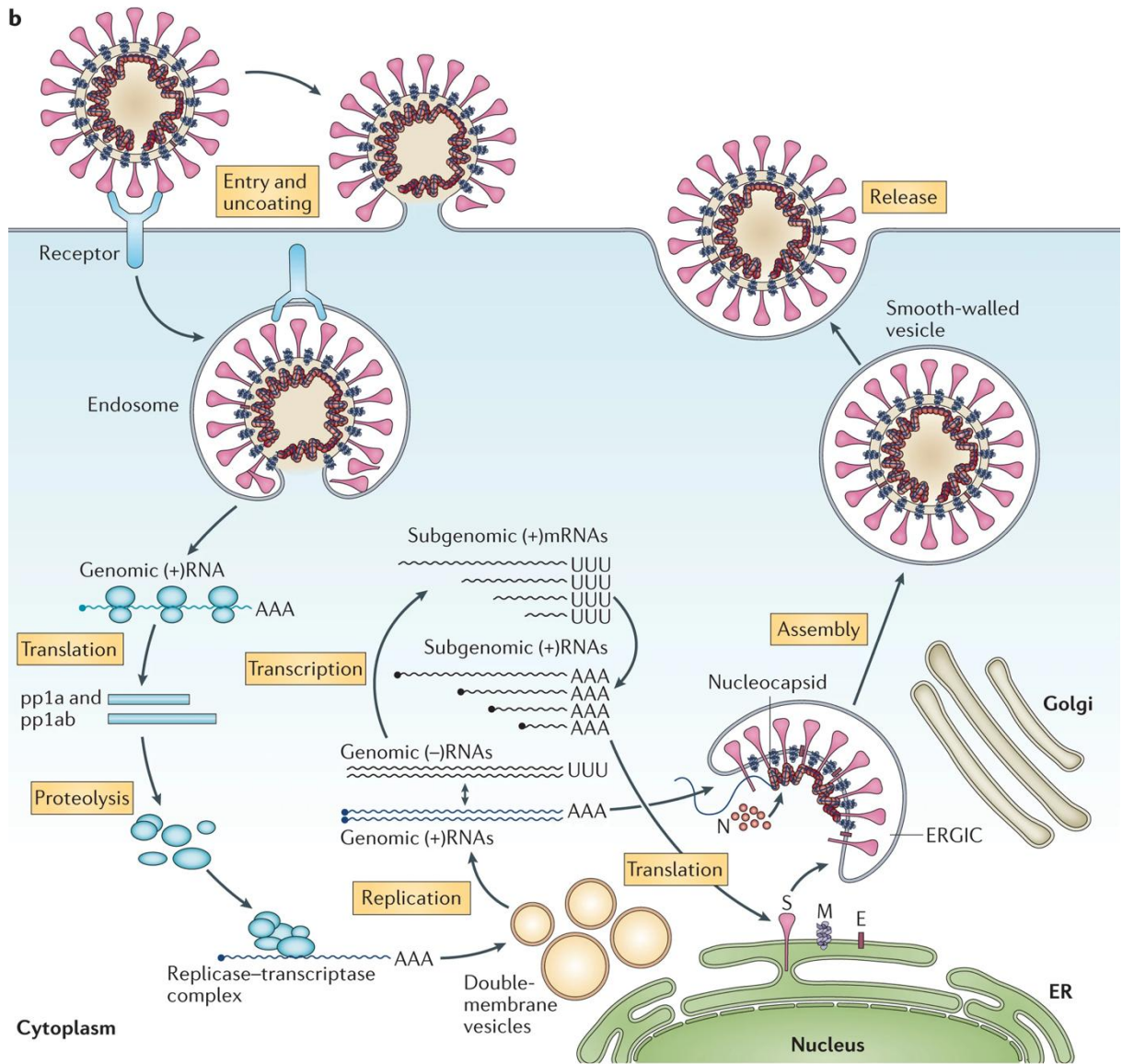


Figure 9 : Fonctions connues des protéines accessoires du SARS-CoV-2 (Redondo et al. 2021).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 10 : Cycle de répliation des coronavirus (de Wit et al. 2016).

2.5 Le cycle viral

2.5.1 L'entrée

L'attachement et la reconnaissance du récepteur cellulaire par le virus se font grâce à la protéine de surface Spike ou S qui contient le domaine RBD. Une fois le virus attaché à la cellule, le virus peut entrer dans les cellules par deux voies d'entrée. En effet, la membrane virale va fusionner avec soit la membrane plasmique (fusion directement à la surface cellulaire), soit avec les membranes des endosomes (fusion après endocytose du virus dans les endosomes). La protéine Spike du coronavirus est une protéine de fusion de classe 1 possédant un mécanisme similaire à celui de l'hémagglutinine du virus de la grippe. Pour que la fusion soit déclenchée, des protéases cellulaires doivent cliver la protéine S au niveau du site S2' permettant ainsi de libérer le peptide de fusion présent dans le sous-domaine S2. Le peptide de fusion va s'insérer dans la membrane cellulaire, puis s'opère un changement de conformation du complexe S1-S2 grâce à l'appariement des domaines HR1 et HR2 (Figure 11). Celui-ci va permettre de rapprocher l'enveloppe lipidique virale à la membrane de la cellule ce qui engendre une fusion des deux membranes lipidiques, libérant ainsi le contenu de la particule virale dans le cytoplasme de la cellule. A la surface cellulaire, plusieurs études ont montré que la protéase cellulaire TMPRSS2 permettait de cliver la protéine S du HCoV-229E, SARS-CoV, MERS-CoV et le SARS-CoV-2. Cette fusion du virus à la membrane améliore le taux d'infection comparé à l'entrée uniquement endosomale (Bertram et al. 2013; Hoffmann et al. 2020; Matsuyama et al. 2010; Millet et Whittaker 2015; Shirato, Kawase, et Matsuyama 2013). Dans la voie endosomale, ce sont d'autres protéases qui interviennent telle que la furine, les cathepsines ou la trypsine selon le type cellulaire (Millet et Whittaker 2015; Shirato et al. 2013). Il a été observé pour les coronavirus humains que la voie d'entrée membranaire médiée par le clivage par TMPRSS2 était prépondérante par rapport à la voie d'entrée endosomale. (Shirato, Kawase, et Matsuyama 2018).

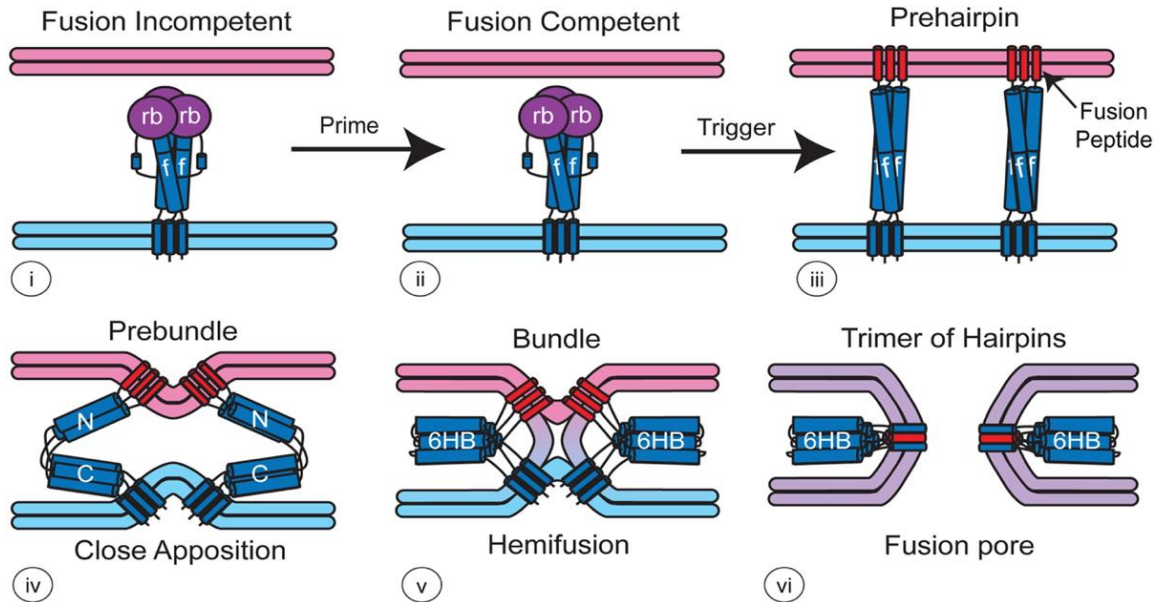


Figure 11 : Mécanisme de fusion (White et Whittaker 2016).

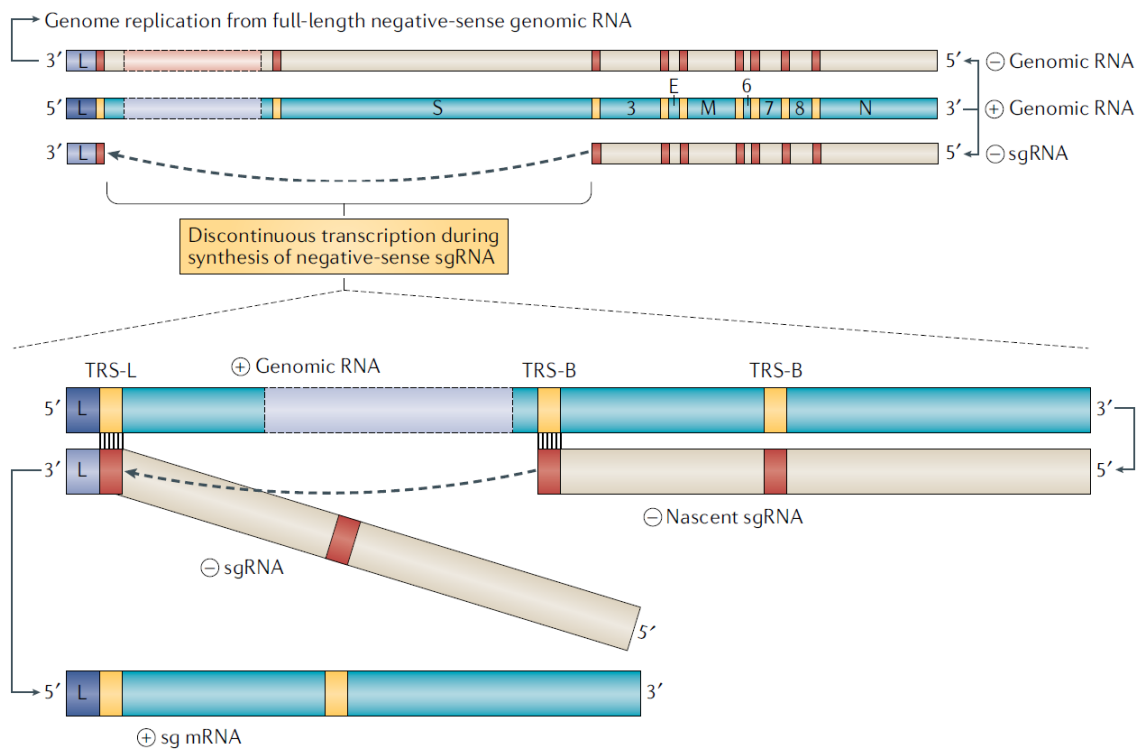


Figure 12: Réplication et transcription discontinue des coronavirus (V'kovski et al. 2021).

2.5.2 La réplication

Une fois l'ARN viral libéré dans le cytoplasme, le génome viral va pouvoir être directement traduit par les ribosomes de la cellule hôte en deux polyprotéines pp1a et pp1a2 (Millet et Whittaker 2015). Ces polyprotéines vont s'autocliner grâce aux protéases PLpro et 3CLpro. Les 16 protéines non structurales ainsi clivées vont former le complexe de réplication (RTC) dont la pièce maîtresse est la polymérase nsp12 (RdRp) (V'kovski et al. 2021). La création d'une coiffe sur l'ARN nouvellement formée, ainsi que l'activité exonucléase sont assurées par nsp14, nsp10, nsp13 et nsp16 (Y. Chen et al. 2020; V'kovski et al. 2021). L'activité exonucléase de la RdRp des coronavirus est une exception parmi les virus ARN, réduisant les risques d'erreur lors de la réplication. La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN anti-sens à partir du brin d'ARN génomique sens, les nouveaux brins d'ARN sens ainsi pourront à leur tour être traduits en polyprotéines ou incorporés dans les virions en formation. Lors de la synthèse des brins anti-sens, la présence de régions de régulations de transcription (« Transcriptions regulatory sequences », TRS) va permettre que la synthèse des brins anti-sens s'arrête lorsque le RTC passe sur un de ces TRS ; la transcription va ensuite reprendre au prochain TRS rencontré dans le sens de la synthèse (Figure 12). Ces TRS sont majoritairement localisés dans la région contenant les protéines structurales et accessoires. Cette transcription discontinue a pour conséquence de générer des ARN anti-sens sous-génomiques (sgRNA), qui vont alors servir de matrice à la synthèse de brins sens sous-génomiques, lesquels seront traduits en différentes protéines structurales et accessoires. Bien que certains ARN sous-génomiques puissent contenir plusieurs ORF, il est établi que chaque sgRNA ne sera traduit qu'en une seule protéine (V'kovski et al. 2021). La réplication de l'ARN à lieu dans des compartiments spécifiques appelés vésicule à double membranes (« double membrane vesicles », DMV). Ces DMV sont dérivées de la membrane lipidique du réticulum endoplasmique sous l'effet de nsp3, nsp4 et nsp6. Il est supposé que ce mécanisme permet de masquer l'ARN viral contre la détection par les senseurs cytoplasmiques cellulaires (V'kovski et al. 2021).

2.5.3 L'assemblage et la sécrétion des particules

Les protéines structurales s'assemblent à la surface du ERGIC, avec les protéines transmembranaires S et E ancrées dans la membrane du réticulum, sur lesquelles va pouvoir s'attacher la protéine de capsid N. Celle-ci va alors recruter l'ARN génomique nouvellement répliqué. Cet ensemble de protéines va continuer à s'assembler et la protéine S va être clivée par les protéases cellulaires comme la furine, permettant un changement de conformation nécessaire au relargage des particules infectieuses (V'kovski et al. 2021). Les particules sont alors transportées à la membrane de la cellule où la particule virale est relarguée par exocytose (Masters 2006).

2.6 Modèles d'études

L'étude des coronavirus humains a nécessité l'utilisation de divers modèles et outils. Les lignées cellulaires immortalisées permissives au virus les plus utilisées sont les cellules VeroE6 (cellule épithéliale de rein de singe), Calu-3 (cellule humaine de cancer du poumon) et Huh-7 (cellule cancéreuse d'hépatocyte humain). Des cellules primaires sont aussi utilisées pour la validation de mécanismes précis, par exemple des cellules pulmonaires primaires humaines, comme c'est le cas pour ces travaux de thèse. En effet, nous avons utilisé des épithéliums pulmonaires reconstitués contenant plusieurs types cellulaires retrouvés dans un poumon humain sur une surface de culture air-liquide. Ce système utilisé est nommé MUCILAIR™ (Epithelix). Le développement d'outils et de modèle d'étude en laboratoire a permis de faciliter la recherche sur les coronavirus. Des outils communément utilisés sont la production de virus-like particules (VLP) ou de pseudovirus qui sont des rétrovirus recombinants possédant la protéine de surface du virus d'intérêt et un gène rapporteur comme la GFP ou la luciférase, ou encore tout simplement le virus d'intérêt génétiquement modifié pour contenir un gène rapporteur. Cependant la manipulation des coronavirus hautement pathogènes nécessite des installations de haute sécurité, il est donc plus facile de trouver un virus modèle, comme par exemple les coronavirus humains peu pathogènes HCoV-229 et OC43, afin de tester des mécanismes conservés chez les coronavirus ou encore cribler des molécules antivirales dans un environnement moins contraignant.

L'utilisation de modèles animaux est une étape clé pour confirmer l'efficacité de composés antiviraux identifiés *in vitro*. Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour l'étude des coronavirus humains. Le plus facile à utiliser est le modèle souris, soit combiné avec un virus mutant capable d'infecter la souris, soit avec des souris transgéniques humanisées pour le récepteur viral (ACE2 ou DPP4 humain). De la même manière, les hamsters dorés syriens sont aussi utilisés comme modèle d'étude notamment pour le SARS-CoV-2. Les furets sont très utilisés pour étudier les maladies respiratoires comme la grippe car ils possèdent un tractus respiratoire assez proche de l'homme pour un animal non primate. Ils sont aussi utilisés pour l'étude des coronavirus. Toutefois les souris, hamsters et furets ne reproduisent pas totalement la pathologie observée chez l'homme et ne développent que des symptômes bénins, voire aucun symptôme ou des symptômes totalement différents de la pathologie humaine. Les meilleurs modèles pour se rapprocher de la pathologie humaine sont les primates non humains, comme le macaque rhésus et le singe vert d'Afrique. Mais le coût d'utilisation de tels modèles est élevé, il nécessite d'obtenir des autorisations éthiques spécifiques et il ne reflète qu'une pathologie modérée et ne sont pas représentatifs de cas sévères observés chez l'homme (Table 1) (V'kovski et al. 2021).

Table 1 : Modèles et outils utilisés dans l'étude des coronavirus

Modèle et outils	Avantage	Limitation
Pseudoparticules	Non répliatif – permet de travailler avec des contraintes de sécurité moins élevées que pour le virus entier. Permet de vérifier si une drogue agit à l'étape d'entrée. Facile à produire	Non répliatif, permet uniquement l'étude de l'étape d'entrée.
Réplicon	Permet de cribler des drogues rapidement avec un niveau de biosécurité minimal. Permet l'étude de l'étape de répliation. Facile à produire.	Ne permet d'étudier que l'étape de répliation du cycle viral.
Virus rapporteur	Permet d'étudier l'ensemble du cycle viral. Infection facilement quantifiable grâce au système rapporteur	Virus infectieux. Nécessite de manipuler en espace confiné de type BSL-2, BSL-3 ou BSL-4 avec équipement spécifique.
Lignée cellulaire	Facilement manipulable, faible coût, Peut être utilisée pour créer des lignées stables exprimant des marqueurs cellulaires spécifiques.	Modèle éloigné des conditions in vivo. Transcriptome différent des cellules saines trouvées in vivo à cause de l'immortalisation et de multiple passage en laboratoire.
Cellules primaires	Proche des conditions naturelles in vivo.	Coût élevé, cellule non immortel, difficile à maintenir en vie sur une longue durée selon le type cellulaire
Souris	Faible coût en comparaison avec d'autres modèles animaux. Possibilité de créer des souris transgéniques. Permet d'évaluer des symptômes légers et la répliation virale	Physiologie éloignée de l'humain. Ne permet pas d'évaluer tous les symptômes de la pathologie humaine. Nécessite d'utiliser des souris humanisées pour l'étude du SARS-CoV-2
Hamster	Faible coût en comparer des autres modèles animaux. Permet d'étudier la transmission du virus SARS-CoV-2. Répliation et infection du virus sans modification génétique. Production de cytokines équivalent aux infections sévères chez l'homme	Pathologie et symptôme équivalent à un COVID modéré uniquement.
Furet	Système respiratoire assez proche de l'humain sur le plan cellulaire. Répliation efficace du virus Permet d'étudier la transmission du virus SARS-CoV-2	Coût moyen. Nécessite des locaux adaptés. Non représentatif des symptômes humains.
Singe non humain	Permet l'étude de la transmission et de la répliation virale. Symptômes cliniques et dégâts pulmonaires proches des cas modérés chez l'homme. Hyperinflammation.	Coût élevé. Laboratoire spécialisé. Manipulation complexe Non représentatif de cas sévères
Rhésus macaque	Génétiquement proche de l'homme. Système immunitaire et réponse immunitaire proche de l'homme lors d'une infection au SARS-CoV-2. Permet l'étude de la transmission et de la répliation virale. Symptômes clinique et dégâts pulmonaires proches des cas modérés chez l'homme. Réplique efficacement le virus	Coût élevé. Laboratoire spécialisé. Manipulation complexe Non représentatif des cas sévères Quantité d'animaux limitée

3 - La pathologie

3.1 La transmission inter-humaine

Grâce aux nombreuses observations croisées et certaines analyses cliniques sur des cohortes de patients, un profil de transmission du SARS-CoV-2 a été établi. Comme pour les coronavirus précédemment identifiés, la transmission du SARS-CoV-2 se fait majoritairement par voie aérienne par le biais d'aérosol, lors de contact rapproché de moins d'un mètre et par microgouttelettes d'eau, suite à une toux ou un éternuement. Le virus peut aussi se transmettre lors d'un contact avec une surface contaminée puis contact avec les voies orales ou respiratoires, cependant cela n'est pas la voie de transmission principale et la probabilité d'être en contact avec un nombre suffisant de particules infectieuses de cette manière est faible. La quantité de particules virales de SARS-CoV-2 expulsées par aérosol ou microgouttelettes est bien plus importante en comparaison avec le SARS-CoV, en effet le taux de réplication de SARS-CoV-2 est 3,2 fois supérieur à celui du SARS-CoV dans les premières 48 h. Cette particularité pourrait expliquer la différence de contagiosité entre les deux virus.

Toutefois, la particularité majeure du SARS-CoV-2 permettant d'expliquer la propagation rapide du virus est sa phase contagieuse, c'est-à-dire la période pendant laquelle une personne infectée peut transmettre le virus.

Il est établi que, contrairement au SARS-CoV, les personnes contaminées par le SARS-CoV-2 sont déjà contagieuses environ 3 jours avant le début des symptômes. Dès lors, le titre viral présent chez le patient infecté augmente avec un pic qui arrive au moment de l'apparition des symptômes plus ou moins 1 jour. Les risques de contamination sont maximaux pendant les quelques jours au pic de titre viral, puis le titre viral diminue rapidement (Figure 13). Bien que de l'ARN viral soit encore détectable par RT-PCR jusqu'à environ 20 jours après le début des symptômes, les particules virales infectieuses ne sont détectables que jusqu'à 7 à 10 jours après début des symptômes. La probabilité de transmission après ce point est considérée comme extrêmement faible (He et al. 2020; van Kampen et al. 2021; Siordia 2020). Il y a un fort risque de contamination démarrant avant l'apparition des symptômes, en effet 46 à 55% des transmissions ont lieu avant la phase symptomatique (Johansson et al. 2021).

SARS-CoV-2 viral load and period of infectiousness

Cevik M et al. <https://doi.org/10.1101/2020.07.25.20162107>

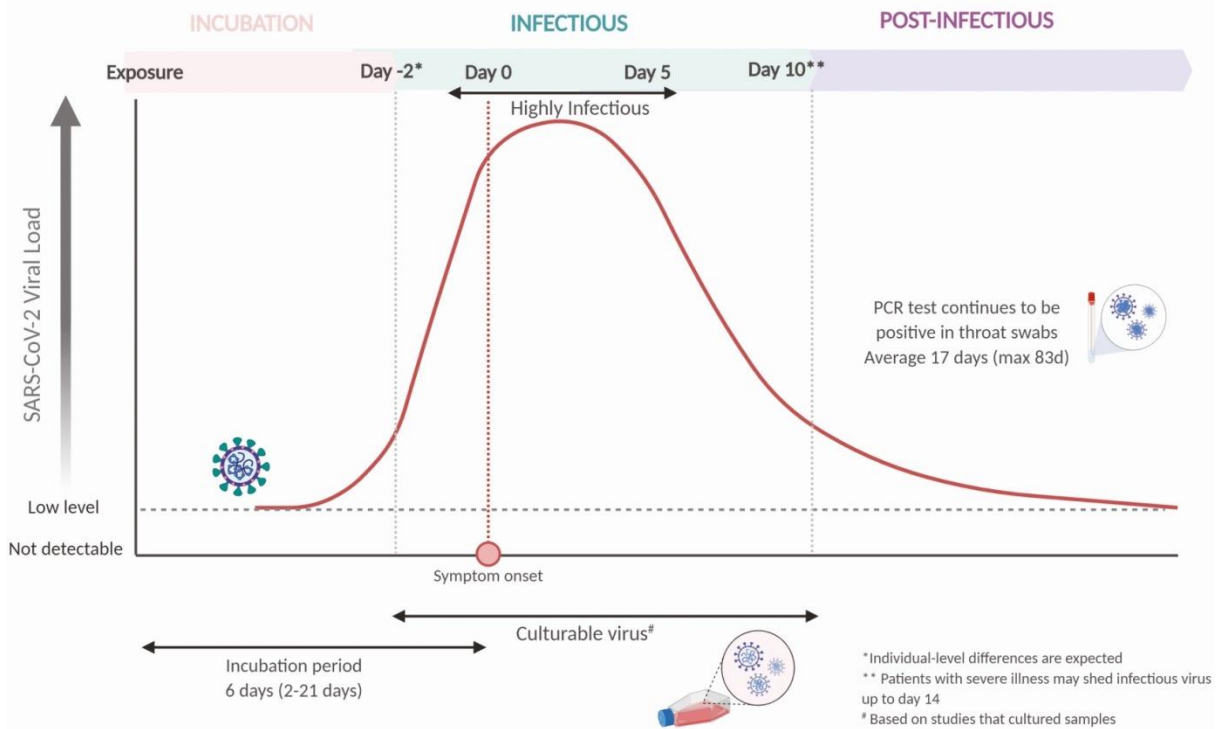


Figure 13 : Période de contagion en fonction du temps (Cevik et al. 2021).

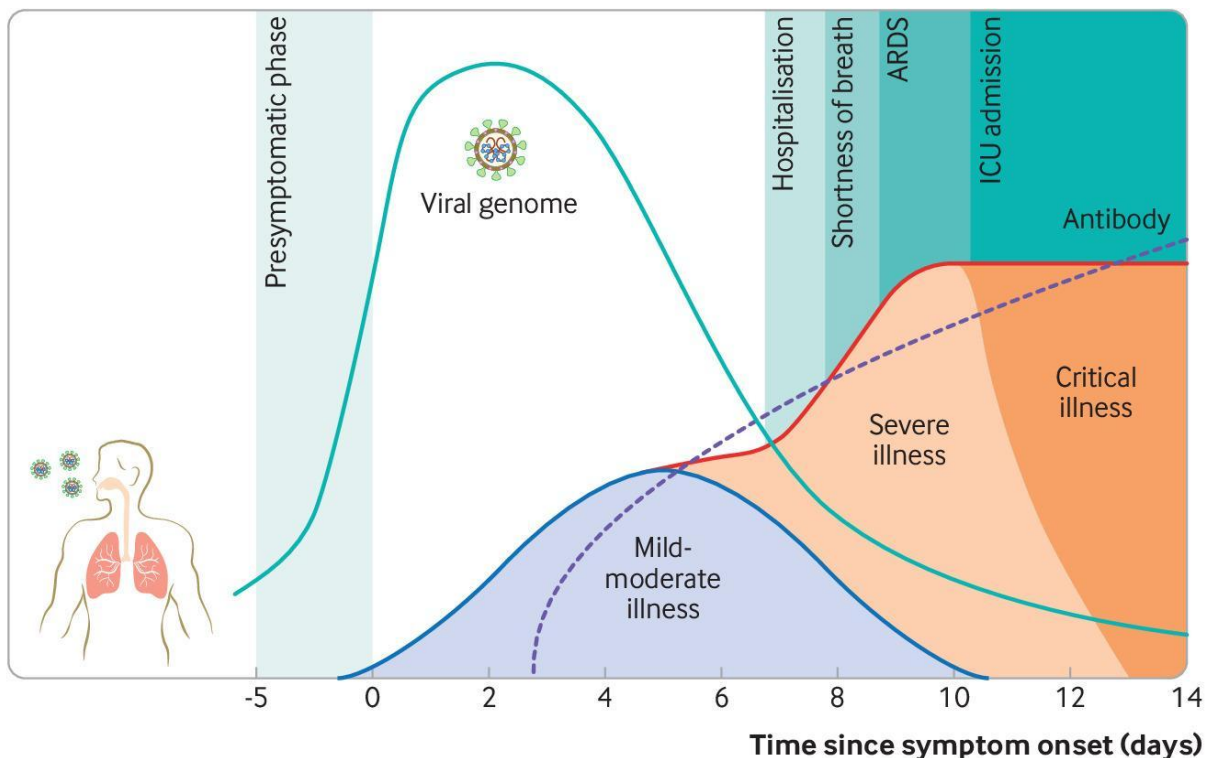


Figure 14 : Progression de la maladie de la COVID-19 en fonction du temps (Cevik et al. 2020). En vert la charge virale, en bleu et rouge la réponse inflammatoire, en pointillé, les anticorps anti-SARS-CoV-2.

Ces données accumulées reflètent une moyenne observée sur l'ensemble des cas, mais dans certains cas particuliers, des individus peuvent avoir des phases symptomatiques allant à plus de 10 jours, on suppose alors que la phase de transmission est d'autant plus allongée.

3.2 Les symptômes

Depuis le début de l'épidémie de SARS-CoV-2, les laboratoires et les hôpitaux ont accumulé un grand nombre de données et de nombreux laboratoires travers le monde sur les malades atteints de la COVID-19 (Figure 14).

En ce qui concerne la période d'incubation qui va jusqu'à l'apparition des premiers symptômes, les données indiquent qu'elle serait de 3 à 5 jours en moyenne. La première phase de l'infection correspond à une augmentation de la charge virale qui débute quelques jours avant l'apparition des premiers symptômes et s'étend sur une période d'environ 5 jours. Cette phase est associée à l'apparition de symptômes bénins, fièvre, toux, fatigue et maux de tête (Aguilar et al. 2020; Cevik et al. 2020). On estime qu'entre 20 à 50% des individus sont asymptomatiques malgré une charge virale équivalente aux individus symptomatiques lors de cette phase (Alene et al. 2021; Almadhi et al. 2021).

La seconde phase correspond à une réduction progressive de la charge virale et l'apparition de cytokine pro-inflammatoire en réponse à l'infection dans les poumons. Cette phase débute environ 3 à 5 jours après l'apparition des symptômes et peut durer 5 à 7 jours. On observe alors l'apparition d'autres symptômes comme la difficulté respiratoire, la perte de goût, et la perte de l'odorat (Aguilar et al. 2020). On parle de « COVID bénin » ou « modéré » selon la gravité des différents symptômes pouvant dans certains cas nécessiter une hospitalisation. Si la plupart des individus guérissent après cette phase, environ 10 à 20% vont évoluer vers un « COVID sévère », où malgré la charge virale faible ou nulle, la sécrétion de cytokines inflammatoires persiste dans les poumons engendrant des lésions importantes sur les tissus pulmonaires, ce qui déclenche le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) (Aguilar et al. 2020; İnandıklioğlu et Akkoc 2020; Schultze et Aschenbrenner 2021). Cette phase nécessite une hospitalisation ainsi qu'une ventilation mécanisée et le taux de survie chute drastiquement en comparaison des deux premières phases.

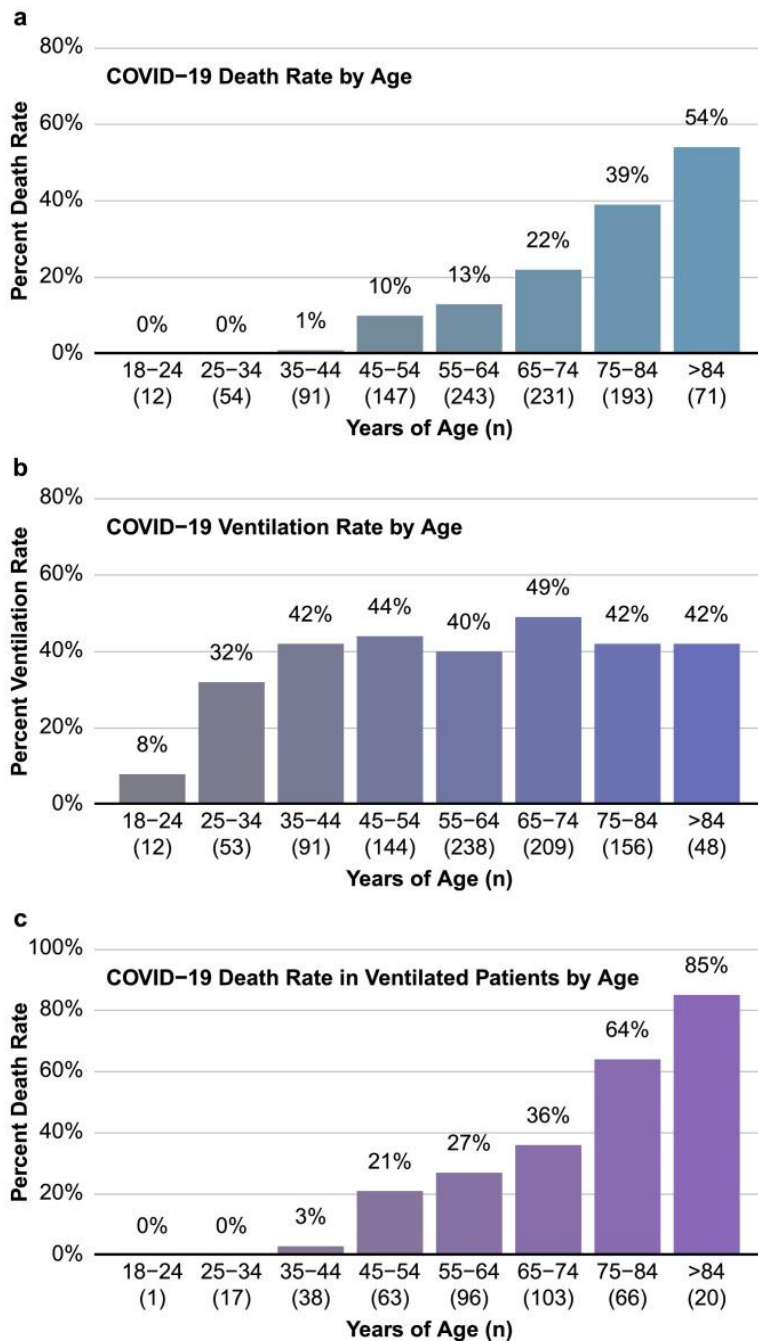


Figure 15 : Conséquence de la COVID-19 en fonction de l'âge des patients. Taux de mortalité (a), taux de mise sous ventilation assistée (b), taux de mortalité pour patients sous ventilation (c) en fonction de l'âge des patients, n = nombre de patients (Nicholson et al. 2021).

On remarque, grâce aux études statistiques réalisées sur les personnes contaminées par le SARS-CoV-2, que l'âge des patients est corrélé avec la sévérité de la détresse respiratoire et de l'atteinte pulmonaire. Les cas les plus graves de la COVID-19 se retrouvent chez les patients de plus de 65 ans et les cas asymptomatiques sont plus fréquents chez des individus plus jeunes (Huang et al. 2020). Toutefois, pour les patients hospitalisés avec un COVID sévère, le taux de patients ayant recours à une assistance respiratoire mécanique n'augmente plus à partir de 35 ans, indiquant qu'au-delà de cette tranche d'âge, avec un COVID sévère, les risques de se retrouver en réanimation sont les mêmes (Figure 15). En revanche le taux de mortalité augmente fortement avec l'âge des patients, avec une augmentation encore plus accentuée parmi les patients sous ventilation mécanique (Figure 15) (Lim et al. 2021; Nicholson et al. 2021). La gravité de la maladie est aussi corrélée avec la présence de « comorbidité » comme le diabète, l'obésité, l'immunodépression (SIDA), l'asthme, le cancer, les maladies cardiaque et pulmonaire chronique etc... Ces mêmes corrélations existent pour le SARS-CoV et le MERS-CoV.

Dans les pneumonies aiguës à coronavirus, on peut observer des atteintes bilatérales des poumons avec des zones opaques (plages de verre dépoli ou « ground glass opacities ») visibles au scanner, des œdèmes pulmonaires, mais aussi une hyperinflammation due à un emballement du système immunitaire, appelé « cytokine storm » ou « orage cytokinique » (Figure 16). Il est supposé que les cas les plus graves de détresses respiratoires sont la conséquence de ces orages cytokiniques. Cette hyper-inflammation est déclenchée par la capacité du SARS-CoV-2 à réduire l'activité de l'immunité cellulaire, diminuant ainsi l'efficacité des cellules T CD8+ et « Natural Killer » (NK) à lyser les cellules infectées, prolongeant ainsi le temps d'exposition des marqueurs d'infection, ce qui augmente de manière anormale la quantité et la durée de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par l'immunité innée (Soy et al. 2020). De plus, la présence de ces cytokines induit le recrutement de neutrophiles et de macrophages sur le site d'infection, qui vont à leur tour s'auto-activer et maintenir une sécrétion élevée de cytokines pro-inflammatoires, ce qui rend très difficile le retour à l'état homéostatique sans traitement anti-inflammatoire (Aguilar et al. 2020; Schultze et Aschenbrenner 2021).

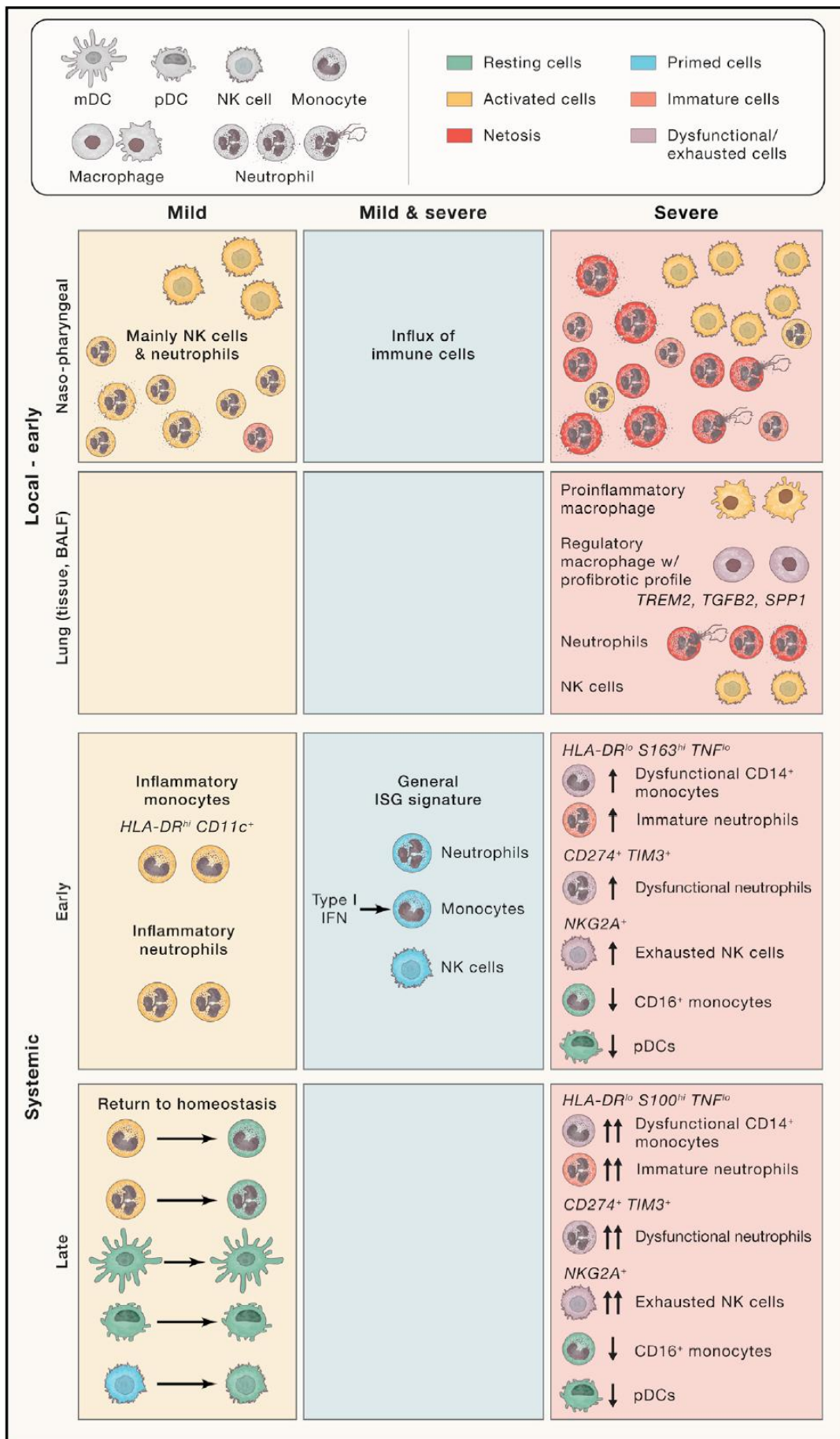


Figure 16 : Comportement de l'immunité innée au cours de la COVID-19 pour les états bénin, modéré et sévère (Schultze et Aschenbrenner 2021)

Les pathologies causées par le SARS-CoV, le MERS-CoV, et le SARS-CoV-2 possèdent des symptômes communs. Cependant l'évolution de la maladie vers un stade plus sévère est plus importante pour le MERS-CoV en comparaison du SARS-CoV, ainsi que le SARS-CoV comparé du SARS-CoV-2 (Hu et al. 2020; Peeri et al. 2020; Pormohammad et al. 2020). Dans tous les cas, les pathologies causées par les trois virus tendent à être plus sévères en présence de facteurs de comorbidité, et en fonction de l'âge des individus touchés.

Bien entendu, chaque pathologie possède des particularités distinctes (Table 2). Toutes partagent les mêmes symptômes mais pas dans les mêmes proportions. La proportion de cas asymptomatiques est plus importante pour la COVID-19. La période d'incubation pour les trois virus est identique (environ 5 jours). La pathologie du SARS se divise en deux périodes, la première où on observe l'apparition des symptômes avec une toux non productive puis la deuxième période où les symptômes s'aggravent, et où l'individu est alors contagieux et la pathologie peut entraîner la mort du patient (Z. Zhu et al. 2020). Pour le MERS les individus manifestent directement des atteintes respiratoires sévères lorsque les symptômes se déclenchent, accompagnés d'un dysfonctionnement rénal sévère (AKI, « Acute kidney injury ») en raison de la présence du récepteur au MERS-CoV DPP4 dans les reins, permettant une infection efficace de cet organe (Chan et al. 2015; Z. Zhu et al. 2020). On retrouve également une forte excrétion virale dans les urines.

Table 2 : Comparaison des symptômes cliniques entre les pathologies causées par le SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV. Traduite a partir de: (Z. Zhu et al. 2020). ARDS : *Acute respiratory distress syndrome*, AKI : *Acute kidney injury*, LDH : *Lactate dehydrogenase*, AST : *Aspartate aminotransferase*, ALT : *Alanine aminotransferase*.

	COVID-19	SARS	MERS
Signes et symptômes			
Fièvre	56-99%	99-100%	81,7-100%
Fatigue	18-55%	31,2%	NA
Toux	39-81%	29-74,3%	75-85%
Maux de gorge	5-17%	11-23,2%	14%
Dyspnée	12-41%	40-42%	72%
Myalgie	18-55%	49,3-60,9%	38%
Diarrée	3-17%	20-25%	26%
Maux de tête	4-23%	15-55,8%	NA
Complications			
ARDS	12-30%	20%	20-30%
AKI	3%	6,7%	41-50%
Observation cliniques			
Leucopénie ($< 40 \times 10^9/L$)	26,8%	23-35%	14%
Lymphopénie ($< 1,5 \times 10^9/L$)	55,3%	68-85%	32%
Thrombocytopénie ($< 150 \times 10^9/L$)	11,5%	40-45%	36%
LDH élevé	55,5%	50-71%	48%
AST élevé	17,9%	20-30%	14%
ALT élevé	16%	20-30%	11%

La perte de goût (agueusie) et l'absence de l'odorat (anosmie) sont des symptômes se retrouvant dans près de la moitié des cas de la COVID-19. Ces symptômes apparaissent lorsque le virus infecte le nerf olfactif situé dans les voies respiratoires hautes. Il est ensuite supposé que c'est par l'infection des terminaisons nerveuses que le virus est capable d'entrer dans le cerveau (Figure 8) (Burks et al. 2021). Bien que les mécanismes permettant au virus de passer dans le cerveau ne soient pas encore totalement élucidés, la présence de virus dans le système nerveux central chez certains patients est avérée. De plus nous savons déjà via des modèles animaux que d'autres coronavirus comme l'OC43 et le HCoV-229E sont capables d'infecter le cerveau (Butler et al. 2006; Talbot et al. 1994, 2016). Les conséquences de la présence du virus dans le système nerveux central sont encore floues mais on suppose que c'est la cause de plusieurs séquelles neurologiques observables dans les « COVID long ». Le COVID long est une nomenclature adoptée pour décrire un ensemble de symptômes chez des patients guéris de la COVID-19.

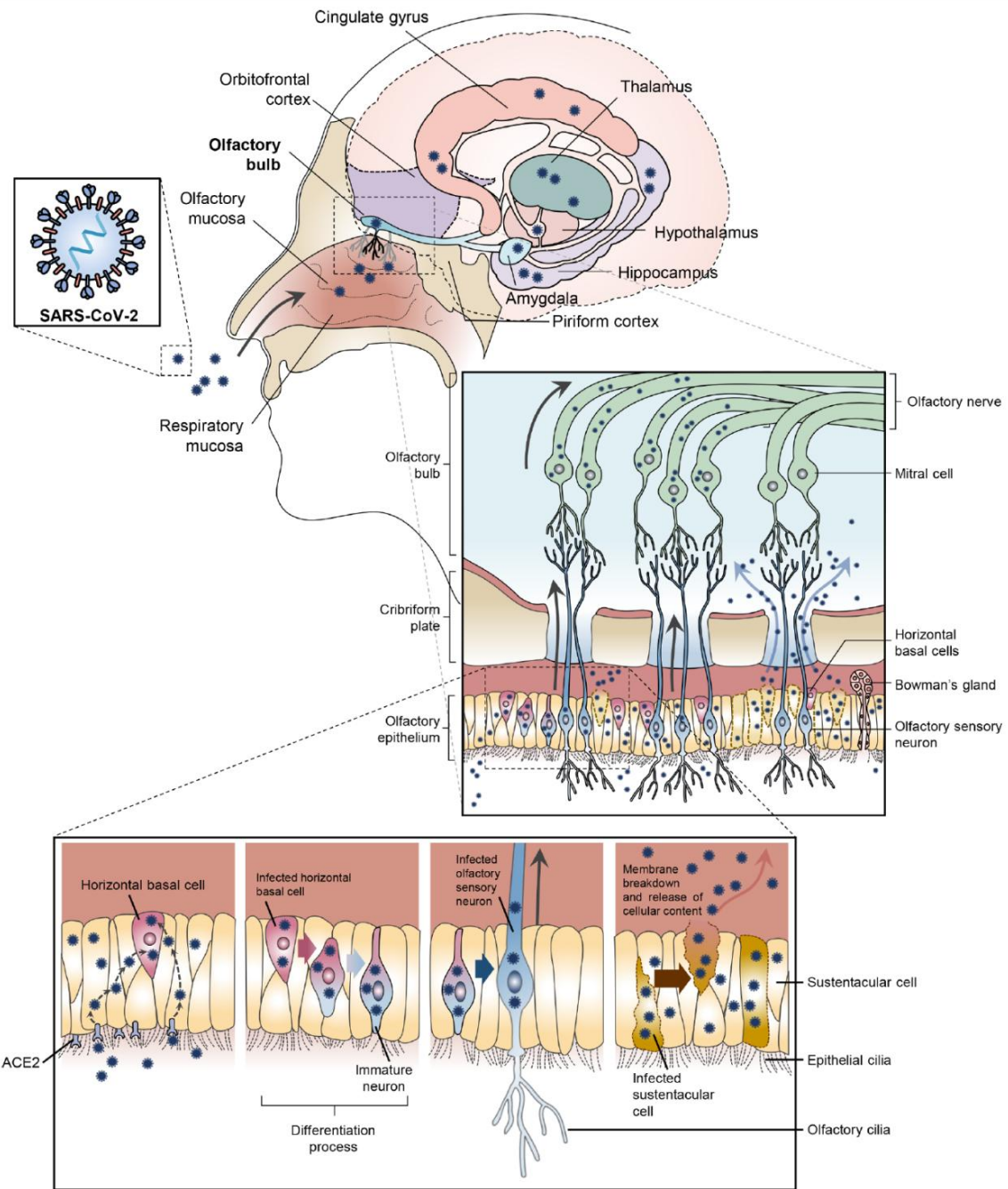


Figure 17 : Voie d'entrée hypothétique du virus SARS-CoV-2 jusqu'au système nerveux central. (Burks et al. 2021)

3.3 Les complications de la COVID-19

Le COVID long (parfois nommé COVID chronique ou symptôme post-COVID) est un état de plus en plus étudié. En effet, un nombre de plus en plus élevé de patients rapportent la présence de symptômes variés après guérison de la COVID-19 (Figure 18) (Lopez-Leon et al. 2021). On estime que 80% des patients qui ont été atteints de la COVID-19 ont au moins un symptôme du COVID long jusqu'à 75 à 245 jours après rétablissement et bien que, dans certains cas, les symptômes finissent par s'estomper, d'autres ne sont toujours pas rétablis après 6 mois d'observation, ce qui peut indiquer que parfois le COVID long puisse être une affliction à vie (Davis et al. 2021; Sykes et al. 2021; Taquet et al. 2021). Les symptômes les plus communément observés sont : la fatigue (58%), maux de tête chroniques (44%), troubles déficit de l'attention (27%), perte de goût et d'odorat (24%). Il est aussi possible de détecter la présence de marqueurs indiquant un COVID long, comme un taux élevé de protéine C-réactive, de ferritine, et de D-dimer (Lopez-Leon et al. 2021). Il ne faut pas confondre les afflictions du COVID long avec des séquelles liées à une hospitalisation prolongée (perte de motricité et réduction de la masse musculaire).

Bien que ces syndromes de COVID long soient fréquents chez les patients hospitalisés lors de cas sévère, il est aussi possible de les retrouver chez des individus après un COVID bénin voir asymptomatique. 31,74% des patients guéris de la COVID-19 sans hospitalisation ont développé au moins un syndrome neurologique du COVID long contre 46,42% pour les patients hospitalisés survivants, en majorité des troubles de l'attention, anxiété et dépression chronique (Taquet et al. 2021). La Haute Autorité de santé a élaboré une liste des symptômes observés dans les COVID longs en distinguant les conséquences directes dues à une forme sévère de la COVID-19 et les syndromes qui apparaissent à la suite de la maladie. Ces informations récentes à propos des conséquences de la COVID-19 viennent augmenter la dangerosité de la maladie. En effet, bien que le taux de mortalité soit estimé entre 0,5 à 3%, il faut ensuite y ajouter une part non négligeable de séquelles pouvant, à plus ou moins long terme, entraîner des handicaps sévères et une réduction importante de l'espérance de vie des individus concernés.

3.4 Méthodes de dépistage

Il est important de réussir à identifier les individus contaminés afin de pouvoir les isoler et ralentir la propagation de l'épidémie. Cette même méthode a permis de stopper l'épidémie de SARS-CoV en 2003 et de contenir l'épidémie de MERS-CoV en majeure partie au Moyen-Orient depuis 2012. Pour cela de nombreux tests de dépistage existent, chaque test avec des avantages et des inconvénients (Figure 19).

Trois tests sont majoritairement utilisés par le public. Les tests PCR sont les plus utilisés dans le cas de la pandémie de COVID-19. Il s'agit d'une RT-PCR qui vise à détecter les ARN viraux. Trois régions conservées sur le génome du SARS-CoV-2 sont ciblées, la RdRp, le gène de la protéine E, et le gène de la nucléocapside N, en utilisant des amorces spécifiques. Les tests antigéniques visent à identifier la présence d'antigènes du SARS-CoV-2 en utilisant une matrice (généralement sous forme de test ELISA) contenant des anticorps spécifiques (anti-S et anti-N). Les tests sérologiques ou immunologiques détectent les anticorps IgG, IgM et IgA grâce à une matrice contenant des antigènes du SARS-CoV-2 (les protéines S, ou N généralement)(Alpdagtas et al. 2020; Azzi et al. 2021; Corman et al. 2020; Tré-Hardy et al. 2021).

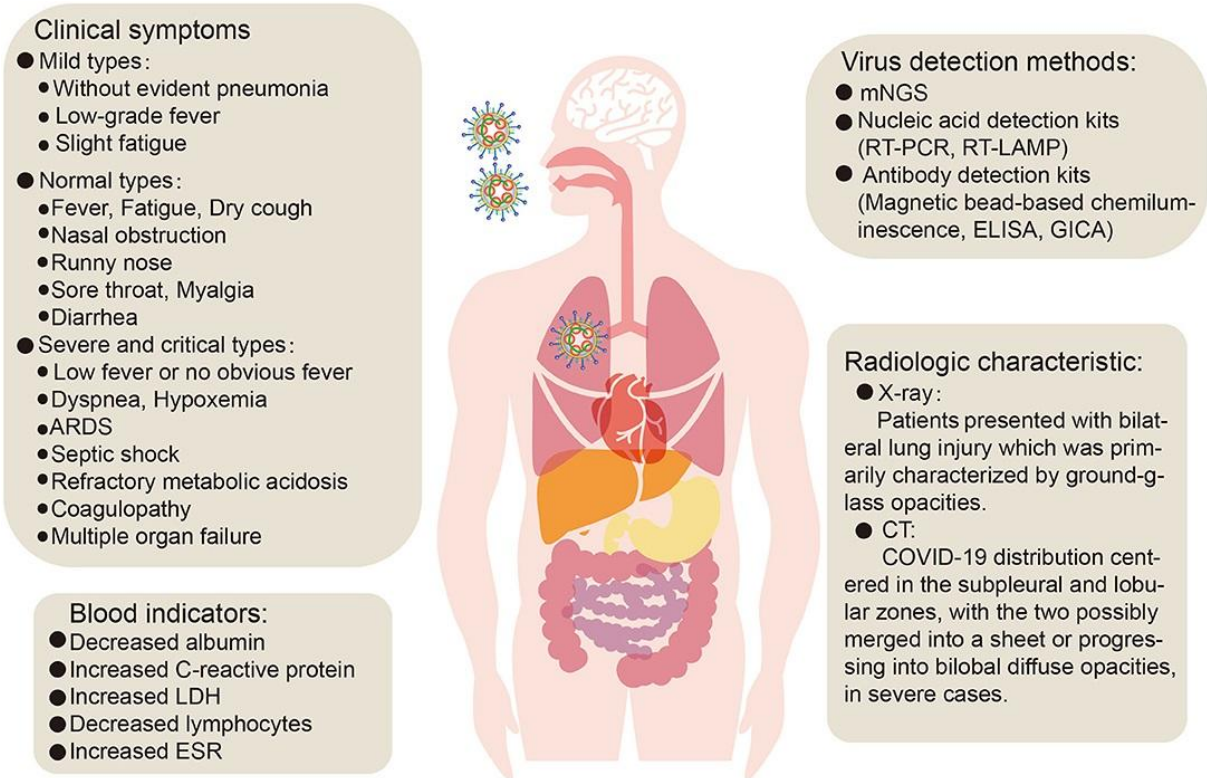


Figure 19 : Symptômes et indicateurs de gravité de la COVID-19 avec indicateurs physiologiques et méthodes de détection. (Guo et al. 2020)

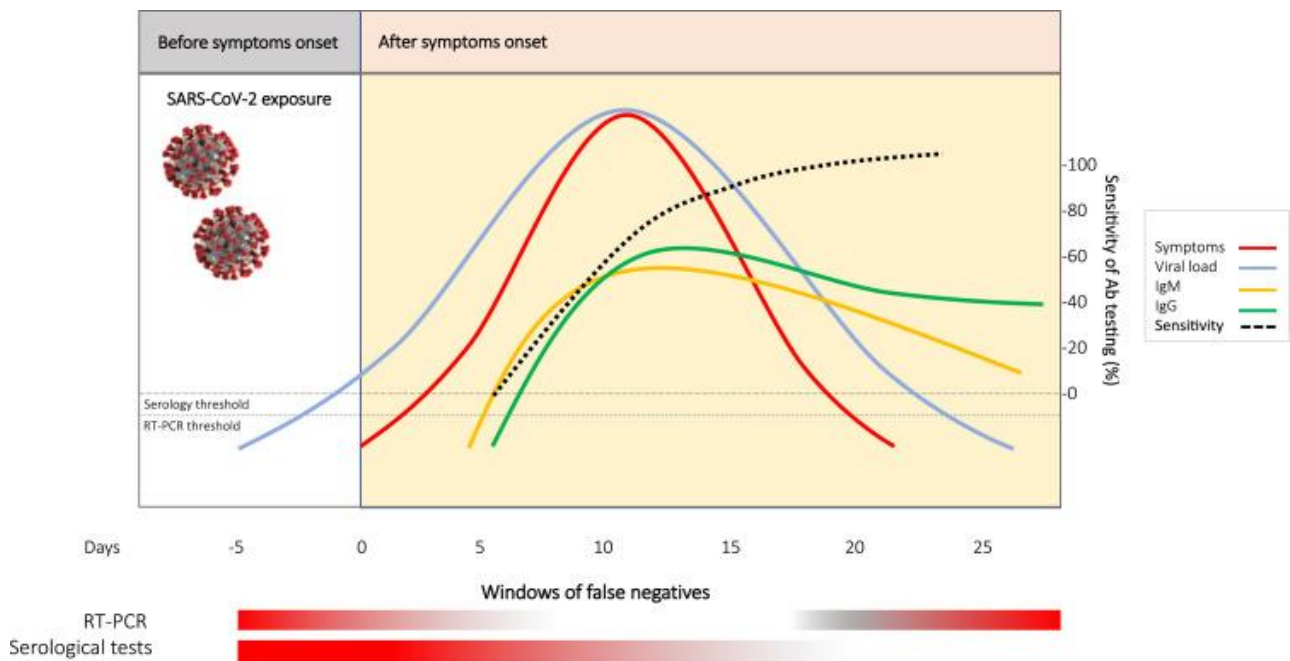


Figure 20 : Différents indicateurs d'une infection au SARS-CoV-2 au cours du temps. (La Marca et al. 2020).

Ces trois tests doivent être utilisés sur un certain laps de temps pour pouvoir être fiables. En effet, comme on peut le voir dans la figure 12 il a été montré que les différents marqueurs d'infection apparaissent à différents temps après la contamination et disparaissent après un certain temps (Caruana et al. 2020; La Marca et al. 2020; Sethuraman, Jeremiah, et Ryo 2020). L'ARN viral n'est détectable dans les prélèvements nasopharyngés que dans les 5 à 7 jours après contamination et jusqu'à 20 jours en moyenne (avec des maxima à 37 jours) (He et al. 2020). Cela indique bien sûr la possibilité de faux négatifs si le test est réalisé trop tôt, mais aussi la possibilité de faux positifs si le test est réalisé trop tard, car même si de l'ARN est détecté au-delà de 15 jours post-contamination, la quantité de particules virales infectieuses est quasi nulle, on est alors dans le cas d'une personne convalescente en phase de guérison. De même, la réalisation de tests immunologiques est inutile avant 10 jours post symptômes car la majorité des patients ne seront pas positifs au IgM et IgG avant 10 jours voire 14 jours (Nicol et al. 2020). Enfin, la détection des antigènes se fait quant à elle dans un temps précoce après contamination, au moment du début des symptômes.

Malheureusement la phase majeure de propagation du SARS-CoV-2 étant pré symptomatique, il est difficile même avec des tests à grande échelle et un rendu de résultats rapide, d'isoler les personnes positives à temps. Cela n'avait pas été un problème lors de l'épidémie de SARS-CoV en 2003, car la phase de contagion du virus débutait après l'apparition des symptômes, il était donc plus facile d'identifier et d'isoler les patients atteints avant propagation (He et al. 2020). D'autant plus que dans le cas de SARS-CoV-2, on estime que la moitié des contaminations proviendrait de cas asymptomatiques pouvant quand même transmettre le virus (Johansson et al. 2021). L'aggravation rapide de l'épidémie à l'échelle mondiale a donc poussé nombre de pays à opter pour des restrictions à l'échelle nationale : confinement, quarantaine, port de masque, et restriction de rassemblement (Howard et al. 2021).

CONVENTIONAL APPROACHES

NOVEL APPROACHES

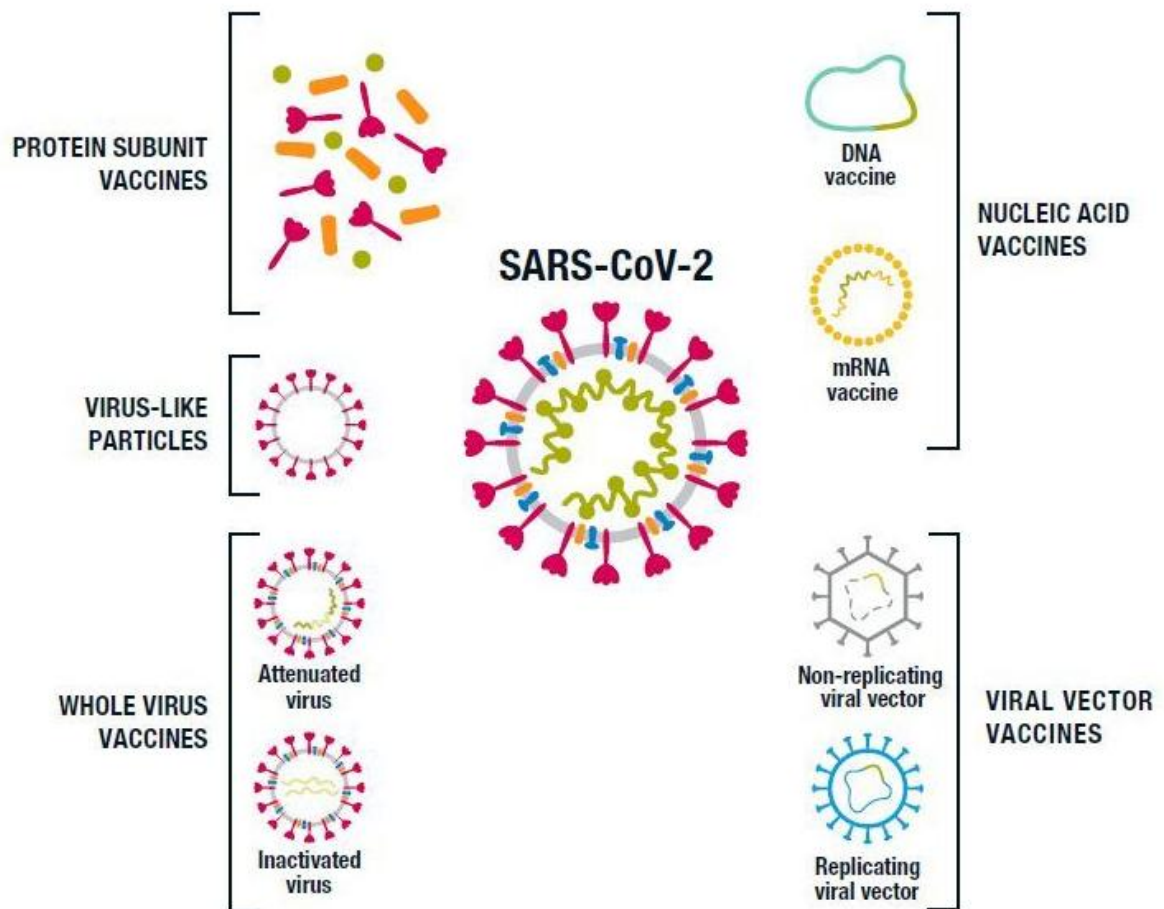


Figure 21 : Les différentes stratégies de vaccins (McIntyre et al. 2020)

4 – Vaccins et traitements

4.1 Les vaccins

Les vaccins ont toujours été un très bon moyen de prévention contre les maladies virales. Face à la pandémie de SARS-CoV-2, il a été nécessaire de rapidement développer des vaccins efficaces. Généralement, pour un nouveau vaccin, les différentes étapes du lancement administratif de la phase I jusqu'au résultat de la phase IV puis la mise sur le marché, prennent une dizaine d'années. En 2020, face à l'urgence sanitaire, des mesures ont été prises pour accélérer le processus. Ainsi la durée des essais cliniques a pu être réduite à environ 18 mois au lieu de 6 à 10 ans (Tregoning et al. 2020), avec des autorisations anticipées de mise sur le marché. D'autres part, la mise au point des vaccins contre le SARS-CoV-2 a bénéficié d'avancées technologiques exceptionnelles, telle que la production de vaccin à ARNm. Cette technologie avait été récemment appliquée pour la création de vaccins ARNm contre le virus de l'immunodéficience humaine (NCT05001373) et contre le cancer (NCT04526899).

4.1.1 Les différentes catégories de vaccins

Différentes stratégies vaccinales ont rapidement été étudiées dès le début de la pandémie de SARS-CoV-2 (Figure 21). Certains vaccins sont encore dans leur dernière étape d'essai clinique avant d'être approuvés, mais la majorité a déjà terminé la phase 2/3 avec succès et ils sont actuellement utilisés pour vacciner les populations. On compte à ce jour plus de 2,6 milliards de vaccinés (tous vaccins confondus, vaccination complète) dans le monde. Nous allons présenter ici une liste non exhaustive des vaccins les plus aboutis à ce jour.

a) Les vaccins à vecteur viraux

Les vaccins à vecteurs viraux utilisent un autre virus non répliquatif pour transporter du matériel génétique ou des protéines appartenant au virus d'intérêt. Plusieurs vaccins contre le virus SARS-CoV-2 à base d'adénovirus ont été élaborés et ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché.

Le vaccin AZD1222 ou ChAdOx1 nCoV-19 développé par AstraZeneca et l'Université d'Oxford contient le gène de la protéine S dans un vecteur adénovirus de chimpanzé (Alturki et al. 2020). De précédents travaux utilisant le même vecteur pour élaborer un vaccin contre le MERS-CoV a fourni un gain de temps lors de la mise au point de ce nouveau vaccin contre le SARS-CoV-2 (Alharbi et al. 2017; Folegatti et al. 2020). Il est 100% efficace dans la prévention des formes graves, et 55% à 81% efficace dans la prévention de toute forme symptomatique (Tregoning et al. 2021). Toutefois, un essai clinique a montré une efficacité de seulement 10% contre le variant Beta B 1.351 (Afrique du Sud) (Y. Li et al. 2021; Madhi et al. 2021). Il est distribué dans 184 pays et non distribué aux Etats Unis, en Russie, et en Chine, bien que certains l'aient fortement régulé voire abandonné à cause d'effets secondaires légèrement plus importants que pour les autres vaccins disponibles.

Le vaccin dose unique JNJ-78436735 de Johnson & Johnson utilise un vecteur adénovirus humain Ad26 codant pour la protéine S du SARS-CoV-2, il a montré 66% d'efficacité pour la prévention des formes symptomatiques, et est 85,4% efficace dans la prévention des formes graves (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Distribué dans 50 pays en Amérique, Europe et Afrique.

Le vaccin Ad5-nCoV de CanSinoBiologicals est un vaccin à dose unique utilisant comme vecteur l'adénovirus humain Ad5 non répliquatif, codant pour la protéine S du SARS-CoV-2. L'utilisation du vecteur Ad5 fut précédemment mis au point lors de travaux sur un vaccin contre le MERS-CoV (Guo et al. 2015; Kim et al. 2014). Les essais cliniques indiquent une efficacité dans la prévention de cas symptomatiques de 65,7% à 74,8% et une protection de plus de 90,98% pour les cas graves (Funk, Laferrière, et Ardakani 2021). Très peu d'informations sont disponibles en dehors des résultats d'essais cliniques. Il est actuellement distribué au Mexique, Pérou, Argentine, Chine, Pakistan et en Malaisie (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021).

Enfin le vaccin Sputnik V, développé par Gamaleya Research Institute, utilise deux adénovirus humains comme vecteurs, rad26 et rad5, en injections séparées dans le but de contourner une éventuelle immunité contre le vecteur du vaccin. Chacun des deux vecteurs code pour la protéine S du SARS-CoV-2. Il est efficace à 92% pour la prévention de forme symptomatique, mais très peu de données sont disponibles quant à son efficacité contre les formes graves et les variants (Y. Li et al. 2021; Logunov et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Il est actuellement distribué dans 46 pays.

b) Les vaccins nucléotidiques

Vaccins à ARNm

Les vaccins à ARN messenger (ARNm) sont une nouvelle technologie qui a fait son apparition avec la pandémie de COVID-19. Le principe est d'encapsuler un ARNm codant pour une ou plusieurs protéines du virus d'intérêt dans des nanoparticules lipidiques.

Deux vaccins à ARNm particulièrement efficaces ont été développés simultanément. Il s'agit d'une part du vaccin BNT1162 de Pfizer BioNTech qui est constitué d'une nanoparticule lipidique encapsulant l'ARNm de la protéine S. Il est efficace à 95% dans la prévention de forme symptomatique et entre 95,3 et 100% pour les formes graves (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Il est distribué dans 125 pays, en Amérique, Europe et Océanie.

D'autre part, un vaccin très similaire est le mRNA-1273 de Moderna, un vaccin basé sur le même principe que celui de Pfizer BioNTech. Il est efficace à 94% dans la prévention de forme asymptomatique et à 100% pour les formes graves (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Il est distribué dans 72 pays, en Amérique et en Europe majoritairement. Dans les deux cas, les ARNm sont synthétisés avec des pseudo-uridines au lieu d'uridines, ce qui permet à l'ARNm d'échapper au système immunitaire et d'être traduit en protéine avant que les ARN soient détruits par la cellule.

Un autre vaccin à ARN a été développé par CureVac. Dans ce cas, il s'agit d'ARN viral non modifié, codant également la protéine S. Ce vaccin a donné des résultats décevants en essai clinique avec une efficacité de 48% (Kremsner et al. 2020).

Vaccins à ADN

Le vaccin à ADN de Inovio, utilise aussi une stratégie visant à présenter un antigène sous forme nucléotidique spécifique du virus d'intérêt. Cette fois-ci sous forme d'ADN codant la protéine S dans un plasmide (pVax). Cette technique avait déjà été utilisée pour un vaccin contre le MERS CoV INO-4700 (Alturki et al. 2020; Muthumani et al. 2015) et avait montré des résultats encourageants *in vivo* en modèle animal mais aussi lors d'essais cliniques de phase 1 qui se sont terminés en 2019 (Modjarrad et al. 2019). Contre le SARS-CoV-2, le vaccin INO-4800 utilise le même principe. L'essai clinique de phase 2/3 a débuté en novembre 2020 (NCT04336410) (Y. Li et al. 2021) et n'est pas encore disponible.

c) Les vaccins à virus entier

Une autre stratégie est celle des vaccins inactivés ou atténués. Le vaccin utilisé correspond au virus d'intérêt préalablement inactivé par un traitement chimique ou thermique. Deux vaccins de fabrication chinoise utilisent cette stratégie. Le vaccin CoronaVac de Sinovac Biotech est un virus SARS-CoV-2 inactivé au Beta-propiolactone. Son efficacité varie de 50,7% à 91% dans la prévention des formes symptomatiques en fonction des pays. Malgré cette faible efficacité, ce vaccin a été autorisé à la commercialisation dans 41 pays (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2020, 2021).

Le vaccin BBIBP-Corv de Sinopharm et l'Institut de Wuhan, est un autre vaccin inactivé chimiquement. Montrant 78% d'efficacité dans la prévention de forme symptomatique et 79% dans la prévention de forme grave (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021) et très peu de données sont disponibles en dehors des essais cliniques publiés. Il est distribué dans 71 pays, en Asie, Afrique et Amérique du sud.

d) Autres types de vaccins

Des vaccins de type protéique ont également été développés. Dans ce cas, il s'agit d'injecter directement la protéine antigénique (ici la protéine Spike des coronavirus complète ou partielle) afin de produire des anticorps.

L'utilisation comme vaccin contre le MERS-CoV de nanoparticules (micelle amphiphilic) présentant la protéine S du MERS-CoV avec la protéine M de matrice comme adjuvant a été envisagée. Les résultats montrent l'apparition d'anticorps neutralisants chez la souris (Coleman et al. 2014). Ce système est actuellement utilisé pour le vaccin NVX-CoV2373 de Novavax contre le SARS-CoV-2. Le vaccin NVX-CoV2373 de Novavax, présente la protéine S recombinante du SARS-CoV-2 encapsidé dans une nanoparticule avec comme adjuvant la protéine M du SARS-CoV-2. Il a montré une efficacité de 89% dans la prévention de forme symptomatique et de 100% contre les formes graves (Y. Li et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Il sera distribué aux Etats-Unis, en Europe et en Asie fin 2021.

Le vaccin EpiVacCorona développé par le « VECTOR Center of Virology » en Russie, est un vaccin protéique présentant plusieurs épitopes de la protéine S du SARS-CoV-2 fusionné à une protéine de transport (Pollet, Chen, et Strych 2021). Les essais cliniques sont actuellement en cours (NCT04780035).

Genomic epidemiology of novel coronavirus - Global subsampling

Built with nextstrain/ncov. Maintained by the Nextstrain team. Enabled by data from [GISAIID](https://gisaid.org).

Showing 3449 of 3449 genomes sampled between Dec 2019 and Sep 2021.

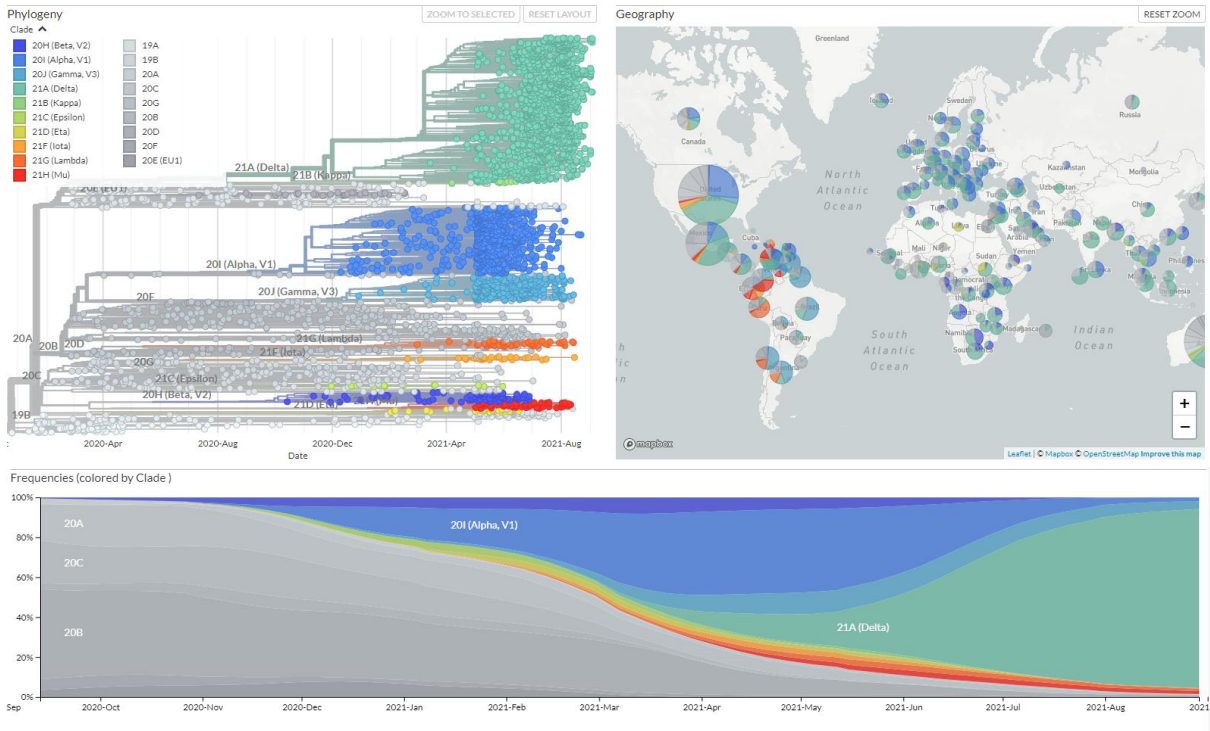


Figure 22 : Capture d'écran du site Nextstrain au 10 septembre 2021.

Indications sur la phylogénie et répartition mondiale des variants ainsi que la fréquence d'infection. <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global>

4.1.2 Les variants

Le SARS-CoV-2, originaire de la région de Hubei en Chine, s'est rapidement propagé à travers le monde. Une première séquence virale a été déposée dans les banques de données internationales le 29 janvier 2020. Au fur et à mesure de l'évolution de l'épidémie, des centaines de nouvelles séquences virales ont été collectées à travers le monde, montrant l'évolution du virus. Bien que le taux de mutation du génome des coronavirus soit faible grâce à la fonction exonucléase de leurs polymérases, leur taux élevé de réplication et leur capacité à réarranger leur génome lors de la réplication va contribuer à un taux d'apparition de variants élevé comparé aux autres virus ARN (estimé à 104 mutations par an par site) (Ghosh et Malik 2020). Toutefois, les mutations sont observées à grande échelle uniquement si celles-ci confèrent un gain de « fitness », c'est-à-dire un avantage par rapport aux autres virus, comme par exemple la capacité de se répliquer plus rapidement, en plus grande quantité, de mieux lier le récepteur, etc.

En fonction de la « dangerosité » potentielle de ces variants, ils ont été classés « variant of concern (VOC) » ou « variant of interest (VOI) » par l'OMS. Les VOC sont des variants actuellement rigoureusement surveillés à cause du risque plus important de propagation et de devenir le variant majoritaire dans certaines régions ou pays. Les VOI sont surveillés car ils sont à risque potentiel de propagation. Grâce au séquençage haut débit, c'est la première fois que l'on peut suivre « en direct » et au niveau mondial l'évolution d'un virus. Plusieurs bases de données collectent les séquences qui sont accessibles en « open access » comme le site « Nextstrain », donnant une vue d'ensemble sur l'arrangement phylogénique des variants entre eux, le taux d'incidence par pays, ainsi que la prévalence de chaque variant au niveau mondial (Figure 22). On peut d'ailleurs y observer que le variant Delta correspond à 90% des nouvelles infections depuis août 2021. Les VOC et les VOI présentent des mutations de la protéine S qui rendent le virus plus infectieux notamment en lui permettant de mieux s'attacher au récepteur cellulaire mais également engendrant des changements de conformation potentiels de la protéine S induisant un échappement aux anticorps neutralisants (Lazarevic et al. 2021) (Figure 23). Les VOC ont été récemment renommés alpha, beta, gamma, delta (Table 3).

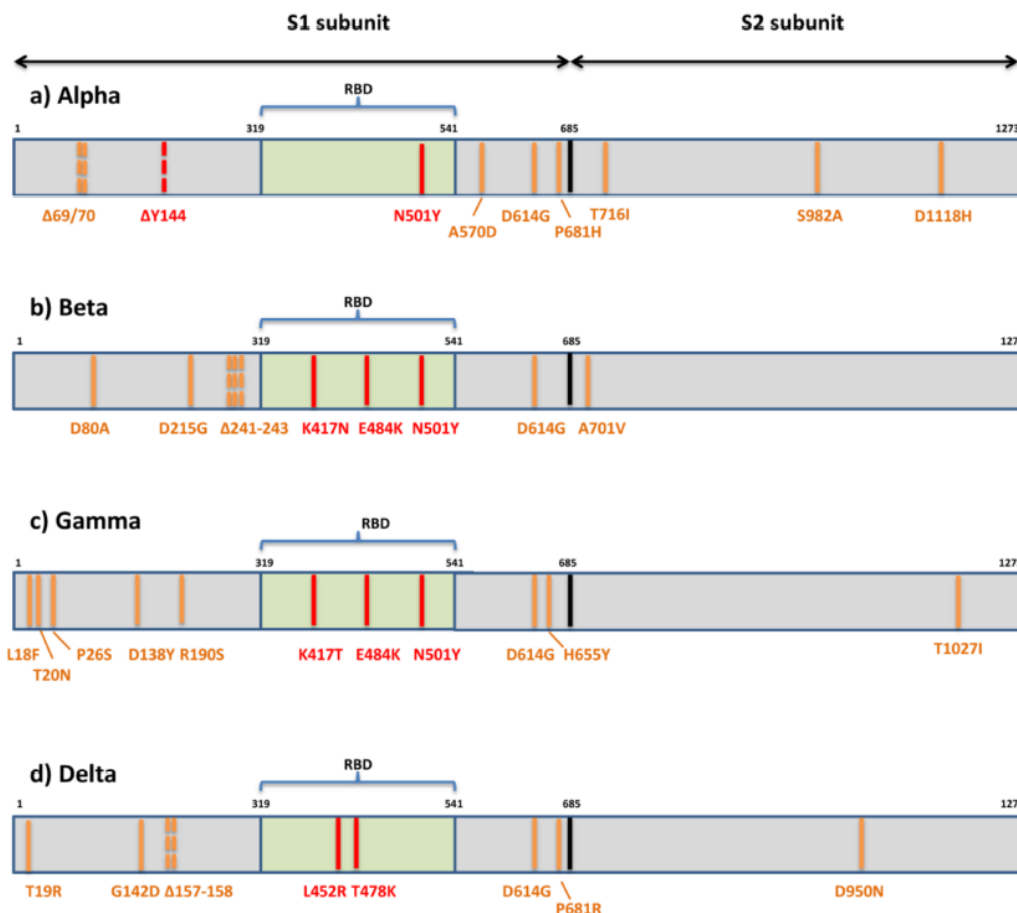


Figure 23 : Liste des mutations présentes sur la protéine S des quatre variants VOC qui leur confèrent un gain de fitness sur la souche d'origine (Lazarevic et al. 2021)

Table 3 : Liste des variants VOC et VOI par l'OMS.

<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

Variant of Concern (VOC)		
WHO label	Lineage	Origin
Alpha	B.1.1.7	UK Sept-2020
Beta	B.1.351	South Africa May-2020
Gamma	P.1	Brazil Nov-2020
Delta	B.1.617.2	India Oct-2020
Variant of interest (VOI)		
WHO label	Lineage	Origin
Epsilon	B.1.427/429	USA Mars-2020
Zeta	P.2	Brazil Apr-2020
Eta	B.1.525	Multiple Dec-2020
Theta	P.3	Philippines Jan-2021
Iota	B.1.526	USA Nov-2020
Kappa	B.1.617.1	India Oct-2020
Lambda	C.37	Peru Dec-2020
Mu	B.1.621	Colombia Jan-2021

Le premier VOC détecté est le B.1.1.7 renommé variant alpha, détecté en septembre 2020 au Royaume-Uni et en Afrique du Sud. Il contient des mutations dans la protéine S (N501Y, K417N et E484K), présente dans tous les nouveaux variants actuels (Ioannou et al. 2021:7; Rouchka, Chariker, et Chung 2020) ainsi que chez le variant Beta identifié en Afrique du Sud nommé B.1.351 ou 501Y.V2 (Davies et al. 2021; Tegally et al. 2021). D'autres variants ont aussi été détectés au Brésil, nommé P.1 ou B.1.1.248 ou variant Gamma et possédant aussi les mutations citées précédemment à la différence d'une mutation K417T et non K417N (Khan et al. 2021). Et très récemment en Inde, le variant B.1.617.2 ou Delta qui possède les mutations présentes dans le variant Brésilien et Sud-Africain (Rahimi et Talebi Bezman Abadi 2021; Yadav et al. 2021). Ce dernier variant Delta s'est propagé à travers le monde et est devenu majoritaire au cours de l'été 2021 comme il avait déjà été observé courant mars 2020 lors qu'un variant européen a pris l'avantage sur la souche d'origine asiatique (Korber et al. 2020). Si ces mutants ont effectivement un gain de fonction permettant une propagation plus efficace que la souche d'origine, il est encore difficile de dire avec certitude s'il y a des différences majeures dans les pathologies observées.

4.1.3 Efficacité des vaccins par rapport aux variants

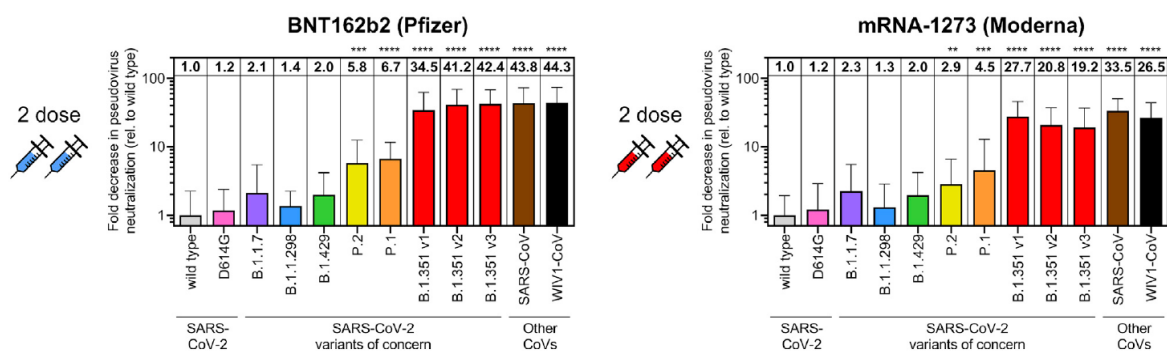


Figure 24 : Réduction de l'efficacité de la neutralisation de pseudoparticules correspondant à chaque variants par des sérums de patients vaccinés par le vaccin BNT162 ou mRNA-1273 (Garcia-Beltran et al. 2021).

L'apparition de nouveaux variants possédant des mutations de plus en plus diverses sur la protéine S réduit le taux de neutralisation par les anticorps générés par les vaccins (Figure 24). Cependant, ces études de neutralisation sont réalisées à partir de sérums de patients contaminés et des pseudovirus et ne peuvent donc évaluer que l'efficacité de

l'immunité humorale et non l'immunité cellulaire (Garcia-Beltran et al. 2021). Bien que les nouveaux variants échappent plus facilement à la neutralisation, plusieurs vaccins maintiennent un niveau de protection à plus de 90% contre les formes graves et les hospitalisations (Gómez, Perdiguero, et Esteban 2021; Tregoning et al. 2021).

En outre, les vaccins permettent de ralentir la propagation du virus, car il a été montré que des individus vaccinés contaminés avaient un risque réduit de transmettre le virus par rapport aux individus non vaccinés (Harris et al. 2021; Levine-Tiefenbrun et al. 2021). Ceci n'est pas totalement le cas face à certains variants. En effet, pour les vaccins les plus distribués, comme BNT162, mRNA-1273 et AZD1222, il a été observé qu'ils étaient moins efficaces pour contrer l'infection par le variant delta, avec un taux d'efficacité respectif de 53.5% à 88% (BNT162), 50.6% à 84.8% (mRNA-1273), 60% à 67% (AZD1222) après deux doses (Lopez Bernal et al. 2021; Nanduri et al. 2021; Tang et al. 2021; Tregoning et al. 2021). Globalement on remarque une tendance de perte d'efficacité face au variant et celle-ci semble être d'autant plus importante chez les individus plus âgés (Nanduri et al. 2021).

Bien que les vaccins aient été sujets à polémique en raison d'effets secondaires observés à caractère potentiellement grave, comme par exemple les thromboses causées par la capacité de la protéine S du SARS-CoV-2 à agréger les plaquettes (Schultze et Aschenbrenner 2021), des études récentes ont montré que tout effet néfaste observé lors d'une vaccination était 2 à 5 fois plus présent lors d'une infection par le SARS-CoV-2 chez un individu non vacciné (Hippisley-Cox et al. 2021). Les vaccins sont donc un atout majeur contre les infections au SARS-CoV-2 malgré l'apparition de nouveaux variants résistants à la neutralisation. Malheureusement, il semble peu probable de réussir à obtenir une immunité de masse capable d'éradiquer le virus comme ce fut le cas pour la variole et la poliomyélite. En effet, pour qu'un tel scénario se produise, il faudrait que le vaccin soit capable de bloquer totalement l'entrée du virus et/ou sa transmission, or nous savons maintenant que les individus vaccinés sont capables d'être contaminés et de transmettre le virus. Cependant le vaccin réduit fortement la sévérité de la maladie et ralentit quand même sa propagation. Ainsi une couverture vaccinale suffisante couplée à une immunité naturelle forte des patients convalescents (Gazit et al. 2021), pourraient permettre d'avoir une population suffisamment immunisée pour fortement réduire le nombre d'hospitalisations et la circulation du virus (Lipsitch et al., 2020; Randolph and Barreiro, 2020; Ashwanden, 2021). Toutefois, un grand nombre d'individus ne sont pas encore vaccinés et une partie refuse de

l'être, ce qui retarde ce seuil d'immunité et tout retard permet l'apparition de nouveaux variants moins affectés par les vaccins, retardant encore plus la fin de la pandémie.

4.2 Les traitements utilisés en thérapie clinique

Les différentes épidémies de coronavirus ont montré la nécessité de développer des antiviraux spécifiques à cette famille de virus. Les premières études ont commencé à la suite de l'épidémie de SARS-CoV en 2003, mais la plupart des efforts de recherche se sont ralentis, voire arrêtés en 2004. L'apparition du MERS-CoV a relancé les recherches et a permis le lancement des premiers essais cliniques pour certains antiviraux et vaccins. Ces mêmes antiviraux, qui avaient déjà été testés *in vitro*, *in vivo*, et utilisés dans certains essais cliniques, sont actuellement en cours de test contre le nouveau coronavirus SARS-CoV-2 bien que la recherche de nouveaux antiviraux continue.

En l'absence d'antiviraux spécifiques contre le SARS-CoV-2, les traitements contre les individus pris en charge pour cas de COVID-19 modéré et sévère consiste au soulagement des symptômes. Les patients hospitalisés sont soit en 2^e phase de COVID (modéré avec possibilité d'hypoxie), soit en phase 3 (ARDS et hyper-inflammation). La prise en charge des patients consiste tout d'abord en une oxygénothérapie. Lorsque le sang n'est plus suffisamment ni correctement saturé en oxygène, (normalement au-dessus de 95%) à cause des dégâts sur le tissu pulmonaire causés par l'hyper-inflammation, les patients requièrent un apport extérieur d'oxygène (Aguilar et al. 2020; Celejewska-Wójcik et al. 2021). Cet apport d'oxygène peut se faire par sonde nasale, masque à oxygène, intubation trachéale, ou ventilation mécanique invasive selon la sévérité de la détresse respiratoire. Cette oxygénation peut dans certains cas être prolongée dans les cas « post-covid » une fois l'hyper-inflammation résolue, si les séquelles de celle-ci sont trop importantes, afin d'aider le patient le temps du rétablissement complet (Ray et al. 2021).

L'ARDS étant provoqué par l'hyper-inflammation dans les poumons, l'état d'oxygénothérapie est souvent accompagné de traitements anti-inflammatoires, par exemple des corticostéroïdes telle que la dexaméthasone qui a montré une réduction de la mortalité lors d'essais cliniques sur des patients atteints de COVID sévère (29,3% de taux de mortalité dans le groupe dexaméthasone contre 41,4% dans le groupe contrôle) (The RECOVERY Collaborative Group 2021). Cependant la dexaméthasone n'a montré aucun bénéfice lors d'une administration chez des cas de COVID modéré (sans hyper- inflammation) (Ahmed et Hassan 2020; The RECOVERY Collaborative Group 2021).

D'autres approches comme l'utilisation d'immuno-modulateurs, comme le Tocilizumab, un anticorps ciblant les récepteurs à l'IL6, sont aussi utilisés pour traiter la phase d'hyper inflammation. Toutefois il semblerait que le Tocilizumab n'améliore pas le taux de survie des patients en phase 3 mais réduirait les chances de transition d'une phase 2 vers une phase 3 (Salama et al. 2021; Stone et al. 2020; Toniati et al. 2020). La colchicine, molécule anti-inflammatoire possédant un effet plus faible que la dexaméthasone mais sans effet secondaire immunosuppresseur, est aussi envisagée comme alternative pour traiter les patients hospitalisés (Reyes et al. 2021).

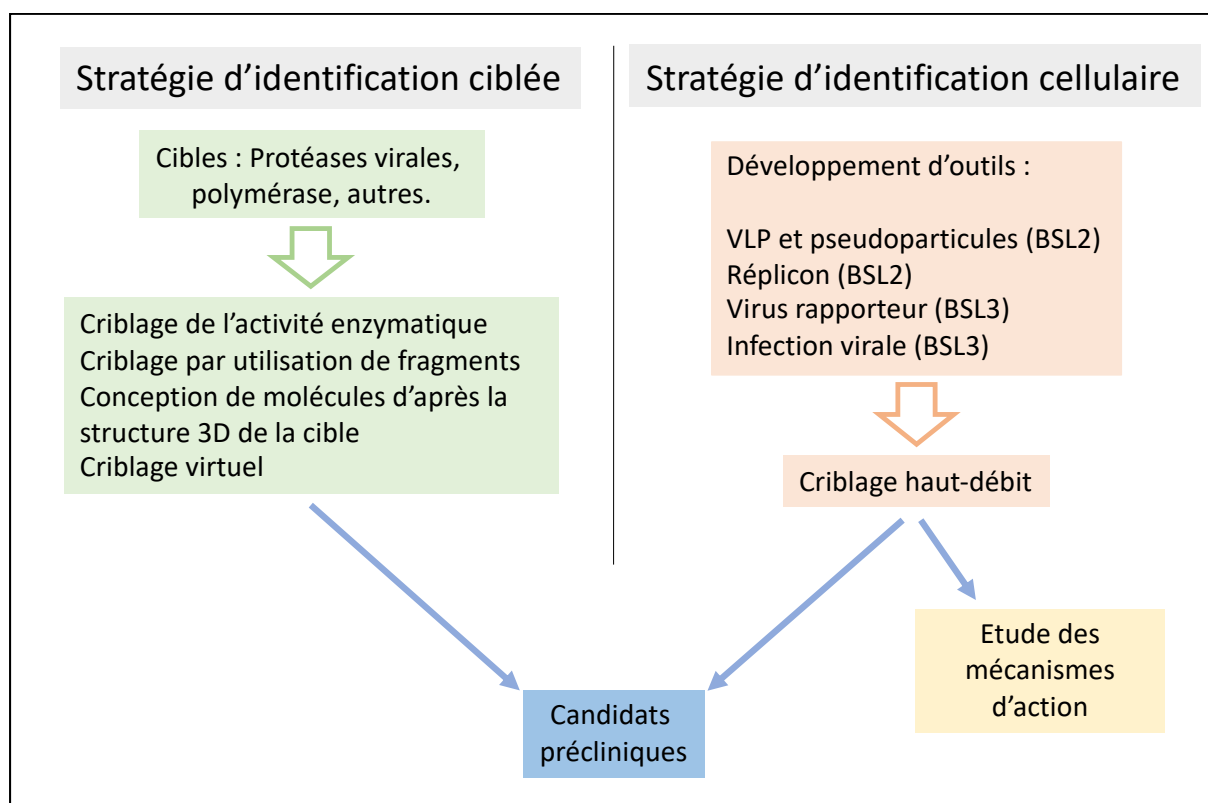


Figure 25 : Stratégies d'identification des antiviraux.

4.3 Les stratégies d'identification des antiviraux

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour identifier des antiviraux. Elles se divisent en deux catégories, soit ciblées (sur une activité enzymatique virale par exemple, protéase, polymérase, ...), soit cellulaires (sans cible définie, en essayant d'inhiber le cycle infectieux) (Figure 25).

La stratégie d'identification ciblée consiste à identifier des composés inhibant directement des protéines virales indispensables à l'infection. Si la protéine en question est une enzyme, cela revient à rechercher des composés capables de bloquer cette activité enzymatique. Ce genre de crible peut être fait *in silico*, en mettant en contact l'enzyme cible avec les composés d'intérêt et en mesurant la réduction de l'activité enzymatique.

Une autre méthode, l'identification par fragments (fragment-based discovery) consiste à cribler une banque de petits composés (les fragments) contre des cibles protéine virale, afin d'identifier un composé capable d'interagir avec les cibles choisies. Une fois le fragment identifié, il est possible de créer chimiquement un composé stable à partir de celui-ci, dans le but de créer un composé antiviral (Li 2020). La recherche via interaction structurale est basée sur le même principe mais utilise des composés déjà complets, ce genre de criblage peut se faire virtuellement par interaction simulée sur ordinateur à condition de connaître la structure des différents composés et de leur cible (Chen, de Bruyn Kops, et Kirchmair 2017; Parks et Smith 2020). Une fois les composés d'intérêt identifiés, il est nécessaire de vérifier leurs effets dans un modèle infectieux contre le virus entier.

La stratégie de recherche cellulaire, consiste à cribler des composés candidats directement grâce à un système rapporteur comme le virus d'intérêt, ou un virus rapporteur, ou un réplicon ou des VLP (« virus like particules ») dans le but d'identifier une molécule capable d'inhiber le cycle viral sans pour autant avoir une cible définie. Étant donné que cette méthode identifie des molécules dans un contexte infectieux, il y a moins d'étapes de vérification nécessaires comparé à la stratégie d'identification ciblée. Cependant d'autres expérimentations peuvent avoir lieu afin d'élucider le mécanisme d'action des molécules identifiées dans le crible.

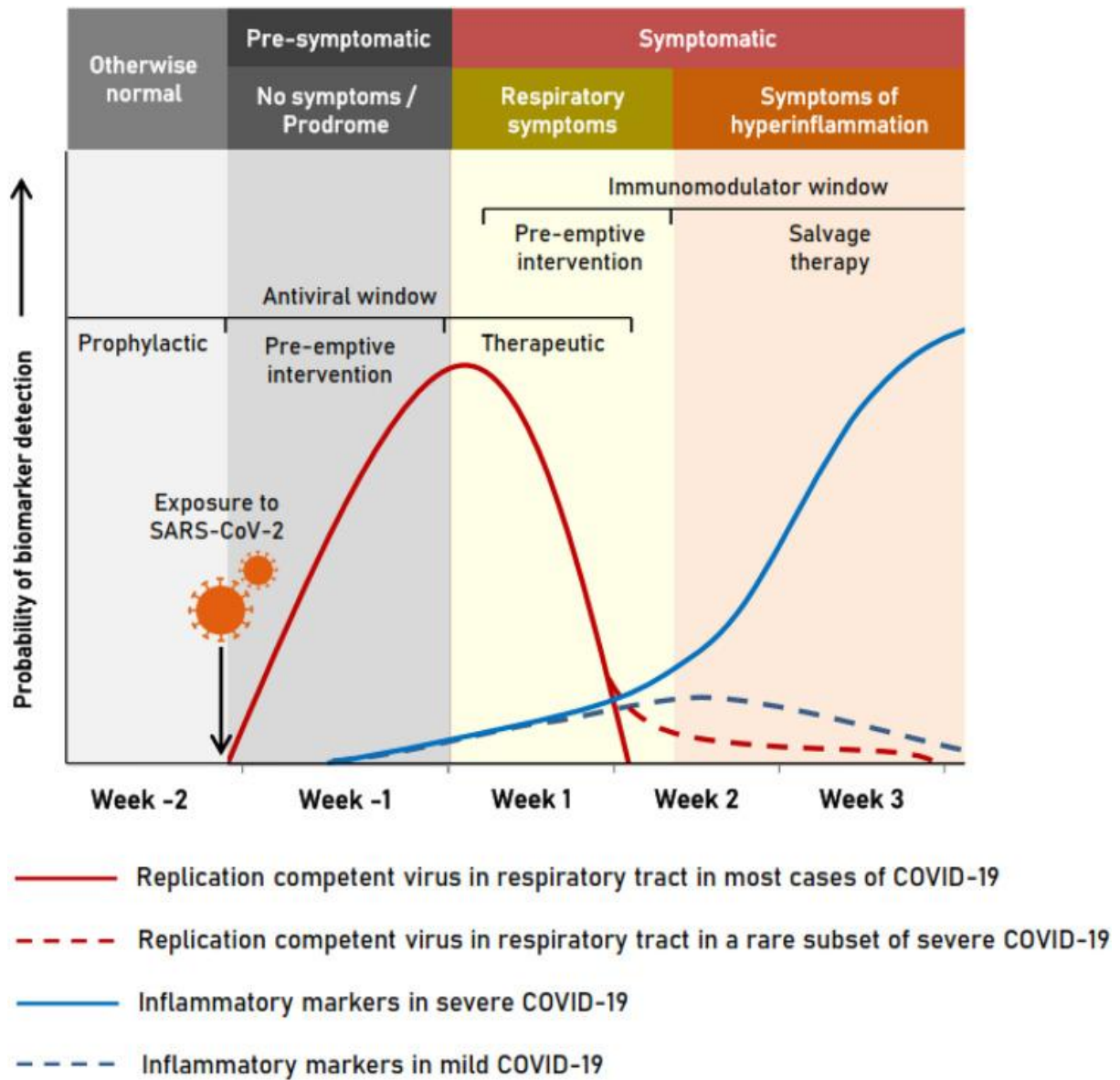


Figure 26 : Temporalité de la pathologie de la COVID-19 pour l'administration d'antiviraux et d'immunomodulateurs (Sundararaj Stanleyraj et al. 2021)

Une fois les molécules d'intérêt identifiées, d'autres études *in vivo* sur animaux ou cliniques sur l'homme, auront pour but d'établir la meilleure voie d'administration, le meilleur dosage pour éviter tout effet secondaire et surtout le moment précis où la molécule devra être administrée par rapport au déroulement de la maladie (Figure 26). En effet une même molécule antivirale peut avoir un effet contraire si mal administrée : dans l'exemple de la COVID-19, une administration d'anti-inflammatoire lors des étapes précoces de la pathologie pourrait exacerber l'infection virale, alors qu'une administration dans les phases tardives de la maladie, lorsque la charge virale est faible ou nulle et que l'auto-inflammation est très importante, peut sauver la vie du patient (Sundararaj Stanleyraj et al. 2021).

Une large base de données a été créée recensant toutes les molécules identifiées comme antivirales contre le SARS-CoV-2 *in vivo*, *in vitro* et *in silico*. Cette base de données quasi exhaustive donne des informations sur la qualité de l'identification de chaque molécule, à savoir s'il s'agit uniquement d'une identification lors d'un crible, d'une étude mécanistique approfondie, ou de test *in vivo* et essai clinique abouti (Figure 27) ((Kuleshov et al. 2020)). Ainsi, à ce jour 17 cribles CRISPR-Cas9 ont été réalisés, et 2583 molécules ont été identifiées comme ayant une activité contre le SARS-CoV-2, des chiffres en constante augmentation.

Il est possible à partir de molécules dont l'effet antiviral est déjà avéré, de modifier chimiquement leur structure pour améliorer leur effet antiviral, par exemple en augmentant leur stabilité, leur affinité avec leur cible et réduire les risques d'apparition de résistance. Enfin, il est possible de créer des molécules *de novo* en utilisant comme modèle des molécules déjà connues possédant un effet antiviral.

4.4 Le repositionnement de médicaments existants

Certains antiviraux suffisamment décrits dans la littérature avant l'apparition du SARS-CoV-2 ont été les premiers testés en essai clinique pour lutter contre la pandémie. D'autres médicaments disposant d'autorisation de mise sur le marché ont également été testés dans une stratégie de « repositionnement ». Dans la quasi-totalité des cas, l'efficacité de ces molécules n'a pas été prouvée par les essais cliniques.

The COVID-19 Drug and Gene Set Library

A collection of drug and gene sets related to COVID-19 research contributed by the community

568 drug sets 568 total

2583 unique drugs

722 gene sets 722 total

26162 unique genes

16 in-vitro drug screen drug sets

In-vitro drug screens to identify compounds that block SARS-CoV-2 replication in cell-based reporter assays.



106 differential expression signatures gene sets

Genome-wide differentially expressed genes in cells and tissues due to SARS-CoV-2 infection profiled with RNA-seq.



17 CRISPR screen gene sets

Genome-wide CRISPR screens to identify hits that increase or decrease SARS-CoV-2 proliferation in cell-based assays.



Drug sets | Gene sets

🔍 Experimental drug sets | 📄 Computational drug sets | 🐦 Twitter drug sets | 🌐 All drug sets

Draw a Venn diagram

Search in description, metadata or drugs:

Description	Drugs	DrugEnrich link
<input type="checkbox"/> 16 compounds reducing TMPRSS2 expression against SARS-CoV-2 from Chen et al. (2021)	15 drugs	🔗
<input type="checkbox"/> 32 hit compounds from TGFβ-induced ECM deposition assay in human lung fibroblasts from Marwick et al. (2021)	32 drugs	🔗

Figure 27 : « The COVID-19 Drug and Gene SET library », site en ligne regroupant une liste quasi exhaustive de composés identifiés pour avoir un effet antiviral contre le SARS-CoV-2. <https://maayanlab.cloud/covid19/>

L'hydroxychloroquine est un antiparasitaire utilisé contre le paludisme, précédemment identifié lors de criblage contre le MERS-CoV (de Wilde et al. 2014). Elle a récemment montré un effet inhibiteur contre le SARS-CoV-2 (Gendrot et al. 2020; Yao et al. 2020) *in vitro* et contre d'autres virus (Yan 2013). D'autres antiparasitaires comme la ferroquine et la chloroquine ont été testés mais sont moins efficaces que l'hydroxychloroquine (Gendrot et al. 2020). Dans un contexte hors parasite, l'hydroxychloroquine joue un rôle antiviral indirect en inhibant la voie d'endocytose des cellules, réduisant ainsi l'infection virale. Toutefois comme le SARS-CoV-2 utilise principalement la voie d'entrée membranaire avec la protéase TMPRSS2 *in vivo*, et non la voie endosomale, les nombreux essais cliniques n'ont montré aucune efficacité de l'hydroxychloroquine chez l'homme (Abella et al. 2021; Johnston et al. 2021; Ou et al. 2021; Sun et al. 2020)

Le remdesivir, ou GS 5734, est un analogue nucléotidique initialement étudié contre le virus Ebola (Tchesnokov et al. 2019). Il s'agit d'un inhibiteur de la réplication virale. Une fois métabolisé par l'organisme en une forme triphosphate, il va s'incorporer dans l'ARN viral et bloquer la réplication en inhibant la polymérase virale RdRp. Il s'est montré efficace *in vitro et vivo* sur plusieurs coronavirus (MERS-CoV, SARS-CoV, OC43, HCoV-299E, SARS-CoV-2) (Brown et al. 2019; Choy et al. 2020; Gordon et al. 2020; Sheahan et al. 2017, 2020). Il a été montré, dans un modèle de souris infectées par le MERS-CoV, qu'une mutation dans la RdRp du virus modifiant sa fonction exonucléase pouvait rendre le virus résistant à cet antiviral, mais avec une grande perte de fitness et de réduction de la sévérité de la maladie (Agostini et al. 2018). Les essais cliniques avec le remdesivir ont indiqué une légère amélioration de l'état de santé des patients avec COVID modéré et une décharge hospitalière plus rapide, mais aucune amélioration chez les cas sévères ni baisse du taux de mortalité (Al-Abdoun et al. 2021; Beigel et al. 2020; Lai et al. 2021; Skipper et al. 2020; Y. Wang et al. 2020)

La ribavirine, un autre analogue nucléotidique à large spectre, a été testée contre le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV. Etant beaucoup moins efficace que le Remdesivir (100 fois moins dans le cas du SARS-CoV-2), l'utilisation de cette molécule a rapidement été abandonnée (Ghanbari et al., 2020).

La combinaison lopinavir/ritonavir est un traitement utilisé pour traiter le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), il s'agit d'inhibiteurs de protéases. Il a été observé que ces molécules étaient capables d'inhiber la 3CLpro de SARS-CoV-2, ce qui a mené à lancer des essais cliniques pour son éventuelle utilisation dans le traitement de la Covid-19. Ceux-ci n'ont pas démontré une grande efficacité de lopinavir/ritonavir à réduire le temps

d'hospitalisation et le taux de mortalité, bien qu'une étude indique une réduction de l'apparition de symptômes sévères (Cao et al. 2020; Osborne et al. 2020). D'autres drogues anti VIH comme le danoprevir et le nelfinavir ont montré une efficacité à inhiber la protéase 3CLpro du SARS-CoV-2, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces molécules avec ou sans combinaison (H. Chen et al. 2020; Ghanbari et al. 2020).

L'ivermectine, une drogue antiparasitaire à spectre large, approuvée par la « Food and drug administration » (FDA)(González Canga et al. 2008), a montré des propriétés antivirales *in vitro* contre le VIH, la dengue, le virus du Nil occidental, et d'autres virus ARN (Caly et al. 2020; Tay et al. 2013; Wagstaff et al. 2012). Le mécanisme proposé pour l'effet antiviral de l'ivermectine est l'inhibition de l'import nucléaire par inhibition de l'importine alpha/beta (Kosyna et al. 2015). Dans le cas des coronavirus, cette inhibition empêcherait les protéines accessoires de rentrer dans le noyau et de jouer un rôle inhibiteur du système immunitaire inné cellulaire par la voie STAT. Une autre hypothèse est qu'il s'agit d'un effet indirect lié aux propriétés anti-inflammatoires de l'ivermectine. Chez les patients atteints de COVID-19 modéré, les essais clinique montrent que l'invermectine n'a qu'une légère réduction des symptômes et une amélioration de la vitesse de guérison de la perte de goût et odorat (Chaccour et al. 2021; Shahbaznejad et al. 2021). Toutefois aucune différence n' a été observée chez les cas sévères ou pour le taux de mortalité (Abd-Elsalam et al. 2021; López-Medina et al. 2021).

D'autres composés antibiotiques possédant, dans certaines conditions, une propriété antivirale à spectre large comme la doxycycline et l'azithromycine ont été testées en essais cliniques en combinaison avec des molécules citées plus haut. Dans le cas de l'hydroxychloroquine combinée à l'azithromycine, une augmentation de la mortalité a été observée (Fiolet et al. 2021). La combinaison doxycycline et ivermectine permet une guérison plus rapide chez les cas modérés et réduit les risques de progression vers un COVID sévère (Mahmud et al. 2021).

Étant donné l'absence d'effets bénéfiques pour les cas sévères, et l'effet bénéfique jugé trop faible pour les cas modérés comparés aux risques d'effets secondaires, les traitements listés ci-dessus ne sont actuellement pas approuvés comme antiviraux contre le SARS-CoV-2 et déconseillés par l'OMS et l'EMA pour traiter les patients hospitalisés.

4.5 Les antiviraux spécifiques des coronavirus

La recherche d'antiviraux spécifiques contre les coronavirus prend du temps. De nombreux composés avaient déjà préalablement été identifiés contre le SARS-CoV et le MERS-CoV. Certains ont été à nouveau identifiés lors de crible contre le SARS-CoV-2. L'activité antivirale de ces composés a été démontrée pour la plupart *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux et, pour un certain nombre d'entre eux, sont au stade d'essai clinique. Nous pouvons regrouper ces molécules selon l'étape du cycle viral ciblé.

4.5.1 Les inhibiteurs d'entrée

Les molécules identifiées comme inhibiteur de l'étape d'entrée vont cibler les protéines d'enveloppe du virus et/ou les récepteurs cellulaires pour bloquer l'attachement.

a) Les anticorps monoclonaux

Certaines molécules comme les anticorps monoclonaux ont pu être disponibles rapidement. Les anticorps monoclonaux sont principalement des immunoglobulines de type G, conçus à partir des lymphocytes B récupérés dans des souris immunisées par la protéine d'intérêt ou dans du sang de patient convalescent. Les lymphocytes sont alors fusionnés avec des mélanomes pour obtenir des lignées immortalisées produisant des IgG en continu. Les anticorps sont alors criblés contre le virus entier et les lignées produisant les meilleurs anticorps neutralisants sont sélectionnés pour être amplifiés. Tout comme des anticorps naturels, les anticorps monoclonaux sont capables de neutralisation mais aussi d'activer les molécules du complément, d'aider à la phagocytose via leur fragment Fc et de cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (Pelegrin, Naranjo-Gomez, et Piechaczyk 2015). Ils peuvent aussi être utilisés comme immuno-modulateurs lorsqu'ils ciblent un récepteur cellulaire aux cytokines inflammatoires (Stone et al. 2020).

Les traitements utilisant des anticorps monoclonaux est une solution qui avait déjà été étudiée précédemment contre le SARS-CoV et le MERS-COV. Des efforts de recherche ont été réalisés pour isoler des anticorps neutralisants ciblant spécifiquement la particule virale et pouvant être utilisés en tant que traitement thérapeutique. Des anticorps monoclonaux, pouvant neutraliser le MERS-CoV avec une haute affinité ont été décrits (Ying

et al. 2014). De plus, il a été montré que des anticorps issus de souris infectées par le MERS-CoV avaient le même pouvoir neutralisant que du sérum de patients convalescents (L. Wang et al. 2018; Xu et al. 2019) Plusieurs thérapies à base d'anticorps ont été élaborées contre le SARS-CoV-2.

Un mélange de 2 anticorps monoclonaux casirivimab et imdevimab, appelé RegnCoV2 créé par Regneron et ciblant la protéine S, ont montré de très bons résultats *in vivo* sur des hamsters et singes, réduisant le titre viral et sans effet toxique (Baum et al. 2020) et les effets ont été confirmés lors d'essais cliniques montrant une amélioration de taux de survie chez les cas sévères. Aucun effet n'est observé si le patient est déjà immunisé (vaccin ou réinfection) (Weinreich et al. 2021)

Le bamlanivimab a montré en essai clinique une réduction de la mortalité et des risques d'hospitalisation lorsqu'il est pris en prophylaxie, en réduisant la sévérité des symptômes (M. M. Alam et al. 2021; Chen et al. 2021).

Le RegnCoV2 et le bamlanivimab sont actuellement les 2 seuls traitements approuvés par l'OMS et l'EMA pour traiter les cas sévères de COVID-19 à l'hôpital. Malheureusement, une étude récente a montré une apparition de résistance à l'anticorps bamlanivimab utilisé en thérapie pour les variants Beta, Gamma et Delta. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles solutions thérapeutiques avant que de nouveaux variants totalement résistants aux anticorps monoclonaux fassent leur apparition (Hoffmann et al. 2021).

b) Les antiviraux à action directe

D'autres molécules peuvent cibler directement la particule virale et provoquer une déstabilisation de celle-ci. Empêcher l'entrée du virus dans la cellule est une stratégie nécessitant souvent la prise de la molécule dans les phases précoces de la maladie ou en prophylaxie.

Les peptides « HR2P » sont dérivés du domaine HR2 de la protéine S. Ce peptide est capable de se lier au domaine HR1, entrant en compétition avec le domaine HR2, bloquant ainsi le changement de conformation de la protéine S nécessaire à l'étape de fusion. Les résultats sur le SARS-CoV (Liu et al. 2004, Bosch et al. 2004), ont montré que l'utilisation d'un peptide dérivé de HR2 était beaucoup plus efficace qu'un peptide dérivé de HR1. Le principe a ensuite été appliqué avec succès contre le MERS-CoV, (Gao et al. 2013, Lu et al. 2014) montrant aussi que le peptide HR2P pouvait bloquer la formation du complexe 6HB, et que la modification du peptide par des résidus chargés peut stabiliser son interaction (Liang et al.

2018). Le HR2P possède une IC_{50} de 0,60 nM pour une CC_{50} de 40 μ M (Liu et al. 2015; Xia et al. 2014) et est efficace *in vivo* sur des souris humanisées (Channappanavar et al. 2015; Jiang et al. 2015). Le HR2P a été testé contre le MERS-CoV en essai clinique en combinaison avec des anticorps monoclonaux, réduisant l'infection de 90% (Wang et al. 2019). La même stratégie a été appliquée au SARS-CoV-2 (Kandeel et al. 2021; Outlaw et al. 2020; Xia et al. 2020) et a démontré une efficacité *in vitro* en épithélium primaire humain (VanPatten et al. 2020; Y. Zhu et al. 2020). Le peptide HR2P est un inhibiteur de fusion très prometteur et un traitement à base de HR2P sous forme de spray nasal est en cours de test pré-clinique au CIRI de Lyon.

La surfactine est un peptide isolé de *Bacillus subtilis* qui possède des propriétés antibiotiques mais aussi antivirales. En effet, elle peut s'intégrer dans les membranes virales et déclenche la disruption de celle-ci. L'effet semble être similaire contre tous les virus enveloppés dont les coronavirus (Johnson et al. 2019).

L'efficacité antivirale de peptides conçus à partir du récepteur ACE2, capables de se lier au RBD du domaine S1 et de bloquer l'attachement, a été démontrée contre le SARS-CoV (Hu et al. 2005; Xiu et al. 2020). Ce principe a été appliqué au SARS-CoV-2 en créant un peptide dérivé de ACE2 qui a montré une efficacité antivirale en empêchant l'interaction entre le ACE2 cellulaire et le RBD (Larue et al. 2021; Panda et al. 2021; Souza et al. 2021)

c) Les antiviraux à cible cellulaire

A l'Inverse des peptides dérivé du récepteur ACE2, un peptide dérivé du domaine S1 peut se lier à ACE2 et bloquer également l'attachement par compétition avec le virus (Ho et al. 2006). Aucune toxicité n'a été observée lors des études *in vitro* (Struck et al. 2012). Le peptide artificiel MLN-4760 est le plus puissant inhibiteur d'ACE2 connu, avec une concentration active de l'ordre du picomolaire, mais ses propriétés anti-coronavirus n'ont pas encore été vérifiées (Xiu et al. 2020).

La chlorpromazine, un médicament antipsychotique, a montré des effets anti-coronavirus contre le MERS-CoV (Dyall et al. 2014; de Wilde et al. 2014) et le SARS-CoV-2 *in vitro* (Plaze et al. 2021). Elle inhibe l'entrée du SARS-CoV-2 en inhibant l'endocytose clathrine-dépendant. Bien qu'assez toxique avec une SI de 2,4, les études de biodisponibilité ont montré une concentration dans les poumons de 20 à 200 fois supérieure au plasma sanguin.

Des molécules ciblant les protéases cellulaires comme la furine, les cathepsines, et TMPRSS2, nécessaires pour déclencher l'étape de fusion, sont également en cours d'étude.

L'arbidol, un inhibiteur de fusion du virus de la grippe, commercialisé en Chine et en Russie, est capable d'inhiber la fusion du SARS-CoV-2 (Xiu et al. 2020). La molécule ADS-J1 a été identifiée par criblage comme inhibiteur de fusion des coronavirus MERS-CoV et SARS-CoV (Chu et al. 2008; Zhao et al. 2013). Et le MDL-28170, un peptide inhibiteur des cathepsines L, est capable d'inhiber l'entrée du SARS-CoV (Cannalire et al. 2020).

Le camostat, est une molécule inhibitrice des protéases TMPRSS2, qui a permis de démontrer *in vitro* que les coronavirus MERS-CoV et SARS-CoV utilisent TMPRSS2 comme voie d'entrée (Shirato et al. 2013). Cette molécule a été étudiée pour ses potentielles utilisations thérapeutiques contre SARS-CoV-2. Bien que rapidement dégradée en 4-(4-guanidinobenzoyloxy) phenylacetic acid (GBPA) cette nouvelle forme conserve ses propriétés inhibitrices de TMPRSS2. D'autres études sont en cours pour déterminer l'utilité de cette molécule (Hoffmann et al. 2020). De même, le nafamostat a montré des propriétés inhibitrices de TMPRSS2 contre le MERS-CoV et le SARS-CoV2, empêchant ainsi l'étape de fusion à la membrane (Ghanbari et al. 2020).

4.5.2 Les inhibiteurs de la réplication

Certaines molécules ont été identifiées pour avoir une action inhibitrice plus tardive dans le cycle de réplication du coronavirus, en ciblant l'étape de réplication au sens large. Certains composés ciblent la première étape de la réplication, l'auto-clivage des poly protéines pp1a et pp1ab par les protéases PLpro et 3CLpro. L'inhibition de cette étape empêche la formation du complexe de réplication.

a) Les antiviraux à action directe

De nombreux inhibiteurs des protéases PLpro et 3CLpro ont été identifiés lors de plusieurs criblages de molécule, le X139 (Zumla et al. 2016) et le lopinavir/ritonavir (de Wilde et al. 2014) sur le MERS-CoV, ce dernier a été testé en essais cliniques contre SARS-CoV-2. De très nombreuses molécules avec des propriétés inhibitrices des protéases du coronavirus ont été identifiées par étude de docking et simulation 3D, ainsi que des tests enzymatiques (Ghosh et Malik 2020). Plusieurs de ces molécules ont été testées en infection virale sur cellule dans un contexte biologique *in vitro*, et certaines sont en essai clinique.

Par exemple, le GC-376, les calpain inhibitor II et XII, et le boceprevir ont été identifiés par interaction simulée en spectrométrie de masse, puis ensuite vérifiée en condition infectieuse (Ma et al. 2020)

Le diméthylamiloride, un composé chimique dérivé de la guanidine, est capable de se fixer au 5'UTR des ARN du SARS-CoV-2, son mécanisme d'action sur d'autre virus a montré qu'il empêchait la reconnaissance des IRES par les ribosomes et bloque la traduction. Toutefois aucun test de cytotoxicité n'a encore été effectué pour cette molécule (Zafferani et al. 2020).

Récemment une molécule à prise orale nommée PF-07321332 (paxlovid), issue d'interactions simulées par ordinateur avec la protéase 3CLpro du SARS-CoV-2, a été synthétisée et est actuellement en cours d'essai clinique par Pfizer (Pavan et al. 2021) (NCT04756531).

Une autre nouvelle molécule à prise orale, le molnupiravir (aussi nommé EIDD-2801/MK-4482 ou N⁴-hydroxycytidine) développée par Merck, est un analogue nucléosidique en cours d'évaluation contre le SARS-CoV-2. Créé initialement contre la grippe et l'hépatite C, cet antiviral est capable d'inhiber la réplication en s'incorporant dans l'ARN viral nouvellement synthétisé par la RdRp à la place d'une cytidine ou d'une uridine (Kabinger 2021). Il va ensuite s'apparier de manière stable avec le nucléoside complémentaire, empêchant ainsi la détection et la correction de l'erreur de réplication par l'exonucléase des coronavirus. Le molnupiravir a montré son efficacité *in vivo* chez les hamsters syriens et les furets (Abdelnabi et al. 2021; Cox, Wolf, et Plemper 2021). Lors des essais cliniques de phase 1, il n'a montré aucun effet secondaire important chez l'homme et une réduction significative de la charge virale lorsqu'il est administré oralement dans les 7 jours après le début des symptômes. (Fischer et al. 2021; Painter et al. 2021). Des essais cliniques de phase 2/3 sont en cours sur des cohortes plus larges et devraient s'achever en janvier 2022 (NCT04405739).

b) Les antiviraux à cible cellulaire

La thérapie interféron a été étudiée dans le cas du SARS-CoV-2, en effet la capacité du SARS-CoV-2 à inhiber la réponse interféron réduit fortement l'efficacité de l'immunité innée en début d'infection. Les études cliniques ont montré qu'une administration d'interféron de type bêta 1b permet d'accélérer la guérison chez les cas modérés, mais n'ont aucun effet chez les cas sévères qui en sont déjà au stade d'hyper-inflammation (Alavi Darazam et al. 2021; Rahmani et al. 2020).

La plitidepsine, un composé extrait de *Ascidies aplidiumalbicans* causant l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la croissance tumorale et utilisé en cancérologie, a été identifiée comme un inhibiteur du SARS-CoV-2. Cette molécule cible eEF1A est un facteur cellulaire utilisé par de nombreux virus pour leur réplication. De ce fait, elle est capable d'inhiber le SARS-CoV2 *in vitro et in vivo* en modèle animal et a montré des résultats encourageants en essais cliniques lors de sa phase 1/2, et sa phase 3 est en cours (NCT04784559) (White et al. 2021).

5 - Les plantes comme sources de médicaments

Certaines plantes sont utilisées pour leurs propriétés médicales depuis plusieurs milliers d'années et sont une source de composés naturels non décrits pouvant posséder des propriétés antivirales. A ce jour encore 80% de la population mondiale utilise et consomme des plantes selon l'OMS (Dias, Urban, et Roessner 2012).

5.1 La médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle est l'utilisation des plantes et produits naturels de manière brute (broyat et décoction de feuilles, racines...) dans le but de traiter des symptômes pathologiques ou stimuler les défenses immunitaires (Yang et al. 2020), à la différence de la médecine moderne qui utilise une molécule spécifique, qui peut être naturelle et issue des plantes. A ce jour, les pays asiatiques et principalement la Chine, utilisent les médecines traditionnelles de façon courante et parfois même en complément de la médecine moderne. Ainsi, lors de l'épidémie de SARS-CoV-2, différents lots de plantes et d'extraits ont été proposés pour soigner les différents stades de la COVID-19 (Ang et al. 2020; Yang et al. 2020) et ont été testés en essais cliniques, (S. Alam et al. 2021) montrant une réduction de la durée de certains symptômes et une stimulation des lymphocytes T CD8+ et CD4+.

5.2 Les molécules naturelles dans les médicaments

De nombreuses molécules utilisées actuellement en médecine moderne ont été isolées dans les plantes. Par exemple, la morphine isolée de *Papaver somniferum*, l'aspirine dérivée de la salicine, isolée à partir de l'écorce de *Salix alba* et l'artémisine, un médicament contre la malaria qui est isolé de *Artemisia annua* (Dias et al. 2012). Bien sûr, il existe aussi des composés ciblant des virus d'origine naturelle. Comme l'oseltamivir contre la grippe (Newman et Cragg 2012). Ces molécules font partie des « métabolites secondaires » non nécessaires à la croissance végétale mais présents dans un but précis (défense contre les prédateurs, pigmentation, survie face à un environnement hostile) (Dias et al. 2012). Une fois la molécule d'intérêt identifiée, il est possible de la recréer synthétiquement et de la modifier pour créer des analogues plus stables ou plus efficaces (Newman et Cragg 2012).

5.3 Les stratégies pour identifier des molécules naturelles

Deux stratégies sont utilisées pour l'identification de composés naturels, la première consiste en un criblage de banques molécules connues, de façon identique au crible décrit plus haut. La deuxième consiste à cribler des extraits bruts de plantes, généralement sélectionnées pour leur particularité ethnopharmacologique et leur utilisation en médecine traditionnelle. Ces plantes peuvent aussi être choisies à l'aveugle. Les extraits ainsi obtenus sont soumis à un fractionnement bioguidé afin d'isoler le(s) principe(s) actif(s) (Figure 28) (Bhuiyan et al. 2020).

5.3.1 L'ethnopharmacologie

L'ethnopharmacologie est l'étude de produit naturel a propriété médical dérivé des plantes. Une grande partie des études d'ethnopharmacologie se fait sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle. la médecine traditionnelle comprend les connaissances, compétences et pratiques utilisées dans le traitement, la prévention et le diagnostic de maladies physiques et mentales au sein de différentes cultures. Ainsi lors de la recherche de molécules antivirales, on peut se baser sur des études d'ethnopharmacologie pour pré-sélectionner des plantes utilisées en médecine traditionnelle contre des symptômes pouvant être causés par le pathogène d'intérêt. Il est possible aussi de cribler des « banques » de plantes « à l'aveugle » sans discrimination par rapport à leurs propriétés ou leur utilisation en médecine traditionnelle

5.3.2 L'expérience du laboratoire sur le VHC

L'équipe de Dr Karin Séron dans le laboratoire de Virologie Moléculaire et Cellulaire du CIIL a déjà identifié plusieurs antiviraux naturels contre le VHC. L'EGCG présent dans l'extrait de thé vert (Calland et al. 2012), la delphinidine, pigment rouge de fleurs et de fruit (Calland et al. 2015) et le dehydrojuncusol (Sahuc et al. 2019), extrait du jonc de mer et identifié par fractionnement bioguidé. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué cette thèse possède donc toutes les compétences et les outils pour permettre d'identifier et de décrire de nouveaux composés d'origine naturelle contre les coronavirus.

5.3.3 Le fractionnement bioguidé

Le fractionnement bioguidé est une approche permettant la séparation de différentes molécules présentes dans un extrait (de plante en l'occurrence) et qui, en étant guidé par des tests biologiques, permet d'identifier la ou les molécules d'intérêt. De nombreuses méthodes de séparation peuvent être utilisées, seules ou en combinaison.

Après un premier criblage d'extraits bruts de plantes, la première étape consiste souvent à séparer les milliers de molécules présentes dans une plante ou partie de plante (feuille, tige...) active en utilisant successivement différents solvants via des extractions solide/liquide. Ces solvants possèdent généralement une polarité croissante et vont permettre d'extraire des molécules différentes de la plante, des plus lipophiles ou plus hydrophiles. Après macération dans un premier solvant, le filtrat est conservé (1^{er} extrait), et la partie de plante restante après extraction (marc) est séchée puis macérée avec un autre solvant, et ainsi de suite. Les solvants utilisés peuvent être l'eau, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane ou encore l'acétate d'éthyle. Chacun des filtrats obtenus est évaporé à sec, conservé au frais, puis dissous dans un solvant tel que le DMSO pour des tests biologiques. A chaque extraction, une partie des molécules (fraction) sera extraite selon leur affinité avec le solvant utilisé. On obtient ainsi différentes fractions qui sont alors testées contre le pathogène d'intérêt comme un virus. La (ou les) fractions contenant l'effet antiviral est alors sélectionnée pour être refractionnée par une autre méthode de fractionnement, par exemple sur colonne de chromatographie. Les molécules de la fraction sont injectées dans une colonne où elles vont s'adsorber, puis différents solvants, encore une fois de différentes polarités, sont utilisés pour élué les molécules de la colonne en de multiples fractions qui vont être analysées par la suite. Lorsque suffisamment d'étapes de fractionnement ont été effectuées, on obtient alors une fraction pure ou quasi pure correspondant à une seule molécule. Il est alors possible de l'identifier par spectrométrie de masse et Résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le composé pur obtenu est ensuite testé *in vitro*, éventuellement *in vivo*, voire en essais cliniques selon l'efficacité et l'utilité de la molécule en question. Il est aussi possible de modifier chimiquement le composé obtenu afin d'améliorer sa stabilité et d'autres propriétés physico-chimiques si nécessaire (Bhuiyan et al. 2020, Zulma et al. 2016).

1. Plant selection, Identification, collection and sample preparation

Collection, Herbarium and Authentication of antiviral properties bearing plant by a taxonomist and preparation of sample



Sample Plant

2. Primary screening

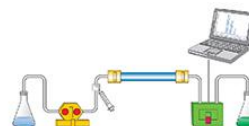
Plant crude extract preparation using plant parts (Root, stem, Leaf, flower) Bioassays, Toxicology



Crude preparation

3. Secondary screening

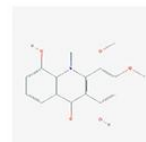
Compound separation, Purification, qualitative and quantitative Analysis, bioassay of pure compound, Toxicology



Purification

4. Tertiary screening

Structure elucidation, structure modification and bioassay, Toxicology and synthesis



Structure elucidation

5. Preclinical trial

Lead identification, lead optimization and lead development



In vitro

6. Clinical trial

Phase I, Phase II, Phase III trial and treatment review



In vivo

7. Authority Approval

Review of the trial and final approval



Figure 28 : Stratégie d'identification de composé antiviral à partir de plante (Bhuiyan et al. 2020)

5.4 Les molécules naturelles contre les coronavirus

Dans la course aux antiviraux contre le SARS-CoV-2, les molécules naturelles ont fait l'objet de nombreuses études (Llivosaca-Contreras et al. 2021; Zumla et al. 2016). Plusieurs composés d'origine naturelle aux propriétés antivirales ont également été identifiés contre le SARS-CoV et le MERS-CoV, et de nombreuses banques de molécules naturelles ont été criblées contre le SARS-CoV-2. Certaines études n'ont pas identifié de principes actifs mais uniquement des extraits bruts ou des fractions d'extraits de plantes possédant des effets anti-coronavirus.

Plusieurs familles de molécules naturelles sont étudiées pour leur propriété ethnopharmacologique. Par exemple les flavonoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes, lectines, saponines et tannins regroupent des molécules identifiées comme antivirales. Dans la majorité des cas le mécanisme d'action n'a pas été clairement élucidé mais pour certaines il a été possible de déterminer un mécanisme d'action directe ou action cellulaire immuno-modulateur (Alhadrami et al. 2021; Anand et al. 2021; Ebob, Babiaka, et Ntie-Kang 2021; Gour et al. 2021; Omrani et al. 2021).

5.4.1 Les molécules naturelles à action directe

La griffithsin est une lectine extraite de l'algue rouge *Griffithsia*, identifiée pour son activité antivirale contre le VIH et le VHC. Des études ont montré qu'elle possédait également une activité anti-coronavirus contre le SARS-CoV et le MERS-CoV, en empêchant l'étape d'attachement en se fixant sur la protéine S au niveau des résidus glycosylés (Barton et al. 2016; Millet et al. 2016; O'Keefe et al. 2010). La griffithsin est peu toxique et est stable 96 h *in vivo* après administration orale ou intraveineuse chez les souris et inhibe l'entrée du virus SARS-CoV-2. Etant donné les similitudes structurelles entre SARS-CoV et SARS-CoV2, il est supposé qu'il s'agit du même mécanisme d'action (Alsaïdi et al. 2021; Cai et al. 2020).

L'émétine est une molécule appartenant à la famille des alcaloïdes, extraite de l'ipéca et utilisée comme anti-protozoaire et anti-malaria. Elle a montré un effet antiviral contre les virus à ARN notamment durant l'étape d'entrée contre les virus SARS-CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires et se retrouve concentrée dans les poumons lors des études *in vivo* chez la souris (Choy et al. 2020; Shen et al. 2019; A. Wang et al. 2020). Son utilisation est limitée à cause de ses effets toxiques pour le cœur à

trop forte dose. L'émétine a été utilisée lors un essai clinique de phase 1 contre le SARS-CoV-2 et a permis une très légère amélioration de l'état des patients notamment dans la saturation en oxygène présente dans le sang. D'autres études sont nécessaires afin de savoir si l'émétine peut être un bon antiviral contre les coronavirus (Fan et al. 2021).

La lycorine est un alcaloïde extrait des plantes de la famille *amaryllidaceae* comme *Lycoris radiata*, utilisée en médecine traditionnelle pour soigner les laryngites (Mandal, Jha, et Hazra 2021). Des études *in vitro* ont montré que la lycorine est capable de se fixer sur le site catalytique de la RdRp et d'inhiber la réplication du MERS-CoV et SARS-CoV-2 (Jin et al. 2021; Min, Kwon, et Jin 2021; Zhang et al. 2020).

5.4.2 Les molécules naturelles à cible cellulaire

La cryptotanshinone est une quinone extraite de *Salvia miltiorrhiza Bunge* utilisée en médecine traditionnelle contre les maladies cardiaques. Elle est capable de cibler la protéase TMPRSS2 et de réduire son expression à la surface cellulaire, ce qui en fait un antiviral potentiel contre les coronavirus (Xu et al. 2012).

La curcumine est un polyphénol extrait de la racine du *Curcuma longa*. Elle a la capacité de réduire la production de multiples cytokines inflammatoires impliquées dans de nombreuses maladies dont la COVID-19 (Ahmadi et al. 2021). Un essai clinique a montré que les symptômes étaient présents moins longtemps dans le groupe traité à la curcumine et qu'aucun effet secondaire n'avait été observé (Ahmadi et al. 2021).

Le resveratrol, une molécule naturelle contenue dans le raisin, connue pour ses propriétés anticancéreuses, a été identifié comme inhibiteur de HCoV-229E, MERS-CoV et SARS-CoV-2 *in vitro* avec une faible toxicité cellulaire (McKee et al. 2020; Pasquereau et al. 2021). Le resveratrol possède des propriétés anti-inflammatoires, réduisant la production d'interférons alpha, beta, IL-6 et TNF- α (de Sá Coutinho et al. 2018), ce qui peut réduire les dégâts causés lors des phases hyper-inflammatoires du COVID-19. Le resveratrol a montré une activité antivirale contre le SARS-CoV-2 dans un modèle d'épithélium humain primaire bronchial en interface air-liquide (ter Ellen et al. 2021).

Le silvestrol est un composé extrait de l'écorce de *Aglaia silvestris*. Il est capable d'inhiber EIF4A, un facteur cellulaire nécessaire à la traduction de certains ARN messagers. L'inhibition de EIF4A provoque une inhibition de la réplication chez plusieurs virus comme Ebola, Zika, hépatite E et les coronavirus (Müller et al. 2018, 2020, 2021). Le silvestrol

possède aussi une activité anti-inflammatoire en réduisant la production d'IL-10 et IL-6 (Blum et al. 2020).

La glycyrrhizine, un triterpénoïde saponine extrait de la racine de réglisse, possède une activité antivirale contre plusieurs virus comme le HIV, l'herpès et les flavivirus (Cinatl et al. 2003; Hoever et al. 2005). Elle a des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulateur, réduisant la production de cytokines comme l'IL-4, IL-33 et l'IL-13 qui sont présentes dans les syndromes ARDS suite à l'infection par le SARS-CoV-2 mais augmente la production d'interférons gamma, IL-6 et IL-10. Elle est aussi capable de réduire la concentration du cholestérol dans les radeaux lipidiques, pouvant indirectement affecter l'entrée des coronavirus (Bailly et Vergoten 2020).

Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse d'extrait brut de plantes connues pour leur efficacité en médecine traditionnelle et leur propriété ethno-pharmacologique (Anand et al. 2021; Mandal et al. 2021). Ainsi, plusieurs extraits de plantes comme *Houttuynia cordata*, *Broussonetia papyrifera*, *Cinnamomi cortex*, *Toona sinensis roem*, *Torreya nucifera* ont montré des propriétés antivirales contre les coronavirus, notamment contre les protéases PLpro et 3CLpro (Alsenani 2021; Anand et al. 2021; Anywar, Akram, et Chishti 2021; Chen et al. 2008; Mandal et al. 2021; Park et al. 2017; Zhuang et al. 2009). Dans certains cas, le principe actif a pu être isolé comme la Panduratine A identifiée contre le SARS-CoV-2 à partir de l'extrait de *Boesenbergia rotunda* (Kanjanasirirat et al. 2020).

De nombreux criblages de banque de molécules naturelles, dont la structure moléculaire est connue, ont été effectués *in silico* et en simulation d'appariements conformationnels virtuels contre les protéases virales 3CLpro et PLpro ainsi que la RdRp et sa capacité à se lier au RBD (Bharadwaj et al. 2021; Fadaka et al. 2021; Gyebi et al. 2020; Jang et al. 2021; Jo et al. 2020; Lung et al. 2020; Teli, Shah, et Chhabria 2021). La majorité de ces composés identifiés n'ont pas été vérifiés dans un modèle infectieux cellulaire mais certains ont pu confirmer leurs hits lors de cribles secondaires utilisant des pseudo-particules ou titre infectieux (D. Li et al. 2021; Zhang et al. 2021). Ces études ont permis la présélection de nombreux composés à moindre coût qui doivent maintenant être analysés de manière plus précise. Il est difficile de citer tous les produits naturels d'origine végétale qui sont actifs contre les coronavirus. Plusieurs revues récentes permettent d'avoir une vision d'ensemble de la littérature (Alsenani 2021; Ebob et al. 2021; Kim 2021; Llivisaca-Contreras et al. 2021; Omrani et al. 2021; Remali et Aizat 2021).

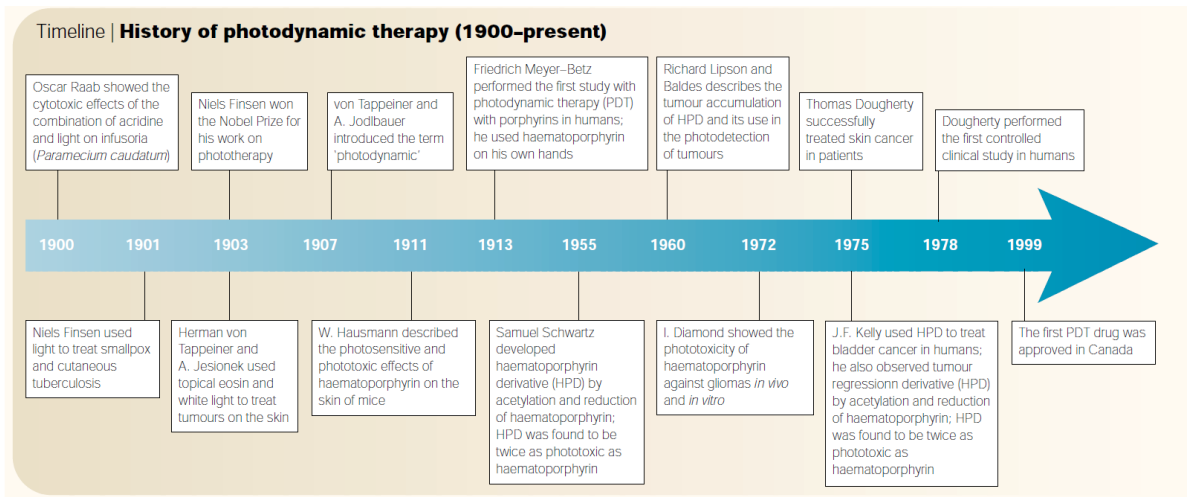


Figure 29 : Evolution de la thérapie photodynamique de 1900 à 2000 (Dolmans, Fukumura, et Jain 2003)

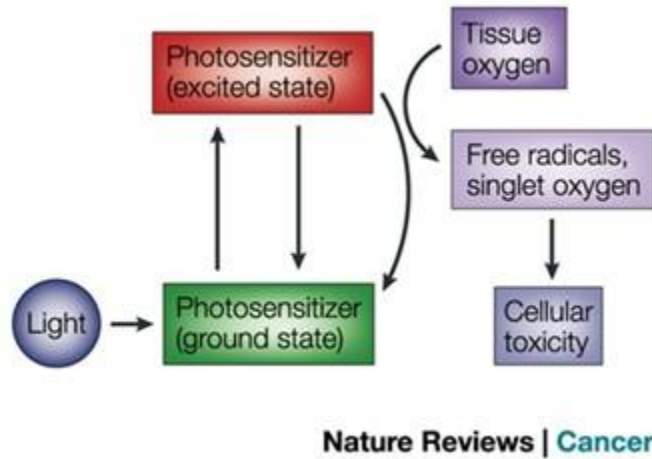


Figure 30 : Principe de la thérapie photodynamique (PTD) (Dolmans et al. 2003)

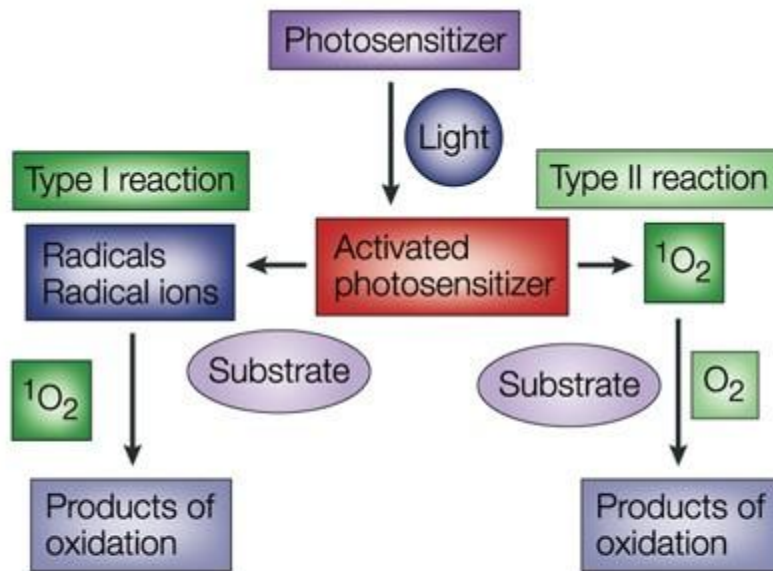
6 - LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

La lumière a été utilisée comme thérapie dans l'Égypte ancienne, l'Inde, la Chine depuis plus de 3000 ans pour soigner diverses maladies. La photothérapie moderne n'a été développée qu'à la fin du 19^e siècle lorsqu'il a été montré que la lumière rouge et les UV pouvaient servir à soigner des maladies de la peau (Figure 29) (Dolmans et al. 2003). La thérapie photodynamique (« photodynamic therapy », PDT) a vu le jour en 1903 lorsqu'une tumeur de la peau a été traitée avec l'application locale d'éosine et de lumière blanche (D'Cruz et al. 2001).

Le principe de la PDT est d'utiliser les propriétés d'un photosensibilisateur qui va indirectement oxyder des éléments organiques environnants grâce aux oxygènes singulets formés en présence de lumière (Figure 30). Comme le photosensibilisateur est inerte en absence de lumière, le principe consiste à administrer la molécule puis à irradier, à une longueur d'onde appropriée, uniquement la zone que l'on souhaite traiter, la tumeur. Ainsi les oxygènes singulets oxydants ne sont créés qu'aux alentours de la tumeur. La PDT peut être utilisée seule ou en complément d'autres chimiothérapies classiques (Agostinis et al. 2011).

6.1 Les photosensibilisateurs

Les molécules photosensibilisantes ou photosensibilisateurs sont des molécules capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour changer la nature des molécules voisines. Suite à l'exposition à la lumière à une longueur d'onde spécifique, le photosensibilisateur va adopter une conformation « active », dans laquelle il va pouvoir donner un électron ou soustraire un atome d'hydrogène à des molécules proches. Après quoi, il retourne rapidement (quelques milli secondes) dans sa forme non active. Il peut ensuite être réactivé suite à une nouvelle exposition à la lumière. De nombreux photosensibilisateurs activés à différentes longueurs d'onde lumineuse ont été décrits (Wilson 2002:20). Les photosensibilisateurs sont capables d'interagir avec les molécules environnantes par un processus appelé photosensibilisation, suivant deux mécanismes distincts (Figure 31) :



Nature Reviews | Cancer

Figure 31 : Mécanisme d'oxydation par photoactivation (Dolmans et al. 2003).

Le mécanisme de type 1, où le photosensibilisateur va réagir avec un substrat autre que l'oxygène par un transfert de charge, modifiant la nature du substrat, le substrat va ensuite réagir avec une molécule d'oxygène pour devenir un produit oxydé (Gómez Alvarez et al. 2012).

Le mécanisme de type 2, où le photo-sensibilisateur va réagir avec une molécule d'oxygène $^3\text{O}_2$, ce qui va transformer l'oxygène en oxygène singulet $^1\text{O}_2$ qui est une forme active de l'oxygène (ROS). Cet oxygène singulet va ensuite, à son tour, réagir avec d'autres molécules organiques avoisinantes sous forme d'oxydation (Jiang et Weiss 2020).

Les photosensibilisateurs utilisant un mécanisme de type 2 sont très utilisés en PTD.

6.2 Les applications de la PDT

La première utilisation de la PDT chez l'homme a eu lieu en 1976, avec l'utilisation de l'hématoporphyrine comme photosensibilisateur pour traiter le cancer de la vessie (Kelly et Snell 1976). Depuis, de multiples études ont été menées visant à identifier les molécules photosensibilisantes les plus efficaces, la majorité d'entre elles sont des tétrapyrroles (Dos Santos et al. 2019; Hamblin 2020) .

La photofrin est un photosensibilisateur synthétique dérivé directement de l'hématoporphyrine, elle fut la première molécule à être approuvée par la FDA contre les cancers de la vessie, des poumons, et de l'oropharynx entre 1993 et 1998. La témoporfin (ou Foscan) fut approuvée dans les années 2000 en Europe mais a été refusée par la FDA. Elle est utilisée en PDT contre les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures. La verteporfin, de la famille des chlorines, fut approuvée dans les années 2000 contre le cancer néovasculaire. Le talaporfin sodium, un dérivé de la chlorine E6, a été approuvé au Japon pour son utilisation en PDT contre le cancer des poumons en 2004. Le Tookad ou padeliporfin, dérivés du bactériophéophorbide, sont utilisés en PDT pour traiter le cancer de la prostate depuis 2017.

Les composés listé ci-dessus sont encore en essais cliniques pour leur utilisation en PDT contre d'autres types de cancer comme le cancer du sein, du pancréas, de la peau, des mélanomes avancés, du cancer du rein et de la prostate (Agostinis et al. 2011; Dos Santos et al. 2019; Hamblin 2020). Mais d'autres candidats photosensibilisateurs synthétiques encore non approuvés sont en cours d'essais cliniques (Dos Santos et al. 2019; Hamblin 2020). Par exemple le 2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a « HPPH » ou Photochlor, un dérivé du pyropheophorbide a été testé en essai clinique contre le cancer de l'oropharynx et le cancer des poumons. Le redaporfin, dérivé de la bactériochlorine est étudié contre les cancers oraux-pharyngés.

6.3 L'inactivation photodynamique (PDI)

Si les photosensibilisateurs sont capables de détruire des cellules cancéreuses, certains sont aussi capables d'attaquer les micro-organismes pathogènes, virus ou bactéries : on parle alors d'inactivation photo-dynamique (« photodynamic inactivation », PDI). Le photosensibilisateur doit être assez proche de sa cible pour que l'effet d'inactivation lié au ROS puisse avoir lieu. Ainsi, dans le cas des bactéries, il est nécessaire que le photosensibilisateur soit capable d'être absorbé par celle-ci pour créer des dégâts à l'intérieur du microorganisme (Costa et al. 2012). Lors de son utilisation contre les virus, il est supposé que le mécanisme de PDI de type 2 est largement majoritaire. Les oxygènes singlets vont alors créer un stress oxydatif sur les protéines, membrane, et les acides nucléiques selon le photosensibilisateur utilisé et le virus ciblé. Il a été observé que les virus enveloppés étaient plus rapidement inactivés par la PDI, indiquant une plus grande susceptibilité d'inactivation via oxydation des membranes lipidiques (Costa et al. 2012; Vigant et al. 2013). De nombreux photo-sensibilisateurs ont déjà été identifiés comme pouvant réaliser de la PDI. La majorité sont des tétrapyrroles comme les chlorines et les bactériochlorines, de nombreux analogues ont pu être synthétisés comme le montre la figure 32, tous capables de PDI. D'autres sont dépourvus de cycles tétrapyrroles mais sont quand même capables de PDI : cela peut être des molécules naturelles comme l'hypericine ou des colorants synthétiques comme le rose Bengale, l'éosine, et le bleu de méthylène (Figure 33).

Vigant et al ont démontré que le photosensibilisateur LJ001 pouvait inactiver l'étape de fusion du virus herpès simplex, du virus Sendai, du virus de la maladie de Newcastle et du virus des stomatites virales. La production d'oxygène singulet par la molécule LJ001 en présence de lumière, engendre une oxydation des phospholipides membranaires, ce qui a pour conséquence une perte de fluidité de la membrane virale qui est alors incapable de fusionner avec la membrane cellulaire (Vigant et al. 2013, 2014; Vigant, Santos, et Lee 2015).

Des études récentes ont montré que la chlorine E6, la protoporphyrine IX, la Zinc-protoporphyrine IX et la mesoporphyrine IX étaient capables de PDI sur plusieurs virus enveloppés (le VHC, le VHB, le VIH, le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune, le virus de Marburg, le virus Junin, le virus de la stomatite virale et le Tacaribe virus) via la production d'oxygène singulet en présence de lumière (Cruz-Oliveira et al. 2017; Lebedeva et al. 2020). De façon intéressante, leurs propriétés antivirales avaient déjà été identifiées sur HIV-1, le virus de la vaccine, DENV-2, HSV-1, MARV, JUNV, TCRV et HBV, mais sans la

démonstration du mécanisme de photoinactivation (Chen-Collins et al. 2003; Guo et al. 2011; Vzorov et al. 2002). Certains photosensibilisateurs seraient capables d'avoir un effet antiviral indépendant de la PDI (Chen-Collins et al. 2003). Deux études récentes ont montré que la protoporphyrine IX était capable d'inhiber le SARS-CoV-2, mais aucune n'a étudié l'effet de la lumière sur cette activité, identifiant plutôt une inhibition de l'attachement du virus au récepteur ACE2 (Gu et al. 2021; Lu et al. 2021). L'activité antivirale *in vivo* chez la souris n'a pas pu être démontrée dans l'une des deux études (Lu et al. 2021). L'absence de lumière dans les poumons de l'animal ne permet pas d'obtenir la PDI du virus. L'autre étude montre un effet protecteur chez la souris mais les virus ont été pré-incubés à la lumière avec la molécule, inactivant le virus avant l'infection de l'animal (Gu et al. 2021).

6.4 Les photosensibilisateurs naturels

6.4.1 Les différentes molécules

L'utilisation de molécules naturelles comme photosensibilisateur pour la PDT a deux avantages : des molécules faciles à produire à moindre coût, et souvent moins toxiques que leurs homologues synthétiques (Hajri et al. 2007; Mansoori et al. 2019). L'analyse de certaines plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise dans des techniques de PDT ont permis d'identifier plusieurs molécules naturelles pouvant jouer le rôle de photosensibilisateur, la tolyporphine, la curcumine, et l'hypericin (Mansoori et al. 2019). Malheureusement les premiers essais cliniques avec ces molécules ont révélé deux problèmes : des difficultés de solubilisation pouvant causer des caillots sanguins et la nécessité d'utiliser des longueurs d'onde dans le bleu et l'ultra-violet qui pénètrent mal les tissus organiques (Mansoori et al. 2019).

6.3.2 Le phéophorbide a (Pba)

La chlorophylle est une molécule qui appartient à la famille des tétrapyrroles. Les pigments de type tétrapyrrole ont pour rôle de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. Lors de la photosynthèse cette énergie est utilisée pour réduire le CO₂ en O₂ mais aussi pour produire de l'ATP. La chlorophylle est un pigment de couleur verte capable d'absorber les longueurs d'ondes dans le bleu et le rouge. Il existe 4 formes de chlorophylle, a, b, c, d, et f mais toutes possèdent un ion Mg²⁺ au centre de leur cycle tétrapyrrole. La forme chlorophylle a est la plus abondante et constitue la molécule clé pour la photosynthèse chez de nombreux organismes (Solymosi et Mysliwa-Kurdziel 2017).

La chlorophylle peut être dégradée en des produits multiples suite à une augmentation de la température, une acidification du pH, ou à une action de la chlorophylase. La quantité de produit de dégradation de la chlorophylle varie selon les espèces de plantes en fonction de leur teneur en chlorophylase et de la méthode de dégradation (acide/température) (Holden 1974). Ce genre de réaction se produit couramment en ingérant ou cuisinant des aliments contenant de la chlorophylle. Deux produits de dégradation de la chlorophylle ingérés régulièrement par l'homme sont la phéophytine et le phéophorbide. La chlorophylase présente dans les plantes est activée à la chaleur entre 60 à 82 °C, son activation, lors de la cuisson des aliments, transforme la chlorophylle en chlorophyllide, ensuite transformée en phéophorbide par un pH acide lors de la digestion des végétaux (Figure 34) (Saide, Lauritano, et Ianora 2020; Yilmaz et Gökmen 2016). La phéophytine est retrouvée à 90% dans les fèces après ingestion orale alors que le phéophorbide est absorbé 65 fois mieux que la phéophytine par les cellules épithéliales du tractus intestinal humain.

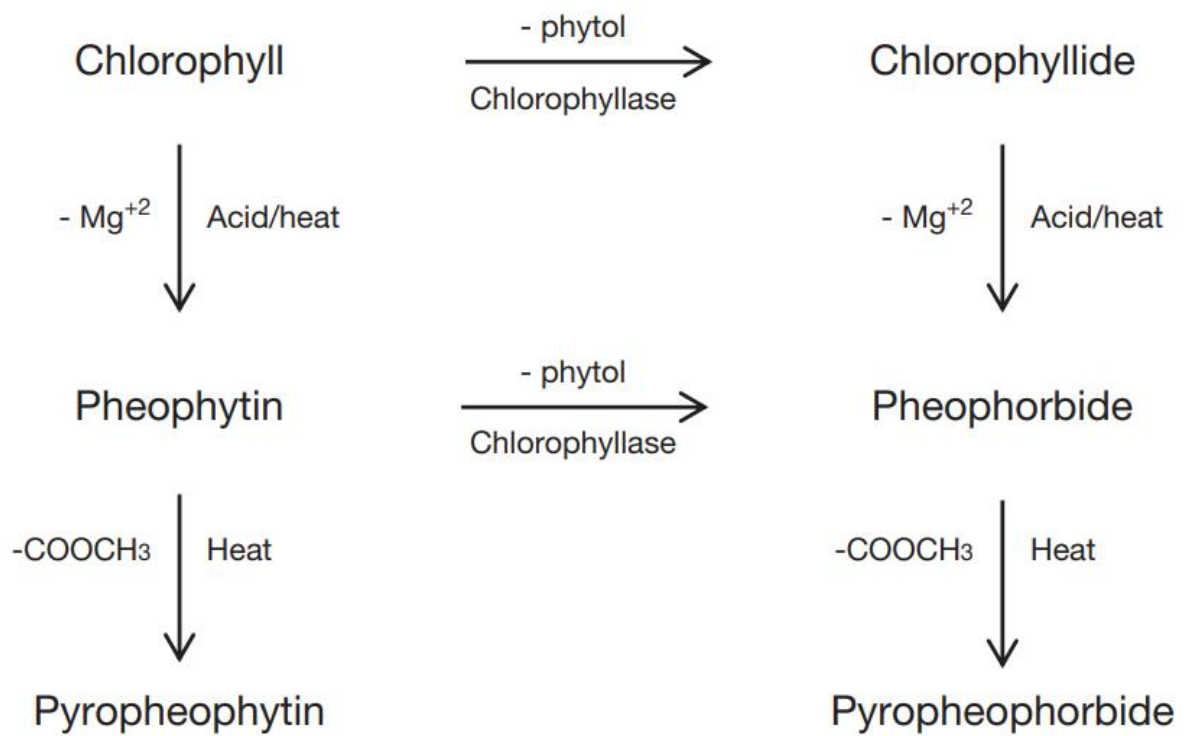


Figure 34 : Dégradation de la chlorophylle. (Yilmaz et Gökmen 2016)

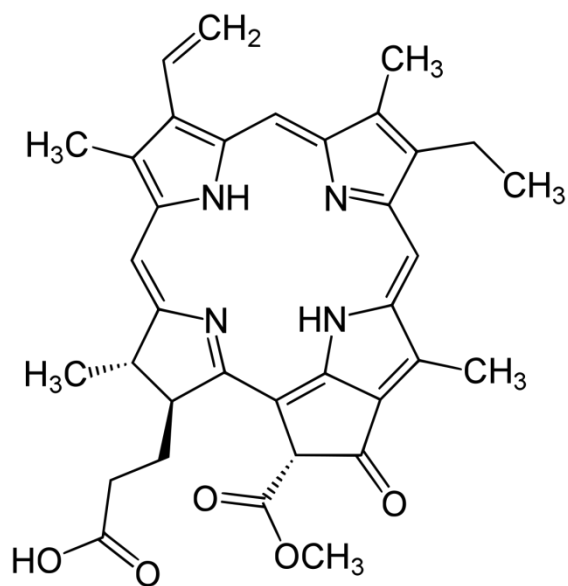


Figure 35 : Structure chimique du pheophorbide a (Pba)

Le phéophorbide a (Pba) est un tétrapyrrole avec 4 groupes méthyles, un groupe éthyle, un groupe vinyle, un groupe méthoxycarbone et un propionyle (Figure 35). Le Pba absorbe les longueurs d'ondes lumineuses entre 650 et 700 nm, ce qui lui donne un gros avantage comparé aux autres photosensibilisateurs naturels (Mansoori et al. 2019). Il possède des propriétés photodynamiques explorées en essais cliniques pour une potentielle utilisation dans les PDT (Busch, Cengel, et Finlay 2009; You et al. 2015). Il se localise naturellement dans la mitochondrie après absorption cellulaire. Les cellules cancéreuses absorbent 25 fois plus de Pba que les cellules saines, ce qui en fait un très bon candidat pour son utilisation en PDT. Il a été utilisé comme photosensibilisant lors d'essais cliniques de PDT, réduisant significativement la croissance des tumeurs, et conduisant à la mort cellulaire et l'apoptose grâce à sa capacité à générer des ROS. Ces derniers endommagent la paroi de la mitochondrie jusqu'à libération du cytochrome C. Le Pba est capable d'inhiber des tumeurs multi-résistantes aux traitements et ne présente aucune toxicité en absence de lumière (Ahn et al. 2017; Li et al. 2007; Tang et al. 2009).

Le Pba et le pyrophéophorbide a (pyroPba), un autre produit de dégradation de la chlorophylle (Figure 33), ont montré une activité antivirale contre plusieurs virus enveloppés : VHC, influenza A, HSV-2 et VIH mais aucune activité contre le virus non enveloppé poliovirus (Bousslama et al. 2011; Ratnoglik et al. 2014; Zhang et al. 2003). Cependant, aucune de ces études ne décrit les mécanismes d'action de ces molécules ni le rôle de la lumière. Plus récemment le pyroPba a été décrit comme ayant une activité antivirale contre le SARS-CoV-2, (D. Chen et al. 2020), mais encore une fois, le paramètre lumière n'a pas été pris en compte et les tests de cytotoxicité ont été réalisés sans exposition à la lumière, faussant grandement l'interprétation des résultats (Lebedeva et al. 2020).

II - CONTEXTE ET OBJECTIFS

Projet 1 : Identification du principe actif de l'extrait de *Mallotus oppositifolius* et caractérisation de son mécanisme d'action

Contexte

Au début de ma thèse, en octobre 2018, deux coronavirus humains hautement pathogènes, le SARS-CoV et le MERS-CoV avaient émergé et avaient causé deux épidémies. A l'époque, l'OMS classait les coronavirus dans la liste des pathogènes à haut risque de pandémie. Aucun antiviral spécifique ni aucun vaccin n'était disponible contre ces virus, ni contre les coronavirus animaux responsables de pertes très importantes dans les élevages. L'épidémie redoutée est apparue, en décembre 2019 en Chine et le SARS-CoV-2 a rapidement été identifié. Le virus s'est rapidement propagé à travers le monde et a engendré la pandémie que l'on subit depuis. Cette pandémie a rappelé l'importance de découvrir des solutions thérapeutiques contre les coronavirus. Bien que de nouveaux vaccins aient été développés très rapidement, il n'existe encore aucun antiviral spécifique pouvant être utilisé pour traiter les patients atteints de la COVID-19.

L'équipe de Karin Séron travaillait depuis plusieurs années en collaboration avec le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille dirigée par le Pr Sevser Sahpaz. Grâce à cette collaboration, plusieurs extraits de plantes ou molécules naturelles ayant des activités antivirales ont pu être identifiés, notamment le déhydrojuncusol, un nouvel antiviral contre le VHC isolé après fractionnement bioguidé d'un extrait de *Juncus maritimus* (Sahuc et al. 2019) (Voir 5.3 Les stratégies pour identifier des molécules naturelles). Dans le contexte de cette collaboration, un projet avait été financé par l'Université de Lille et le CNRS : il consistait à identifier des activités antivirales contre le VHC mais aussi les coronavirus dans des extraits de plantes médicinales ivoiriennes. Ainsi, le Dr Simon Bordage du laboratoire de Pharmacognosie a accueilli en thèse Moussa Bamba qui est venu de Côte d'Ivoire avec des plantes médicinales sélectionnées, après une étude ethnobotanique, pour leur utilisation dans le traitement des troubles hépatiques. Ces extraits ont été testés contre le VHC (Bamba et al., soumis) et contre le coronavirus HCoV-229E (Projet de Master 2 de Kévin Hervouet). L'extrait des feuilles de *Mallotus oppositifolius* a montré l'activité antivirale la plus importante contre le coronavirus HCoV-229E.

Objectif

L'objectif du premier projet était d'identifier le principe actif de *Mallotus oppositifollius*, et de caractériser son mécanisme d'action. La stratégie a été de réaliser un fractionnement bio-guidé en utilisant, comme modèle viral le coronavirus HCoV-229E, puis d'étendre les recherches aux autres coronavirus dont nous disposons au laboratoire, le MERS-CoV et le SARS-CoV-2.

Projet 2 Caractérisation du mécanisme d'action de la delphinidine contre les coronavirus

Contexte

La delphinidine a été identifiée au laboratoire comme inhibiteur de VHC (Calland et al. 2015) mais une expérience préliminaire a aussi montré un effet contre le coronavirus HCoV-229E. La delphinidine est une anthocyanidine appartenant à la famille des flavonoïdes. Ce sont des composés naturels dont plusieurs d'entre eux ont déjà été décrits comme possédant des activités antivirales. L'équipe de Karin Séron a pu montrer que la delphinidine et l'EGCG sont des inhibiteurs de l'entrée du VHC dans les cellules. Ils agissent en déformant l'enveloppe virale et empêchent le virus de s'attacher à la surface cellulaire.

Objectif

L'objectif de ce deuxième projet était de déterminer le mécanisme d'action de la delphinidine contre le coronavirus HCoV-229E, de tester son activité antivirale sur les coronavirus MERS-CoV et SARS-CoV-2, et enfin de réaliser des études de relations structure-activité avec des dérivés de synthèse de cette molécule.

III - LES TRAVAUX DE THESE

A- Projet 1 : Identification du principe actif de l'extrait de *Mallotus oppositifolius* et caractérisation de son mécanisme d'action

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la publication :

“A photoactivable natural product with broad antiviral activity against enveloped viruses including highly pathogenic coronaviruses”

Thomas Meunier, Lowiese Desmarets, Simon Bordage, Moussa Bamba, Kévin Hervouet, Yves Rouillé, Nathan François, Marion Decossas, Fézan Honora Tra Bi, Olivier Lambert, Jean Dubuisson, Sandrine Belouzard, Sevser Sahpaz, and Karin Séron.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, en révision

Résumé

Le criblage d'extraits bruts de plusieurs plantes de Côte d'Ivoire utilisées en médecine traditionnelle a permis d'identifier l'extrait *Mallotus oppositifolius* comme possédant des propriétés anti-coronavirus. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a permis d'isoler le principe actif, le phéophorbide a (Pba). Nos résultats montrent que le Pba est actif contre le SARS-CoV-2, le MERS-CoV, et le HCoV-229E dans des tests d'infection en culture cellulaire, avec un IC_{50} de 0,2 μ M. Le Pba agit à l'étape d'entrée virale en ciblant la particule virale avant l'infection. Le mécanisme d'action du Pba a été étudié. Le Pba est une molécule photosensibilisante activée par la lumière. Les résultats montrent que son activité antivirale ainsi que sa cytotoxicité dépendent du temps d'exposition à la lumière. Les résultats montrent également que l'activité antivirale dépend de la production de 3O_2 induite par le Pba en présence de lumière. Il a été décrit que l' 3O_2 induit une oxydation des phospholipides. Nos résultats de cryo-microscopie électronique montrent que l'enveloppe virale est rigidifiée par la modification des phospholipides, ce qui rend le virus résistant à un choc osmotique. Le Pba empêche le virus de fusionner avec la cellule. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une activité antivirale du Pba sur plusieurs autres virus enveloppés, VHC, YFV, VSV, Sindbis, mais pas sur un virus non enveloppé, le virus coxsackie. L'activité antivirale du Pba a été testée dans un modèle préclinique de cellules épithéliales primaires bronchiques. Le Pba est actif dans ces cellules à la fois contre le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV. Des tests d'infection chez des souris humanisées hAce2 ont été entrepris. Malheureusement, l'activité antivirale du Pba n'a pas pu être démontrée *in vivo*, certainement à cause de l'absence de lumière dans les poumons et donc d'impossibilité d'activer la molécule. Le Pba est un produit naturel issu de la dégradation de la chlorophylle, très facile à obtenir, qui pourrait donc être développé soit dans la décontamination de surface ou d'air contaminé, soit pour l'inactivation de virus enveloppés donnant des lésions externes tels que le virus de l'herpès.

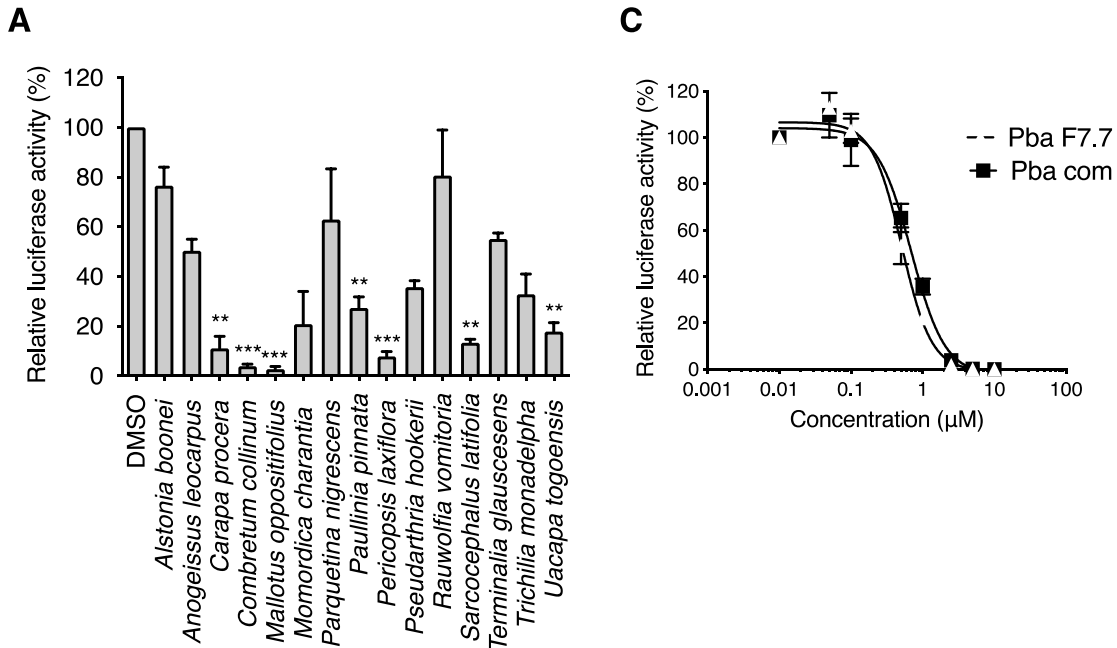


Figure 1 : Identification du Pba. (A) Criblage des extraits bruts de plantes contre HCoV-229E-Luc. Des cellules Huh-7 ont été infectées par le HCoV-229E-Luc en présence de différents extraits de plantes à 25µg/mL. Les cellules ont été lysées à 7h post infection et l'activité luciférase a été quantifiée. (B) Activité antivirale du Pba commercial et du Pba purifié (fraction F7.7) contre HCoV-229E-Luc. Des cellules Huh-7 ont été infectées par le HCoV-229E-Luc en présence du Pba commercial ou purifié ; 1h post infection les cellules ont été rincées et du milieu frais contenant les Pba respectifs a été ajouté. L'activité luciférase a été analysée 7h post infection.

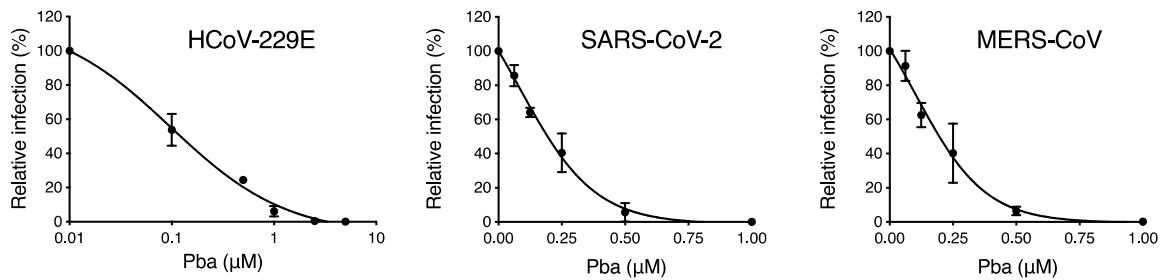


Figure 2 : Activité antivirale du Pba contre les virus HCoV-229E, SARS-CoV-2 et MERS-CoV. Les cellules Huh-7 ont été inoculées avec les virus HCoV-229E et MERS-CoV, des cellules VeroE6 ont été inoculées avec le virus SARS-CoV-2, en présence de Pba pendant 1h puis le milieu a été remplacé par du milieu frais contenant du Pba. Les virus relargués ont été collectés pour titration (9h post-infection pour HCoV-229E et 16h post infection pour SARS-CoV-2 et MERS-CoV).

Résultats

1 - Identification du Pba

Des extraits bruts de 15 plantes utilisées en médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire ont été criblés contre le coronavirus recombinant HCoV-229E-luciférase en cellules Huh-7. Parmi ces extraits, 7 diminuent significativement l'infection. Le plus actif est l'extrait du *Mallotus oppositifolius* (Mo) (Figure 1 A).

Plusieurs étapes de fractionnement bioguidé réalisées au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille, ont permis d'obtenir des fractions à partir de l'extrait brut de Mo, qui ont été criblées contre HCoV-229E-Luc. La fraction la plus active a subi d'autres fractionnements jusqu'à obtenir une fraction (F7.7) quasi pure, contenant un seul composé. Cette fraction a été analysée par spectrométrie de masse et le composé a été identifié comme étant le Pba (Figure 35, introduction). Nous avons obtenu du Pba commercial et l'avons comparé à notre composé pur de la fraction F7.7. Les IC₅₀ se sont révélés identiques, confirmant que le Pba est bien notre molécule antivirale (Figure 1 C). La suite de nos expériences a été effectuée avec le Pba commercial.

2 - Le Pba est actif contre plusieurs coronavirus

Nous avons démontré que le Pba avait une activité antivirale dose-dépendante contre le HCoV-229 et le MERS-CoV dans des cellules Huh-7 et contre le SARS-CoV-2 dans des cellules Vero-E6 (Figure 2). De plus le Pba est non cytotoxique à concentration active (IC₅₀=0,54μM, CC₅₀=6,08μM).

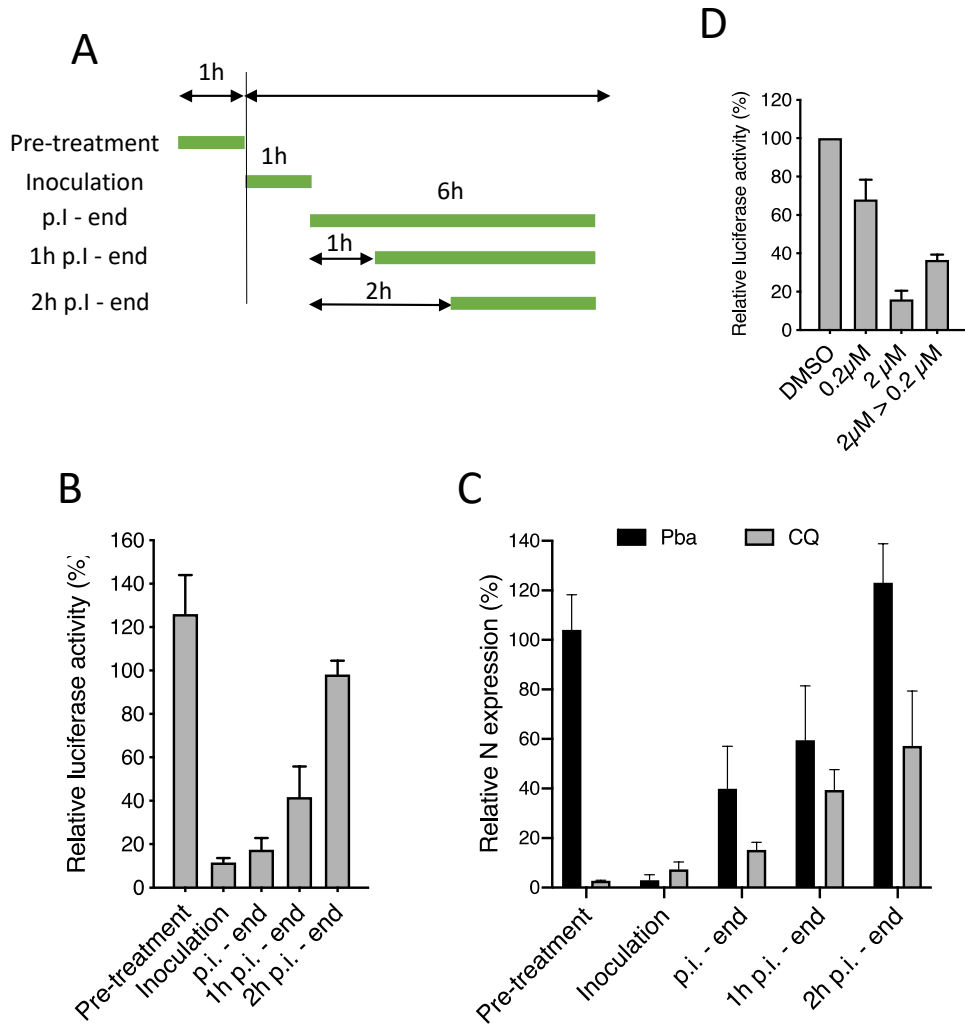


Figure 3 : Schéma représentatif des temps d'incubation avec le Pba (en vert) (A), du Pba a été ajouté à différents temps ; 1h avant inoculation, 1h pendant inoculation, en post inoculation jusqu'à la lyse (6h), 1h post inoculation pendant jusqu'à la lyse (5h), 2h post inoculation jusqu'à la lyse (4h). Cinétique de l'effet antiviral du Pba sur le HCoV-229E-Luc (B) ou le SARS-CoV-2 (C). Des cellules Huh-7 ont été utilisées avec le virus HCoV-229E-Luc et 2μM de Pba, et des cellules Vero-81 ont été utilisées avec le virus SARS-CoV-2 et 1μM de Pba ou 10μM de chloroquine (CQ). (D) Effet du Pba en pré-incubation sur le virus HCoV-229E-Luc. Le virus HCoV-229E-Luc concentré 10x a été pré-traité avec du Pba 2μM avant d'être dilué 10 fois puis utilisé pour inoculer des cellules HuH-7. Il a été comparé à deux contrôles où les cellules Huh-7 ont été inoculées sans pré incubation du virus à 0,2μM et 2μM. Tous les échantillons ont été exposés à 10 minutes de lumière.

3 - Le Pba inhibe les coronavirus à l'étape d'entrée en ciblant la particule virale

Afin de déterminer l'étape du cycle viral ciblé, nous avons réalisé une expérience de cinétique à la fois avec le virus SARS-CoV-2 et HCoV-229E-Luc. Nos résultats montrent que le Pba a son activité majeure au moment de l'inoculation et n'a pas d'effet quand les cellules sont traitées avant l'inoculation contrairement à notre contrôle, la chloroquine (Figure 3 A et B). Nous voulions ensuite vérifier si le Pba ciblait directement la particule virale. Pour cela nous avons prétraité le HCoV-229E-Luc avec du Pba en présence de lumière. Puis le mélange a été dilué 10 fois avant inoculation. Ainsi les virus sont traités à une concentration de 2 μM de Pba mais l'inoculation a lieu à 0,2 μM (Figure 3 C). En parallèle, des infections ont été réalisées à 0,2 et 2 μM de Pba sans pré-incubation préalable du virus. En comparant l'inhibition de l'infection à nos contrôles, nous montrons que lorsque le virus est pré-incubé avec le Pba à 2 μM avant l'inoculation, l'inhibition de l'infection est similaire à celle obtenue avec le Pba à 0,2 μM , suggérant que le Pba agit directement sur la particule virale avant infection.

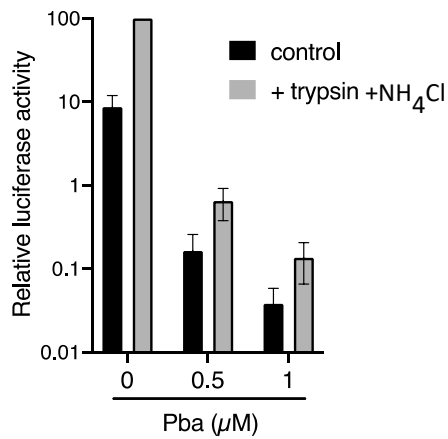


Figure 4 : Inhibition de l'étape de fusion. Des cellules Huh-7 ont été incubées pendant 1h avec du virus HCoV-229E-Luc en présence de NH₄Cl 25mM à 4°C. La fusion a ensuite été déclenchée par de la trypsine à 3μg/mL pendant 5 min à 37°C en présence de NH₄Cl. Les cellules ont été lysées 7h post-infection et l'activité luciférase a été quantifiée.

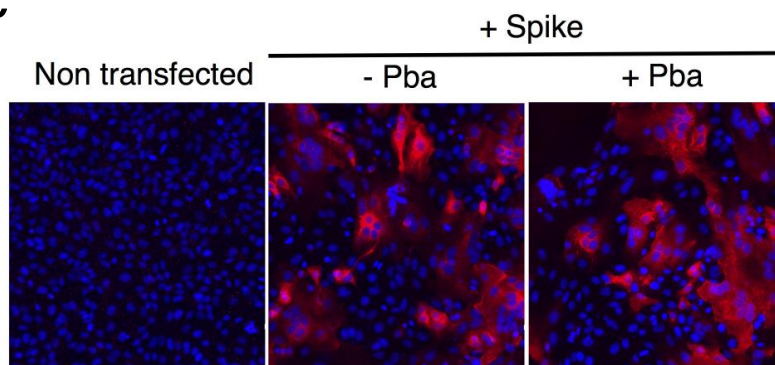


Figure 5 : Fusion cellule-cellule. Des cellules Vero-81 exprimant la protéine S du SARS-CoV-2 et ACE2 ont été traitées ou non avec 1 μM de Pba pendant 24h puis les syncytias ont été visualisés par immunofluorescence.

4 - Le Pba est un inhibiteur de la fusion

Les coronavirus utilisent plusieurs protéases cellulaires pour cliver la protéine de surface S et déclencher la fusion avec la membrane de la cellule cible. La protéase TMPRSS2 pour la fusion à la membrane, les cathepsines et la furine pour la fusion dans les endosomes. Nos résultats précédents montrent que le Pba agit à l'étape d'entrée. D'autres résultats non présentés ici montrent que le Pba agit à la fois sur la voie d'entrée endosomale et la voie d'entrée membranaire dépendante de TMPRSS2. Afin de préciser le mécanisme d'inhibition de l'entrée, nous avons réalisé un test d'attachement du virus à la surface cellulaire puis un test de fusion. Nos résultats montrent que le Pba n'a pas d'effet sur l'attachement (voir Figure 4 de l'article en Annexe) Pour le test de fusion, nous avons infecté des cellules Huh-7 dépourvues de TMPRSS2 avec du virus HCoV-229E-Luc en présence de Pba. L'infection se fait à 4°C pendant 1h ce qui permet l'attachement du virus au récepteur mais bloque l'étape de fusion. De plus, du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) est ajouté, ce qui va bloquer la fusion endosomale. Le virus n'a donc aucun moyen d'entrer. De la trypsine est ajoutée pendant 5 min ce qui va cliver la protéine S et permettre la fusion des virus attachés. On observe que les virus traités avec du Pba ne sont pas capables de fusionner en présence de trypsine, ce qui démontre que le Pba inhibe la fusion du virus avec la cellule hôte (Figure 4).

L'inhibition de la fusion peut se faire soit en ciblant la protéine S, soit en ciblant la membrane. Afin de déterminer si l'élément inhibé par le Pba était la protéine S ou la membrane lipidique virale, nous avons réalisé un test de fusion cellule-cellule. En effet, si on mélange des cellules exprimant la S du SARS-CoV-2 avec d'autres cellules exprimant le récepteur ACE2, elles peuvent fusionner entre-elles ce qui va générer des syncytia (cellules géantes plurinucléées). Cette expérience a été réalisée en présence de Pba et de lumière. Les résultats montrent que le Pba ne permet pas d'empêcher la fusion et la formation de syncytia (Figure 5). Il semble donc que la protéine S ne soit pas la cible du Pba.

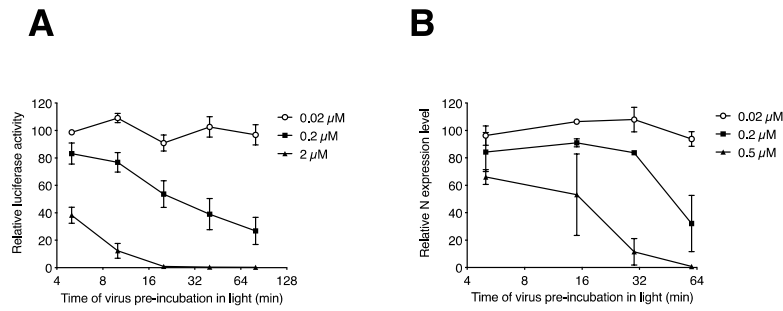


Figure 6 : Effet du temps d'exposition à la lumière combiné au Pba. Les virus HCoV-229E-Luc (A) et SARS-CoV-2 (B) ont été pré-incubés avec du Pba à la lumière pendant différents temps avant inoculation. Puis ils ont servi à inoculer respectivement des cellules Huh-7 ou Vero-81. L'infection a été quantifiée au bout de 7h (HCoV-229E) ou 16h (SARS-CoV-2) post infection.

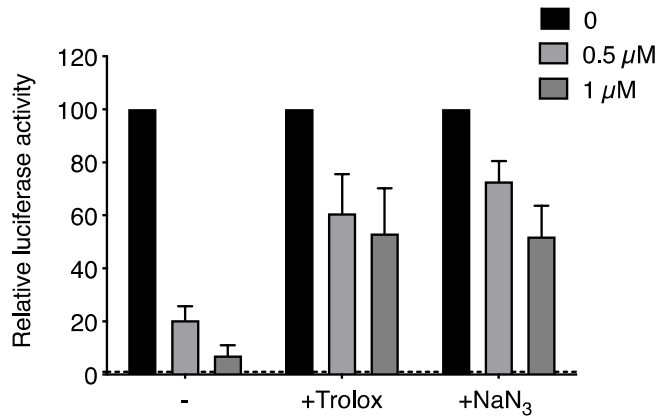


Figure 7 : Effet des chélateurs d'¹O₂ sur l'action antivirale du Pba en présence de lumière. HCoV-229E-Luc a été traité pendant 10 min par du Pba en présence de chélateur d'¹O₂ et de lumière puis a servi à inoculer des cellules Huh-7. Les cellules ont été lysées 7h post infection et l'activité luciférase a été analysée.

5 - L'activité du Pba dépend du temps d'exposition à la lumière et cible les membranes lipidiques

Etant donné que le Pba est un photosensibilisateur, nous avons regardé si l'effet antiviral pouvait être corrélé à la quantité de lumière présente. Pour cela nous avons infecté des cellules Huh-7 avec des virus HCoV-229E-Luc et des cellules Vero-E6 avec des virus SARS-CoV-2. Les virus ont été prétraités avec 3 concentrations de Pba et exposés pendant différents temps (0-80min) à la même source de lumière (Figure 6). Les résultats montrent que l'activité antivirale du Pba est dépendante de la concentration utilisée mais aussi du temps d'exposition à la lumière. Toutefois en dessous d'une certaine concentration (0,02 μ M) nous n'avons pas réussi à observer d'activité antivirale même après un long temps d'exposition à la lumière (80min). Le Pba est donc un photosensibilisateur capable de PDI sur les coronavirus.

Un mécanisme d'action connu des photosensibilisateurs est leur capacité à oxyder les phospholipides membranaires en présence de lumière, par la production de radicaux libres d'oxygène (Vigant et al. 2015). Dans ce cas, c'est le mécanisme de type 2 qui est impliqué (voir paragraphe 6.1 Les photosensibilisateurs) produisant des oxygènes singulets qui vont oxyder les phospholipides. Afin de déterminer si le Pba est capable de produire des ROS par le mécanisme de type 1 ou de type 2, nous avons réalisé une expérience d'infection en présence de deux chélateurs d'oxygène singulet, le Trolox et l'azide de sodium. Ces molécules vont neutraliser les radicaux libres d'oxygène (Figure 7). Nous montrons qu'en présence de Trolox et d'azide de sodium, l'action du Pba est fortement réduite, indiquant que l'activité antivirale du Pba dépend de la production d'oxygène singulet par un mécanisme de type 2.

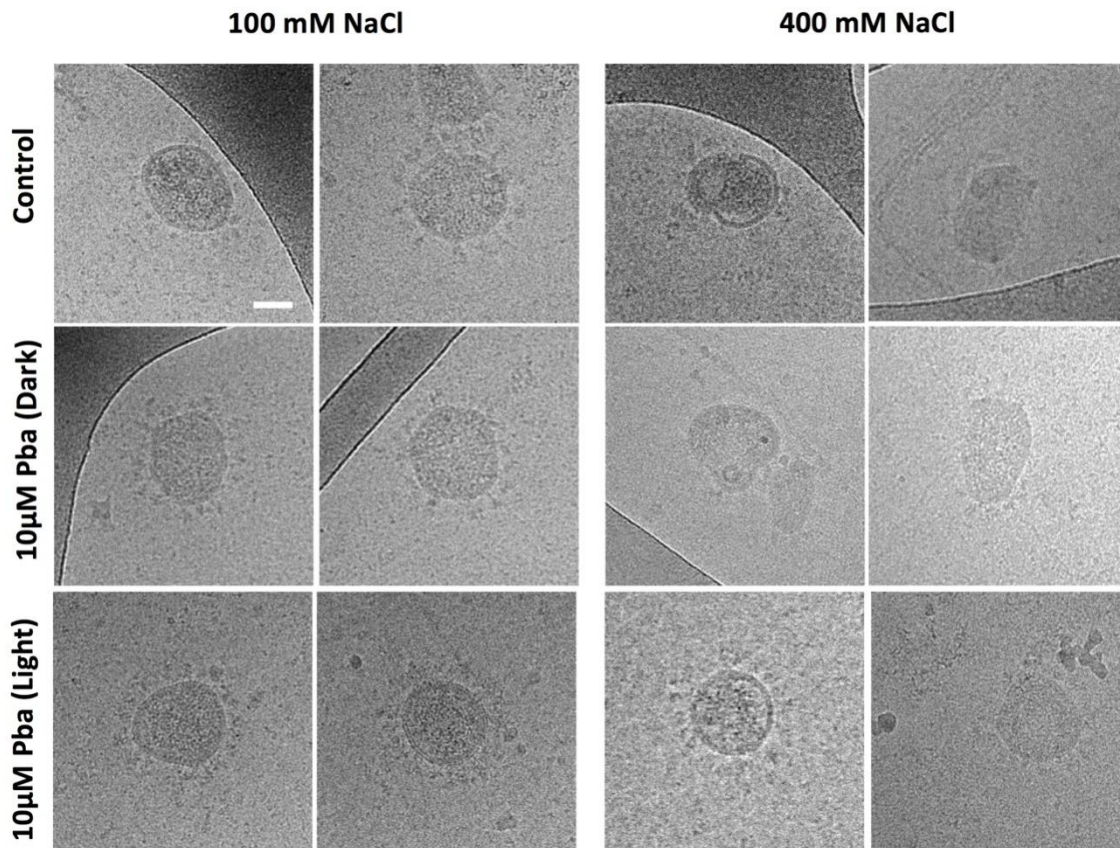


Figure 8 : Observation en cryo-microscopie électronique à transmission de particules virales soumises ou non à un choc osmotique (400 mM NaCl). Les virus HCoV-229E ont été traités pendant 30min avec du Pba à 10 µM en présence de lumière ou à l'obscurité. Le NaCl a ensuite été ajouté dans l'obscurité, puis les virus ont été immédiatement fixés à la PFA 4%. Les échantillons ont ensuite été traités pour l'observation en CryoEM. Les images sont représentatives de 30 images indépendantes recouvrant 2 expériences identiques.

Les données de la littérature montrent que l'oxydation des phospholipides membranaires induit une perte de fluidité des membranes, celles-ci devenant plus rigides. Ainsi, les photosensibilisateurs qui ont une action de PDI, induisent une rigidification de la membrane virale, et inhibent la fusion virus-cellule, qui nécessite une membrane suffisamment fluide (Vigant et al. 2013). Afin de déterminer si le Pba pouvait agir en rigidifiant la membrane virale du HCoV-229E, nous avons entrepris une collaboration avec l'équipe d'Olivier Lambert du Laboratoire Européen de Chimie et Biologie de Bordeaux et Marion Decossas de la plateforme de microscopie électronique de ce laboratoire.

Nous avons émis l'hypothèse que si le Pba induisait une rigidification de la membrane virale, les virus traités au Pba devraient être plus résistants à la déformation induite par un choc osmotique qui pourrait être visualisé en cryo-microscopie électronique. Nous avons donc réalisé un choc osmotique (400 mM NaCl) sur des virus HCoV-229E préalablement traités ou non avec du Pba à 10 μ M et exposés ou non à la lumière. Les virus ont ensuite été fixés avec de la PFA 4% puis observés en cryomicroscopie électronique (Figure 8).

On peut observer que les particules virales qui possèdent normalement une enveloppe arrondie comme le montre le contrôle sans choc osmotique, se retrouvent déformés lors de l'ajout de NaCl 400 mM. En comparaison les virus traités au Pba sans lumière sont eux aussi déformés par le choc osmotique, mais les virus traités au Pba en présence de lumière ne sont pas déformés par le choc osmotique et conservent une forme arrondie comparable aux conditions contrôle à 100 mM NaCl.

Cette absence de déformation indique que le Pba, en présence de lumière, a un effet rigidifiant sur les membranes lipidiques, probablement suite à l'oxydation des phospholipides membranaires comme décrit par Vigant et al (Vigant et al. 2015). Cela montre que le Pba inhibe la fusion virale en ciblant les membranes lipidiques. Cette inhibition n'a pas été observée dans le test fusion cellule-cellule, sans doute parce que la surface lipidique à oxyder d'une membrane cellulaire est beaucoup plus importante qu'une enveloppe virale, et que les cellules sont capables de régénérer leurs membranes par un processus de recyclage.

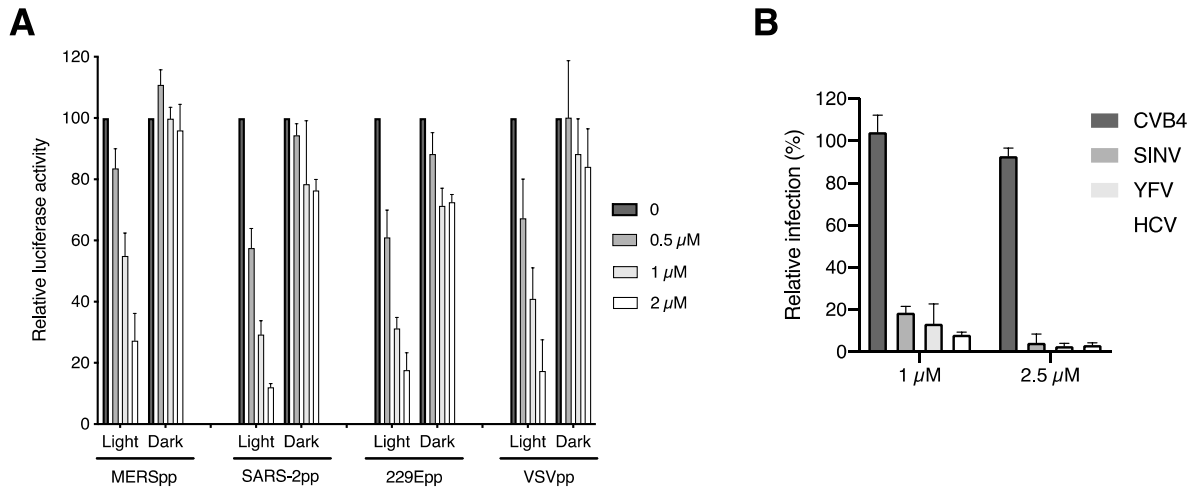


Figure 9 : (A) Effet du Pba en absence ou présence de lumière sur l'infection par des pseudoparticules. Des pseudoparticules ont été prétraitées avec du Pba à différentes concentrations en présence de lumière ou à l'obscurité pendant 30 min, puis ont servi à inoculer des cellules Huh-7 exprimant le récepteur ACE2 et la protéase TMPRSS2 pendant 2h. Les cellules ont été lysées 46 h post-infection et l'activité luciférase a été quantifiée (B) Effet du Pba en présence de lumière sur plusieurs virus enveloppés et un virus non enveloppé. Différents virus ont été traités au Pba en présence de lumière pendant 30 min avant de servir à l'inoculation des cellules. Les cellules ont ensuite été fixées et l'infection a été quantifiée par immunofluorescence.

6 - Le Pba a un effet antiviral contre plusieurs virus enveloppés

Nos résultats précédents montrent que le Pba cible les phospholipodes de l'enveloppe des coronavirus et provoque ainsi une inhibition de la fusion. Nous nous sommes demandés si du fait de cette activité antivirale ciblant l'enveloppe, le Pba pouvait avoir une action antivirale sur d'autres virus enveloppés. Nous avons travaillé avec des pseudoparticules et des virus de famille différentes.

Nous avons utilisé des particules rétrovirales pseudotypées avec les protéines de surface du HCoV-229E, du MERS-CoV, du SARS-CoV-2, du VSV et de VHC (Figure 9). Les résultats montrent que le Pba inhibe l'infection quel que soit la protéine d'enveloppe, en présence de lumière mais pas en absence de lumière.

Une expérience similaire a été réalisée avec plusieurs virus enveloppés, le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus Sindbis (SINV) et VHC, et un virus non enveloppé le virus coxsackie (CVB4). Encore une fois, le Pba en présence de lumière inhibe tous les virus sauf le CVB4. Cela indique que le processus d'inhibition par oxydation des phospholipides de la membrane virale semble être universel à tous les virus enveloppés.

7 - D'autres photosensibilisateurs ont des propriétés anti-coronavirus dépendante de la lumière.

Nous avons comparé d'autres photosensibilisateurs, soit des dérivés de la chlorophylle comme le pyroPba et la chlorine E6, soit des molécules de type porphyrines et métaloporphyrines possédant une structure proche du Pba (N-méthyl protoporphyrin IX, N-méthyl mesoporphyrin IX, Zn-protoporphyrin IX, tin-mesoporphyrin IX, temoporfin, phthalocyanine, hémine chlorure, HPPH, and 5,15-DPP), ainsi qu'un photosensibilisateur déjà décrit dans la littérature, le rose Bengale. Ces différents composés ont été criblés contre le HCoV-229E-Luc (Table 1). Tous se comportent comme le Pba, à savoir une activité antivirale absente ou réduite en absence de lumière. Bien que certains aient une dose active plus basse que le Pba, ils sont aussi plus toxiques. Le Pba est donc le composé le plus actif avec une SI supérieure à 10.

Table 1 : Résumé des activités antivirales et cytotoxiques d'autres photosensibilisateurs sur le HCoV-229E. Plusieurs photosensibilisateurs ont été criblés contre HCoV-229E-Luc dans des cellules Huh-7 dans les mêmes conditions décrites pour la Figure 1 C.

Molécules	IC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM) 24 h	SI
Pba	0.54	6.08	11.2
PyroPba	0.35	2.67	7.6
Chlorin e6	0.72	21.4	29.7
HPPH	1.14	8.13	7.1
N-methyl protoporphyrin IX	1.21	ND > 80	>66.1
N-methyl mesoporphyrin IX	1.25	ND > 80	>64
Zn protoporphyrin IX	0.79	16.64	21.0
Rose Bengale	2.86	ND > 80	27.9

8 - Le Pba inhibe la réplication du SARS-CoV-2 et du MERS-CoV dans un modèle de cellule épithéliale pulmonaire primaire humaine.

Afin de se rapprocher des conditions *in vivo*, nous avons utilisé un modèle d'épithélium bronchial humain reconstitué sur une interface air-liquide, appelé Mucilair™. Ces cellules ont été infectées par le SARS-CoV-2 et le MERS-CoV en présence de Pba ou de remdesivir comme contrôle positif. Trois jours après l'inoculation, le titre viral et l'ARN viral ont été quantifiés (Figure 10). Nous observons une réduction significative de l'infection en présence de Pba. Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation du Pba *in vivo*.

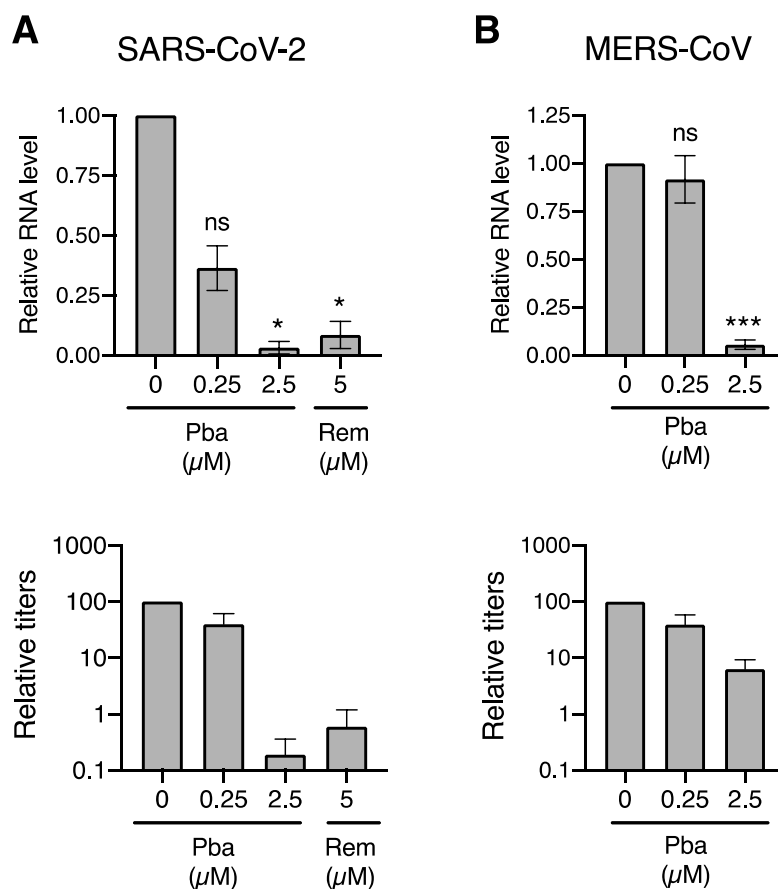


Figure 10 : Effet de Pba sur le SARS-CoV-2 (A) et MERS-CoV (B) dans des cellules épithéliales primaires bronchiques humaines. Des cellules Mucilair™ ont été inoculées avec le SARS-CoV-2 ou MERS-CoV en présence de Pba à 0,25 et 2,5 μM pendant 1h au pôle apical. Le remdesivir à 5μM a été ajouté au pôle basolatéral. Les virus ont été collectés au niveau apical 72h post-infection et l'ARN viral et les titres infectieux ont été quantifiés par qRT-PCR et TCID50.

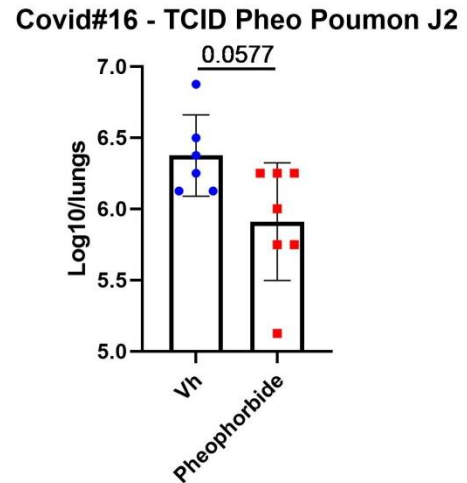
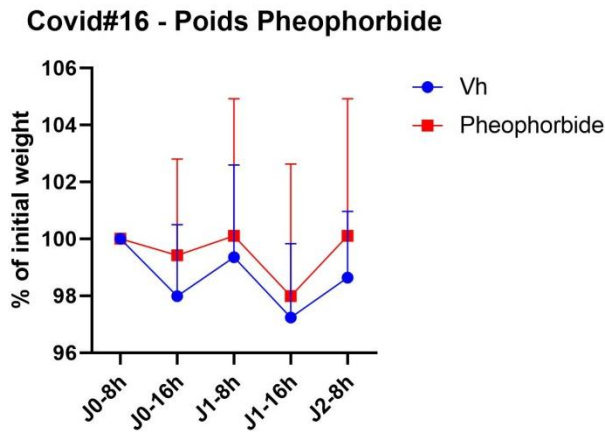


Figure 11 : Effet du traitement au Pba de souris infectées par le SARS-CoV-2. Les souris ont été traitées avec 4 doses de 50 μ L de Pba à 500 mM (estimé à une concentration finale de 500 μ M dans les poumons – quantité totale = 600 mg/Kg) sous forme de microgouttes déposées dans le nez, 1 h avant infection, 6 h après infection, 24 h après infection et 30 h après infection. Les souris ont été infectées par SARS-CoV-2 sous forme de microgouttes dans le nez. Elles ont été pesées 2 fois par jour. Elles ont été sacrifiées 48h après infection et le titre viral dans les poumons a été quantifié.

9 - Le Pba est non toxique pour les souris mais ne permet pas une protection contre l'infection

Nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques humanisées hACE2 pour tester l'efficacité du Pba *in vivo*. Les souris ont été infectées par le SARS-CoV-2 et traitées avec le Pba en plusieurs fois : 1h avant infection, 6h après infection, 24h après infection puis 30h après infection. Les souris contrôles ont reçu à la place du PBS au même temps. Le poids est mesuré au cours de l'expérience et 48h après les souris sont sacrifiées et le titre viral dans les poumons est calculé. Nous n'observons aucune différence dans la réduction de poids dans les conditions contrôles et Pba, indiquant que le Pba n'est pas nocif pour la souris (Figure 11). Malheureusement la faible réduction du titre viral ($1/2 \text{ Log}_{10}$) est non significative et ne nous permet pas de conclure sur l'efficacité du Pba *in vivo*, très probablement à cause de la nécessité de la lumière pour obtenir un effet antiviral et l'intérieur des poumons n'est pas exposé à la lumière extérieure.

Discussion et conclusion

A la suite du fractionnement bioguidé à partir de l'extrait brut de Mo, nous avons identifié le Pba produit de la dégradation de la chlorophylle et photosensibilisateur. Le Pba est très documenté pour son utilisation en thérapie photodynamique mais il n'était pas connu avant nos travaux comme molécule capable de PDI. Il était toutefois décrit comme ayant des propriétés antivirales notamment contre les virus HIV, herpès, VHC et influenza A (Bousslama et al. 2011; Ratnoglik et al. 2014; Zhang et al. 2003) mais son mécanisme d'action et l'importance d'une source de lumière n'étaient pas décrits. D'autres photosensibilisateurs naturels comme le pyroPba ont déjà été décrits comme ayant des propriétés anti-coronavirus, notamment contre le SARS-CoV-2 (D. Chen et al. 2020). Mais encore une fois l'implication de la lumière n'était pas prise en compte, ce qui faussait potentiellement les résultats de cytotoxicité observés.

Le Pba a été montré dans notre étude comme étant capable d'inhiber la fusion virus-cellule grâce à son action photodynamique sur les enveloppes lipidiques, via un mécanisme de type 2 et une oxydation des phospholipides membranaires. Comme l'enveloppe virale ne peut pas se régénérer contrairement aux membranes cellulaires, ce mécanisme d'inhibition

est irréversible et empêche l'apparition de résistance. D'autres photosensibilisateurs, le N-méthyl protoporphyrin IX, N-méthyl mesoporphyrin IX, and Zn-protoporphyrin IX, ont été identifiés lors de nos travaux de criblage, et, de façon intéressante, certains avaient déjà été identifiés contre le virus VSV, avec le mécanisme de photoinactivation en présence de lumière clairement démontré (Cruz-Oliveira et al. 2017). La chlorine E6, identifiée dans notre étude, a déjà été montrée comme possédant des propriétés antivirales ciblant l'enveloppe contre les virus VHC, HIV, DENV, MARV TCRV, et JUNV (Guo et al. 2011) mais le mécanisme d'action de type PDI n'avait pas été démontré. A la lumière de nos résultats, nous pouvons supposer qu'il s'agit bien de ce mécanisme.

La pandémie actuelle de SARS-CoV-2 nécessite d'identifier de nouveaux antiviraux rapidement. De nombreuses recherches montrant que les photosensibilisateurs sont capables de PDI contre de multiples virus enveloppés en font de bons candidats. Le Pba semble être plus actif que la plupart des photosensibilisateurs déjà décrits. Il est capable d'inactiver rapidement le virus SARS-CoV-2 à faible concentration. Toutefois la dépendance à la lumière pour son effet antiviral est limitant. En effet il serait difficile d'utiliser cette molécule en thérapie chez les patients atteints du COVID-19, car la lumière ne rentre pas jusque dans les poumons. Il existe pourtant des techniques permettant d'illuminer certains organes, notamment pour la thérapie anti cancer ; ces mêmes techniques pourraient être utilisées en combinaison du Pba pour traiter les patients atteints de COVID-19 sévère, comme par exemple des fibres optiques pour éclairer les poumons via intubation chez des patients déjà en ventilation assistée (Almeida, Faustino, et Neves 2020; Sabino et al. 2020).

En outre, les propriétés du Pba en font potentiellement un excellent produit à utiliser en prévention, par exemple sous forme d'un spray qui pourrait réduire la transmission. L'application du Pba sous forme de spray nasal pourrait créer une barrière qui inactiverait les virus entrants, car la voie respiratoire haute, comme le nez et la gorge, pourrait être suffisamment éclairée. Ce même spray peut aussi être utilisé comme désinfectant de surface, détruisant tous virus présents ou tout virus arrivant sur une surface si cette surface est éclairée. Le Pba est une molécule naturelle d'obtention aisée, il serait donc intéressant d'étudier d'éventuelles applications peu coûteuses pouvant réduire fortement les chances de contact avec le virus SARS-CoV-2. De plus, de par son mécanisme d'action, les risques d'apparition de résistance virale à ce produit sont quasi nuls et ce produit cible tout virus enveloppé.

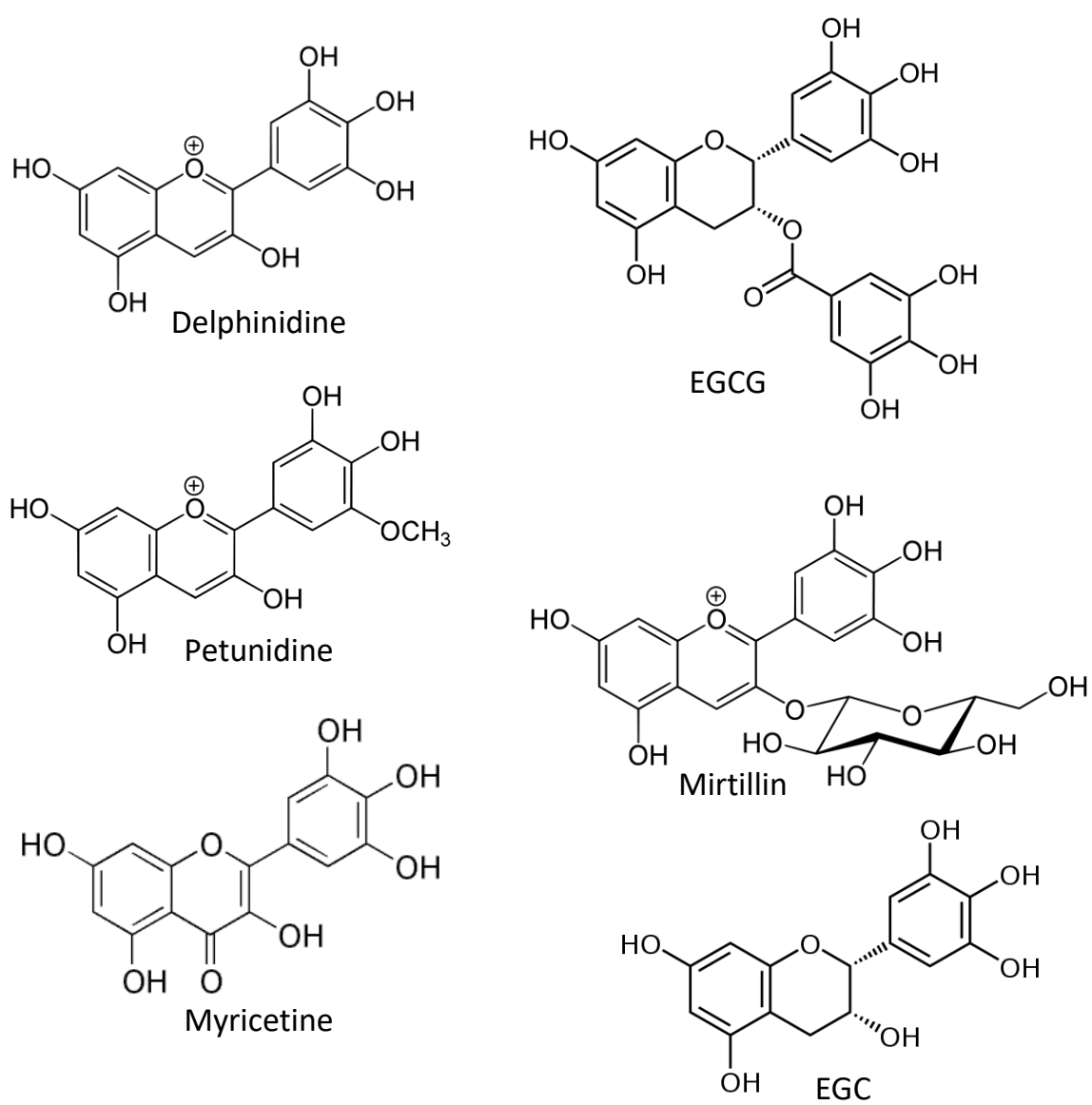


Figure 1 : Analogues structuraux de la delphinidine testés contre le HCoV-229E

B- Projet 2 : Caractérisation du mécanisme d'action de la delphinidine contre les coronavirus

Résumé

Au regard des activités antivirales déjà mises en évidence au laboratoire pour plusieurs polyphénols tels que l'EGCG et la delphinidine contre le VHC, nous avons entrepris un criblage de plusieurs molécules de ce type contre le coronavirus HCoV-229E-Luc. Nous avons montré que la delphinidine était la plus active. La delphinidine est une anthocyanidine, pigment des fleurs et des fruits rouges. Le mécanisme d'action de la delphinidine a été étudié. Elle inhibe l'entrée de HCoV-229E dans les cellules, principalement dans la voie endosomale. De façon intéressante, elle cible la particule virale et nous avons pu montrer grâce à des mutants de glycosylation de la protéine S, que la delphinidine ciblait la protéine S au niveau d'un résidu glycosylé (Asn1035). Ce mécanisme d'inhibition est contourné lorsque la protéase TMPRSS2 est présente et que la fusion du virus avec la cellule se produit au niveau de la membrane plasmique. La delphinidine est également active contre le SARS-CoV et le MERS-CoV, uniquement dans la voie endosomale. Le modèle imaginé à la suite de ces travaux est que la delphinidine se fixe sur la protéine S en ciblant spécifiquement un site de glycosylation et accompagne la particule virale jusque dans l'endosome où elle bloque une étape précoce dans le cycle infectieux, probablement l'étape de fusion.

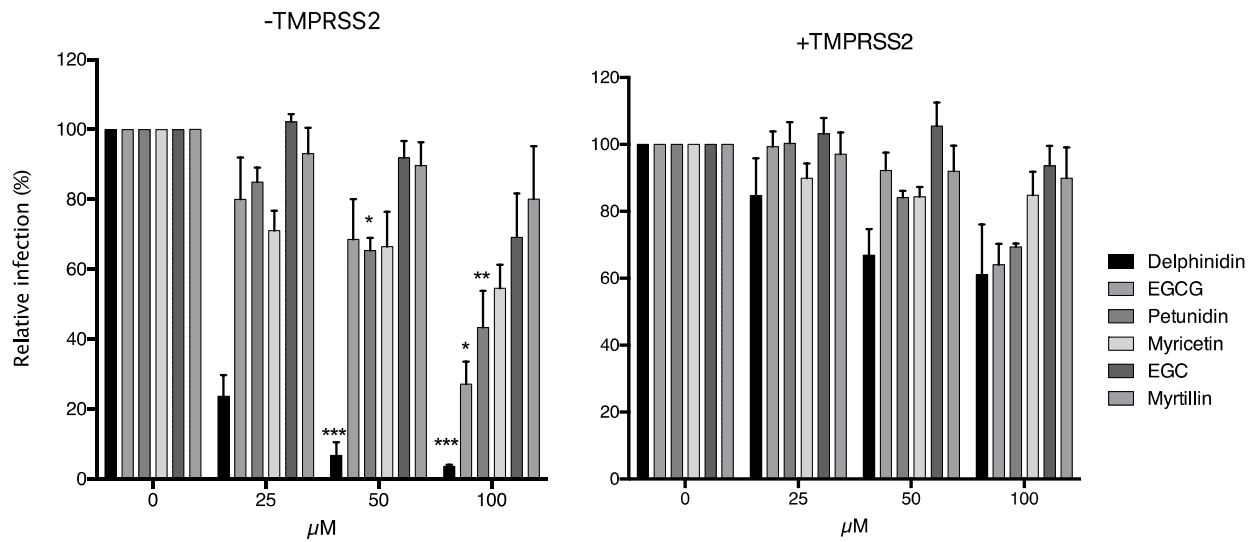


Figure 2 : Criblage de multiples polyphénols contre HCoV-229E-Luc. Les cellules Huh-7 ont été inoculées avec le virus HCoV-229E-Luc pendant 1h en présence de concentrations croissantes de delphinidine et des autres composés ; le milieu a ensuite été renouvelé et les cellules ont été lysées 7h après infection et l'activité luciférase a été quantifiée.

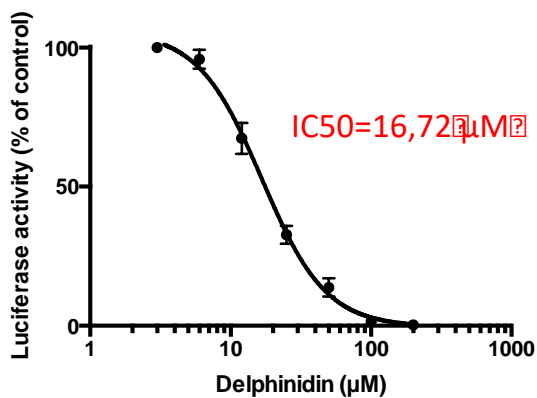
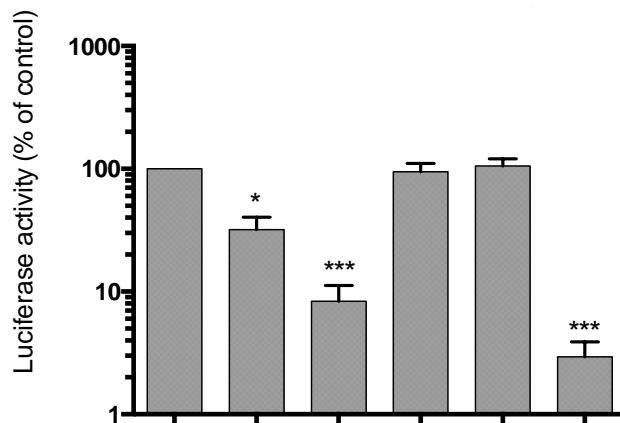


Figure 3 : Dose-réponse de la delphinidine contre HCoV-229E en cellule Huh-7. Les cellules Huh-7 ont été inoculées pendant 1h avec du HCoV-229E-Luc. Puis les cellules ont été lysées 7h post infection et l'activité luciférase a été quantifiée.

Résultats

1 - La delphinidine est le composé le plus actif contre HCoV-229E-Luc et inhibe la voie endosomale.

Nous avons tout d'abord voulu comparer l'effet antiviral de plusieurs analogues structuraux de la delphinidine : la myrtilline, la pétunidine, la myricétine, l'épigallocatechine (EGC) et l'EGCG (Figure 1 et 2). Les résultats montrent que la delphinidine est la plus active des molécules testées. De plus il semble que la delphinidine soit active uniquement sur l'entrée par la voie endosomale (en absence de TMPRSS2) car on observe une faible inhibition de l'infection en présence de TMPRSS2. Enfin, l'inhibition de l'infection est dose-dépendante. Ces premiers résultats confirment l'effet inhibiteur de la delphinidine sur l'infection par le virus HCoV-229E et semble indiquer que la delphinidine n'impacte que la voie d'entrée dans les endosomes. Nous avons ensuite déterminé l'IC₅₀ de la delphinidine (concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'infection) en absence de TMPRSS2, en infectant des cellules Huh-7 avec le virus HCoV-229E-Luc à différentes concentrations de delphinidine (Figure 3). Et nous obtenons un IC₅₀ de 16,72 µM.



Pré inoculation	-	+	-	-	-	+
Inoculation	-	-	+	-	-	+
Post inoculation	-	-	-	+	-	+
Réplication	-	-	-	-	+	+

Delphinidine 100µM

Figure 4 : Cinétique de l'effet de la delphinidine sur le cycle viral du HCoV-229E. La delphinidine a été ajoutée à 100µM à différentes étapes du cycle viral. 30 min avant l'infection, 1h au cours de l'inoculation en présence du virus, 30 min après l'infection et pendant 5h30 à l'étape de la réplication. Les cellules ont été lysées 7h post infection et l'activité luciférase a été quantifiée.

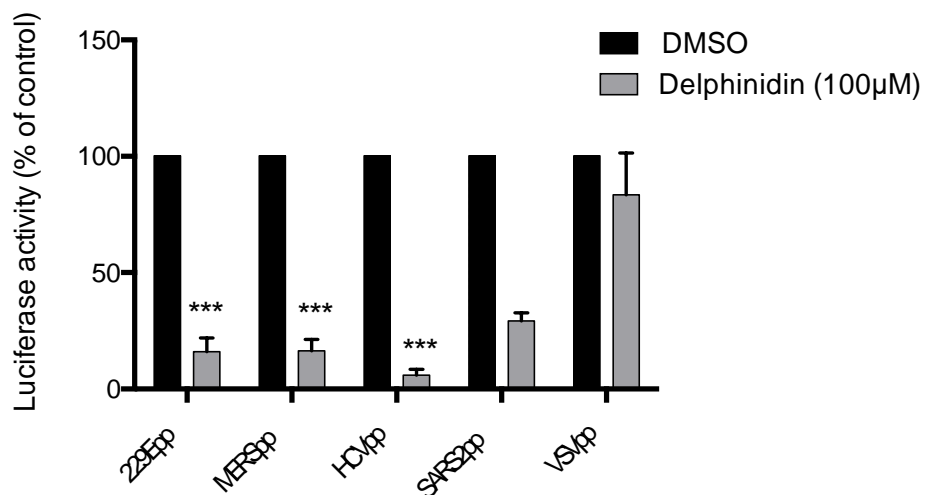


Figure 5 : Les cellules Huh-7 ont été infectées 2h avec des pseudoparticules 299Epp ou MERSpp ou HCVpp ou SARS2pp ou VSVpp en présence de delphinidine à 100 µM, puis le milieu a été renouvelé et les cellules ont été lysées 48h après infection. L'activité luciférase a été quantifiée au luminomètre

2 - La delphinidine joue un rôle sur l'étape d'entrée et semble cibler la particule virale.

Nous avons ensuite voulu préciser quelles étapes du cycle viral étaient inhibées par la delphinidine. Pour cela nous avons tout d'abord effectué un test de cinétique d'infection. La delphinidine a été ajoutée à différentes étapes du cycle viral : 30 min avant l'infection, 1h au cours de l'inoculation en présence du virus, 30 min après l'infection, et pendant 5h30, à l'étape de la réplication (Figure 4). Les résultats montrent que l'activité principale de la delphinidine se situe à l'étape d'inoculation avec également un effet moins important quand elle est ajoutée 30 min avant l'inoculation.

Ces résultats semblent indiquer que la delphinidine joue un rôle au niveau de l'entrée. Nous avons donc réalisé un test d'infection mais en utilisant les pseudoparticules 229Epp, MERSpp et SARS2pp, qui miment la phase d'entrée des virus en question (figure 5). Nous observons la même tendance que précédemment bien qu'avec des valeurs luciférase plus faibles. Comme avec le virus HCoV-229E, les résultats montrent que la delphinidine inhibe l'infection des 229Epp en absence de TMPRSS2. De même la delphinidine inhibe l'infection des MERSpp et SARS2pp en l'absence de TMPRSS2. Ces résultats obtenus avec les pseudoparticules confirment donc que la delphinidine a un effet sur l'entrée virale.

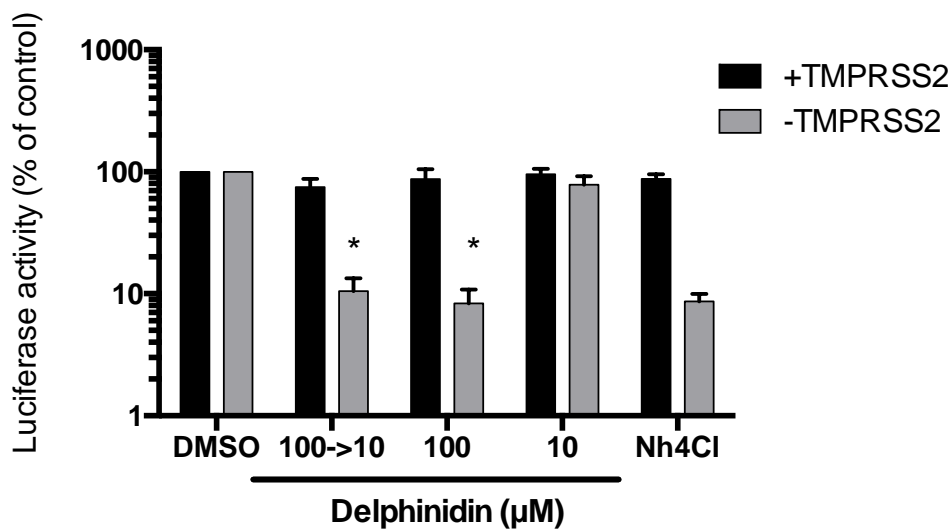


Figure 6 : Effet direct de la delphinidine sur les particules. Le virus HCoV-229E-Luc a été pré-incubé 30 min avec de la delphinidine à 100 µM ; le virus et la molécule ont ensuite été dilués 10 fois pour l'étape d'inoculation sur les cellules (100µM→10µM). En contrôle les cellules ont été infectées avec le virus, sans préincubation, en présence de delphinidine à 100 µM et 10 µM. Les cellules ont été lysées 7h après infection et l'activité luciférase quantifiée.

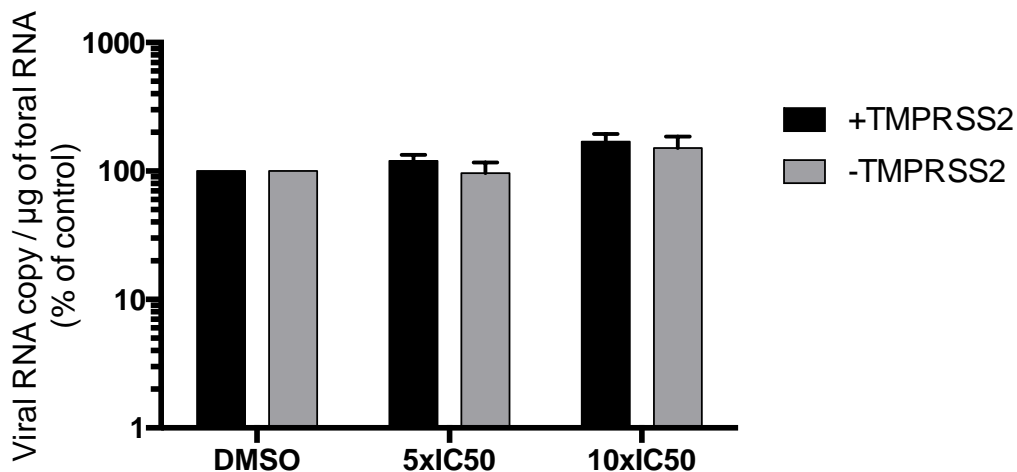


Figure 7 : Quantification de l'attachement des virus à la cellule. Les cellules Huh-7 ont été infectées par le virus HCoV-229E-Luc à 4°C pendant 1 h, en présence de différentes concentrations de delphinidine, puis les ARN ont été extraits et l'ARN viral quantifié par RT-qPCR.

Nous avons ensuite testé si la particule virale était directement ciblée par la delphinidine. Pour ce faire, nous avons pré-incubé les particules virales avec la delphinidine à 100 μ M pendant 30 minutes puis dilué 10 fois avant infection ; les cellules ont ensuite été lysées après 7h d'infection comme précédemment. En contrôle, des cellules ont été infectées en présence de 100 μ M de delphinidine (équivalent à la concentration utilisée lors de la pré-incubation) ou avec 10 μ M de delphinidine (équivalent à la concentration présente dans le mix de préincubation dilué 10 fois) (Figure 6). On observe une inhibition de l'infection similaire quand le virus est préincubé avec la delphinidine à 100 μ M (avant d'être dilué 10 fois) et quand l'inoculation est réalisée en présence de 100 μ M de delphinidine. Ce résultat montre que la delphinidine a un effet direct sur la particule virale avant l'inoculation. De façon étonnante, cet effet est absent dans la voie d'entrée dépendante de TMPRSS2. On suppose que la molécule se fixe sur la particule et délivre son effet plus tard à l'étape de fusion, à condition que la fusion ait lieu dans les endosomes et non à la membrane.

Comme les résultats précédents montrent que la delphinidine a un effet direct sur la particule virale, nous avons voulu savoir si la delphinidine bloquait l'étape d'attachement entre le récepteur et la protéine d'enveloppe. Pour cela nous avons effectué un test d'attachement du virus à la cellule en quantifiant les ARN viraux par RTqPCR (Figure 7). Des cellules Huh-7 ont été inoculées avec du HCoV-229E pendant 1h à 4°C, ce qui permet l'attachement des virus mais pas l'étape de fusions. Les résultats ne montrent aucune différence de quantité d'ARN viral à la surface cellulaire en présence de delphinidine. Il semble donc que la delphinidine n'a pas d'effet sur l'attachement viral. Cela semble en accord avec les résultats obtenus précédemment car on observe un effet différent selon les voies d'entrée utilisées (avec ou sans TMPRSS2). Comme les différences entre ces deux voies se situent après l'étape d'attachement il est logique qu'on n'observe aucune différence avec ou sans delphinidine dans cette expérience.

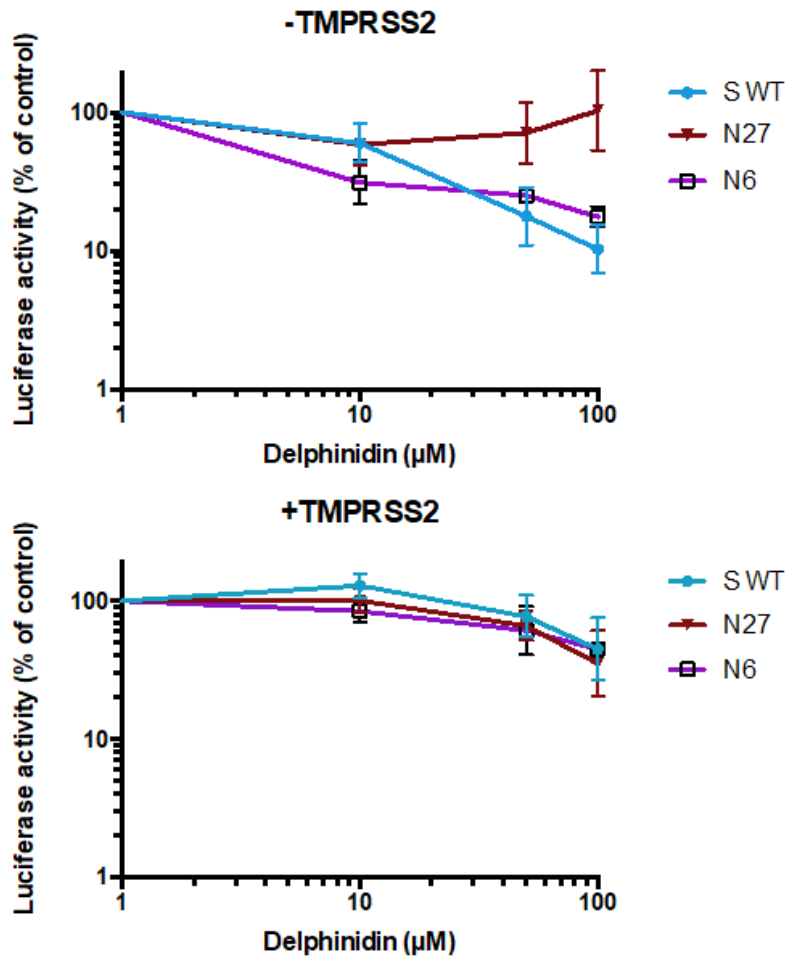


Figure 9 : Capacité infectieuse des mutants de glycosylation N27 (rouge), N6 (rose) et de la S non mutée (bleu) en présence de delphinidine. Les cellules Huh-7 (transduites ou non avec TMPRSS2) ont été infectées les 229pp mutées aux différents sites de glycosylation en présence de concentrations croissantes de delphinidine. Les cellules ont été lysées 48h après infection et l'activité luciférase quantifiée.

3 - La delphinidine cible l'asparagine glycosylée Asn1035 de la protéine S du HCoV-229E

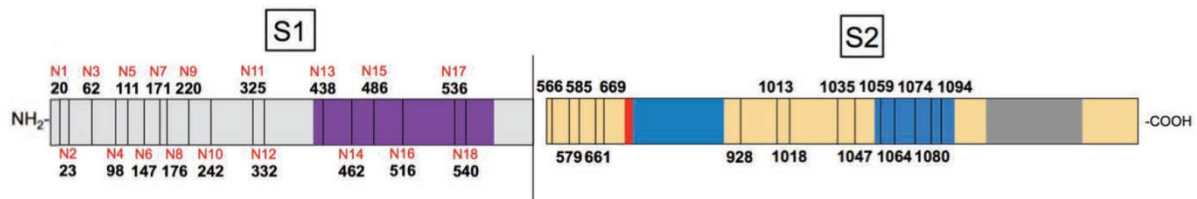


Figure 8 : Sites de glycosylation de la protéine S du HCoV-229E (Ariane Bonnin, 2018)

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation du mécanisme d'action de la delphinidine, nous avons étudié son effet sur des mutants de glycosylation de la protéine S obtenus par Ariane Bonnin au cours de son Doctorat au laboratoire. La protéine S du HCoV-229E possède 33 sites potentiels de N-glycosylation (figure 8). Chacun de ces sites a été muté individuellement et l'effet des mutations sur l'infection a été testé en utilisant le système 229pp. Une des mutations, sur le site de glycosylation N27, a un effet sur l'infection du virus uniquement en absence de TMPRSS2. Ce mutant est également faiblement infectieux. L'hypothèse est que ce site de glycosylation est nécessaire à la fusion via la voie endosomale. Comme la delphinidine inhibe également cette voie, nous avons postulé que sa cible d'action était peut-être ce site de glycosylation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des infections en présence de delphinidine avec des 229pp ayant des mutations sur différents sites de glycosylation de la protéine S. Le mutant N6 présente un niveau d'infection tout autant diminué que le N27 mais dans les deux voies d'entrée, il nous sert donc de contrôle. D'autres mutants correspondant à des sites de glycosylation proche du N27 sur la séquence d'acides aminés sont aussi utilisés, avec des niveaux d'infection plus élevés (N25) ou plus faibles (N26 et N28) que le contrôle protéine sauvage (WT) dans les deux voies d'infections (Données non montrées). Les résultats indiquent une réduction de l'infection en présence de delphinidine pour tous les mutants excepté le mutant N27 qui reste à un niveau d'infection bas mais constant (Figure 9). Le mutant N27 est donc résistant à la delphinidine, ce qui semble prouver que la cible de la delphinidine sur la protéine S est le résidu N27 glycosylé.

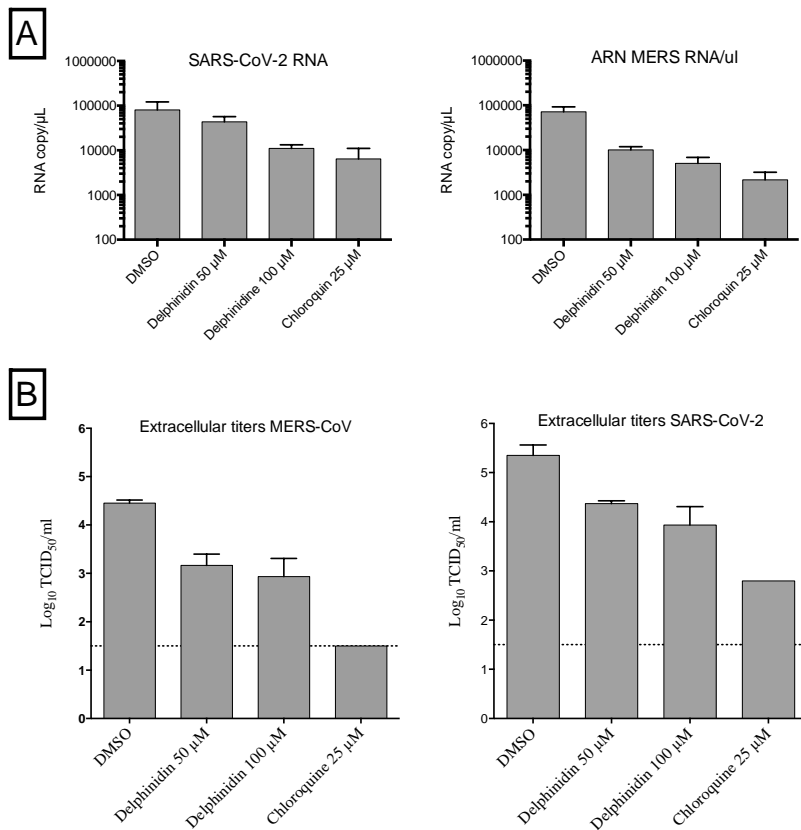


Figure 10 : (A) Quantification par RT-qPCR de l'ARN viral présent dans les cellules 16h après infection en présence de delphinidine. La quantité d'ARN viral a été rapportée à la quantité d'ARN total (ARN cellulaire et ARN viral). (B) Mesure du titre infectieux (TCID₅₀/ml). Des cellules Huh-7 et VeroE6 ont été infectées par MERS-CoV et SARS-CoV-2 respectivement en présence de delphinidine. Les virus ainsi produits ont été dilués de 10 à 10⁸ fois et ont servi à infecter d'autres cellules. Les puits contenant des cellules lysées ont été comptabilisés 6 jours après infection.

4 - La delphinidine est capable d'inhiber les coronavirus hautement pathogènes.

Afin de vérifier les résultats obtenus avec le virus HCoV-229E-Luc, nous avons utilisé les mêmes techniques de quantification de l'ARN viral et de TCID50 pour quantifier l'effet de la delphinidine sur les virus MERS-CoV et SARS-CoV-2 en laboratoire BSL3 (Figure 10). Des cellules Huh-7 ont été utilisées pour l'infection par le MERS-CoV, et des cellules VeroE6 ont été utilisées pour l'infection avec le SARS-CoV-2. On observe que la delphinidine possède également un effet inhibiteur de l'infection avec ces deux virus à la fois en TCID50 et en quantification d'ARN après infection. La chloroquine a été utilisée comme contrôle positif.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que la delphinidine a un effet antiviral dose-dépendant contre plusieurs coronavirus humains au niveau de l'étape d'entrée par endocytose mais pas (ou peu) à l'étape d'entrée à la membrane dépendante de TMPRSS2. La delphinidine semble efficace à la fois contre le virus MERS-CoV et également contre le virus SARS-CoV-2.

- Infection HCoV-229E -TMRSS2
- Infection HCoV-229E +TMRSS2
- ▲ Viability

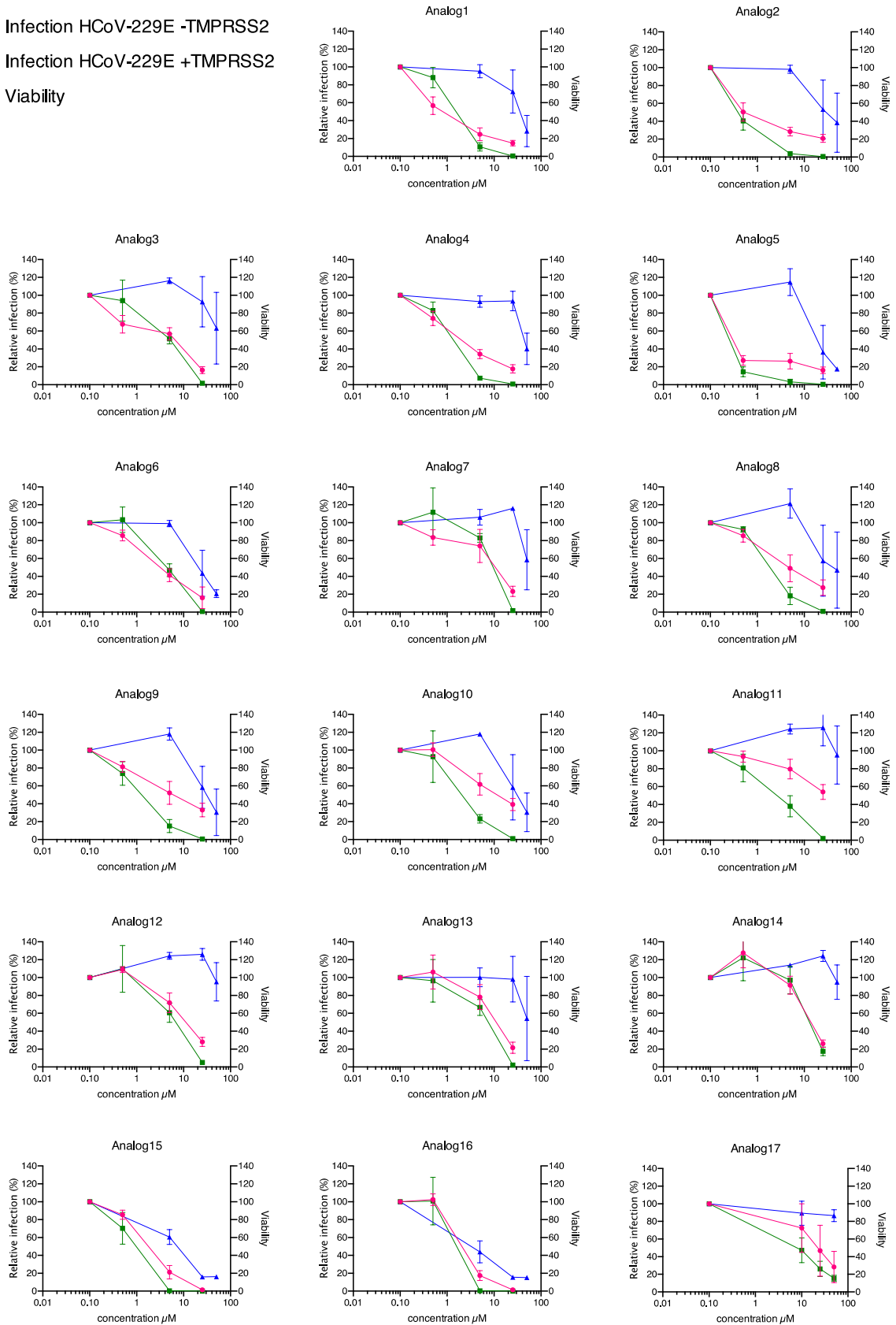


Figure 11 : Criblage des 31 dérivés de la delphinidine contre le HCoV-229E en cellule Huh-7.

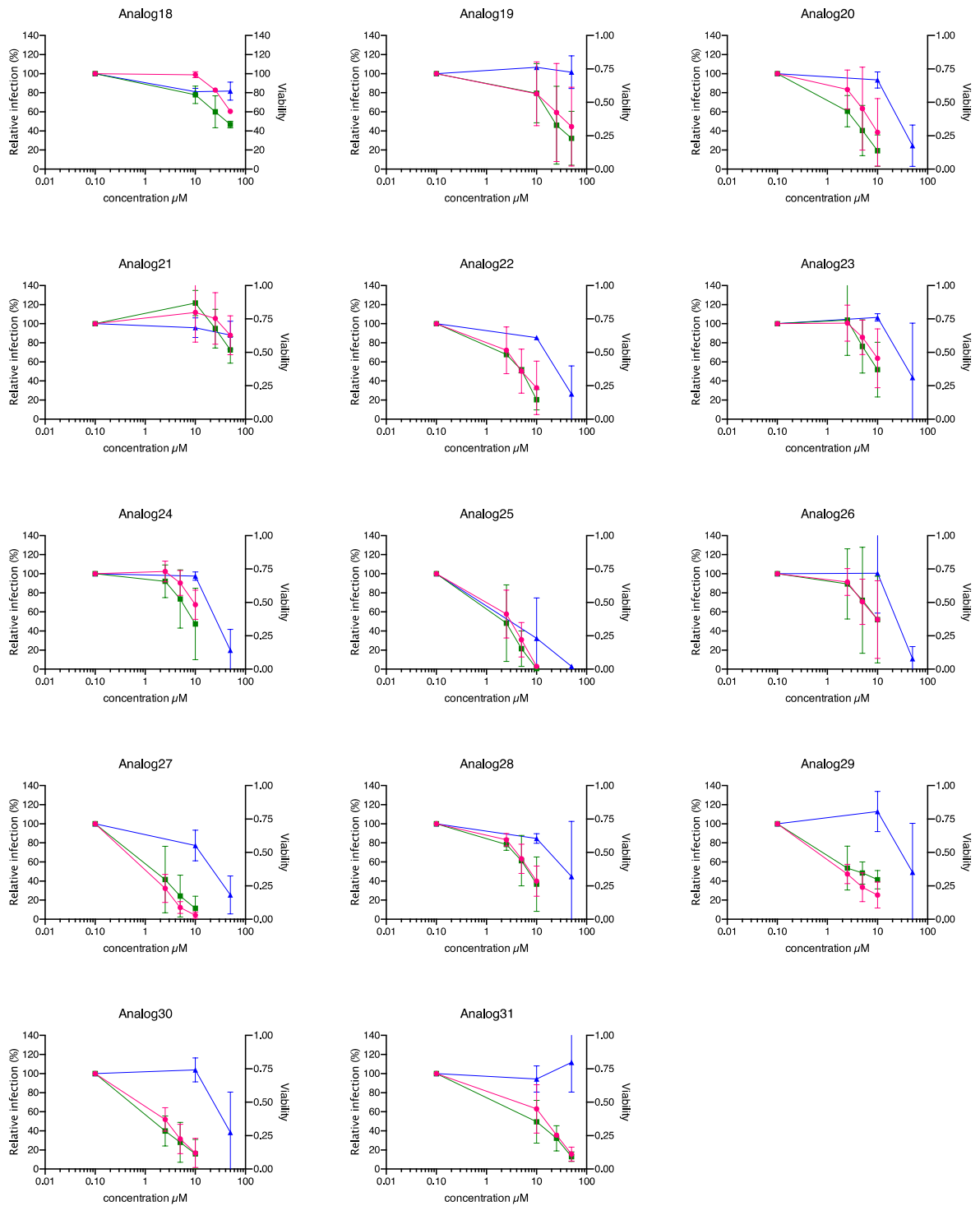


Figure 11 (suite): Des cellules Huh-7 transduites ou non par TMPRSS2, ont été inoculées par du HCoV-229E-LuC en présence de concentrations croissantes des différents analogues. La viabilité des cellules Huh-7 en présence des composés a été calculée via un test MTS à 24h.

Table 1 : IC₅₀, CC₅₀ et SI des 8 analogues sélectionnés dans le crible figure 11. La SI est calculée à partir de l'IC₅₀ la plus haute.

Molécules	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM) 24 h	SI
	-TMPRSS2	+TMPRSS2		
Delphinidine	16,72	NA	>800	>47,8
Analogue1	1,946	1,657	72,42	38
Analogue2	0,54	0,92	>100	>108
Analogue4	2,6	2,6	>100	>38,5
Analogue5	0,065	0,08	45,39	567
Analogue8	0,12	0,38	>75	197
Analogue19	24,7	23,8	>100	4
Analogue20	4,747	3,164	79	16,8
Analogue30	15,5	9,7	24,48	1,5

5 - Des dérivés obtenus par modification chimique sont plus actifs que la delphinidine contre le coronavirus HCoV-229E

Dans le but de générer des dérivés plus actifs que la delphinidine, nous avons entrepris une collaboration avec des chimistes du laboratoire de Chimie Bio-organique et Médicinale de Strasbourg, dirigé les Drs Mourad Elhabiri et Elisabeth Davioud. Les chercheurs ont pu produire une trentaine de dérivés de la delphinidine, en ajoutant des groupements chimiques de diverses natures sur le cœur de la molécule.

Ces molécules ont été criblées contre le HCoV-229E-Luc afin d'effectuer une première sélection de composés plus actifs que la delphinidine. La toxicité de ces molécules a aussi été quantifiée (Figure 11). Grâce à ce crible, nous avons sélectionné 8 analogues qui possédaient une activité supérieure à la delphinidine, tout en étant non toxiques aux concentrations actives. Il s'agit des analogues 1, 2, 4, 5, 8, 19, 20 et 30. Des expériences de dose réponse comme décrit dans la Figure 2 nous ont permis d'obtenir des IC_{50} et CC_{50} pour chaque molécule (Table 1).

Ainsi nous nous sommes rendus compte qu'une combinaison spécifique de groupements dont nous ne pouvons pas divulguer la nature avant publication, augmentait considérablement l'effet antiviral de la delphinidine. Le composé le plus actif, l'analogue 5, a un IC_{50} bien inférieur à celui de la delphinidine ($IC_{50} = 65 \pm 5$ nM) et de plus le composé semble agir sur les 2 voies d'entrée avec la même efficacité. Enfin, il est non toxique aux concentrations actives ($CC_{50} = 45$ μ M). D'autres études mécanistiques sont en cours afin de déterminer son mode d'action. Des résultats préliminaires non présentés ici semblent indiquer qu'il ne cible pas la particule virale ni l'étape d'entrée, toutefois son effet antiviral fort nous empêche de déterminer avec précision son action via une expérience de cinétique comme décrit dans la Figure 4. D'autre part, nos résultats préliminaires semblent montrer que cet analogue n'est pas actif contre le SARS-CoV-2.

Au cours de la même collaboration, nous nous sommes intéressés à une autre molécule naturelle qu'est la ladanéine. Cette molécule a été identifiée comme inhibiteur d'entrée contre VHC (Haid et al. 2012). L'équipe du Dr Elisabeth Davioud et du Dr Mourad Elhabiri nous ont fourni plusieurs dérivés de la ladanéine que nous avons testés sur le HCoV-229E-Luc. Ce projet a été mené avec un stagiaire de BTS, Geoffrey Hubert que j'ai encadré pendant 2 mois (décembre 2019-février 2020) Nos résultats montrent que les molécules dérivées de la ladanéine modifiées avec un type de groupements particulier semblent plus efficaces et moins toxiques que la ladaneine (Figure 12). De plus il semblerait que ces composés soient efficaces sur les deux voies d'entrée (avec et sans TMPRSS2). Ces résultats sont prometteurs et les molécules les plus intéressantes vont être testées contre le SARS-CoV-2.

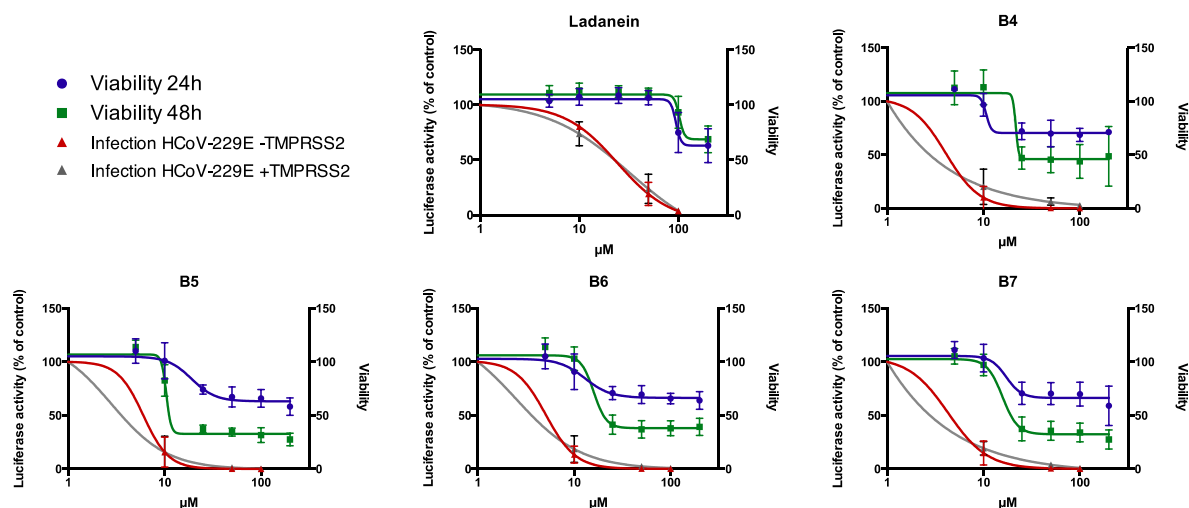


Figure 12 : Inhibition de l'infection par le HCoV-229E-Luc des cellules Huh-7 transduites ou non par TMPRSS2, en présence de concentrations croissantes de dérivés fluorés de la ladaneine (courbe rouge et grise). La viabilité des cellules Huh-7 en présence des composés a été calculée via un test MTS à 24h et 48h (courbe bleu et verte).

Conclusions

L'ensemble de nos résultats présentés ici montrent que la delphinidine est un inhibiteur d'entrée des coronavirus dans la voie endosomale. La delphinidine agit directement sur la particule virale et semble cibler le site de glycosylation N27 du HCoV-229E. Le fait que la delphinidine soit active uniquement dans la voie endosomale n'en fait pas un bon candidat pour un antiviral car les coronavirus utilisent principalement la voie membranaire pour entrer dans les cellules. Cependant, elle peut être un outil pour mieux comprendre le mécanisme d'entrée dans la voie d'endocytose des coronavirus grâce à ses propriétés particulières. Grâce à notre collaboration avec l'équipe de Dr Elhabiri nous avons identifié un nouveau composé dérivé de la delphinidine beaucoup plus actif contre le HCoV-229E qui est donc plus prometteur comme antiviral contre les coronavirus.

IV - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Une moitié de ces travaux de thèse a été consacrée à l'identification du Pba suite au fractionnement bioguidé d'un extrait de plante utilisé en médecine traditionnelle ivoirienne. Le Pba est grandement décrit pour ses propriétés photodynamiques utilisées en essais cliniques comme candidat pour la PTD. Cependant, bien qu'il soit décrit comme possédant des activités antivirales, le mécanisme de PDI impliquant la lumière n'a jamais été mis en évidence, de plus l'effet antiviral du Pba n'était pas décrit contre les coronavirus avant ces travaux de thèse.

Nos travaux ont montré que le Pba utilisait le mécanisme de PDI contre les coronavirus HCoV-229E, MERS-CoV et SARS-CoV-2 et inhibait l'étape de fusion par oxydation des lipides constituant l'enveloppe virale. Nous avons aussi montré que le Pba a été capable d'inhiber d'autres virus enveloppés comme Sinbis, YFV et VHC mais pas le virus coxsackie, virus non enveloppé.

Les propriétés antivirales dépendant de la lumière du Pba rendent son utilisation complexe. Dans le but d'envisager une utilisation chez l'homme nous avons réalisé une étude *in vivo* sur des souris humanisées pour le récepteur ACE2 en collaboration avec l'équipe de François Trottein. Malheureusement, comme nous le pressentions, l'absence de lumière dans les poumons de l'animal empêche le Pba de photoinactiver les particules virales du SARS-CoV-2. De ce fait, il semble compliqué d'envisager un traitement antiviral chez l'homme à base de Pba. Toutefois il existe des techniques d'irradiation lumineuse utilisées en oncologie, (Almeida et al. 2020; Sabino et al. 2020). Ces techniques utilisant des fibres optiques chez des patients intubés pourraient illuminer suffisamment les poumons pour que le Pba puisse agir contre le virus. Cependant, les patients hospitalisés dans les cas de COVID-19 avec une ventilation mécanique et oxygénation par intubation sont principalement dans les stades tardifs de la maladie, où les dégâts sont causés par une hyperinflammation présente dans les poumons et non pas par la présence de virus répliquatifs. Ainsi une utilisation efficace du Pba chez l'homme nécessiterait la pose de fibre optique chez des patients dans la 2^e phase de la COVID-19, ce qui serait trop complexe à réaliser.

En revanche, la nature non toxique et naturelle du Pba pourrait en faire un désinfectant de surface, cela aurait un effet double : l'inactivation des virus présents lors de l'application et un effet protecteur contre les virus se déposant sur la surface après application tant que le Pba n'est pas retiré et que la surface est exposée à une source

lumineuse (lumière blanche provenant d'une quelconque lampe d'intérieur ou lumière du soleil)

Il existe déjà sur le marché des équipements filtrant l'air ambiant et inactivant les virus pris dans le filtre par une forte exposition aux rayons UV. Le Pba combiné à cette technologie pourrait grandement augmenter les capacités d'inactivation de ces filtres. On peut aussi envisager d'utiliser le Pba en prévention, par exemple sous forme de spray dans les voies respiratoires hautes, premier lieu d'infection du SARS-CoV-2, et suffisamment exposé à la lumière extérieure pour déclencher le mécanisme de PDI.

Enfin le Pba est un composé naturel très facile à obtenir, induisant un coût de production très faible comparé à d'autres produits chimiques utilisés au cours de la pandémie de COVID-19. Etudier des potentielles applications comme citées au dessus pourrait donc se faire à faible coût.

La delphinidine, une anthocyanidine identifiée dans le laboratoire comme un inhibiteur de l'étape d'entrée de VHC (Calland et al. 2015) a été l'objet de mon deuxième projet sur lequel j'ai investi la moitié de ma thèse. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons démontré que la delphinidine avait un effet antiviral dose dépendant contre les coronavirus pendant l'étape d'entrée en ciblant la particule virale. La cible de la delphinidine semble être l'asparagine glycosylée en position 1035 sur la protéine S du HCoV-229E. Nous avons créé des mutants des sites de glycosylation de la protéine S du MERS-CoV sur des régions homologues à celle du HCoV-229E présenté ici, mais ces mutations empêchent complètement l'infection des MERSpp par la voie endosomale sans réduire leur capacité infectieuse par la voie membranaire. Notre hypothèse est que la delphinidine s'attacherait à ce glycane qui semble primordial pour l'entrée du virus par la voie endosomale, ce qui aurait comme conséquence l'inhibition de l'étape de fusion.

En effet, comme montré sur la Figure 1 (Yuan et al. 2017), cette région de la protéine S correspond à la région qui va changer de conformation pour s'apparier une fois le peptide de fusion inséré dans la membrane de la cellule cible : ce changement de conformation va rapprocher la membrane cellulaire de la membrane virale provoquant la fusion. Or, si la delphinidine se trouve dans cette région au moment de la fusion (ici entre le domaine SBD3 et HR2 sur le schéma Figure 1), il est envisageable que l'appariement entre HR1 et HR2 soit inhibé, empêchant le rapprochement des membranes. Une autre hypothèse serait que ce glycane joue un rôle clé lors des étapes d'entrée. En effet (Casalino et al. 2020) ont montré que la protéine S était fortement glycosylée et que ces glycanes étaient nécessaires au bon déroulement de l'étape d'entrée via divers changements de conformation. La neutralisation

ou modification d'un des glycanes par la delphinidine sans nécessairement s'y fixer pourrait bloquer un mécanisme clé pour les étapes précoces du cycle viral autre que l'appariement des domaines HR1 et HR2.

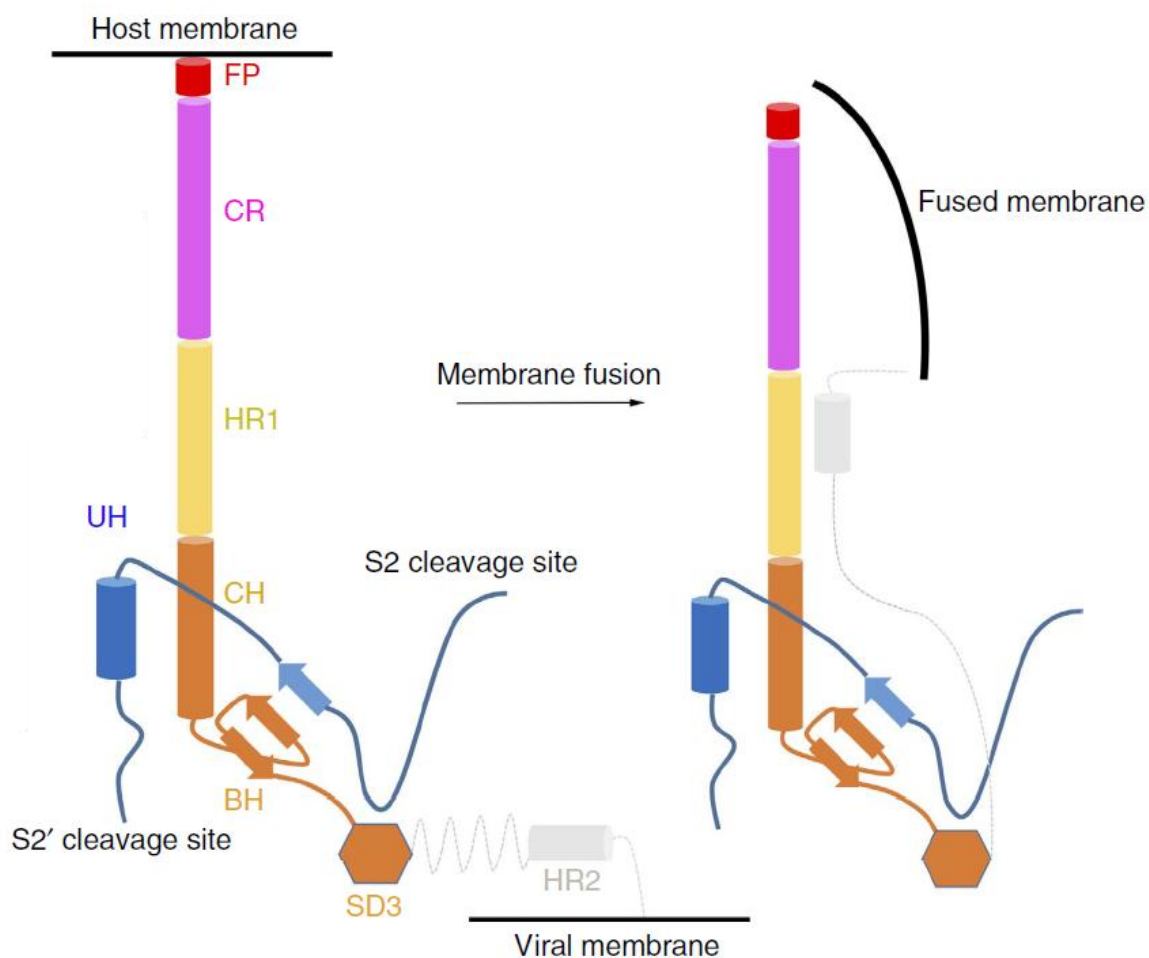


Figure 1 : Changement de conformation de la protéine S du MERS-CoV permettant la fusion membranaire (Yuan et al. 2017)

A la suite de notre collaboration avec l'équipe de Dr Elharbiri du laboratoire de Chimie Bio-organique et Médicinale de Strasbourg nous avons identifié un nouveau composé dérivé de la delphinidine, bien plus actif contre le coronavirus HCoV-229E ($IC_{50} = 65$ nM). Ce composé ne semble pas actif contre le SARS-CoV2 et doit encore être testé contre le MERS-CoV mais serait potentiellement un antiviral prometteur. Toutefois son mécanisme d'action reste à être élucidé. En effet, contrairement à la delphinidine, ce composé semble avoir un effet antiviral similaire dans la voie d'entrée endosomale et membranaire.

En parallèle de ce projet, nous nous sommes intéressés à la ladanéine, qui a été identifiée comme antiviral contre le VHC (Haid et al. 2012). Plusieurs dérivés de la ladaneine ont montré une meilleure efficacité que le composé d'origine, pouvant être des composés prometteurs contre le SARS-CoV-2.

V - BIBLIOGRAPHIE

- Abdelnabi, Rana, Caroline S. Foo, Steven De Jonghe, Piet Maes, Birgit Weynand, et Johan Neyts. 2021. « Molnupiravir Inhibits Replication of the Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern in a Hamster Infection Model ». *The Journal of Infectious Diseases* 224(5):749-53. doi: 10.1093/infdis/jiab361.
- Abd-El salam, Sherief, Rasha A. Noor, Rehab Badawi, Mai Khalaf, Eslam S. Esmail, Shaimaa Soliman, Mohamed S. Abd El Ghafar, Mohamed Elbahnasawy, Ehab F. Moustafa, Sahar M. Hassany, Mohammed A. Medhat, Haidi Karam-Allah Ramadan, Maii A. S. Eldeen, Mohamed Alboraie, Ahmed Cordie, et Gamal Esmat. 2021. « Clinical Study Evaluating the Efficacy of Ivermectin in COVID-19 Treatment: A Randomized Controlled Study ». *Journal of Medical Virology* jmv.27122. doi: 10.1002/jmv.27122.
- Abella, Benjamin S., Eliana L. Jolkovsky, Barbara T. Biney, Julie E. Uspal, Matthew C. Hyman, Ian Frank, Scott E. Hensley, Saar Gill, Dan T. Vogl, Ivan Maillard, Daria V. Babushok, Alexander C. Huang, Sunita D. Nasta, Jennifer C. Walsh, E. Paul Wiletyo, Phyllis A. Gimotty, Michael C. Milone, Ravi K. Amaravadi, et Prevention and Treatment of COVID-19 With Hydroxychloroquine (PATCH) Investigators. 2021. « Efficacy and Safety of Hydroxychloroquine vs Placebo for Pre-Exposure SARS-CoV-2 Prophylaxis Among Health Care Workers: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA Internal Medicine* 181(2):195. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.6319.
- Agostini, Maria L., Erica L. Andres, Amy C. Sims, Rachel L. Graham, Timothy P. Sheahan, Xiaotao Lu, Everett Clinton Smith, James Brett Case, Joy Y. Feng, Robert Jordan, Adrian S. Ray, Tomas Cihlar, Dustin Siegel, Richard L. Mackman, Michael O. Clarke, Ralph S. Baric, et Mark R. Denison. 2018. « Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease » édité par K. Subbarao. *MBio* 9(2):e00221-18, /mbio/9/2/mBio.00221-18.atom. doi: 10.1128/mBio.00221-18.
- Agostinis, Patrizia, Kristian Berg, Keith A. Cengel, Thomas H. Foster, Albert W. Girotti, Sandra O. Gollnick, Stephen M. Hahn, Michael R. Hamblin, Asta Juzeniene, David Kessel, Mladen Korbek, Johan Moan, Pawel Mroz, Dominika Nowis, Jacques Piette, Brian C. Wilson, et Jakub Golab. 2011. « Photodynamic Therapy of Cancer: An Update ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.20114.
- Aguilar, Richard B., Patrick Hardigan, Bindu Mayi, Darby Sider, Jared Piotrkowski, Jinesh P. Mehta, Jenankan Dev, Yelenis Seijo, Antonio Lewis Camargo, Luis Andux, Kathleen Hagen, et Marlow B. Hernandez. 2020. « Current Understanding of COVID-19 Clinical Course and Investigational Treatments ». *Frontiers in Medicine* 7:555301. doi: 10.3389/fmed.2020.555301.
- Ahmadi, Reza, Soofia Salari, Mohammad Davood Sharifi, Hamidreza Reihani, Mohammad Bagher Rostamiani, Morteza Behmadi, Zhila Taherzadeh, Saeed Eslami, Seyed Mahdi Rezayat, Mahmoud Reza Jaafari, et Sepideh Elyasi. 2021. « Oral Nano-curcumin Formulation Efficacy in the Management of Mild to Moderate Outpatient COVID-19: A Randomized Triple-blind Placebo-controlled Clinical Trial ». *Food Science & Nutrition* 9(8):4068-75. doi: 10.1002/fsn3.2226.

- Ahmed, Mukhtar H., et Arez Hassan. 2020. «Dexamethasone for the Treatment of Coronavirus Disease (COVID-19): A Review ». *SN Comprehensive Clinical Medicine* 2(12):2637-46. doi: 10.1007/s42399-020-00610-8.
- Ahn, Mee-Young, Hyo-Eun Yoon, Seong-Yong Moon, Yong-Chul Kim, et Jung-Hoon Yoon. 2017. « Intratumoral Photodynamic Therapy With Newly Synthesized Pheophorbide a in Murine Oral Cancer ». *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 25(2):295-304. doi: 10.3727/096504016X14732527645922.
- Al-Abdoun, Ahmad, Anas Bizanti, Mahmoud Barbarawi, Ahmad Jabri, Ashish Kumar, Oluwaseun E. Fashanu, Safi U. Khan, Di Zhao, Annukka A. R. Antar, et Erin D. Michos. 2021. « Remdesivir for the Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *Contemporary Clinical Trials* 101:106272. doi: 10.1016/j.cct.2021.106272.
- Alam, Mohammud M., Saborny Mahmud, Sandeep Aggarwal, Sawsan Fathma, Naim Al Mahi, Mohammed S. Shibli, Siddiqi M. Haque, Sharothy Mahmud, et Ziauddin Ahmed. 2021. « Clinical Impact of the Early Use of Monoclonal Antibody LY-CoV555 (Bamlanivimab) on Mortality and Hospitalization Among Elderly Nursing Home Patients: A Multicenter Retrospective Study ». *Cureus*. doi: 10.7759/cureus.14933.
- Alam, Safaet, Md. Moklesur Rahman Sarker, Sadia Afrin, Fahmida Tasnim Richi, Chao Zhao, Jin-Rong Zhou, et Isa Naina Mohamed. 2021. « Traditional Herbal Medicines, Bioactive Metabolites, and Plant Products Against COVID-19: Update on Clinical Trials and Mechanism of Actions ». *Frontiers in Pharmacology* 12:671498. doi: 10.3389/fphar.2021.671498.
- Alavi Darazam, Ilad, Shervin Shokouhi, Mohamad Amin Pourhoseingholi, Seyed Sina Naghibi Irvani, Majid Mokhtari, Minoosh Shabani, Mahdi Amirdosara, Parham Torabinaid, Maryam Golmohammadi, SayedPayam Hashemi, Arsalan Azimi, Mohammad Hossein Jafarazadeh Maivan, Omidvar Rezaei, Alireza Zali, Mohammadreza Hajiesmaeili, Hadiseh Shabanpour Dehbsneh, Akram Hoseyni Kusha, Maryam Taleb Shoushtari, Negar Khalili, Azam Soleymaninia, Latif Gachkar, et Ali Khoshkar. 2021. « Role of Interferon Therapy in Severe COVID-19: The COVIFERON Randomized Controlled Trial ». *Scientific Reports* 11(1):8059. doi: 10.1038/s41598-021-86859-y.
- Alene, Muluneh, Leltework Yismaw, Moges Agazhe Assemie, Daniel Bekele Ketema, Belayneh Mengist, Bekalu Kassie, et Tilahun Yemanu Birhan. 2021. « Magnitude of Asymptomatic COVID-19 Cases throughout the Course of Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis » édité par K. O. Kwok. *PLOS ONE* 16(3):e0249090. doi: 10.1371/journal.pone.0249090.
- Alhadrami, Hani A., Ahmed M. Sayed, Ahmed M. Sharif, Esam I. Azhar, et Mostafa E. Rateb. 2021. « Olive-Derived Triterpenes Suppress SARS COV-2 Main Protease: A Promising Scaffold for Future Therapeutics ». *Molecules* 26(9):2654. doi: 10.3390/molecules26092654.
- Alharbi, Naif Khalaf, Eriko Padron-Regalado, Craig P. Thompson, Alexandra Kupke, Daniel Wells, Megan A. Sloan, Keith Grehan, Nigel Temperton, Teresa Lambe, George Warimwe, Stephan Becker, Adrian V. S. Hill, et Sarah C. Gilbert. 2017. « ChAdOx1 and MVA Based Vaccine Candidates against MERS-CoV Elicit Neutralising

- Antibodies and Cellular Immune Responses in Mice ». *Vaccine* 35(30):3780-88. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.032.
- Almadhi, Marwa Ali, Abdulkarim Abdulrahman, Sayed Ali Sharaf, Dana AlSaad, Nigel J. Stevenson, Stephen L. Atkin, et Manaf M. AlQahtani. 2021. « The High Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection Reveals the Silent Spread of COVID-19 ». *International Journal of Infectious Diseases* 105:656-61. doi: 10.1016/j.ijid.2021.02.100.
- Almeida, Adelaide, M. Amparo F. Faustino, et Maria G. P. M. S. Neves. 2020. « Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19 ». *Antibiotics* 9(6):320. doi: 10.3390/antibiotics9060320.
- Alpdagtas, Saadet, Elif Ilhan, Ebru Uysal, Mustafa Sengor, Cem Bulent Ustundag, et Oguzhan Gunduz. 2020. « Evaluation of Current Diagnostic Methods for COVID-19 ». *APL Bioengineering* 4(4):041506. doi: 10.1063/5.0021554.
- Alsaidi, Sahar, Nadjat Cornejal, Oneil Mahoney, Claudia Melo, Neeharika Verma, Thierry Bonnaire, Theresa Chang, Barry R. O'Keefe, James Sailer, Thomas M. Zydowsky, Natalia Teleshova, et José A. Fernández Romero. 2021. « Griffithsin and Carrageenan Combination Results in Antiviral Synergy against SARS-CoV-1 and 2 in a Pseudoviral Model ». *Marine Drugs* 19(8):418. doi: 10.3390/md19080418.
- Alsenani, Faisal. 2021. « Potential Natural Candidates in the Treatment of Coronavirus Infections ». *Saudi Journal of Biological Sciences* S1319562X2100468X. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.008.
- Alturki, Sana O., Sawsan O. Alturki, Jennifer Connors, Gina Cusimano, Michele A. Kutzler, Abdullah M. Izmirly, et Elias K. Haddad. 2020. « The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development ». *Frontiers in Immunology* 11:1880. doi: 10.3389/fimmu.2020.01880.
- Anand, Arumugam Vijaya, Balasubramanian Balamuralikrishnan, Mohandass Kaviya, Kathirvel Bharathi, Aluru Parithathvi, Meyyazhagan Arun, Nachiappan Senthilkumar, Shanmugam Velayuthaprabhu, Muthukrishnan Saradhadevi, Naif Abdullah Al-Dhabi, Mariadhas Valan Arasu, Mohammad Iqbal Yattoo, Ruchi Tiwari, et Kuldeep Dhama. 2021. « Medicinal Plants, Phytochemicals, and Herbs to Combat Viral Pathogens Including SARS-CoV-2 ». *Molecules* 26(6):1775. doi: 10.3390/molecules26061775.
- Ang, Lin, Hye Won Lee, Jun Yong Choi, Junhua Zhang, et Myeong Soo Lee. 2020. « Herbal medicine and pattern identification for treating COVID-19: a rapid review of guidelines ». *Integrative Medicine Research* 9(2):100407. doi: 10.1016/j.imr.2020.100407.
- Anon. s. d. « d41586-021-00728-2.pdf ».
- Anywar, Godwin, Muhammad Akram, et Muhammad Amjad Chishti. 2021. « African and Asian Medicinal Plants as a Repository for Prospective Antiviral Metabolites Against HIV-1 and SARS CoV-2: A Mini Review ». *Frontiers in Pharmacology* 12:703837. doi: 10.3389/fphar.2021.703837.
- Azzi, L., V. Maurino, A. Baj, M. Dani, A. d'Aiuto, M. Fasano, M. Lualdi, F. Sessa, et T. Alberio. 2021. « Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2 ». *Journal of Dental Research* 100(2):115-23. doi: 10.1177/0022034520969670.

- Bailly, Christian, et Gérard Vergoten. 2020. « Glycyrrhizin: An Alternative Drug for the Treatment of COVID-19 Infection and the Associated Respiratory Syndrome? » *Pharmacology & Therapeutics* 214:107618. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107618.
- Barton, Christopher, J. Kouokam, Harrell Hurst, et Kenneth Palmer. 2016. « Pharmacokinetics of the Antiviral Lectin Griffithsin Administered by Different Routes Indicates Multiple Potential Uses ». *Viruses* 8(12):331. doi: 10.3390/v8120331.
- Baum, Alina, Dharani Ajithdoss, Richard Copin, Anbo Zhou, Kathryn Lanza, Nicole Negron, Min Ni, Yi Wei, Kusha Mohammadi, Bret Musser, Gurinder S. Atwal, Adelekan Oyejide, Yenny Goetz-Gazi, John Dutton, Elizabeth Clemmons, Hilary M. Staples, Carmen Bartley, Benjamin Klaffke, Kendra Alfson, Michal Gazi, Olga Gonzalez, Edward Dick, Ricardo Carrion, Laurent Pessaint, Maciel Porto, Anthony Cook, Renita Brown, Vaneesha Ali, Jack Greenhouse, Tammy Taylor, Hanne Andersen, Mark G. Lewis, Neil Stahl, Andrew J. Murphy, George D. Yancopoulos, et Christos A. Kyratsous. 2020. « REGN-COV2 Antibodies Prevent and Treat SARS-CoV-2 Infection in Rhesus Macaques and Hamsters ». *Science* 370(6520):1110-15. doi: 10.1126/science.abe2402.
- Beigel, John H., Kay M. Tomashek, Lori E. Dodd, Aneesh K. Mehta, Barry S. Zingman, Andre C. Kalil, Elizabeth Hohmann, Helen Y. Chu, Annie Luetkemeyer, Susan Kline, Diego Lopez de Castilla, Robert W. Finberg, Kerry Dierberg, Victor Tapson, Lanny Hsieh, Thomas F. Patterson, Roger Paredes, Daniel A. Sweeney, William R. Short, Giota Touloumi, David Chien Lye, Norio Ohmagari, Myoung-don Oh, Guillermo M. Ruiz-Palacios, Thomas Benfield, Gerd Fätkenheuer, Mark G. Kortepeter, Robert L. Atmar, C. Buddy Creech, Jens Lundgren, Abdel G. Babiker, Sarah Pett, James D. Neaton, Timothy H. Burgess, Tyler Bonnett, Michelle Green, Mat Makowski, Anu Osinusi, Seema Nayak, et H. Clifford Lane. 2020. « Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report ». *New England Journal of Medicine* 383(19):1813-26. doi: 10.1056/NEJMoa2007764.
- Belouzard, S., V. C. Chu, et G. R. Whittaker. 2009. « Activation of the SARS Coronavirus Spike Protein via Sequential Proteolytic Cleavage at Two Distinct Sites ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(14):5871-76. doi: 10.1073/pnas.0809524106.
- Belouzard, Sandrine, Jean K. Millet, Beth N. Licitra, et Gary R. Whittaker. 2012. « Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein ». *Viruses* 4(6):1011-33. doi: 10.3390/v4061011.
- Bertram, S., R. Dijkman, M. Habjan, A. Heurich, S. Gierer, I. Glowacka, K. Welsch, M. Winkler, H. Schneider, H. Hofmann-Winkler, V. Thiel, et S. Pohlmann. 2013. « TMPRSS2 Activates the Human Coronavirus 229E for Cathepsin-Independent Host Cell Entry and Is Expressed in Viral Target Cells in the Respiratory Epithelium ». *Journal of Virology* 87(11):6150-60. doi: 10.1128/JVI.03372-12.
- Bharadwaj, Shiv, Amit Dubey, Umesh Yadava, Sarad Kumar Mishra, Sang Gu Kang, et Vivek Dhar Dwivedi. 2021. « Exploration of Natural Compounds with Anti-SARS-CoV-2 Activity via Inhibition of SARS-CoV-2 Mpro ». *Briefings in Bioinformatics* 22(2):1361-77. doi: 10.1093/bib/bbaa382.
- Bhuiyan, Farhana Rumzum, Sabbir Howlader, Topu Raihan, et Mahmudul Hasan. 2020. « Plants Metabolites: Possibility of Natural Therapeutics Against the COVID-19 Pandemic ». *Frontiers in Medicine* 7:444. doi: 10.3389/fmed.2020.00444.

- Blum, Leonard, Gerd Geisslinger, Michael J. Parnham, Arnold Grünweller, et Susanne Schiffmann. 2020. « Natural Antiviral Compound Silvestrol Modulates Human Monocyte-derived Macrophages and Dendritic Cells ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(12):6988-99. doi: 10.1111/jcmm.15360.
- Boni, Maciej F., Philippe Lemey, Xiaowei Jiang, Tommy Tsan-Yuk Lam, Blair W. Perry, Todd A. Castoe, Andrew Rambaut, et David L. Robertson. 2020. « Evolutionary Origins of the SARS-CoV-2 Sarbecovirus Lineage Responsible for the COVID-19 Pandemic ». *Nature Microbiology* 5(11):1408-17. doi: 10.1038/s41564-020-0771-4.
- Bousslama, Lamjed, Kyoko Hayashi, Jung-Bum Lee, Abdelwahed Ghorbel, et Toshimitsu Hayashi. 2011. « Potent Virucidal Effect of Pheophorbide a and Pyropheophorbide a on Enveloped Viruses ». *Journal of Natural Medicines* 65(1):229-33. doi: 10.1007/s11418-010-0468-8.
- Brown, Ariane J., John J. Won, Rachel L. Graham, Kenneth H. Dinno, Amy C. Sims, Joy Y. Feng, Tomas Cihlar, Mark R. Denison, Ralph S. Baric, et Timothy P. Sheahan. 2019. « Broad Spectrum Antiviral Remdesivir Inhibits Human Endemic and Zoonotic Deltacoronaviruses with a Highly Divergent RNA Dependent RNA Polymerase ». *Antiviral Research* 169:104541. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104541.
- Burks, Susan M., Hector Rosas-Hernandez, Manuel Alejandro Ramirez-Lee, Elvis Cuevas, et John C. Talpos. 2021. « Can SARS-CoV-2 Infect the Central Nervous System via the Olfactory Bulb or the Blood-Brain Barrier? » *Brain, Behavior, and Immunity* 95:7-14. doi: 10.1016/j.bbi.2020.12.031.
- Busch, Theresa, Keith A. Cengel, et Jarod Finlay. 2009. « Pheophorbide a as a Photosensitizer in Photodynamic Therapy: In Vivo Considerations ». *Cancer Biology & Therapy* 8(6):540-42. doi: 10.4161/cbt.8.6.8067.
- Butler, Noah, Lecia Pewe, Kathryn Trandem, et Stanley Perlman. 2006. « Murine Encephalitis Caused by HCoV-OC43, a Human Coronavirus with Broad Species Specificity, Is Partly Immune-Mediated ». *Virology* 347(2):410-21. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.044.
- Cai, Yanxing, Wei Xu, Chenjian Gu, Xia Cai, Di Qu, Lu Lu, Youhua Xie, et Shibo Jiang. 2020. « Griffithsin with A Broad-Spectrum Antiviral Activity by Binding Glycans in Viral Glycoprotein Exhibits Strong Synergistic Effect in Combination with A Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting SARS-CoV-2 Spike S2 Subunit ». *Virologica Sinica* 35(6):857-60. doi: 10.1007/s12250-020-00305-3.
- Calland, Noémie, Anna Albecka, Sandrine Belouzard, Czeslaw Wychowski, Gilles Duverlie, Véronique Descamps, Didier Hober, Jean Dubuisson, Yves Rouillé, et Karin Séron. 2012. « (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus Entry ». *Hepatology* 55(3):720-29. doi: 10.1002/hep.24803.
- Calland, Noémie, Marie-Emmanuelle Sahuc, Sandrine Belouzard, Véronique Pène, Pierre Bonnaïfous, Ahmed Atef Mesalam, Gaspard Deloison, Véronique Descamps, Sevser Sahpaz, Czeslaw Wychowski, Olivier Lambert, Priscille Brodin, Gilles Duverlie, Philip Meuleman, Arielle R. Rosenberg, Jean Dubuisson, Yves Rouillé, et Karin Séron. 2015. « Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action » édité par M. S. Diamond. *Journal of Virology* 89(19):10053-63. doi: 10.1128/JVI.01473-15.

- Caly, Leon, Julian D. Druce, Mike G. Catton, David A. Jans, et Kylie M. Wagstaff. 2020. « The FDA-Approved Drug Ivermectin Inhibits the Replication of SARS-CoV-2 in Vitro ». *Antiviral Research* 178:104787. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.
- Cannalire, Rolando, Irina Stefanelli, Carmen Cerchia, Andrea R. Beccari, Sveva Pelliccia, et Vincenzo Summa. 2020. « SARS-CoV-2 Entry Inhibitors: Small Molecules and Peptides Targeting Virus or Host Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(16):5707. doi: 10.3390/ijms21165707.
- Cao, Bin, Yeming Wang, Danning Wen, Wen Liu, Jingli Wang, Guohui Fan, Lianguo Ruan, Bin Song, Yanping Cai, Ming Wei, Xingwang Li, Jiaan Xia, Nanshan Chen, Jie Xiang, Ting Yu, Tao Bai, Xuelei Xie, Li Zhang, Caihong Li, Ye Yuan, Hua Chen, Huadong Li, Hanping Huang, Shengjing Tu, Fengyun Gong, Ying Liu, Yuan Wei, Chongya Dong, Fei Zhou, Xiaoying Gu, Jiuyang Xu, Zhibo Liu, Yi Zhang, Hui Li, Lianhan Shang, Ke Wang, Kunxia Li, Xia Zhou, Xuan Dong, Zhaohui Qu, Sixia Lu, Xujuan Hu, Shunan Ruan, Shanshan Luo, Jing Wu, Lu Peng, Fang Cheng, Lihong Pan, Jun Zou, Chunmin Jia, Juan Wang, Xia Liu, Shuzhen Wang, Xudong Wu, Qin Ge, Jing He, Haiyan Zhan, Fang Qiu, Li Guo, Chaolin Huang, Thomas Jaki, Frederick G. Hayden, Peter W. Horby, Dingyu Zhang, et Chen Wang. 2020. « A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19 ». *New England Journal of Medicine* 382(19):1787-99. doi: 10.1056/NEJMoa2001282.
- Caruana, G., A. Croxatto, A. T. Coste, O. Opota, F. Lamoth, K. Jatun, et G. Greub. 2020. « Diagnostic Strategies for SARS-CoV-2 Infection and Interpretation of Microbiological Results ». *Clinical Microbiology and Infection* 26(9):1178-82. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.019.
- Casalino, Lorenzo, Zied Gaieb, Jory A. Goldsmith, Christy K. Hjorth, Abigail C. Dommer, Aoife M. Harbison, Carl A. Fogarty, Emilia P. Barros, Bryn C. Taylor, Jason S. McLellan, Elisa Fadda, et Rommie E. Amaro. 2020. « Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein ». *ACS Central Science* 6(10):1722-34. doi: 10.1021/acscentsci.0c01056.
- Celejewska-Wójcik, Natalia, Kamil Polok, Karolina Górka, Tomasz Stachura, Aleksander Kania, Paweł Nastątek, Sabina Lichołai, Jacek Krawczyk, Krzysztof Wójcik, et Krzysztof Sładek. 2021. « High-Flow Nasal Oxygen Therapy in the Treatment of Acute Respiratory Failure in Severe COVID-19 Pneumonia: A Prospective Observational Study ». *Polish Archives of Internal Medicine*. doi: 10.20452/pamw.16015.
- Cevik, Muge, Krutika Kuppalli, Jason Kindrachuk, et Malik Peiris. 2020. « Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2 ». *BMJ* m3862. doi: 10.1136/bmj.m3862.
- Cevik, Muge, Julia L. Marcus, Caroline Buckee, et Tara C. Smith. 2021. « Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Transmission Dynamics Should Inform Policy ». *Clinical Infectious Diseases* 73(Supplement_2):S170-76. doi: 10.1093/cid/ciaa1442.
- Chaccour, Carlos, Aina Casellas, Andrés Blanco-Di Matteo, Iñigo Pineda, Alejandro Fernandez-Montero, Paula Ruiz-Castillo, Mary-Ann Richardson, Mariano Rodríguez-Mateos, Carlota Jordán-Iborra, Joe Brew, Francisco Carmona-Torre, Miriam Giráldez, Ester Laso, Juan C. Gabaldón-Figueira, Carlota Dobaño, Gemma Moncunill, José R. Yuste, Jose L. Del Pozo, N. Regina Rabinovich, Verena Schöning, Felix Hammann,

- Gabriel Reina, Belen Sadaba, et Mirian Fernández-Alonso. 2021. « The Effect of Early Treatment with Ivermectin on Viral Load, Symptoms and Humoral Response in Patients with Non-Severe COVID-19: A Pilot, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial ». *EClinicalMedicine* 32:100720. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100720.
- Chan, Jasper F. W., Susanna K. P. Lau, Kelvin K. W. To, Vincent C. C. Cheng, Patrick C. Y. Woo, et Kwok-Yung Yuen. 2015. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease ». *Clinical Microbiology Reviews* 28(2):465-522. doi: 10.1128/CMR.00102-14.
- Chan, Jasper Fuk-Woo, Kelvin Kai-Wang To, Herman Tse, Dong-Yan Jin, et Kwok-Yung Yuen. 2013. « Interspecies Transmission and Emergence of Novel Viruses: Lessons from Bats and Birds ». *Trends in Microbiology* 21(10):544-55. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.005.
- Channappanavar, Rudragouda, Lu Lu, Shuai Xia, Lanying Du, David K. Meyerholz, Stanley Perlman, et Shibo Jiang. 2015. « Protective Effect of Intranasal Regimens Containing Peptidic Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Inhibitor Against MERS-CoV Infection ». *Journal of Infectious Diseases* 212(12):1894-1903. doi: 10.1093/infdis/jiv325.
- Chen, Chung-Jen, Martin Michaelis, Hseng-Kuang Hsu, Chin-Chuan Tsai, Kunder D. Yang, Yang-Chang Wu, Jindrich Cinatl, et Hans Wilhelm Doerr. 2008. « Toona Sinensis Roem Tender Leaf Extract Inhibits SARS Coronavirus Replication ». *Journal of Ethnopharmacology* 120(1):108-111. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.048.
- Chen, Daiwei, Shengsheng Lu, Guang Yang, Xiaoyan Pan, Sheng Fan, Xi Xie, Qi Chen, Fangfang Li, Zhonghuang Li, Shaohua Wu, et Jian He. 2020. « The Seafood *Musculus Senhoussei* Shows Anti-Influenza A Virus Activity by Targeting Virion Envelope Lipids ». *Biochemical Pharmacology* 177:113982. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113982.
- Chen, Hongyi, Zhicheng Zhang, Li Wang, Zhihua Huang, Fanghua Gong, Xiaodong Li, Yahong Chen, et Jinzi J. Wu. 2020. « First Clinical Study Using HCV Protease Inhibitor Danoprevir to Treat COVID-19 Patients ». *Medicine* 99(48):e23357. doi: 10.1097/MD.00000000000023357.
- Chen, Peter, Ajay Nirula, Barry Heller, Robert L. Gottlieb, Joseph Boscia, Jason Morris, Gregory Huhn, Jose Cardona, Bharat Mocherla, Valentina Stosor, Imad Shawa, Andrew C. Adams, Jacob Van Naarden, Kenneth L. Custer, Lei Shen, Michael Durante, Gerard Oakley, Andrew E. Schade, Janelle Sabo, Dipak R. Patel, Paul Klekotka, et Daniel M. Skovronsky. 2021. « SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19 ». *New England Journal of Medicine* 384(3):229-37. doi: 10.1056/NEJMoa2029849.
- Chen, Ya, Christina de Bruyn Kops, et Johannes Kirchmair. 2017. « Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products ». *Journal of Chemical Information and Modeling* 57(9):2099-2111. doi: 10.1021/acs.jcim.7b00341.
- Chen, Yu, Qianyun Liu, et Deyin Guo. 2020. « Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis ». *Journal of Medical Virology* 92(4):418-23. doi: 10.1002/jmv.25681.

- Chen-Collins, Avril RM, Dabney W. Dixon, Andrei N. Vzorov, Luigi G. Marzilli, et Richard W. Compans. 2003. « Prevention of Poxvirus Infection by Tetrapyrroles ». *BMC Infectious Diseases* 3(1):9. doi: 10.1186/1471-2334-3-9.
- Choy, Ka-Tim, Alvina Yin-Lam Wong, Prathanporn Kaewpreedee, Sin Fun Sia, Dongdong Chen, Kenrie Pui Yan Hui, Daniel Ka Wing Chu, Michael Chi Wai Chan, Peter Pak-Hang Cheung, Xuhui Huang, Malik Peiris, et Hui-Ling Yen. 2020. « Remdesivir, Lopinavir, Emetine, and Homoharringtonine Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vitro ». *Antiviral Research* 178:104786. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104786.
- Chu, Hin, Jasper Fuk-Woo Chan, Yixin Wang, Terrence Tsz-Tai Yuen, Yue Chai, Yuxin Hou, Huiping Shuai, Dong Yang, Bingjie Hu, Xiner Huang, Xi Zhang, Jian-Piao Cai, Jie Zhou, Shuofeng Yuan, Kin-Hang Kok, Kelvin Kai-Wang To, Ivy Hau-Yee Chan, Anna Jinxia Zhang, Ko-Yung Sit, Wing-Kuk Au, et Kwok-Yung Yuen. 2020. « Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19 ». *Clinical Infectious Diseases* 71(6):1400-1409. doi: 10.1093/cid/ciaa410.
- Chu, Ling-Hon Matthew, Siu-Hong Chan, Sau-Na Tsai, Yi Wang, Christopher Hon-Ki Cheng, Kam-Bo Wong, Mary Miu-Yee Waye, et Sai-Ming Ngai. 2008. « Fusion Core Structure of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV): In Search of Potent SARS-CoV Entry Inhibitors ». *Journal of Cellular Biochemistry* 104(6):2335-47. doi: 10.1002/jcb.21790.
- Cinatl, J., B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, et Hw Doerr. 2003. « Glycyrrhizin, an Active Component of Licorice Roots, and Replication of SARS-Associated Coronavirus ». *The Lancet* 361(9374):2045-46. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13615-X.
- Coleman, Christopher M., Ye V. Liu, Haiyan Mu, Justin K. Taylor, Michael Massare, David C. Flyer, Gregory M. Glenn, Gale E. Smith, et Matthew B. Frieman. 2014. « Purified Coronavirus Spike Protein Nanoparticles Induce Coronavirus Neutralizing Antibodies in Mice ». *Vaccine* 32(26):3169-74. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.016.
- Corman, Victor M., Olfert Landt, Marco Kaiser, Richard Molenkamp, Adam Meijer, Daniel KW Chu, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Julia Schneider, Marie Luisa Schmidt, Daphne GJC Mulders, Bart L. Haagmans, Bas van der Veer, Sharon van den Brink, Lisa Wijsman, Gabriel Goderski, Jean-Louis Romette, Joanna Ellis, Maria Zambon, Malik Peiris, Herman Goossens, Chantal Reusken, Marion PG Koopmans, et Christian Drosten. 2020. « Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR ». *Eurosurveillance* 25(3). doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Costa, Liliana, Maria Amparo F. Faustino, Maria Graça P. M. S. Neves, Ângela Cunha, et Adelaide Almeida. 2012. « Photodynamic Inactivation of Mammalian Viruses and Bacteriophages ». *Viruses* 4(7):1034-74. doi: 10.3390/v4071034.
- Cox, Robert M., Josef D. Wolf, et Richard K. Plemper. 2021. « Therapeutically Administered Ribonucleoside Analogue MK-4482/EIDD-2801 Blocks SARS-CoV-2 Transmission in Ferrets ». *Nature Microbiology* 6(1):11-18. doi: 10.1038/s41564-020-00835-2.
- Cruz-Oliveira, Christine, Andreza F. Almeida, João M. Freire, Marjolly B. Caruso, Maria A. Morando, Vivian N. S. Ferreira, Iranaia Assunção-Miranda, Andre M. O. Gomes,

- Miguel A. R. B. Castanho, et Andrea T. Da Poian. 2017. « Mechanisms of Vesicular Stomatitis Virus Inactivation by Protoporphyrin IX, Zinc-Protoporphyrin IX, and Mesoporphyrin IX ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(6):e00053-17, e00053-17. doi: 10.1128/AAC.00053-17.
- Cui, Jie, Fang Li, et Zheng-Li Shi. 2019. « Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses ». *Nature Reviews Microbiology* 17(3):181-92. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- Davies, Nicholas G., Sam Abbott, Rosanna C. Barnard, Christopher I. Jarvis, Adam J. Kucharski, James D. Munday, Carl A. B. Pearson, Timothy W. Russell, Damien C. Tully, Alex D. Washburne, Tom Wenseleers, Amy Gimma, William Waites, Kerry L. M. Wong, Kevin van Zandvoort, Justin D. Silverman, CMMID COVID-19 Working Group¹‡, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium[‡], Karla Diaz-Ordaz, Ruth Keogh, Rosalind M. Eggo, Sebastian Funk, Mark Jit, Katherine E. Atkins, et W. John Edmunds. 2021. « Estimated Transmissibility and Impact of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England ». *Science* 372(6538):eabg3055. doi: 10.1126/science.abg3055.
- Davis, Hannah E., Gina S. Assaf, Lisa McCorkell, Hannah Wei, Ryan J. Low, Yochai Re'em, Signe Redfield, Jared P. Austin, et Athena Akrami. 2021. « Characterizing Long COVID in an International Cohort: 7 Months of Symptoms and Their Impact ». *EClinicalMedicine* 38:101019. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101019.
- D'Cruz, Celina M., Edward J. Gunther, Robert B. Boxer, Jennifer L. Hartman, Louis Sintasath, Susan E. Moody, James D. Cox, Seung I. Ha, George K. Belka, Alexander Golant, Robert D. Cardiff, et Lewis A. Chodosh. 2001. « c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations ». *Nature Medicine* 7(2):235-39. doi: 10.1038/84691.
- Dias, Daniel A., Sylvia Urban, et Ute Roessner. 2012. « A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery ». *Metabolites* 2(2):303-36. doi: 10.3390/metabo2020303.
- Dolmans, Dennis E. J. G. J., Dai Fukumura, et Rakesh K. Jain. 2003. « Photodynamic therapy for cancer ». *Nature Reviews Cancer* 3(5):380-87. doi: 10.1038/nrc1071.
- Dos Santos, Ancelmo Ly Ferreira, Daria Raquel Queiroz De Almeida, Leticia Ferreira Terra, Mauricio S. Baptista, et Leticia Labriola. 2019. « Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review ». *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2019. doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
- Dyall, Julie, Christopher M. Coleman, Brit J. Hart, Thiagarajan Venkataraman, Michael R. Holbrook, Jason Kindrachuk, Reed F. Johnson, Gene G. Olinger, Peter B. Jahrling, Monique Laidlaw, Lisa M. Johansen, Calli M. Lear-Rooney, Pamela J. Glass, Lisa E. Hensley, et Matthew B. Frieman. 2014. « Repurposing of Clinically Developed Drugs for Treatment of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(8):4885-93. doi: 10.1128/AAC.03036-14.
- Ebob, Oyere Tanyi, Smith B. Babiaka, et Fidele Ntie-Kang. 2021. « Natural Products as Potential Lead Compounds for Drug Discovery Against SARS-CoV-2 ». *Natural Products and Bioprospecting*. doi: 10.1007/s13659-021-00317-w.
- ter Ellen, Bram M., Nilima Dinesh Kumar, Ellen M. Bouma, Berit Troost, Denise P. I. van de Pol, Heidi H. van der Ende-Metselaar, Leonie Apperloo, Djoke van Gosliga, Maarten van den Berge, Martijn C. Nawijn, Peter H. J. van der Voort, Jill Moser,

- Izabela A. Rodenhuis-Zybert, et Jolanda M. Smit. 2021. « Resveratrol and Pterostilbene Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Air-Liquid Interface Cultured Human Primary Bronchial Epithelial Cells ». *Viruses* 13(7):1335. doi: 10.3390/v13071335.
- Fadaka, Adewale Oluwaseun, Nicole Remalialh Samantha Sibuyi, Darius Riziki Martin, Ashwil Klein, Abram Madiehe, et Mervin Meyer. 2021. « Development of Effective Therapeutic Molecule from Natural Sources against Coronavirus Protease ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(17):9431. doi: 10.3390/ijms22179431.
- Fan, Song, Qi Zhen, Cheng Chen, Wenjun Wang, Qibing Wu, Huihui Ma, Chengyuan Zhang, Li Zhang, Baojing Lu, Huiyao Ge, Liang Yong, Bao Li, Yafen Yu, Weiwei Chen, Yiwen Mao, Guangbo Qu, Li Su, Aoli Wang, Zhen Ding, Haiwen Li, Jin Zhang, Yonglian Wang, Yufeng Gao, Xihai Xu, Zhongming Zhu, Jun Chen, Long Zhang, Hongqiang Liang, Song Wu, Meng Huang, Quan Xia, Ping Li, Yehuan Sun, Chaozhao Liang, Wei Wei, Qingsong Liu, et Liangdan Sun. 2021. « Clinical Efficacy of Low-Dose Emetine for Patients with COVID-19: A Real-World Study ». *Journal of Bio-X Research* 4(2):53-59. doi: 10.1097/JBR.0000000000000076.
- Fiolet, Thibault, Anthony Guihur, Mathieu Edouard Rebeaud, Matthieu Mulot, Nathan Peiffer-Smadja, et Yahya Mahamat-Saleh. 2021. « Effect of Hydroxychloroquine with or without Azithromycin on the Mortality of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Clinical Microbiology and Infection* 27(1):19-27. doi: 10.1016/j.cmi.2020.08.022.
- Fischer, William, Joseph J. Eron, Wayne Holman, Myron S. Cohen, Lei Fang, Laura J. Szewczyk, Timothy P. Sheahan, Ralph Baric, Katie R. Mollan, Cameron R. Wolfe, Elizabeth R. Duke, Masoud M. Azizad, Katyna Borroto-Esoda, David A. Wohl, Amy James Loftis, Paul Alabanza, Felicia Lipansky, et Wendy P. Painter. 2021. *Molnupiravir, an Oral Antiviral Treatment for COVID-19. preprint*. Infectious Diseases (except HIV/AIDS). doi: 10.1101/2021.06.17.21258639.
- Folegatti, Pedro M., Mustapha Bittaye, Amy Flaxman, Fernando Ramos Lopez, Duncan Bellamy, Alexandra Kupke, Catherine Mair, Rebecca Makinson, Jonathan Sheridan, Cornelius Rohde, Sandro Halwe, Yuji Jeong, Young-Shin Park, Jae-Ouk Kim, Manki Song, Amy Boyd, Nguyen Tran, Daniel Silman, Ian Poulton, Mehreen Dattoo, Julia Marshal, Yrene Themistocleous, Alison Lawrie, Rachel Roberts, Eleanor Berrie, Stephan Becker, Teresa Lambe, Adrian Hill, Katie Ewer, et Sarah Gilbert. 2020. « Safety and Immunogenicity of a Candidate Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Viral-Vectored Vaccine: A Dose-Escalation, Open-Label, Non-Randomised, Uncontrolled, Phase 1 Trial ». *The Lancet Infectious Diseases* S1473309920301602. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30160-2.
- Funk, Colin D., Craig Laferrière, et Ali Ardakani. 2021. « Target Product Profile Analysis of COVID-19 Vaccines in Phase III Clinical Trials and Beyond: An Early 2021 Perspective ». 19.
- Garcia-Beltran, Wilfredo F., Evan C. Lam, Kerri St. Denis, Adam D. Nitido, Zeidy H. Garcia, Blake M. Hauser, Jared Feldman, Maia N. Pavlovic, David J. Gregory, Mark C. Poznansky, Alex Sigal, Aaron G. Schmidt, A. John Iafate, Vivek Naranbhai, et Alejandro B. Balazs. 2021. « Multiple SARS-CoV-2 Variants Escape Neutralization by Vaccine-Induced Humoral Immunity ». *Cell* 184(9):2372-2383.e9. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.013.

- Gazit, Sivan, Roei Shlezinger, Galit Perez, Roni Lotan, Asaf Peretz, Amir Ben-Tov, Dani Cohen, Khitam Muhsen, Gabriel Chodick, et Tal Patalon. 2021. *Comparing SARS-CoV-2 Natural Immunity to Vaccine-Induced Immunity: Reinfections versus Breakthrough Infections*. preprint. Infectious Diseases (except HIV/AIDS). doi: 10.1101/2021.08.24.21262415.
- Gendrot, Mathieu, Julien Andreani, Manon Boxberger, Priscilla Jardot, Isabelle Fonta, Marion Le Bideau, Isabelle Duflot, Joel Mosnier, Clara Rolland, Hervé Bogreau, Sébastien Hutter, Bernard La Scola, et Bruno Pradines. 2020. « Antimalarial Drugs Inhibit the Replication of SARS-CoV-2: An in Vitro Evaluation ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 37:101873. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101873.
- Ghanbari, Reza, Ali Teimoori, Anahita Sadeghi, Ashraf Mohamadkhani, Sama Rezasoltani, Ebrahim Asadi, Abolghasem Jouyban, et Susan CJ Sumner. 2020. « Existing Antiviral Options against SARS-CoV-2 Replication in COVID-19 Patients ». *Future Microbiology* 15(18):1747-58. doi: 10.2217/fmb-2020-0120.
- Ghosh, Souvik, et Yashpal S. Malik. 2020. « Drawing Comparisons between SARS-CoV-2 and the Animal Coronaviruses ». *Microorganisms* 8(11):1840. doi: 10.3390/microorganisms8111840.
- Gómez Alvarez, Elena, Henri Wortham, Rafal Strekowski, Cornelius Zetzsch, et Sasho Gligorovski. 2012. « Atmospheric Photosensitized Heterogeneous and Multiphase Reactions: From Outdoors to Indoors ». *Environmental Science & Technology* 46(4):1955-63. doi: 10.1021/es2019675.
- Gómez, Carmen Elena, Beatriz Perdiguero, et Mariano Esteban. 2021. « Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19 ». *Vaccines* 9(3):243. doi: 10.3390/vaccines9030243.
- González Canga, Aránzazu, Ana M. Sahagún Prieto, M. José Díez Liébana, Nélida Fernández Martínez, Matilde Sierra Vega, et Juan J. García Vieitez. 2008. « The Pharmacokinetics and Interactions of Ivermectin in Humans—A Mini-Review ». *The AAPS Journal* 10(1):42-46. doi: 10.1208/s12248-007-9000-9.
- Gordon, Calvin J., Egor P. Tchesnokov, Joy Y. Feng, Danielle P. Porter, et Matthias Gotte. 2020. « The Antiviral Compound Remdesivir Potently Inhibits RNA-Dependent RNA Polymerase from Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Journal of Biological Chemistry* jbc.AC120.013056. doi: 10.1074/jbc.AC120.013056.
- Gour, Abhishek, Diksha Manhas, Swarnendu Bag, Bapi Gorain, et Utpal Nandi. 2021. « Flavonoids as Potential Phytotherapeutics to Combat Cytokine Storm in SARS-CoV-2 ». *Phytotherapy Research* 35(8):4258-83. doi: 10.1002/ptr.7092.
- de Groot, R. J., S. C. Baker, R. S. Baric, C. S. Brown, C. Drosten, L. Enjuanes, R. A. M. Fouchier, M. Galiano, A. E. Gorbalenya, Z. A. Memish, S. Perlman, L. L. M. Poon, E. J. Snijder, G. M. Stephens, P. C. Y. Woo, A. M. Zaki, M. Zambon, et J. Ziebuhr. 2013. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group ». *Journal of Virology* 87(14):7790-92. doi: 10.1128/JVI.01244-13.
- Gu, Chenjian, Yang Wu, Huimin Guo, Yuanfei Zhu, Wei Xu, Yuyan Wang, Yu Zhou, Zhiping Sun, Xia Cai, Yutang Li, Jing Liu, Zhong Huang, Zhenghong Yuan, Rong Zhang, Qiang Deng, Di Qu, et Youhua Xie. 2021. « Protoporphyrin IX and Verteporfin Potently Inhibit SARS-CoV-2 Infection in Vitro and in a Mouse Model

- Guo, Gangqiang, Lele Ye, Kan Pan, Yu Chen, Dong Xing, Kejing Yan, Zhiyuan Chen, Ning Ding, Wenshu Li, Hong Huang, Lifang Zhang, Xiaokun Li, et Xiangyang Xue. 2020. « New Insights of Emerging SARS-CoV-2: Epidemiology, Etiology, Clinical Features, Clinical Treatment, and Prevention ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:410. doi: 10.3389/fcell.2020.00410.
- Guo, Haitao, Xiaoben Pan, Richeng Mao, Xianchao Zhang, Lijuan Wang, Xuanyong Lu, Jinhong Chang, Ju-Tao Guo, Shendra Passic, Fred C. Krebs, Brian Wigdahl, Travis K. Warren, Cary J. Retterer, Sina Bavari, Xiaodong Xu, Andrea Cuconati, et Timothy M. Block. 2011. « Alkylated Porphyrins Have Broad Antiviral Activity against Hepadnaviruses, Flaviviruses, Filoviruses, and Arenaviruses ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(2):478-86. doi: 10.1128/AAC.00989-10.
- Guo, Xiaojuan, Yao Deng, Hong Chen, Jiaming Lan, Wen Wang, Xiaohui Zou, Tao Hung, Zhuozhuang Lu, et Wenjie Tan. 2015. « Systemic and Mucosal Immunity in Mice Elicited by a Single Immunization with Human Adenovirus Type 5 or 41 Vector-Based Vaccines Carrying the Spike Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Immunology* 145(4):476-84. doi: 10.1111/imm.12462.
- Gyebi, Gideon A., Olalekan B. Ogunro, Adegbenro P. Adegunloye, Oludare M. Ogunyemi, et Saheed O. Afolabi. 2020. « Potential Inhibitors of Coronavirus 3-Chymotrypsin-like Protease (3CL^{pro}): An *in Silico* Screening of Alkaloids and Terpenoids from African Medicinal Plants ». *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 1-13. doi: 10.1080/07391102.2020.1764868.
- Haid, Sibylle, Alexandra Novodomská, Juliane Gentsch, Christina Grethe, Silvia Geuenich, Dorothea Bankwitz, Patrick Chhatwal, Beate Jannack, Thierry Hennebelle, Francois Bailleul, Oliver T. Keppler, Marion Poenisch, Ralf Bartenschlager, Céline Hernandez, Matthieu Lemasson, Arielle R. Rosenberg, Flossie Wong-Staal, Elisabeth Davioud-Charvet, et Thomas Pietschmann. 2012. « A Plant-Derived Flavonoid Inhibits Entry of All HCV Genotypes Into Human Hepatocytes ». *Gastroenterology* 143(1):213-222.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.036.
- Hajri, A., S. Wack, C. Meyer, M. K. Smith, C. Leberquier, M. Kedinger, et M. Aprahamian. 2007. « In Vitro and In Vivo Efficacy of Photofrin® and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in Photodynamic Therapy of Colonic Cancer Cells¶ ». *Photochemistry and Photobiology* 75(2):140-48. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0750140IVAIVE2.0.CO2.
- Hamblin, Michael R. 2020. « Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past Is Prologue ». *Photochemistry and Photobiology* 96(3):506-16. doi: 10.1111/php.13190.
- Hamming, I., W. Timens, Mlc Bulthuis, At Lely, GJ Navis, et H. van Goor. 2004. « Tissue Distribution of ACE2 Protein, the Functional Receptor for SARS Coronavirus. A First Step in Understanding SARS Pathogenesis ». *The Journal of Pathology* 203(2):631-37. doi: 10.1002/path.1570.
- Harris, Ross J., Jennifer A. Hall, Asad Zaidi, Nick J. Andrews, J. Kevin Dunbar, et Gavin Dabrera. 2021. « Effect of Vaccination on Household Transmission of SARS-CoV-2 in England ». *New England Journal of Medicine* NEJMc2107717. doi: 10.1056/NEJMc2107717.

- He, Xi, Eric H. Y. Lau, Peng Wu, Xilong Deng, Jian Wang, Xinxin Hao, Yiu Chung Lau, Jessica Y. Wong, Yujuan Guan, Xinghua Tan, Xiaoneng Mo, Yanqing Chen, Baolin Liao, Weilie Chen, Fengyu Hu, Qing Zhang, Mingqiu Zhong, Yanrong Wu, Lingzhai Zhao, Fuchun Zhang, Benjamin J. Cowling, Fang Li, et Gabriel M. Leung. 2020. « Temporal Dynamics in Viral Shedding and Transmissibility of COVID-19 ». *Nature Medicine* 26(5):672-75. doi: 10.1038/s41591-020-0869-5.
- Hippisley-Cox, Julia, Martina Patone, Xue W. Mei, Defne Saatci, Sharon Dixon, Kamlesh Khunti, Francesco Zaccardi, Peter Watkinson, Manu Shankar-Hari, James Doidge, David A. Harrison, Simon J. Griffin, Aziz Sheikh, et Carol A. C. Coupland. 2021. « Risk of Thrombocytopenia and Thromboembolism after Covid-19 Vaccination and SARS-CoV-2 Positive Testing: Self-Controlled Case Series Study ». *BMJ* n1931. doi: 10.1136/bmj.n1931.
- Ho, T., S. Wu, J. Chen, Y. Wei, S. Cheng, Y. Chang, H. Liu, et C. Hsiang. 2006. « Design and Biological Activities of Novel Inhibitory Peptides for SARS-CoV Spike Protein and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Interaction ». *Antiviral Research* 69(2):70-76. doi: 10.1016/j.antiviral.2005.10.005.
- van der Hoek, Lia, Krzysztof Pyrc, Maarten F. Jebbink, Wilma Vermeulen-Oost, Ron J. M. Berkhout, Katja C. Wolthers, Pauline M. E. Wertheim-van Dillen, Jos Kaandorp, Joke Spaargaren, et Ben Berkhout. 2004. « Identification of a New Human Coronavirus ». *Nature Medicine* 10(4):368-73. doi: 10.1038/nm1024.
- Hoever, Gerold, Lidia Baltina, Martin Michaelis, Rimma Kondratenko, Lia Baltina, Genrich A. Tolstikov, Hans W. Doerr, et Jindrich Cinatl. 2005. « Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS–Coronavirus ». *Journal of Medicinal Chemistry* 48(4):1256-59. doi: 10.1021/jm0493008.
- Hoffmann, Markus, Prerna Arora, Rüdiger Groß, Alina Seidel, Bojan F. Hörnich, Alexander S. Hahn, Nadine Krüger, Luise Graichen, Heike Hofmann-Winkler, Amy Kempf, Martin S. Winkler, Sebastian Schulz, Hans-Martin Jäck, Bernd Jahrsdörfer, Hubert Schrezenmeier, Martin Müller, Alexander Kleger, Jan Münch, et Stefan Pöhlmann. 2021. « SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and P.1 Escape from Neutralizing Antibodies ». *Cell* 184(9):2384-2393.e12. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.036.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, Georg Herrler, Nai-Huei Wu, Andreas Nitsche, Marcel A. Müller, Christian Drosten, et Stefan Pöhlmann. 2020. « SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor ». *Cell* 181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- Holden, Margaret. 1974. « Chlorophyll Degradation Products in Leaf Protein Preparations ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25(11):1427-32. doi: 10.1002/jsfa.2740251111.
- Howard, Jeremy, Austin Huang, Zhiyuan Li, Zeynep Tufekci, Vladimir Zdimal, Helene-Mari van der Westhuizen, Arne von Delft, Amy Price, Lex Fridman, Lei-Han Tang, Viola Tang, Gregory L. Watson, Christina E. Bax, Reshama Shaikh, Frederik Questier, Danny Hernandez, Larry F. Chu, Christina M. Ramirez, et Anne W. Rimoin. 2021. « An evidence review of face masks against COVID-19 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(4). doi: 10.1073/pnas.2014564118.

- Hozhabri, Hossein, Francesca Piccini Sparascio, Hamidreza Sohrabi, Leila Mousavifar, René Roy, Daniela Scribano, Alessandro De Luca, Cecilia Ambrosi, et Meysam Sarshar. 2020. « The Global Emergency of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2): An Update of the Current Status and Forecasting ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(16):5648. doi: 10.3390/ijerph17165648.
- Hu, Hongbo, Li Li, Richard Y. Kao, Binbin Kou, Zhanguo Wang, Liang Zhang, Huiyuan Zhang, Zhiyong Hao, Wayne H. Tsui, Anping Ni, Lianxian Cui, Baoxing Fan, Feng Guo, Shuan Rao, Chengyu Jiang, Qian Li, Manji Sun, Wei He, et Gang Liu. 2005. « Screening and Identification of Linear B-Cell Epitopes and Entry-Blocking Peptide of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus Using Synthetic Overlapping Peptide Library ». *Journal of Combinatorial Chemistry* 7(5):648-56. doi: 10.1021/cc0500607.
- Hu, Tingting, Ying Liu, Mingyi Zhao, Quan Zhuang, Linyong Xu, et Qingnan He. 2020. « A Comparison of COVID-19, SARS and MERS ». *PeerJ* 8:e9725. doi: 10.7717/peerj.9725.
- Huang, Chaolin, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelei Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Jungang Xie, Guangfa Wang, Rongmeng Jiang, Zhancheng Gao, Qi Jin, Jianwei Wang, et Bin Cao. 2020. « Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China ». *The Lancet* 395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Hui, D. S. C. 2004. « Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS): Epidemiology and Clinical Features ». *Postgraduate Medical Journal* 80(945):373-81. doi: 10.1136/pgmj.2004.020263.
- Hui, David S., Esam I. Azhar, Yae-Jean Kim, Ziad A. Memish, Myoung-don Oh, et Alimuddin Zumla. 2018. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Risk Factors and Determinants of Primary, Household, and Nosocomial Transmission ». *The Lancet Infectious Diseases* 18(8):e217-27. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30127-0.
- İnandıklioğlu, Nihal, et Tunc Akkoc. 2020. « Immune Responses to SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 ». P. 5-12 in *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 9*. Vol. 1288, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, édité par K. Turksen. Cham: Springer International Publishing.
- Ioannou, Petros, Stamatis Karakostas, Eirini Astrinaki, Stamatina Saplamidou, Efsevia Vitsaxaki, Georgios Hamilos, George Sourvinos, et Diamantis P. Kofteridis. 2021. « Transmission of SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7 among Vaccinated Health Care Workers ». *Infectious Diseases* 1-4. doi: 10.1080/23744235.2021.1945139.
- Jang, Woo Dae, Sangeun Jeon, Seungtaek Kim, et Sang Yup Lee. 2021. « Drugs Repurposed for COVID-19 by Virtual Screening of 6,218 Drugs and Cell-Based Assay ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(30):e2024302118. doi: 10.1073/pnas.2024302118.
- Jiang, Shibo, Xinrong Tao, Shuai Xia, Tania Garron, Fei Yu, Lanying Du, Lu Lu, et Chien-Te K. Tseng. 2015. « Intranasally Administered Peptidic Viral Fusion Inhibitor Protected HDPP4 Transgenic Mice from MERS-CoV Infection ». *The Lancet* 386:S44. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00625-X.

- Jiang, Yishu, et Emily A. Weiss. 2020. « Colloidal Quantum Dots as Photocatalysts for Triplet Excited State Reactions of Organic Molecules ». *Journal of the American Chemical Society* 142(36):15219-29. doi: 10.1021/jacs.0c07421.
- Jin, Young-Hee, Jung Sun Min, Sangeun Jeon, Jihye Lee, Seungtaek Kim, Tamina Park, Daeui Park, Min Seong Jang, Chul Min Park, Jong Hwan Song, Hyoung Rae Kim, et Sunoh Kwon. 2021. « Lycorine, a Non-Nucleoside RNA Dependent RNA Polymerase Inhibitor, as Potential Treatment for Emerging Coronavirus Infections ». *Phytomedicine* 86:153440. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153440.
- Jo, Seri, Suwon Kim, Dong Hae Shin, et Mi-Sun Kim. 2020. « Inhibition of SARS-CoV 3CL Protease by Flavonoids ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35(1):145-51. doi: 10.1080/14756366.2019.1690480.
- Johansson, Michael A., Talia M. Quandelacy, Sarah Kada, Pragati Venkata Prasad, Molly Steele, John T. Brooks, Rachel B. Slayton, Matthew Biggerstaff, et Jay C. Butler. 2021. « SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms ». *JAMA Network Open* 4(1):e2035057. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35057.
- Johnson, Bryan A., Adam Hage, Birte Kalveram, Megan Mears, Jessica A. Plante, Sergio E. Rodriguez, Zhixia Ding, Xuemei Luo, Dennis Bente, Shelton S. Bradrick, Alexander N. Freiberg, Vsevolod Popov, Ricardo Rajsbaum, Shannan Rossi, William K. Russell, et Vineet D. Menachery. 2019. « Peptidoglycan-Associated Cyclic Lipopeptide Disrupts Viral Infectivity ». *Journal of Virology* 93(22):15.
- Johnston, Christine, Elizabeth R. Brown, Jenell Stewart, Helen C. Stankiewicz Karita, Patricia J. Kissinger, John Dwyer, Sybil Hosek, Temitope Oyedele, Michael K. Paasche-Orlow, Kristopher Paolino, Kate B. Heller, Hannah Leingang, Harald S. Haugen, Tracy Q. Dong, Anna Bershteyn, Arun R. Sridhar, Jeanne Poole, Peter A. Noseworthy, Michael J. Ackerman, Susan Morrison, Alexander L. Greninger, Meei-Li Huang, Keith R. Jerome, Mark H. Wener, Anna Wald, Joshua T. Schiffer, Connie Celum, Helen Y. Chu, Ruanne V. Barnabas, et Jared M. Baeten. 2021. « Hydroxychloroquine with or without Azithromycin for Treatment of Early SARS-CoV-2 Infection among High-Risk Outpatient Adults: A Randomized Clinical Trial ». *EClinicalMedicine* 33:100773. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100773.
- Kabinger, Florian. 2021. « Mechanism of Molnupiravir-Induced SARS-CoV-2 Mutagenesis ». *Molecular Biology* 28:16.
- van Kampen, Jeroen J. A., David A. M. C. van de Vijver, Pieter L. A. Fraaij, Bart L. Haagmans, Mart M. Lamers, Nisreen Okba, Johannes P. C. van den Akker, Henrik Endeman, Diederik A. M. P. J. Gommers, Jan J. Cornelissen, Rogier A. S. Hoek, Menno M. van der Eerden, Dennis A. Hesselink, Herold J. Metselaar, Annelies Verbon, Jurriaan E. M. de Steenwinkel, Georgina I. Aron, Eric C. M. van Gorp, Sander van Boheemen, Jolanda C. Voermans, Charles A. B. Boucher, Richard Molenkamp, Marion P. G. Koopmans, Corine Geurtsvankessel, et Annemiek A. van der Eijk. 2021. « Duration and Key Determinants of Infectious Virus Shedding in Hospitalized Patients with Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) ». *Nature Communications* 12(1):267. doi: 10.1038/s41467-020-20568-4.
- Kandeel, Mahmoud, Mizuki Yamamoto, Hideki Tani, Ayako Kobayashi, Jin Gohda, Yasushi Kawaguchi, Byoung Kwon Park, Hyung-Joo Kwon, Jun-ichiro Inoue, et Abdallah Alkattan. 2021. « Discovery of New Fusion Inhibitor Peptides against SARS-CoV-2

by Targeting the Spike S2 Subunit ». *Biomolecules & Therapeutics* 29(3):282-89. doi: 10.4062/biomolther.2020.201.

- Kanjanasirirat, Phongthon, Ampa Suksatu, Suwimon Manopwisedjaroen, Bamroong Munyoo, Patoomratana Tuchinda, Kedchin Jearawuttanakul, Sawinee Seemakhan, Sitthivut Charoensutthivarakul, Patompon Wongtrakoongate, Noppawan Rangkasenee, Supaporn Pitiporn, Neti Waranuch, Napason Chabang, Phisit Khemawoot, Khanit Sangiamsuntorn, Yongyut Pewkliang, Piyanoot Thongsri, Somchai Chutipongtanate, Suradej Hongeng, Suparek Borwornpinyo, et Arunee Thitithanyanont. 2020. « High-Content Screening of Thai Medicinal Plants Reveals Boesenbergia Rotunda Extract and Its Component Panduratin A as Anti-SARS-CoV-2 Agents ». *Scientific Reports* 10(1):19963. doi: 10.1038/s41598-020-77003-3.
- Kelly, J. F., et M. E. Snell. 1976. « Hematoporphyrin Derivative: A Possible Aid in the Diagnosis and Therapy of Carcinoma of the Bladder ». *Journal of Urology* 115(2):150-51. doi: 10.1016/S0022-5347(17)59108-9.
- Khan, Abbas, Tauqir Zia, Muhammad Suleman, Taimoor Khan, Syed Shujait Ali, Aamir Ali Abbasi, Anwar Mohammad, et Dong-Qing Wei. 2021. « Higher Infectivity of the SARS-CoV-2 New Variants Is Associated with K417N/T, E484K, and N501Y Mutants: An Insight from Structural Data ». *Journal of Cellular Physiology* jcp.30367. doi: 10.1002/jcp.30367.
- Kim, Cheorl-Ho. 2021. « Anti-SARS-CoV-2 Natural Products as Potentially Therapeutic Agents ». *Frontiers in Pharmacology* 12:590509. doi: 10.3389/fphar.2021.590509.
- Kim, Eun, Kaori Okada, Tom Kenniston, V. Stalin Raj, Mohd M. AlHajri, Elmoubasher A. B. A. Farag, Farhoud AlHajri, Albert D. M. E. Osterhaus, Bart L. Haagmans, et Andrea Gambotto. 2014. « Immunogenicity of an Adenoviral-Based Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Vaccine in BALB/c Mice ». *Vaccine* 32(45):5975-82. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.058.
- Kim, K. H., T. E. Tandi, J. W. Choi, J. M. Moon, et M. S. Kim. 2017. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Outbreak in South Korea, 2015: Epidemiology, Characteristics and Public Health Implications ». *Journal of Hospital Infection* 95(2):207-13. doi: 10.1016/j.jhin.2016.10.008.
- Korber, Bette, Will M. Fischer, Sandrasegaram Gnanakaran, Hyejin Yoon, James Theiler, Werner Abfalterer, Nick Hengartner, Elena E. Giorgi, Tanmoy Bhattacharya, Brian Foley, Kathryn M. Hastie, Matthew D. Parker, David G. Partridge, Cariad M. Evans, Timothy M. Freeman, Thushan I. de Silva, Charlene McDanal, Lautaro G. Perez, Haili Tang, Alex Moon-Walker, Sean P. Whelan, Celia C. LaBranche, Erica O. Saphire, David C. Montefiori, Adrienne Angyal, Rebecca L. Brown, Laura Carrilero, Luke R. Green, Danielle C. Groves, Katie J. Johnson, Alexander J. Keeley, Benjamin B. Lindsey, Paul J. Parsons, Mohammad Raza, Sarah Rowland-Jones, Nikki Smith, Rachel M. Tucker, Dennis Wang, et Matthew D. Wyles. 2020. « Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence That D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus ». *Cell* 182(4):812-827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
- Kosyna, Friederike K., Marie Nagel, Larissa Kluxen, Kim Kraushaar, et Reinhard Depping. 2015. « The Importin α/β -Specific Inhibitor Ivermectin Affects HIF-Dependent Hypoxia Response Pathways ». *Biological Chemistry* 396(12):1357-67. doi: 10.1515/hsz-2015-0171.

- Kremsner, Peter, Philipp Mann, Jacobus Bosch, Rolf Fendel, Julian J. Gabor, Andrea Kreidenweiss, Arne Kroidl, Isabel Leroux-Roels, Geert Leroux-Roels, Christoph Schindler, Mirjam Schunk, Thirumalaisamy P. Velavan, Mariola Fotin-Mleczek, Stefan Müller, Gianluca Quintini, Oliver Schönborn-Kellenberger, Dominik Vahrenhorst, Thomas Verstraeten, Lisa Walz, Olaf-Oliver Wolz, et Lidia Oostvogels. 2020. *Phase 1 Assessment of the Safety and Immunogenicity of an mRNA- Lipid Nanoparticle Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2 in Human Volunteers. preprint. Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. doi: 10.1101/2020.11.09.20228551.
- Kuleshov, Maxim V., Daniel J. Stein, Daniel J. B. Clarke, Eryk Kropiwnicki, Kathleen M. Jagodnik, Alon Bartal, John E. Evangelista, Jason Hom, Minxuan Cheng, Allison Bailey, Abigail Zhou, Laura B. Ferguson, Alexander Lachmann, et Avi Ma'ayan. 2020. « The COVID-19 Drug and Gene Set Library ». *Patterns* 1(6):100090. doi: 10.1016/j.patter.2020.100090.
- La Marca, Antonio, Martina Capuzzo, Tiziana Paglia, Laura Roli, Tommaso Trenti, et Scott M. Nelson. 2020. « Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): A Systematic Review and Clinical Guide to Molecular and Serological in-Vitro Diagnostic Assays ». *Reproductive BioMedicine Online* 41(3):483-99. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001.
- Lai, Chih-Cheng, Chao-Hsien Chen, Cheng-Yi Wang, Kuang-Hung Chen, Ya-Hui Wang, et Po-Ren Hsueh. 2021. « Clinical Efficacy and Safety of Remdesivir in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* dkab093. doi: 10.1093/jac/dkab093.
- Larue, Ross C., Enming Xing, Adam D. Kenney, Yuexiu Zhang, Jasmine A. Tuazon, Jianrong Li, Jacob S. Yount, Pui-Kai Li, et Amit Sharma. 2021. « Rationally Designed ACE2-Derived Peptides Inhibit SARS-CoV-2 ». *Bioconjugate Chemistry* 32(1):215-23. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00664.
- Lazarevic, Ivana, Vera Pravica, Danijela Miljanovic, et Maja Cupic. 2021. « Immune Evasion of SARS-CoV-2 Emerging Variants: What Have We Learnt So Far? » *Viruses* 13(7):1192. doi: 10.3390/v13071192.
- Lebedeva, Natalya Sh., Yury A. Gubarev, Mikhail O. Koifman, et Oskar I. Koifman. 2020. « The Application of Porphyrins and Their Analogues for Inactivation of Viruses ». *Molecules* 25(19):4368. doi: 10.3390/molecules25194368.
- Levine-Tiefenbrun, Matan, Idan Yelin, Rachel Katz, Esmat Herzog, Ziv Golan, Licita Schreiber, Tamar Wolf, Varda Nadler, Amir Ben-Tov, Jacob Kuint, Sivan Gazit, Tal Patalon, Gabriel Chodick, et Roy Kishony. 2021. « Initial Report of Decreased SARS-CoV-2 Viral Load after Inoculation with the BNT162b2 Vaccine ». *Nature Medicine* 27(5):790-92. doi: 10.1038/s41591-021-01316-7.
- Li, Daixi, Cheng Wang, Shaobo Wang, Aamir Mehmood, Jiang Gu, Xin Cheng, Peiqin Chen, Jingfei Qiu, Jinghong Zhao, Junping Wang, et Dongqing Wei. 2021. « Discovery of a Natural Product with Potent Efficacy Against SARS-CoV-2 by Drug Screening ». *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. doi: 10.1007/s12539-021-00477-w.
- Li, Qingxin. 2020. « Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7:180. doi: 10.3389/fmolb.2020.00180.

- Li, Wenhui, Michael J. Moore, Natalya Vasilieva, Jianhua Sui, Swee Kee Wong, Michael A. Berne, Mohan Somasundaran, John L. Sullivan, Katherine Luzuriaga, Thomas C. Greenough, Hyeryun Choe, et Michael Farzan. 2003. « Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the SARS Coronavirus ». *Nature* 426(6965):450-54. doi: 10.1038/nature02145.
- Li, Wen-Tyng, Hsin-Wei Tsao, Ying-Ying Chen, Shih-Wei Cheng, et Yih-Chih Hsu. 2007. « A Study on the Photodynamic Properties of Chlorophyll Derivatives Using Human Hepatocellular Carcinoma Cells ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 6(12):1341. doi: 10.1039/b704539e.
- Li, Yingzhu, Rumiana Tenchov, Jeffrey Smoot, Cynthia Liu, Steven Watkins, et Qiongqiong Zhou. 2021. « A Comprehensive Review of the Global Efforts on COVID-19 Vaccine Development ». *ACS Central Science* 7(4):512-33. doi: 10.1021/acscentsci.1c00120.
- Lim, Zheng Jie, Ashwin Subramaniam, Mallikarjuna Ponnappa Reddy, Gabriel Blecher, Umesh Kadam, Afsana Afroz, Baki Billah, Sushma Ashwin, Mark Kubicki, Federico Bilotta, J. Randall Curtis, et Francesca Rubulotta. 2021. « Case Fatality Rates for Patients with COVID-19 Requiring Invasive Mechanical Ventilation. A Meta-Analysis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 203(1):54-66. doi: 10.1164/rccm.202006-2405OC.
- Lipsitch, Marc, Yonatan H. Grad, Alessandro Sette, et Shane Crotty. 2020. « Cross-Reactive Memory T Cells and Herd Immunity to SARS-CoV-2 ». *Nature Reviews Immunology* 20(11):709-13. doi: 10.1038/s41577-020-00460-4.
- Liu, Qi, Shuai Xia, Zhiwu Sun, Qian Wang, Lanying Du, Lu Lu, et Shibo Jiang. 2015. « Testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Inhibitors for the Ability To Block Viral Entry ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(1):742-44. doi: 10.1128/AAC.03977-14.
- Llivosaca-Contreras, Susana A., Jaime Naranjo-Morán, Andrea Pino-Acosta, Luc Pieters, Wim Vanden Berghe, Patricia Manzano, Jeffrey Vargas-Pérez, Fabian León-Tamariz, et Juan M. Cevallos-Cevallos. 2021. « Plants and Natural Products with Activity against Various Types of Coronaviruses: A Review with Focus on SARS-CoV-2 ». *Molecules* 26(13):4099. doi: 10.3390/molecules26134099.
- Logunov, Denis Y., Inna V. Dolzhikova, Dmitry V. Shcheblyakov, Amir I. Tukhvatulin, Olga V. Zubkova, Alina S. Dzharullaeva, Anna V. Kovyrshina, Nadezhda L. Lubenets, Daria M. Grousova, Alina S. Erokhova, Andrei G. Botikov, Fatima M. Izhaeva, Olga Popova, Tatiana A. Ozharovskaya, Ilias B. Esmagambetov, Irina A. Favorskaya, Denis I. Zrelkin, Daria V. Voronina, Dmitry N. Shcherbinin, Alexander S. Semikhin, Yana V. Simakova, Elizaveta A. Tokarskaya, Daria A. Egorova, Maksim M. Shmarov, Natalia A. Nikitenko, Vladimir A. Gushchin, Elena A. Smolyarchuk, Sergey K. Zyryanov, Sergei V. Borisevich, Boris S. Naroditsky, et Alexander L. Gintsburg. 2021. « Safety and Efficacy of an RAd26 and RAd5 Vector-Based Heterologous Prime-Boost COVID-19 Vaccine: An Interim Analysis of a Randomised Controlled Phase 3 Trial in Russia ». *The Lancet* 397(10275):671-81. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
- Lopez Bernal, Jamie, Nick Andrews, Charlotte Gower, Eileen Gallagher, Ruth Simmons, Simon Thelwall, Julia Stowe, Elise Tessier, Natalie Groves, Gavin Dabrera, Richard Myers, Colin N. J. Campbell, Gayatri Amirthalingam, Matt Edmunds, Maria Zambon, Kevin E. Brown, Susan Hopkins, Meera Chand, et Mary Ramsay. 2021.

- « Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant ». *New England Journal of Medicine* NEJMoa2108891. doi: 10.1056/NEJMoa2108891.
- Lopez-Leon, Sandra, Talia Wegman-Ostrosky, Carol Perelman, Rosalinda Sepulveda, Paulina A. Rebolledo, Angelica Cuapio, et Sonia Villapol. 2021. « More than 50 Long-Term Effects of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Scientific Reports* 11(1):16144. doi: 10.1038/s41598-021-95565-8.
- López-Medina, Eduardo, Pío López, Isabel C. Hurtado, Diana M. Dávalos, Oscar Ramirez, Ernesto Martínez, Jesus A. Díazgranados, José M. Oñate, Hector Chavarriaga, Sócrates Herrera, Beatriz Parra, Gerardo Libreros, Roberto Jaramillo, Ana C. Avendaño, Dilian F. Toro, Miyerlandi Torres, Maria C. Lesmes, Carlos A. Rios, et Isabella Caicedo. 2021. « Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 325(14):1426. doi: 10.1001/jama.2021.3071.
- Lu, Shengsheng, Xiaoyan Pan, Daiwei Chen, Xi Xie, Yan Wu, Weijuan Shang, Xiaming Jiang, Yuan Sun, Sheng Fan, et Jian He. 2021. « Broad-Spectrum Antivirals of Protoporphyrins Inhibit the Entry of Highly Pathogenic Emerging Viruses ». *Bioorganic Chemistry* 107:104619. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104619.
- Lung, Jrhau, Yu-Shih Lin, Yao-Hsu Yang, Yu-Lun Chou, Li-Hsin Shu, Yu-Ching Cheng, Hung Te Liu, et Ching-Yuan Wu. 2020. « The Potential Chemical Structure of Anti-SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA Polymerase ». *Journal of Medical Virology* 92(6):693-97. doi: 10.1002/jmv.25761.
- Ma, Liang, Chen Yang, Jiaojiao Zheng, Yuchen Chen, Yushuo Xiao, et Kun Huang. 2020. « Non-Polyphenolic Natural Inhibitors of Amyloid Aggregation ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 192:112197. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112197.
- Madhi, Shabir A., Vicky Baillie, Clare L. Cutland, Merryn Voysey, Anthonet L. Koen, Lee Fairlie, Sherman D. Padayachee, Keertan Dheda, Shaun L. Barnabas, Qasim E. Bhorat, Carmen Briner, Gaurav Kwatra, Khatija Ahmed, Parvinder Aley, Sutika Bhikha, Jinal N. Bhiman, As'ad E. Bhorat, Jeanine du Plessis, Aliasgar Esmail, Marisa Groenewald, Elizea Horne, Shi-Hsia Hwa, Aylin Jose, Teresa Lambe, Matt Laubscher, Mookho Malahleha, Masebole Masenya, Mduduzi Masilela, Shakeel McKenzie, Kgaogelo Molapo, Andrew Moultrie, Suzette Oelofse, Faezah Patel, Sureshnee Pillay, Sarah Rhead, Hylton Rodel, Lindie Rossouw, Carol Taoushanis, Houriiyah Tegally, Asha Thombrayil, Samuel van Eck, Constantinos K. Wibmer, Nicholas M. Durham, Elizabeth J. Kelly, Tonya L. Villafana, Sarah Gilbert, Andrew J. Pollard, Tulio de Oliveira, Penny L. Moore, Alex Sigal, et Alane Izu. 2021. « Efficacy of the ChAdOx1 NCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant ». *New England Journal of Medicine* 384(20):1885-98. doi: 10.1056/NEJMoa2102214.
- Mahmud, Reaz, Md. Mujibur Rahman, Iftikher Alam, Kazi Gias Uddin Ahmed, A. K. M. Humayon Kabir, S. K. Jakaria Been Sayeed, Mohammad Aftab Rassel, Farhana Binte Monayem, Md Shahidul Islam, Mohammad Monirul Islam, Anindita Das Barshan, Mohammad Mahfuzul Hoque, MD. Uzzal Mallik, Mohammad Abdullah Yusuf, et Mohammad Zaid Hossain. 2021. « Ivermectin in Combination with Doxycycline for Treating COVID-19 Symptoms: A Randomized Trial ». *Journal of International Medical Research* 49(5):030006052110135. doi: 10.1177/03000605211013550.

- Mandal, Anirban, Ajeet Kumar Jha, et Banasri Hazra. 2021. « Plant Products as Inhibitors of Coronavirus 3CL Protease ». *Frontiers in Pharmacology* 12:583387. doi: 10.3389/fphar.2021.583387.
- Mansoori, Behzad, Ali Mohammadi, Mohammad Amin Doustvandi, Fatemeh Mohammadnejad, Farzin Kamari, Morten F. Gjerstorff, Behzad Baradaran, et Michael R. Hamblin. 2019. « Photodynamic Therapy for Cancer: Role of Natural Products ». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 26:395-404. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.033.
- Masters, Paul S. 2006. « The Molecular Biology of Coronaviruses ». P. 193-292 in *Advances in Virus Research*. Vol. 66. Academic Press.
- Matsuyama, Shutoku, Noriyo Nagata, Kazuya Shirato, Miyuki Kawase, Makoto Takeda, et Fumihiro Taguchi. 2010. « Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2 ». *Journal of Virology* 84(24):12658-64. doi: 10.1128/JVI.01542-10.
- McIntyre, Peter, Ye Jin Joo, Clayton Chiu, Katie Flanagan, et Kristine Macartney. 2020. « COVID-19 Vaccines - Are We There Yet? ». *Australian Prescriber* 44(1):19-25. doi: 10.18773/austprescr.2020.084.
- McKee, Dwight L., Ariane Sternberg, Ulrike Stange, Stefan Laufer, et Cord Naujokat. 2020. « Candidate Drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19 ». *Pharmacological Research* 157:104859. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104859.
- Millet, Jean K., Karin Séron, Rachael N. Labitt, Adeline Danneels, Kenneth E. Palmer, Gary R. Whittaker, Jean Dubuisson, et Sandrine Belouzard. 2016. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Is Inhibited by Griffithsin ». *Antiviral Research* 133:1-8. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.011.
- Millet, Jean Kaoru, et Gary R. Whittaker. 2014. « Host Cell Entry of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus after Two-Step, Furin-Mediated Activation of the Spike Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(42):15214-19. doi: 10.1073/pnas.1407087111.
- Millet, Jean Kaoru, et Gary R. Whittaker. 2015. « Host Cell Proteases: Critical Determinants of Coronavirus Tropism and Pathogenesis ». *Virus Research* 202:120-34. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
- Min, Jung Sun, Sunoh Kwon, et Young-Hee Jin. 2021. « SARS-CoV-2 RdRp Inhibitors Selected from a Cell-Based SARS-CoV-2 RdRp Activity Assay System ». *Biomedicines* 9(8):996. doi: 10.3390/biomedicines9080996.
- Modjarrad, Kayvon, Christine C. Roberts, Kristin T. Mills, Amy R. Castellano, Kristopher Paolino, Kar Muthumani, Emma L. Reuschel, Merlin L. Robb, Trina Racine, Myungdon Oh, Claude Lamarre, Faraz I. Zaidi, Jean Boyer, Sagar B. Kudchodkar, Moon-sup Jeong, Janice M. Darden, Young K. Park, Paul T. Scott, Celine Remigio, Ajay P. Parikh, Megan C. Wise, Ami Patel, Elizabeth K. Duperret, Kevin Y. Kim, Hyeree Choi, Scott White, Mark Bagarazzi, Jeanine M. May, Deborah Kane, Hyojin Lee, Gary Kobinger, Nelson L. Michael, David B. Weiner, Stephen J. Thomas, et Joel N. Maslow. 2019. « Safety and Immunogenicity of an Anti-Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus DNA Vaccine: A Phase 1, Open-Label, Single-Arm, Dose-Escalation Trial ». *The Lancet Infectious Diseases* 19(9):1013-22. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30266-X.

- Müller, Christin, Wiebke Obermann, Nadja Karl, Hans-Guido Wendel, Gaspar Taroncher-Oldenburg, Stephan Pleschka, Roland K. Hartmann, Arnold Grünweller, et John Ziebuhr. 2021. « The Rocaglate CR-31-B (–) Inhibits SARS-CoV-2 Replication at Non-Cytotoxic, Low Nanomolar Concentrations in Vitro and Ex Vivo ». *Antiviral Research* 186:105012. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105012.
- Müller, Christin, Wiebke Obermann, Falk W. Schulte, Kerstin Lange-Grünweller, Lisa Oestereich, Fabian Elgner, Mirco Glitscher, Eberhard Hildt, Kamini Singh, Hans-Guido Wendel, Roland K. Hartmann, John Ziebuhr, et Arnold Grünweller. 2020. « Comparison of Broad-Spectrum Antiviral Activities of the Synthetic Rocaglate CR-31-B (–) and the EIF4A-Inhibitor Silvestrol ». *Antiviral Research* 175:104706. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104706.
- Müller, Christin, Falk W. Schulte, Kerstin Lange-Grünweller, Wiebke Obermann, Ramakanth Madhugiri, Stephan Pleschka, John Ziebuhr, Roland K. Hartmann, et Arnold Grünweller. 2018. « Broad-Spectrum Antiviral Activity of the EIF4A Inhibitor Silvestrol against Corona- and Picornaviruses ». *Antiviral Research* 150:123-29. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.010.
- Muthumani, Karupiah, Darryl Falzarano, Emma L. Reuschel, Colleen Tingey, Seleeke Flingai, Daniel O. Villarreal, Megan Wise, Ami Patel, Abdullah Izmirly, Abdulelah Aljuaid, Alecia M. Seliga, Geoff Soule, Matthew Morrow, Kimberly A. Kraynyak, Amir S. Khan, Dana P. Scott, Friederike Feldmann, Rachel LaCasse, Kimberly Meade-White, Atsushi Okumura, Kenneth E. Ugen, Niranjana Y. Sardesai, J. Joseph Kim, Gary Kobinger, Heinz Feldmann, et David B. Weiner. 2015. « A Synthetic Consensus Anti-Spike Protein DNA Vaccine Induces Protective Immunity against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Nonhuman Primates ». *Science Translational Medicine* 7(301):301ra132-301ra132. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7462.
- Nanduri, Srinivas, Tamara Pilishvili, Gordana Derado, Minn Minn Soe, Philip Dollard, Hsiu Wu, Qunna Li, Suparna Bagchi, Heather Dubendris, Ruth Link-Gelles, John A. Jernigan, Daniel Budnitz, Jeneita Bell, Andrea Benin, Nong Shang, Jonathan R. Edwards, Jennifer R. Verani, et Stephanie J. Schrag. 2021. « Effectiveness of Pfizer-BioNTech and Moderna Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Nursing Home Residents Before and During Widespread Circulation of the SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant — National Healthcare Safety Network, March 1–August 1, 2021 ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 70(34):1163-66. doi: 10.15585/mmwr.mm7034e3.
- Neuman, Benjamin W., Gabriella Kiss, Andreas H. Kunding, David Bhella, M. Fazil Baksh, Stephen Connelly, Ben Droese, Joseph P. Klaus, Shinji Makino, Stanley G. Sawicki, Stuart G. Siddell, Dimitrios G. Stamou, Ian A. Wilson, Peter Kuhn, et Michael J. Buchmeier. 2011. « A Structural Analysis of M Protein in Coronavirus Assembly and Morphology ». *Journal of Structural Biology* 174(1):11-22. doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
- Newman, David J., et Gordon M. Cragg. 2012. « Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 ». *Journal of Natural Products* 75(3):311-35. doi: 10.1021/np200906s.
- Nicholson, Christopher J., Luke Wooster, Haakon H. Sigursslid, Rebecca H. Li, Wanlin Jiang, Wenjie Tian, Christian L. Lino Cardenas, et Rajeev Malhotra. 2021. « Estimating Risk of Mechanical Ventilation and In-Hospital Mortality among Adult COVID-19 Patients

Admitted to Mass General Brigham: The VICE and DICE Scores ». *EClinicalMedicine* 33:100765. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100765.

- Nicol, Thomas, Caroline Lefevre, Oriane Serri, Adeline Pivert, Françoise Joubaud, Vincent Dubée, Achille Kouatchet, Alexandra Ducancelle, Françoise Lunel-Fabiani, et Hélène Le Guillou-Guillemette. 2020. « Assessment of SARS-CoV-2 Serological Tests for the Diagnosis of COVID-19 T through the Evaluation of Three Immunoassays: Two Automated Immunoassays (Euroimmun and Abbott) and One Rapid Lateral Flow Immunoassay (NG Biotech) ». *Journal of Clinical Virology* 8.
- O'Keefe, Barry R., Barbara Giomarelli, Dale L. Barnard, Shilpa R. Shenoy, Paul K. S. Chan, James B. McMahon, Kenneth E. Palmer, Brian W. Barnett, David K. Meyerholz, Christine L. Wohlford-Lenane, et Paul B. McCray. 2010. « Broad-Spectrum In Vitro Activity and In Vivo Efficacy of the Antiviral Protein Griffithsin against Emerging Viruses of the Family Coronaviridae ». *J. VIROL.* 84:12.
- Omrani, Marzieh, Mohsen Keshavarz, Samad Nejad Ebrahimi, Meysam Mehrabi, Lyndy J. McGaw, Muna Ali Abdalla, et Parvaneh Mehrbod. 2021. « Potential Natural Products Against Respiratory Viruses: A Perspective to Develop Anti-COVID-19 Medicines ». *Frontiers in Pharmacology* 11:586993. doi: 10.3389/fphar.2020.586993.
- Osborne, Vicki, Miranda Davies, Samantha Lane, Alison Evans, Jacqueline Denyer, Sandeep Dhanda, Debabrata Roy, et Saad Shakir. 2020. « Lopinavir-Ritonavir in the Treatment of COVID-19: A Dynamic Systematic Benefit-Risk Assessment ». *Drug Safety* 43(8):809-21. doi: 10.1007/s40264-020-00966-9.
- Ou, Tianling, Huihui Mou, Lizhou Zhang, Amrita Ojha, Hyeryun Choe, et Michael Farzan. 2021. « Hydroxychloroquine-Mediated Inhibition of SARS-CoV-2 Entry Is Attenuated by TMPRSS2 » édité par B. Lee. *PLOS Pathogens* 17(1):e1009212. doi: 10.1371/journal.ppat.1009212.
- Outlaw, Victor K., Francesca T. Bovier, Megan C. Mears, Maria N. Cajimat, Yun Zhu, Michelle J. Lin, Amin Addetia, Nicole A. P. Lieberman, Vikas Peddu, Xuping Xie, Pei-Yong Shi, Alexander L. Greninger, Samuel H. Gellman, Dennis A. Bente, Anne Moscona, et Matteo Porotto. 2020. « Inhibition of Coronavirus Entry *In Vitro* and *Ex Vivo* by a Lipid-Conjugated Peptide Derived from the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein HRC Domain » édité par S. Schultz-Cherry. *MBio* 11(5):e01935-20, /mbio/11/5/mBio.01935-20.atom. doi: 10.1128/mBio.01935-20.
- Painter, Wendy P., Wayne Holman, Jim A. Bush, Firas Almazedi, Hamzah Malik, Nicola C. J. E. Eraut, Meribeth J. Morin, Laura J. Szewczyk, et George R. Painter. 2021. « Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity against SARS-CoV-2 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65(5). doi: 10.1128/AAC.02428-20.
- Panda, Saroj Kumar, Parth Sarthi Sen Gupta, Satyaranjan Biswal, Abhik Kumar Ray, et Malay Kumar Rana. 2021. « ACE-2-Derived Biomimetic Peptides for the Inhibition of Spike Protein of SARS-CoV-2 ». *Journal of Proteome Research* 20(2):1296-1303. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00686.
- Park, Ji-Young, Heung Joo Yuk, Hyung Won Ryu, Su Hwan Lim, Kyung Su Kim, Ki Hun Park, Young Bae Ryu, et Woo Song Lee. 2017. « Evaluation of Polyphenols from *Broussonetia Papyrifera* as Coronavirus Protease Inhibitors ». *Journal of Enzyme*

- Parks, Jerry M., et Jeremy C. Smith. 2020. « How to Discover Antiviral Drugs Quickly » édité par E. G. Phimister. *New England Journal of Medicine* 382(23):2261-64. doi: 10.1056/NEJMcibr2007042.
- Pasquereau, Sébastien, Zeina Nehme, Sandy Haidar Ahmad, Fadoua Daouad, Jeanne Van Assche, Clémentine Wallet, Christian Schwartz, Olivier Rohr, Stéphanie Morot-Bizot, et Georges Herbein. 2021. « Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro ». *Viruses* 13(2):354. doi: 10.3390/v13020354.
- Pavan, Matteo, Giovanni Bolcato, Davide Bassani, Mattia Sturlese, et Stefano Moro. 2021. « Supervised Molecular Dynamics (SuMD) Insights into the Mechanism of Action of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitor PF-07321332 ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1):1646-50. doi: 10.1080/14756366.2021.1954919.
- Peeri, Noah C., Nistha Shrestha, Md Siddikur Rahman, Rafdzah Zaki, Zhengqi Tan, Saana Bibi, Mahdi Baghbanzadeh, Nasrin Aghamohammadi, Wenyi Zhang, et Ubydul Haque. 2020. « The SARS, MERS and Novel Coronavirus (COVID-19) Epidemics, the Newest and Biggest Global Health Threats: What Lessons Have We Learned? » *International Journal of Epidemiology* 49(3):717-26. doi: 10.1093/ije/dyaa033.
- Peiris, J. S. M., Y. Guan, et K. Y. Yuen. 2004. « Severe Acute Respiratory Syndrome ». *Nature Medicine* 10(S12):S88-97. doi: 10.1038/nm1143.
- Pelegrin, Mireia, Mar Naranjo-Gomez, et Marc Piechaczyk. 2015. « Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents? » *Trends in Microbiology* 23(10):653-65. doi: 10.1016/j.tim.2015.07.005.
- Perrier, Anabelle, Ariane Bonnin, Lowiese Desmarests, Adeline Danneels, Anne Goffard, Yves Rouillé, Jean Dubuisson, et Sandrine Belouzard. 2019. « The C-Terminal Domain of the MERS Coronavirus M Protein Contains a *Trans* -Golgi Network Localization Signal ». *Journal of Biological Chemistry* 294(39):14406-21. doi: 10.1074/jbc.RA119.008964.
- Platto, Sara, Tongtong Xue, et Ernesto Carafoli. 2020. « COVID19: An Announced Pandemic ». *Cell Death & Disease* 11(9):799. doi: 10.1038/s41419-020-02995-9.
- Plaze, Marion, David Attali, Matthieu Prot, Anne-Cécile Petit, Michael Blatzer, Fabien Vinckier, Laurine Levillayer, Jeanne Chiaravalli, Florent Perin-Dureau, Arnaud Cachia, Gérard Friedlander, Fabrice Chrétien, Etienne Simon-Loriere, et Raphaël Gaillard. 2021. « Inhibition of the Replication of SARS-CoV-2 in Human Cells by the FDA-Approved Drug Chlorpromazine ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 57(3):106274. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106274.
- Pollet, Jeroen, Wen-Hsiang Chen, et Ulrich Strych. 2021. « Recombinant Protein Vaccines, a Proven Approach against Coronavirus Pandemics ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 170:71-82. doi: 10.1016/j.addr.2021.01.001.
- Pormohammad, Ali, Saied Ghorbani, Alireza Khatami, Rana Farzi, Behzad Baradaran, Diana L. Turner, Raymond J. Turner, Nathan C. Bahr, et Juan-Pablo Idrovo. 2020. « Comparison of Confirmed COVID -19 with SARS and MERS Cases - Clinical Characteristics, Laboratory Findings, Radiographic Signs and Outcomes: A

- Systematic Review and Meta-analysis ». *Reviews in Medical Virology* 30(4). doi: 10.1002/rmv.2112.
- Poudel, Uddab, Deepak Subedi, Saurav Pantha, et Santosh Dhakal. 2020. « Animal Coronaviruses and Coronavirus Disease 2019: Lesson for One Health Approach ». *Open Veterinary Journal* 10(3). doi: 10.4314/ovj.v10i3.1.
- Rahimi, Farid, et Amin Talebi Bezmin Abadi. 2021. « Implications of the Emergence of a New Variant of SARS-CoV-2, VUI-202012/01 ». *Archives of Medical Research* S0188440921000060. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.01.001.
- Rahmani, Hamid, Effat Davoudi-Monfared, Anahid Nourian, Hossein Khalili, Nooshin Hajizadeh, Narjes Zarei Jalalabadi, Mohammad Reza Fazeli, Monireh Ghazaeian, et Mir Saeed Yekaninejad. 2020. « Interferon β -1b in Treatment of Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial ». *International Immunopharmacology* 88:106903. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106903.
- Raj, V. Stalin, Huihui Mou, Saskia L. Smits, Dick H. W. Dekkers, Marcel A. Müller, Ronald Dijkman, Doreen Muth, Jeroen A. A. Demmers, Ali Zaki, Ron A. M. Fouchier, Volker Thiel, Christian Drosten, Peter J. M. Rottier, Albert D. M. E. Osterhaus, Berend Jan Bosch, et Bart L. Haagmans. 2013. « Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Functional Receptor for the Emerging Human Coronavirus-EMC ». *Nature* 495(7440):251-54. doi: 10.1038/nature12005.
- Randolph, Haley E., et Luis B. Barreiro. 2020. « Herd Immunity: Understanding COVID-19 ». *Immunity* 52(5):737-41. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.012.
- Ratnoglik, Suratno Lulut, Chie Aoki, Pratiwi Sudarmono, Mari Komoto, Lin Deng, Ikuo Shoji, Hiroyuki Fuchino, Nobuo Kawahara, et Hak Hotta. 2014. « Antiviral Activity of Extracts from *Morinda Citrifolia* Leaves and Chlorophyll Catabolites, Pheophorbide a and Pyropheophorbide a, against Hepatitis C Virus: Anti-HCV Activity of Pheophorbide a ». *Microbiology and Immunology* 58(3):188-94. doi: 10.1111/1348-0421.12133.
- Ray, Alokanda, Rajan Chaudhry, Sudhir Rai, Sujata Mitra, Sridhar Pradhan, Ashok Sunder, et Deb Sanjay Nag. 2021. « Prolonged Oxygen Therapy Post COVID-19 Infection: Factors Leading to the Risk of Poor Outcome ». *Cureus*. doi: 10.7759/cureus.13357.
- Redondo, Natalia, Sara Zaldívar-López, Juan J. Garrido, et Maria Montoya. 2021. « SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns ». *Frontiers in Immunology* 12:708264. doi: 10.3389/fimmu.2021.708264.
- Remali, Juwairiah, et Wan Mohd Aizat. 2021. « A Review on Plant Bioactive Compounds and Their Modes of Action Against Coronavirus Infection ». *Frontiers in Pharmacology* 11:589044. doi: 10.3389/fphar.2020.589044.
- Reyes, Aaron Z., Kelly A. Hu, Jacob Teperman, Theresa L. Wampler Muskardin, Jean-Claude Tardif, Binita Shah, et Michael H. Pillinger. 2021. « Anti-Inflammatory Therapy for COVID-19 Infection: The Case for Colchicine ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 80(5):550-57. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-219174.
- Rouchka, Eric C., Julia H. Chariker, et Donghoon Chung. 2020. « Variant Analysis of 1,040 SARS-CoV-2 Genomes » édité par T. Preiss. *PLOS ONE* 15(11):e0241535. doi: 10.1371/journal.pone.0241535.

- de Sá Coutinho, Diego, Maria Pacheco, Rudimar Frozza, et Andressa Bernardi. 2018. « Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(6):1812. doi: 10.3390/ijms19061812.
- Sabino, Caetano P., Anthony R. Ball, Mauricio S. Baptista, Tianhong Dai, Michael R. Hamblin, Martha S. Ribeiro, Ana L. Santos, Fábio P. Sellera, George P. Tegos, et Mark Wainwright. 2020. « Light-Based Technologies for Management of COVID-19 Pandemic Crisis ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 212:111999. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111999.
- Sahuc, Marie-Emmanuelle, Ramla Sahli, Céline Rivière, Véronique Pène, Muriel Lavie, Alexandre Vandeputte, Priscille Brodin, Arielle R. Rosenberg, Jean Dubuisson, Riadh Ksouri, Yves Rouillé, Sevser Sahpaz, et Karin Séron. 2019. « Dehydrojuncusol, a Natural Phenanthrene Compound Extracted from *Juncus Maritimus*, Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus RNA Replication » édité par J.-H. J. Ou. *Journal of Virology* 93(10):e02009-18, /jvi/93/10/JVI.02009-18.atom. doi: 10.1128/JVI.02009-18.
- Saïde, Assunta, Chiara Lauritano, et Adrianna Ianora. 2020. « Pheophorbide a: State of the Art ». *Marine Drugs* 18(5):257. doi: 10.3390/md18050257.
- Salama, Carlos, Jian Han, Linda Yau, William G. Reiss, Benjamin Kramer, Jeffrey D. Neidhart, Gerard J. Criner, Emma Kaplan-Lewis, Rachel Baden, Lavannya Pandit, Miriam L. Cameron, Julia Garcia-Diaz, Victoria Chávez, Martha Mekebeb-Reuter, Ferdinando Lima de Menezes, Reena Shah, Maria F. González-Lara, Beverly Assman, Jamie Freedman, et Shalini V. Mohan. 2021. « Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia ». *New England Journal of Medicine* 384(1):20-30. doi: 10.1056/NEJMoa2030340.
- Schultze, Joachim L., et Anna C. Aschenbrenner. 2021. « COVID-19 and the Human Innate Immune System ». *Cell* 184(7):1671-92. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.029.
- Sethuraman, Nandini, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, et Akihide Ryo. 2020. « Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 ». *JAMA* 323(22):2249. doi: 10.1001/jama.2020.8259.
- Shahbaznejad, Leila, Alireza Davoudi, Gohar Eslami, John S. Markowitz, Mohammad Reza Navaeifar, Fatemeh Hosseinzadeh, Faeze Sadat Movahedi, et Mohammad Sadegh Rezai. 2021. « Effects of Ivermectin in Patients With COVID-19: A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial ». *Clinical Therapeutics* S0149291821002010. doi: 10.1016/j.clinthera.2021.04.007.
- Sheahan, Timothy P., Amy C. Sims, Rachel L. Graham, Vineet D. Menachery, Lisa E. Gralinski, James B. Case, Sarah R. Leist, Krzysztof Pyrc, Joy Y. Feng, Iva Trantcheva, Roy Bannister, Yeojin Park, Darius Babusis, Michael O. Clarke, Richard L. Mackman, Jamie E. Spahn, Christopher A. Palmiotti, Dustin Siegel, Adrian S. Ray, Tomas Cihlar, Robert Jordan, Mark R. Denison, et Ralph S. Baric. 2017. « Broad-Spectrum Antiviral GS-5734 Inhibits Both Epidemic and Zoonotic Coronaviruses ». *Science Translational Medicine* 9(396):eaal3653. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653.
- Sheahan, Timothy P., Amy C. Sims, Sarah R. Leist, Alexandra Schäfer, John Won, Ariane J. Brown, Stephanie A. Montgomery, Alison Hogg, Darius Babusis, Michael O. Clarke, Jamie E. Spahn, Laura Bauer, Scott Sellers, Danielle Porter, Joy Y. Feng, Tomas Cihlar, Robert Jordan, Mark R. Denison, et Ralph S. Baric. 2020. « Comparative Therapeutic Efficacy of Remdesivir and Combination Lopinavir, Ritonavir, and

- Interferon Beta against MERS-CoV ». *Nature Communications* 11(1):222. doi: 10.1038/s41467-019-13940-6.
- Shen, Liang, Junwei Niu, Chunhua Wang, Baoying Huang, Wenling Wang, Na Zhu, Yao Deng, Huijuan Wang, Fei Ye, Shan Cen, et Wenjie Tan. 2019. « High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses » édité par T. Gallagher. *Journal of Virology* 93(12):e00023-19, /jvi/93/12/JVI.00023-19.atom. doi: 10.1128/JVI.00023-19.
- Shieh, Wun-Ju, Cheng-Hsiang Hsiao, Christopher D. Paddock, Jeannette Guarner, Cynthia S. Goldsmith, Kathleen Tatti, Michelle Packard, Laurie Mueller, Mu-Zong Wu, Pierre Rollin, Ih-Jen Su, et Sherif R. Zaki. 2005. « Immunohistochemical, in Situ Hybridization, and Ultrastructural Localization of SARS-Associated Coronavirus in Lung of a Fatal Case of Severe Acute Respiratory Syndrome in Taiwan ». *Human Pathology* 36(3):303-9. doi: 10.1016/j.humpath.2004.11.006.
- Shirato, Kazuya, Miyuki Kawase, et Shutoku Matsuyama. 2013. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2 ». *Journal of Virology* 87(23):12552-61. doi: 10.1128/JVI.01890-13.
- Shirato, Kazuya, Miyuki Kawase, et Shutoku Matsuyama. 2018. « Wild-Type Human Coronaviruses Prefer Cell-Surface TMPRSS2 to Endosomal Cathepsins for Cell Entry ». *Virology* 517:9-15. doi: 10.1016/j.virol.2017.11.012.
- Siordia, Juan A. 2020. « Epidemiology and Clinical Features of COVID-19: A Review of Current Literature ». *Journal of Clinical Virology* 127:104357. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104357.
- Skipper, Caleb P., Katelyn A. Pastick, Nicole W. Engen, Ananta S. Bangdiwala, Mahsa Abassi, Sarah M. Lofgren, Darlisha A. Williams, Elizabeth C. Okafor, Matthew F. Pullen, Melanie R. Nicol, Alanna A. Nascene, Kathy H. Hullsieck, Matthew P. Cheng, Darlette Luke, Sylvain A. Lothar, Lauren J. MacKenzie, Glen Drobot, Lauren E. Kelly, Ilan S. Schwartz, Ryan Zarychanski, Emily G. McDonald, Todd C. Lee, Radha Rajasingham, et David R. Boulware. 2020. « Hydroxychloroquine in Nonhospitalized Adults With Early COVID-19: A Randomized Trial ». *Annals of Internal Medicine* 173(8):623-31. doi: 10.7326/M20-4207.
- Solymosi, Katalin, et Beata Mysliwa-Kurdziel. 2017. « Chlorophylls and Their Derivatives Used in Food Industry and Medicine ». *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 17(13). doi: 10.2174/1389557516666161004161411.
- Souza, Pedro F. N., Jackson L. Amaral, Leandro P. Bezerra, Francisco E. S. Lopes, Valder N. Freire, Jose T. A. Oliveira, et Cleverson D. T. Freitas. 2021. « ACE2-Derived Peptides Interact with the RBD Domain of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, Disrupting the Interaction with the Human ACE2 Receptor ». *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 1-14. doi: 10.1080/07391102.2020.1871415.
- Soy, Mehmet, Gökhan Keser, Pamir Atagündüz, Fehmi Tabak, Işık Atagündüz, et Servet Kayhan. 2020. « Cytokine Storm in COVID-19: Pathogenesis and Overview of Anti-Inflammatory Agents Used in Treatment ». *Clinical Rheumatology* 39(7):2085-94. doi: 10.1007/s10067-020-05190-5.
- Stone, John H., Matthew J. Frigault, Naomi J. Serling-Boyd, Ana D. Fernandes, Liam Harvey, Andrea S. Foulkes, Nora K. Horick, Brian C. Healy, Ruta Shah, Ana Maria Bensaci, Ann E. Woolley, Sarah Nikiforow, Nina Lin, Manish Sagar, Harry Schragar, David S.

- Huckins, Matthew Axelrod, Michael D. Pincus, Jorge Fleisher, Chana A. Sacks, Michael Dougan, Crystal M. North, Yuan-Di Halvorsen, Tara K. Thurber, Zeina Dagher, Allison Scherer, Rachel S. Wallwork, Arthur Y. Kim, Sara Schoenfeld, Pritha Sen, Tomas G. Neilan, Cory A. Perugino, Sebastian H. Unizony, Deborah S. Collier, Mark A. Matza, Janeth M. Vinh, Kathryn A. Bowman, Eric Meyerowitz, Amna Zafar, Zsofia D. Drobni, Marcy B. Bolster, Minna Kohler, Kristin M. D'Silva, Jonathan Dau, Megan M. Lockwood, Caroline Cubbison, Brittany N. Weber, et Michael K. Mansour. 2020. « Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 ». *New England Journal of Medicine* 383(24):2333-44. doi: 10.1056/NEJMoa2028836.
- Struck, Anna-Winona, Marco Axmann, Susanne Pfefferle, Christian Drosten, et Bernd Meyer. 2012. « A Hexapeptide of the Receptor-Binding Domain of SARS Corona Virus Spike Protein Blocks Viral Entry into Host Cells via the Human Receptor ACE2 ». *Antiviral Research* 94(3):288-96. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.12.012.
- Sun, JingKang, YuTing Chen, XiuDe Fan, XiaoYun Wang, QunYing Han, et ZhengWen Liu. 2020. « Advances in the Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine for the Treatment of COVID-19 ». *Postgraduate Medicine* 132(7):604-13. doi: 10.1080/00325481.2020.1778982.
- Sundararaj Stanleyraj, Jeremiah, Nandini Sethuraman, Rajesh Gupta, Sohanlal Thiruvoth, Manisha Gupta, et Akihide Ryo. 2021. « Treating COVID-19: Are We Missing out the Window of Opportunity? » *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76(2):283-85. doi: 10.1093/jac/dkaa442.
- Sykes, Dominic L., Luke Holdsworth, Nadia Jawad, Pumali Gunasekera, Alyn H. Morice, et Michael G. Crooks. 2021. « Post-COVID-19 Symptom Burden: What Is Long-COVID and How Should We Manage It? » *Lung* 199(2):113-19. doi: 10.1007/s00408-021-00423-z.
- Talbot, Pierre J., Marc Desforges, Mathieu Dubé, et Alain Le Coupanec. 2016. « Coronavirus respiratoires humains neurotropes: Une relation ambiguë entre neurovirulence et clivage protéique ». *médecine/sciences* 32(8-9):696-99. doi: 10.1051/medsci/20163208012.
- Talbot, Pierre J., Sophie Ékandé, Neil R. Cashman, Samir Mounir, et Janet N. Stewart. 1994. « Neurotropism of Human Coronavirus 229E ». P. 339-46 in *Coronaviruses*. Vol. 342, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, édité par H. Laude et J.-F. Vautherot. Boston, MA: Springer US.
- Tang, Patrick, Mohammad R. Hasan, Hiam Chemaitelly, Hadi M. Yassine, Fatiha M. Benslimane, Hebah A. Al Khatib, Sawsan AlMukdad, Peter Coyle, Houssein H. Ayoub, Zaina Al Kanaani, Einas Al Kuwari, Andrew Jeremijenko, Anvar Hassan Kaleeckal, Ali Nizar Latif, Riyazuddin Mohammad Shaik, Hanan F. Abdul Rahim, Gheyath K. Nasrallah, Mohamed Ghaith Al Kuwari, Hamad Eid Al Romaihi, Adeel A. Butt, Mohamed H. Al-Thani, Abdullatif Al Khal, Roberto Bertollini, et Laith J. Abu-Raddad. 2021. *BNT162b2 and MRNA-1273 COVID-19 Vaccine Effectiveness against the Delta (B.1.617.2) Variant in Qatar. preprint*. *Epidemiology*. doi: 10.1101/2021.08.11.21261885.
- Tang, Patrick Ming-Kuen, Xiao-Zhuo Liu, Dong-Mei Zhang, Wing-Ping Fong, et Kwok-Pui Fung. 2009. « Pheophorbide a Based Photodynamic Therapy Induces Apoptosis via Mitochondrial-Mediated Pathway in Human Uterine Carcinosarcoma ». *Cancer Biology & Therapy* 8(6):533-39. doi: 10.4161/cbt.8.6.7694.

- Taquet, Maxime, John R. Geddes, Masud Husain, Sierra Luciano, et Paul J. Harrison. 2021. « 6-Month Neurological and Psychiatric Outcomes in 236 379 Survivors of COVID-19: A Retrospective Cohort Study Using Electronic Health Records ». *The Lancet Psychiatry* 8(5):416-27. doi: 10.1016/S2215-0366(21)00084-5.
- Tay, M. Y. F., J. E. Fraser, W. K. K. Chan, N. J. Moreland, A. P. Rathore, C. Wang, S. G. Vasudevan, et D. A. Jans. 2013. « Nuclear Localization of Dengue Virus (DENV) 1–4 Non-Structural Protein 5; Protection against All 4 DENV Serotypes by the Inhibitor Ivermectin ». *Antiviral Research* 99(3):301-6. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.002.
- Tchesnokov, Egor, Joy Feng, Danielle Porter, et Matthias Götte. 2019. « Mechanism of Inhibition of Ebola Virus RNA-Dependent RNA Polymerase by Remdesivir ». *Viruses* 11(4):326. doi: 10.3390/v11040326.
- Tegally, Houriiyah, Eduan Wilkinson, Marta Giovanetti, Arash Iranzadeh, Vagner Fonseca, Jennifer Giandhari, Deelan Doolabh, Sureshnee Pillay, Emmanuel James San, Nokukhanya Msomi, Koleka Mlisana, Anne von Gottberg, Sibongile Walaza, Mushal Allam, Arshad Ismail, Thabo Mohale, Allison J. Glass, Susan Engelbrecht, Gert Van Zyl, Wolfgang Preiser, Francesco Petruccione, Alex Sigal, Diana Hardie, Gert Marais, Nei-yuan Hsiao, Stephen Korsman, Mary-Ann Davies, Lynn Tyers, Innocent Mudau, Denis York, Caroline Maslo, Dominique Goedhals, Shareef Abrahams, Oluwakemi Laguda-Akingba, Arghavan Alisoltani-Dehkordi, Adam Godzik, Constantinos Kurt Wibmer, Bryan Trevor Sewell, José Lourenço, Luiz Carlos Junior Alcantara, Sergei L. Kosakovsky Pond, Steven Weaver, Darren Martin, Richard J. Lessells, Jinal N. Bhiman, Carolyn Williamson, et Tulio de Oliveira. 2021. « Detection of a SARS-CoV-2 Variant of Concern in South Africa ». *Nature* 592(7854):438-43. doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
- Teli, Divya M., Mamta B. Shah, et Mahesh T. Chhabria. 2021. « In Silico Screening of Natural Compounds as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease and Spike RBD: Targets for COVID-19 ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7:599079. doi: 10.3389/fmolb.2020.599079.
- The RECOVERY Collaborative Group. 2021. « Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 ». *New England Journal of Medicine* 384(8):693-704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
- Toniati, Paola, Simone Piva, Marco Cattalini, Emirena Garrafa, Francesca Regola, Francesco Castelli, Franco Franceschini, Paolo Airò, Chiara Bazzani, Eva-Andrea Beindorf, Marialma Berlendis, Michela Bezzi, Nicola Bossini, Maurizio Castellano, Sergio Cattaneo, Ilaria Cavazzana, Giovanni-Battista Contessi, Massimo Crippa, Andrea Delbarba, Elena De Peri, Angela Faletti, Matteo Filippini, Matteo Filippini, Micol Frassi, Mario Gaggiotti, Roberto Gorla, Michael Lanspa, Silvia Lorenzotti, Rosa Marino, Roberto Maroldi, Marco Metra, Alberto Matteelli, Denise Modina, Giovanni Moioli, Giovanni Montani, Maria-Lorenza Muiesan, Silvia Odolini, Elena Peli, Silvia Pesenti, Maria-Chiara Pezzoli, Ilenia Pirola, Alessandro Pozzi, Alessandro Proto, Francesco-Antonio Rasulo, Giulia Renisi, Chiara Ricci, Damiano Rizzoni, Giuseppe Romanelli, Mara Rossi, Massimo Salvetti, Francesco Scolari, Liana Signorini, Marco Taglietti, Gabriele Tomasoni, Lina-Rachele Tomasoni, Fabio Turla, Alberto Valsecchi, Davide Zani, Francesco Zuccalà, Fiammetta Zunica, Emanuele Focà, Laura Andreoli, et Nicola Latronico. 2020. « Tocilizumab for the Treatment of Severe COVID-19 Pneumonia with Hyperinflammatory Syndrome and Acute Respiratory Failure: A Single Center Study of 100 Patients in Brescia, Italy ». *Autoimmunity Reviews* 19(7):102568. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102568.

- Tregoning, J. S., E. S. Brown, H. M. Cheeseman, K. E. Flight, S. L. Higham, N. -M. Lemm, B. F. Pierce, D. C. Stirling, Z. Wang, et K. M. Pollock. 2020. « Vaccines for COVID-19 ». *Clinical & Experimental Immunology* 202(2):162-92. doi: 10.1111/cei.13517.
- Tregoning, John S., Katie E. Flight, Sophie L. Higham, Ziyin Wang, et Benjamin F. Pierce. 2021. « Progress of the COVID-19 Vaccine Effort: Viruses, Vaccines and Variants versus Efficacy, Effectiveness and Escape ». *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/s41577-021-00592-1.
- Tré-Hardy, Marie, Alain Wilmet, Ingrid Beukinga, Julien Favresse, Jean-Michel Dogné, Jonathan Douxfils, et Laurent Blairon. 2021. « Analytical and Clinical Validation of an ELISA for Specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM Antibodies ». *Journal of Medical Virology* 93(2):803-11. doi: 10.1002/jmv.26303.
- VanPatten, Sonya, Mingzhu He, Ahmad Altit, Kai F Cheng, Mustafa H. Ghanem, et Yousef Al-Abed. 2020. « Evidence Supporting the Use of Peptides and Peptidomimetics as Potential SARS-CoV-2 (COVID-19) Therapeutics ». *Future Medicinal Chemistry* 12(18):1647-56. doi: 10.4155/fmc-2020-0180.
- Vigant, F., A. Hollmann, J. Lee, N. C. Santos, M. E. Jung, et B. Lee. 2014. « The Rigid Amphipathic Fusion Inhibitor DUY11 Acts through Photosensitization of Viruses ». *Journal of Virology* 88(3):1849-53. doi: 10.1128/JVI.02907-13.
- Vigant, Frederic, Jihye Lee, Axel Hollmann, Lukas B. Tanner, Zeynep Akyol Ataman, Tatyana Yun, Guanghou Shui, Hector C. Aguilar, Dong Zhang, David Meriwether, Gleyder Roman-Sosa, Lindsey R. Robinson, Terry L. Juelich, Hubert Buczkowski, Sunwen Chou, Miguel A. R. B. Castanho, Mike C. Wolf, Jennifer K. Smith, Ashley Banyard, Margaret Kielian, Srinivasa Reddy, Markus R. Wenk, Matthias Selke, Nuno C. Santos, Alexander N. Freiberg, Michael E. Jung, et Benhur Lee. 2013. « A Mechanistic Paradigm for Broad-Spectrum Antivirals That Target Virus-Cell Fusion » édité par J. A. T. Young. *PLoS Pathogens* 9(4):e1003297. doi: 10.1371/journal.ppat.1003297.
- Vigant, Frederic, Nuno C. Santos, et Benhur Lee. 2015. « Broad-Spectrum Antivirals against Viral Fusion ». *Nature Reviews Microbiology* 13(7):426-37. doi: 10.1038/nrmicro3475.
- V'kovski, Philip, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder, et Volker Thiel. 2021. « Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2 ». *Nature Reviews Microbiology* 19(3):155-70. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- Vzorov, Andrei N., Dabney W. Dixon, Jenna S. Trommel, Luigi G. Marzilli, et Richard W. Compans. 2002. « Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Porphyrins ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(12):3917-25. doi: 10.1128/AAC.46.12.3917-3925.2002.
- Wagstaff, Kylie M., Haran Sivakumaran, Steven M. Heaton, David Harrich, et David A. Jans. 2012. « Ivermectin Is a Specific Inhibitor of Importin α/β -Mediated Nuclear Import Able to Inhibit Replication of HIV-1 and Dengue Virus ». *Biochemical Journal* 443(3):851-56. doi: 10.1042/BJ20120150.
- Wang, Aoli, Yong Sun, Qingwang Liu, Hong Wu, Juan Liu, Jun He, Junling Yu, Qing Qing Chen, Yinglu Ge, Zhuhui Zhang, Chen Hu, Cheng Chen, Ziping Qi, Fengming Zou, Feiyang Liu, Jie Hu, Ming Zhao, Tao Huang, Beilei Wang, Li Wang, Wei Wang,

- Wenchao Wang, Tao Ren, Jing Liu, Yehuan Sun, Song Fan, Qibing Wu, Chaozhao Liang, Liangdan Sun, Bin Su, Wei Wei, et Qingsong Liu. 2020. « Low Dose of Emetine as Potential Anti-SARS-CoV-2 Virus Therapy: Preclinical in Vitro Inhibition and in Vivo Pharmacokinetic Evidences ». *Molecular Biomedicine* 1(1):14. doi: 10.1186/s43556-020-00018-9.
- Wang, Cong, Chen Hua, Shuai Xia, Weihua Li, Lu Lu, et Shibo Jiang. 2019. « Combining a Fusion Inhibitory Peptide Targeting the MERS-CoV S2 Protein HR1 Domain and a Neutralizing Antibody Specific for the S1 Protein Receptor-Binding Domain (RBD) Showed Potent Synergism against Pseudotyped MERS-CoV with or without Mutations in RBD ». *Viruses* 11(1):31. doi: 10.3390/v11010031.
- Wang, Lingshu, Wei Shi, James D. Chappell, M. Gordon Joyce, Yi Zhang, Masaru Kanekiyo, Michelle M. Becker, Neeltje van Doremalen, Robert Fischer, Nianshuang Wang, Kizzmekia S. Corbett, Misook Choe, Rosemarie D. Mason, Joseph G. Van Galen, Tongqing Zhou, Kevin O. Saunders, Kathleen M. Tatti, Lia M. Haynes, Peter D. Kwong, Kayvon Modjarrad, Wing-Pui Kong, Jason S. McLellan, Mark R. Denison, Vincent J. Munster, John R. Mascola, et Barney S. Graham. 2018. « Importance of Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting Multiple Antigenic Sites on the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein To Avoid Neutralization Escape » édité par T. Gallagher. *Journal of Virology* 92(10):e02002-17, /jvi/92/10/e02002-17.atom. doi: 10.1128/JVI.02002-17.
- Wang, Ning, Shi-Yue Li, Xing-Lou Yang, Hui-Min Huang, Yu-Ji Zhang, Hua Guo, Chu-Ming Luo, Maureen Miller, Guangjian Zhu, Aleksei A. Chmura, Emily Hagan, Ji-Hua Zhou, Yun-Zhi Zhang, Lin-Fa Wang, Peter Daszak, et Zheng-Li Shi. 2018. « Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China ». *Virologica Sinica* 33(1):104-7. doi: 10.1007/s12250-018-0012-7.
- Wang, Yeming, Dingyu Zhang, Guanhua Du, Ronghui Du, Jianping Zhao, Yang Jin, Shouzhi Fu, Ling Gao, Zhenshun Cheng, Qiaofa Lu, Yi Hu, Guangwei Luo, Ke Wang, Yang Lu, Huadong Li, Shuzhen Wang, Shunan Ruan, Chengqing Yang, Chunlin Mei, Yi Wang, Dan Ding, Feng Wu, Xin Tang, Xianzhi Ye, Yingchun Ye, Bing Liu, Jie Yang, Wen Yin, Aili Wang, Guohui Fan, Fei Zhou, Zhibo Liu, Xiaoying Gu, Jiuyang Xu, Lianhan Shang, Yi Zhang, Lianjun Cao, Tingting Guo, Yan Wan, Hong Qin, Yushen Jiang, Thomas Jaki, Frederick G. Hayden, Peter W. Horby, Bin Cao, et Chen Wang. 2020. « Remdesivir in Adults with Severe COVID-19: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Trial ». *The Lancet* 395(10236):1569-78. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31022-9.
- Weinreich, David M., Sumathi Sivapalasingam, Thomas Norton, Shazia Ali, Haitao Gao, Rafia Bhore, Bret J. Musser, Yuhwen Soo, Diana Rofail, Joseph Im, Christina Perry, Cynthia Pan, Romana Hosain, Adnan Mahmood, John D. Davis, Kenneth C. Turner, Andrea T. Hooper, Jennifer D. Hamilton, Alina Baum, Christos A. Kyratsous, Yunji Kim, Amanda Cook, Wendy Kampman, Anita Kohli, Yessica Sachdeva, Ximena Graber, Bari Kowal, Thomas DiCioccio, Neil Stahl, Leah Lipsich, Ned Braunstein, Gary Herman, et George D. Yancopoulos. 2021. « REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19 ». *New England Journal of Medicine* 384(3):238-51. doi: 10.1056/NEJMoa2035002.
- White, Judith M., et Gary R. Whittaker. 2016. « Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes ». *Traffic* 17(6):593-614. doi: 10.1111/tra.12389.

- White, Kris M., Romel Rosales, Soner Yildiz, Thomas Kehrer, Lisa Miorin, Elena Moreno, Sonia Jangra, Melissa B. Uccellini, Raveen Rathnasinghe, Lynda Coughlan, Carles Martinez-Romero, Jyoti Batra, Ajda Rojc, Mehdi Bouhaddou, Jacqueline M. Fabius, Kirsten Obernier, Marion Dejosez, María José Guillén, Alejandro Losada, Pablo Avilés, Michael Schotsaert, Thomas Zwaka, Marco Vignuzzi, Kevan M. Shokat, Nevan J. Krogan, et Adolfo García-Sastre. 2021. « Plitidepsin Has Potent Preclinical Efficacy against SARS-CoV-2 by Targeting the Host Protein EEF1A ». *Science* 371(6532):926-31. doi: 10.1126/science.abf4058.
- de Wilde, Adriaan H., Dirk Jochmans, Clara C. Posthuma, Jessika C. Zevenhoven-Dobbe, Stefan van Nieuwkoop, Theo M. Bestebroer, Bernadette G. van den Hoogen, Johan Neyts, et Eric J. Snijder. 2014. « Screening of an FDA-Approved Compound Library Identifies Four Small-Molecule Inhibitors of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in Cell Culture ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(8):4875-84. doi: 10.1128/AAC.03011-14.
- Wilson, Brian C. 2002. « Photodynamic Therapy for Cancer: Principles ». *Canadian Journal of Gastroenterology* 16(6):393-96. doi: 10.1155/2002/743109.
- de Wit, Emmie, Neeltje van Doremalen, Darryl Falzarano, et Vincent J. Munster. 2016. « SARS and MERS: Recent Insights into Emerging Coronaviruses ». *Nature Reviews Microbiology* 14(8):523-34. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
- Woo, Patrick C. Y., Susanna K. P. Lau, Chung-ming Chu, Kwok-hung Chan, Hoi-wah Tsoi, Yi Huang, Beatrice H. L. Wong, Rosana W. S. Poon, James J. Cai, Wei-kwang Luk, Leo L. M. Poon, Samson S. Y. Wong, Yi Guan, J. S. Malik Peiris, et Kwok-yung Yuen. 2005. « Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia ». *Journal of Virology* 79(2):884-95. doi: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
- Xia, Shuai, Qi Liu, Qian Wang, Zhiwu Sun, Shan Su, Lanying Du, Tianlei Ying, Lu Lu, et Shibo Jiang. 2014. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Entry Inhibitors Targeting Spike Protein ». *Virus Research* 194:200-210. doi: 10.1016/j.virusres.2014.10.007.
- Xia, Shuai, Yun Zhu, Meiqin Liu, Qiaoshuai Lan, Wei Xu, Yanling Wu, Tianlei Ying, Shuwen Liu, Zhengli Shi, Shibo Jiang, et Lu Lu. 2020. « Fusion Mechanism of 2019-NCoV and Fusion Inhibitors Targeting HR1 Domain in Spike Protein ». *Cellular & Molecular Immunology* 17(7):765-67. doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.
- Xiao, Kangpeng, Junqiong Zhai, Yaoyu Feng, Niu Zhou, Xu Zhang, Jie-Jian Zou, Na Li, Yaqiong Guo, Xiaobing Li, Xuejuan Shen, Zhipeng Zhang, Fanfan Shu, Wanyi Huang, Yu Li, Ziding Zhang, Rui-Ai Chen, Ya-Jiang Wu, Shi-Ming Peng, Mian Huang, Wei-Jun Xie, Qin-Hui Cai, Fang-Hui Hou, Wu Chen, Lihua Xiao, et Yongyi Shen. 2020. « Isolation of SARS-CoV-2-Related Coronavirus from Malayan Pangolins ». *Nature* 583(7815):286-89. doi: 10.1038/s41586-020-2313-x.
- Xiu, Siyu, Alexej Dick, Han Ju, Sako Mirzaie, Fatemeh Abdi, Simon Cocklin, Peng Zhan, et Xinyong Liu. 2020. « Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities ». *Journal of Medicinal Chemistry* 63(21):12256-74. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00502.
- Xu, Defeng, Tzu-Hua Lin, Shaoshun Li, Jun Da, Xing-Qiao Wen, Jiang Ding, Chawnshang Chang, et Shuyuan Yeh. 2012. « Cryptotanshinone Suppresses Androgen Receptor-

- Mediated Growth in Androgen Dependent and Castration Resistant Prostate Cancer Cells ». *Cancer Letters* 316(1):11-22. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.006.
- Xu, Jiuyang, Wenxu Jia, Pengfei Wang, Senyan Zhang, Xuanling Shi, Xinquan Wang, et Linqi Zhang. 2019. « Antibodies and Vaccines against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Emerging Microbes & Infections* 8(1):841-56. doi: 10.1080/22221751.2019.1624482.
- Yadav, Pragya D., Nivedita Gupta, Dimpal A. Nyayanit, Rima R. Sahay, Anita M. Shete, Triparna Majumdar, Savita Patil, Harmanmeet Kaur, Chaitali Nikam, Jayshri Pethani, Deepak Y. Patil, Neeraj Aggarwal, Neetu Vijay, et Jitendra Narayan. 2021. « Imported SARS-CoV-2 V501Y.V2 Variant (B.1.351) Detected in Travelers from South Africa and Tanzania to India ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 41:102023. doi: 10.1016/j.tmaid.2021.102023.
- Yan, Yiwu. 2013. « Anti-Malaria Drug Chloroquine Is Highly Effective in Treating Avian Influenza A H5N1 Virus Infection in an Animal Model ». *Cell Research* 23(2):3.
- Yang, Yang, Md Shahidul Islam, Jin Wang, Yuan Li, et Xin Chen. 2020. « Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Patients Infected with 2019-New Coronavirus (SARS-CoV-2): A Review and Perspective ». *International Journal of Biological Sciences* 16(10):1708-17. doi: 10.7150/ijbs.45538.
- Yao, Xueting, Fei Ye, Miao Zhang, Cheng Cui, Baoying Huang, Peihua Niu, Xu Liu, Li Zhao, Erdan Dong, Chunli Song, Siyan Zhan, Roujian Lu, Haiyan Li, Wenjie Tan, et Dongyang Liu. 2020. « In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ». *Clinical Infectious Diseases* 71(15):732-39. doi: 10.1093/cid/ciaa237.
- Yeager, Curtis L., Richard A. Ashmun, Richard K. Williams, Christine B. Cardellicchio, Linda H. Shapiro, A. Thomas Look, et Kathryn V. Holmes. 1992. « Human Aminopeptidase N Is a Receptor for Human Coronavirus 229E ». *Nature* 357(6377):420-22. doi: 10.1038/357420a0.
- Yilmaz, C., et V. Gökmen. 2016. « Chlorophyll ». P. 37-41 in *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier.
- Ying, Tianlei, Lanying Du, Tina W. Ju, Ponraj Prabakaran, Candy C. Y. Lau, Lu Lu, Qi Liu, Lili Wang, Yang Feng, Yanping Wang, Bo-Jian Zheng, Kwok-Yung Yuen, Shibo Jiang, et Dimiter S. Dimitrov. 2014. « Exceptionally Potent Neutralization of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus by Human Monoclonal Antibodies » édité par R. W. Doms. *Journal of Virology* 88(14):7796-7805. doi: 10.1128/JVI.00912-14.
- You, Hyun, Hyo-Eun Yoon, Pyeong-Hwa Jeong, Hyojin Ko, Jung-Hoon Yoon, et Yong-Chul Kim. 2015. « Pheophorbide-a Conjugates with Cancer-Targeting Moieties for Targeted Photodynamic Cancer Therapy ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(7):1453-62. doi: 10.1016/j.bmc.2015.02.014.
- Yuan, Shu, Si-Cong Jiang, et Zi-Lin Li. 2020. « Analysis of Possible Intermediate Hosts of the New Coronavirus SARS-CoV-2 ». *Frontiers in Veterinary Science* 7:379. doi: 10.3389/fvets.2020.00379.
- Yuan, Yuan, Duanfang Cao, Yanfang Zhang, Jun Ma, Jianxun Qi, Qihui Wang, Guangwen Lu, Ying Wu, Jinghua Yan, Yi Shi, Xinzheng Zhang, et George F. Gao. 2017. « Cryo-

- EM Structures of MERS-CoV and SARS-CoV Spike Glycoproteins Reveal the Dynamic Receptor Binding Domains ». *Nature Communications* 8(1):15092. doi: 10.1038/ncomms15092.
- Zafferani, Martina, Christina Haddad, Le Luo, Jesse Davila-Calderon, Liang Yuan-Chiu, Christian Shema Mugisha, Adeline G. Monaghan, Andrew A. Kennedy, Joseph D. Yesselman, Robert R. Gifford, Andrew W. Tai, Sebla B. Kutluay, Mei-Ling Li, Gary Brewer, Blanton S. Tolbert, et Amanda E. Hargrove. 2020. *Amilorides Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vitro by Targeting RNA Structures*. preprint. Microbiology. doi: 10.1101/2020.12.05.409821.
- Zaki, Ali M., Sander Van Boheemen, Theo M. Bestebroer, Albert DME Osterhaus, et Ron AM Fouchier. 2012. « Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia ». *New England Journal of Medicine* 367(19):1814-20.
- Zhang, Dingqi, Sami Hamdoun, Ruihong Chen, Lijun Yang, Chi Kio Ip, Yuanqing Qu, Runfeng Li, Haiming Jiang, Zifeng Yang, Sookja Kim Chung, Liang Liu, et Vincent Kam Wai Wong. 2021. « Identification of Natural Compounds as SARS-CoV-2 Entry Inhibitors by Molecular Docking-Based Virtual Screening with Bio-Layer Interferometry ». *Pharmacological Research* 172:105820. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105820.
- Zhang, Hong-Jie, Ghee Teng Tan, Vu Dinh Hoang, Nguyen Van Hung, Nguyen Manh Cuong, D. Doel Soejarto, John M. Pezzuto, et Harry H. S. Fong. 2003. « Natural Anti-HIV Agents. Part IV. Anti-HIV Constituents from *Vatica c Inerea*¹ ». *Journal of Natural Products* 66(2):263-68. doi: 10.1021/np020379y.
- Zhang, Ya-Nan, Qiu-Yan Zhang, Xiao-Dan Li, Jin Xiong, Shu-Qi Xiao, Zhen Wang, Zhe-Rui Zhang, Cheng-Lin Deng, Xing-Lou Yang, Hong-Ping Wei, Zhi-Ming Yuan, Han-Qing Ye, et Bo Zhang. 2020. « Gemcitabine, Lycorine and Oxysophoridine Inhibit Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Cell Culture ». *Emerging Microbes & Infections* 9(1):1170-73. doi: 10.1080/22221751.2020.1772676.
- Zhao, Guangyu, Lanying Du, Cuiqing Ma, Ye Li, Lin Li, Vincent KM Poon, Lili Wang, Fei Yu, Bo-Jian Zheng, Shibo Jiang, et Yusen Zhou. 2013. « A Safe and Convenient Pseudovirus-Based Inhibition Assay to Detect Neutralizing Antibodies and Screen for Viral Entry Inhibitors against the Novel Human Coronavirus MERS-CoV ». *Virology Journal* 10(1):266. doi: 10.1186/1743-422X-10-266.
- Zhou, Peng, Xing-Lou Yang, Xian-Guang Wang, Ben Hu, Lei Zhang, Wei Zhang, Hao-Rui Si, Yan Zhu, Bei Li, Chao-Lin Huang, Hui-Dong Chen, Jing Chen, Yun Luo, Hua Guo, Ren-Di Jiang, Mei-Qin Liu, Ying Chen, Xu-Rui Shen, Xi Wang, Xiao-Shuang Zheng, Kai Zhao, Quan-Jiao Chen, Fei Deng, Lin-Lin Liu, Bing Yan, Fa-Xian Zhan, Yan-Yi Wang, Geng-Fu Xiao, et Zheng-Li Shi. 2020. « A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin ». *Nature* 579(7798):270-73. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhu, Yuanmei, Danwei Yu, Hongxia Yan, Huihui Chong, et Yuxian He. 2020. « Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS- CoV-2, an Emerging Coronavirus with High Fusogenic Activity ». *Journal of Virology* 94(14):12.
- Zhu, Zhixing, Xihua Lian, Xiaoshan Su, Weijing Wu, Giuseppe A. Marraro, et Yiming Zeng. 2020. « From SARS and MERS to COVID-19: A Brief Summary and Comparison of

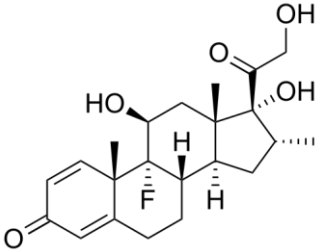
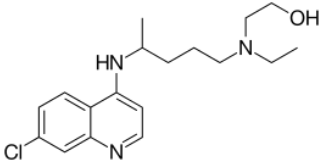
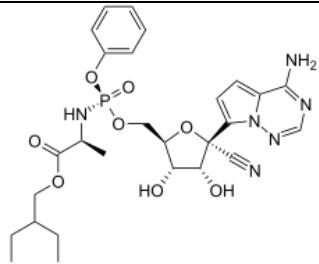
Severe Acute Respiratory Infections Caused by Three Highly Pathogenic Human Coronaviruses ». *Respiratory Research* 21(1):224. doi: 10.1186/s12931-020-01479-w.

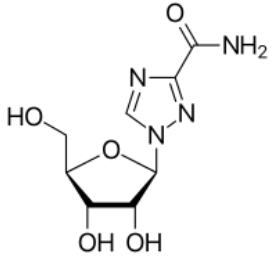
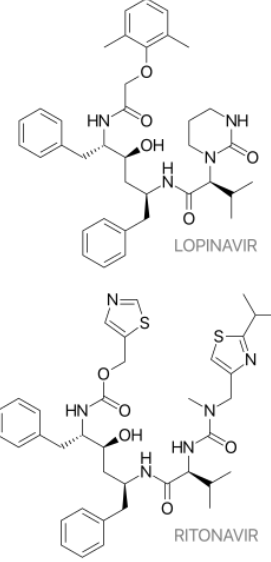
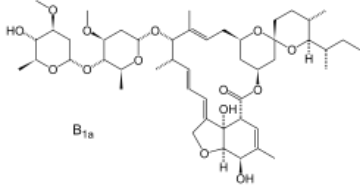
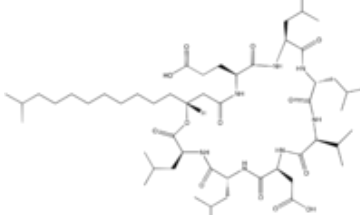
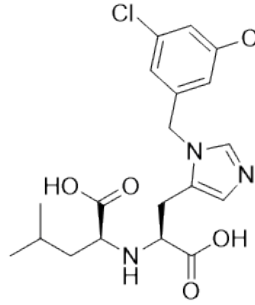
Zhuang, Min, Hong Jiang, Yasuhiro Suzuki, Xiaoguang Li, Peng Xiao, Takashi Tanaka, Hong Ling, Baofeng Yang, Hiroki Saitoh, Lianfeng Zhang, Chuan Qin, Kazuo Sugamura, et Toshio Hattori. 2009. « Procyanidins and Butanol Extract of Cinnamomi Cortex Inhibit SARS-CoV Infection ». *Antiviral Research* 82(1):73-81. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.02.001.

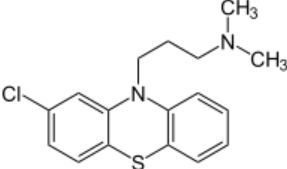
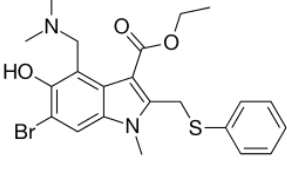
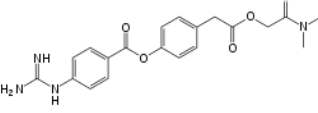
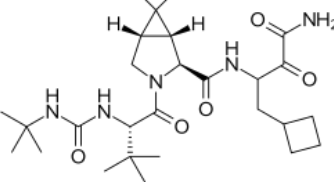
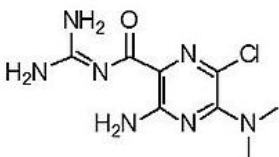
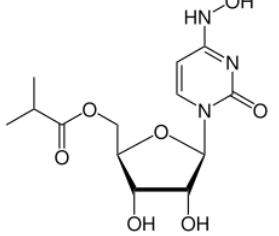
Zumla, Alimuddin, Jasper F. W. Chan, Esam I. Azhar, David S. C. Hui, et Kwok-Yung Yuen. 2016. « Coronaviruses — Drug Discovery and Therapeutic Options ». *Nature Reviews Drug Discovery* 15(5):327-47. doi: 10.1038/nrd.2015.37.

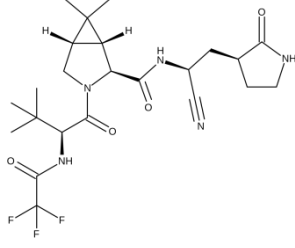
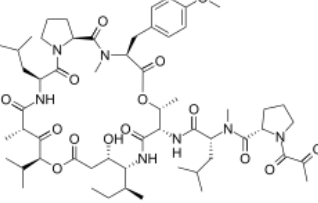
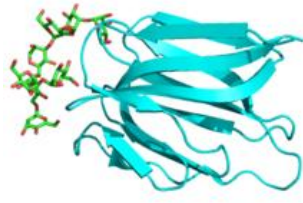
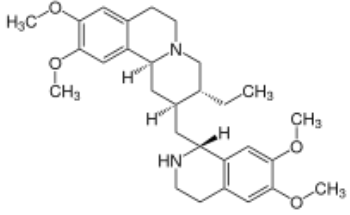
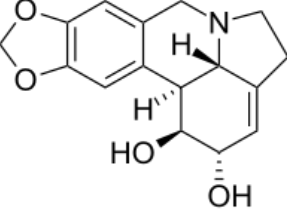
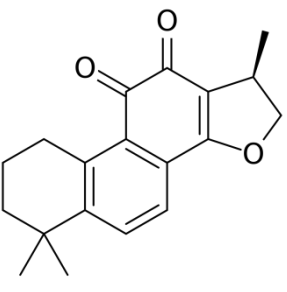
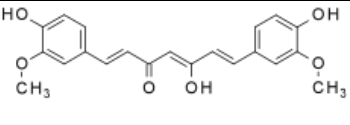
VI - ANNEXE

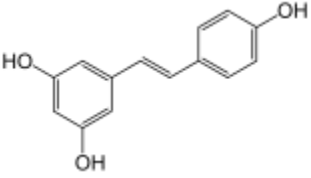
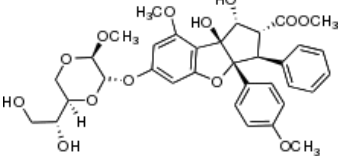
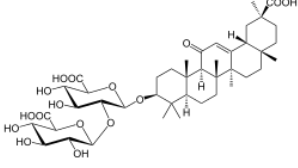
A - Table récapitulative des molécules décrites

Formule	Nom et effets	Utilisation contre la COVID-19	Effets secondaires
	<p>Déxaméthasone</p> <p>Agoniste du récepteur au glucocorticoïde. Anti-inflammatoire utilisé lors d'allergies, asthme, rhumatisme</p>	<p>Traiter les stades d'hyperinflammation dans les formes sévères</p>	<p>Perte de masse osseuse, risque d'infection opportuniste, perte de tonicité musculaire, dépression</p>
	<p>Hydroxychloroquine</p> <p>Anti-inflammatoire et antalgique. Traitement contre la polyarthrite. Initialement développé contre le paludisme</p>	<p>Inhibition de la voie d'entrée endosomale pH dépendant</p>	<p>Risque en cas de surdosage. Risque cardiaque, neuronale, rénaux, hépatocyttaire, rétinopathie</p>
	<p>Remdesivir</p> <p>Analogue nucléotidique de l'adénosine, utilisé contre le virus Ebola. Inhibe l'ARN polymérase ARN dépendante</p>	<p>Inhibition de l'étape de réplication par incorporation de molécule de Remdesivir à la place des adénosines</p>	<p>Lésions rénales et trouble hépatiques</p>

	<p>Ribavirine</p> <p>Analogue nucléotidique de la guanosine à large spectre</p>	<p>Inhibition de l'étape de réplication par incorporation de molécule de Ribavirine à la place des guanosines</p>	<p>Anémie hémolytique, céphalées, fatigue, troubles digestifs, anxiété, dépression, toux, inflammation cutanée</p>
	<p>Lopinavir/Ritonavir</p> <p>Inhibiteur de protéase du VIH, le Ritonavir est aussi un inhibiteur enzymatique</p>	<p>Inhibition de la protéase virale 3CLpro</p>	<p>Diarrhées, vomissement, céphalées, troubles hépatiques et pancréatiques, myalgie, fatigue</p>
	<p>Ivermectine</p> <p>Antiparasitaire à spectre large</p>	<p>Inhibition de l'importine alpha/beta. Inhibition indirecte des protéines accessoires du coronavirus</p>	<p>Faible neurotoxicité</p>
	<p>Surfactine</p> <p>Lipopeptide amphiphile dérivé des bactéries</p>	<p>Insertion dans l'enveloppe lipidique et disruption de la particule virale</p>	<p>ND</p>
	<p>MLN-4760</p> <p>Inhibiteur d'ACE2</p>	<p>NA</p>	<p>Aucune toxicité <i>in vitro</i></p>

	<p>Chlorpromazine</p> <p>Antipsychotique contre la schizophrénie et les troubles bipolaires</p>	<p>Inhibition de l'endocytose clathrine dépendant</p>	<p>Gain de poids, épilepsie, tension musculaire</p>
	<p>Arbidol – Umifénovir</p> <p>Inhibiteur de fusion utilisé contre la grippe en Russie et en Chine</p>	<p>Potentiel inhibiteur de fusion</p>	<p>ND</p>
	<p>Camostat</p> <p>Inhibiteur de sérine protéase</p>	<p>Inhibition de la sérine protéase TMPRSS2</p>	<p>Trouble hépatocitaire, trouble allergique, jaunisse</p>
	<p>Bocéprévir</p> <p>Inhibiteur de protéase du VHC ciblant la protéine NSP3</p>	<p>Inhibiteur potentiel des protéases 3CLpro et PLpro</p>	<p>Fatigue, anémie, nausée, maux de tête</p>
	<p>Diméthylamiloride</p> <p>Analogue de l'Amiloride pour le traitement des leucémies</p>	<p>Inhibe la traduction en se fixant sur les sites IRES des ARN</p>	<p>Trouble gastrique, maux de tête, vomissement, perte d'appétit</p>
	<p>Molnupiravir</p> <p>Analogue nucléosidique de la cytidine initialement créé contre le virus de la grippe et abandonné</p>	<p>Inhibition de l'étape de répliation par incorporation de molécules de Molnuopiravir à la place des cytidines</p>	<p>Potentiel risque mutagène et génération de variant</p>

	<p>Paxlovid</p> <p>Inhibiteur de protéase 3CLpro des coronavirus</p>	<p>Inhibiteur de la protéase 3CLpro en combinaison avec le Ritonavir pour réduire la métabolisation du Paxlovid</p>	<p>Risque iatrogène selon les interactions avec d'autres médicaments</p>
	<p>Plitidepsine</p> <p>Propriété immunosuppressive et anti cancéreuse</p>	<p>Inhibition indirecte de la réplication virale par inhibition du facteur d'élongation eEF1A</p>	<p>Nausée, vomissement, diarrhée, fatigue</p>
<p>Formule</p>	<p>Nom et origine</p>	<p>Utilisation contre la COVID-19</p>	<p>Effets secondaires</p>
	<p>Griffithsin</p> <p>Isolé de l'algue rouge</p>	<p>Inhibition de l'étape d'attachement en se fixant sur la protéine S</p>	<p>ND</p>
	<p>Emétine</p> <p>Racine d'épicea, utilisé comme antiprotozoaire</p>	<p>Inhibition de l'étape d'entrée</p>	<p>Vomissement, troubles cardiaques</p>
	<p>Lycorine</p> <p>Extrait de la racine de <i>Lycorice radiata</i></p>	<p>Inhibition de l'ARN polymérase ARN dépendante</p>	<p>Inhibiteur de la synthèse d'actine, peut provoquer l'apoptose cellulaire</p>
	<p>Cryptotanshinone</p> <p>extraite de <i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i></p>	<p>Inhibition de la protéase cellulaire TMPRSS2</p>	<p>ND</p>
	<p>Curcumine pigment</p> <p>du <i>curcuma longa</i></p>	<p>Propriété anti- inflammatoire</p>	<p>Non observé à la dose prescrite</p>

	<p>Resvératrol</p> <p>Extraite du raisin et mûre</p>	<p>Propriété anti- inflammatoire</p>	<p>ND</p>
	<p>Silvestrol</p> <p>extrait de l'<i>Aglaia silvestris</i></p>	<p>Inhibiteur de l'eIF4A utilisé lors de la traduction de certains ARN messagers</p>	<p>ND</p>
	<p>Glycyrrhizine</p> <p>extrait de la réglisse</p>	<p>Anti-inflammatoire et immunomodulateur</p>	<p>ND</p>

B - Publication

1 A photoactivable natural product with broad antiviral activity against enveloped
2 viruses including highly pathogenic coronaviruses

3

4

5

6 Thomas Meunier^{†1}, Lowiese Desmarets^{†1}, Simon Bordage^{†2}, Moussa Bamba^{2,3}, Kévin
7 Hervouet¹, Yves Rouillé¹, Nathan François¹, Marion Decossas⁴, Valentin Sencio¹, François
8 Trottein¹, Fézan Honora Tra Bi³, Olivier Lambert⁴, Jean Dubuisson¹, Sandrine Belouard¹,
9 Sevser Sahpaz^{2‡}, and Karin Séron^{1‡*}

10

11 ¹ Univ Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-
12 Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.

13

14 ²Univ Lille, Université de Liège, Université de Picardie Jules Verne, JUNIA, UMRT 1158
15 BioEcoAgro, Métabolites spécialisés d'origine végétale, F-59000 Lille, France.

16

17 ³ UFR Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

18

19 ⁴Univ Bordeaux, CBMN UMR 5248, Bordeaux INP, F-33600 Pessac, France.

20

21 * corresponding author

22 E-mail: karin.seron@ibl.cnrs.fr

23

24 † These authors contributed equally to this work

25 ‡ These authors also contributed equally to this work

26

27

28 **Abstract**

29 The SARS-CoV-2 outbreak has highlighted the need for broad-spectrum antivirals against
30 coronaviruses (CoVs). Here, pheophorbide a (Pba) was identified as a highly active antiviral
31 molecule against HCoV-229E after bioguided fractionation of plant extracts. The antiviral
32 activity of Pba was subsequently shown for SARS-CoV-2 and MERS-CoV, and its mechanism of
33 action was further assessed, showing that Pba is an inhibitor of coronavirus entry by directly
34 targeting the viral particle. Interestingly, the antiviral activity of Pba depends on light exposure,
35 and Pba was shown to inhibit virus-cell fusion by stiffening the viral membrane as demonstrated
36 by cryo-electron microscopy. Moreover, Pba was shown to be broadly active against several
37 other enveloped viruses, and reduced SARS-CoV-2 and MERS-CoV replication in primary
38 human bronchial epithelial cells. Pba is the first described natural antiviral against SARS-CoV-2
39 with direct photosensitive virucidal activity that holds potential for COVID-19 therapy or
40 disinfection of SARS-CoV-2 contaminated surfaces.

41

42

43 **Introduction**

44 The COVID-19 pandemic has highlighted the lack of specific antiviral compounds available
45 against coronaviruses (CoVs). COVID-19 is caused by the severe acute respiratory syndrome
46 coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the third identified human CoV causing severe pneumonia (1–3).
47 Before 2003, coronaviruses were known to cause severe diseases in animals, but human CoVs,
48 such as HCoV-229E and OC-43, were mainly associated with common colds, and only rarely
49 with severe outcomes (4). The severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)
50 outbreak in 2003 was the first emergence of a highly pathogenic human CoV. The second highly
51 pathogenic coronavirus, identified in 2012 in Saudi Arabia, is the Middle-East respiratory
52 syndrome coronavirus (MERS-CoV), which is still endemically present up to date. SARS-CoV-2
53 is highly related to SARS-CoV (5). The tremendous efforts of the scientific community
54 worldwide to counteract the COVID-19 pandemic have rapidly led to the development of highly
55 efficient vaccines that are now administered worldwide. Unfortunately, the emergence of SARS-
56 CoV-2 variants in different regions of the world might render the vaccines less efficient and may
57 necessitate a booster vaccination every year which might not be achievable for billions of human
58 beings in all parts of the world. Therefore, to get rid of this pandemic and face future epidemics,
59 it is assumed that not only vaccination is necessary but also the availability of efficient antiviral
60 treatments. Before the emergence of SARS-CoV-2, no specific antiviral was commercially
61 available for treatment of CoV infections. Due to the urgent need for antivirals against SARS-
62 CoV-2, many researchers have focused their investigations on repurposing available drugs.
63 Unfortunately, until now, none of them has been able to significantly reduce severe outcomes in
64 patients. High content screening *in vitro* of approved drugs identified some potential interesting
65 antiviral molecules that have still to be tested in clinic on patients with COVID-19 (6–8).
66 Protease and polymerase inhibitors are also widely investigated in *in vitro* studies (9). Recently,
67 White *et al.* identified plitidepsin, an inhibitor of the host protein eEF1A as a potential antiviral

68 agent for SARS-CoV-2 (10). To date, only synthetic neutralizing monoclonal antibodies have
69 been approved for emergency usage in newly infected patients.

70 Coronavirus are members of the *Coronaviridae* family within the order *Nidovirales*. CoVs are
71 enveloped viruses with a positive single-stranded RNA genome of around 30 kb. The genome
72 encodes 4 structural proteins, the nucleocapsid (N), the spike (S), the envelope (E), and the
73 membrane (M) proteins. The S protein is important for the interaction of the viral particle with
74 the cellular host receptor, being angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) for SARS-CoVs (11,
75 12), dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) for MERS-CoV (13) and aminopeptidase N (APN) for HCoV-
76 229E (14). Once attached, the virus releases its genome into the cytosol by fusion of the viral
77 envelope with a host membrane. This fusion process is mediated by the S protein, a class I fusion
78 protein, and can occur either at the plasma- or at the endosomal membrane. Viral class I fusion
79 proteins are typically synthesized as inactive precursor proteins and require proteolytical
80 activation by cellular proteases to acquire their fusion competent state. The host-cell protease
81 TMPRSS2 has been shown to be necessary for plasma membrane fusion of many coronaviruses
82 including SARS-CoV-2 (12, 15, 16), whereas cathepsins are often involved in fusion processes at
83 endosomal membranes (17).

84 It is estimated that about 80% of the global population rely on traditional medicine to treat
85 infectious diseases. Plants are a natural source of compounds with a structural diversity that is
86 much higher than those obtained by chemical synthesis. Many of these compounds have proven
87 their antiviral activity *in vitro*. To date, some reports describe the antiviral activity of natural
88 compounds on coronavirus including SARS-CoV-2, but many of them are *in silico* analyses
89 without any *in vitro* or *in vivo* evidence (18, 19).

90 Here we show that pheophorbide a (Pba) isolated from *Mallotus oppositifolius* (Geiseler)
91 Müll.Arg. (Mo, *Euphorbiaceae*) leave crude extract after bioguided fractionation has antiviral
92 activity against various CoVs, including HCoV-229E, MERS-CoV and SARS-CoV-2, but also

93 against other enveloped viruses, such as yellow fever virus (YFV), hepatitis C virus (HCV) and
94 Sindbis virus (SINV). Moreover, we demonstrate that Pba is an antiviral photosensitizer directly
95 acting on the viral particle, thereby impairing the virus-cell fusion step.

96

97 **Results**

98 **Pheophorbide a (Pba) isolated from the crude methanolic extract from *Mallotus*** 99 ***oppositifolius* (Geiseler) Müll.Arg. is highly active against HCoV-229E**

100 Fifteen plants methanolic extracts from the Ivorian pharmacopeia, which were initially screened
101 for their anti-HCV activity (Bamba *et al.*, submitted), were tested against HCoV-229E-Luc, a
102 luciferase recombinant version of HCoV-229E, which allows for a rapid and easy screening of
103 diverse molecules *in vitro*. Seven of the fifteen extracts significantly reduced HCoV-229E
104 infection (Figure 1A), whereas none of the extracts showed cytotoxicity in Huh-7 cells at the
105 tested concentrations (Bamba *et al.*, submitted). The *Mallotus oppositifolius* (Mo) crude extract
106 was the most active and therefore selected for further analyses. A bioguided fractionation was
107 performed to find out the active compound(s) in this plant. This revealed that the methylene
108 chloride (MC) partition was the most active on HCoV-229E (Figure 1B) and was therefore
109 chosen for fractionation by centrifugal partition chromatography (CPC), leading to 10 fractions
110 (F1-F10). Among these fractions, F7 was the most active and subjected to further fractionation by
111 preparative high performance liquid chromatography (HPLC), leading to 9 subfractions (F7.1-
112 F7.9). F7.7 was the most active of them and seemed to contain only one molecule. This dark
113 green product was analysed by LC-UV-MS, which revealed only one peak ($m+H = 593,3$) with
114 two maxima of absorption in the visible light (409 and 663 nm). This information was used for a
115 Dictionary of Natural Product search (<https://dnp.chemnetbase.com/>), indicating that this
116 molecule could be pheophorbide a (Pba). F7.7 purity and chemical structure was further
117 confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR)(data not shown).

118 To confirm that Pba was the active compound of the Mo extract, a dose-response experiment was
119 performed with both the pure compound isolated in F7.7 and commercial Pba against HCoV-
120 229E-Luc in Huh-7 cells. As shown in Figure 1C, IC_{50} values were comparable for both natural
121 and commercial Pba (0.51 μ M and 0.54 μ M, respectively), confirming that Pba was indeed the
122 active substance of Mo.

123

124 **Pba is active against several human CoVs at non-cytotoxic concentrations**

125 Prior to the assessment of its broad-spectrum activity against various CoVs, the cytotoxicity of
126 Pba was determined in different cells lines. As Pba is known to be a photosensitizer it was
127 assumed that light could affect its toxicity. MTS assays were performed in similar conditions
128 than the infection procedures. Cells were incubated with Pba at different concentrations and taken
129 out of the incubator after 1 h to change the medium and left for 10 min under light exposure in
130 the biosafety cabinet (BSC), after which they were replaced in the incubator for 23 h. In parallel,
131 plates were kept for 24 h in the dark. Pba did not exhibit any toxicity at concentrations up to
132 120 μ M when left in the incubator for 24 h without light exposure, whereas it showed some
133 toxicity when the cells were shortly exposed to light, with CC_{50} values of 4.4 ± 1.2 μ M, 5.8 ± 1.9
134 μ M and 5.5 ± 2.0 μ M for Huh-7, Vero-E6 cells, and Vero-81, respectively (Figure 2 and Figure S1).
135 Taken together, these results show that the cytotoxicity of Pba in cell culture depends on light
136 exposure.

137 The antiviral activity of Pba was tested on different human CoVs. It was first confirmed on
138 HCoV-229E by measuring infectious titers (Figure 2) with an IC_{50} value of 0.1 μ M, resulting in a
139 selectivity index of 44. Similarly, infection inhibition assays were performed with various non-
140 cytotoxic concentrations of Pba against SARS-CoV-2 and MERS-CoV. As shown in Figure 2,
141 Pba had a strong antiviral effect against both highly pathogenic coronaviruses at non-toxic

142 concentrations, with IC₅₀ values of 0.18 μM for both SARS-CoV-2 and MERS-CoV, resulting in
143 a selectivity index of 32 and 24, respectively.

144

145 **Pba is an inhibitor of coronavirus entry by direct action on the particle**

146 Coronaviruses fusion is triggered by proteolytic cleavage of the spike protein. Depending on
147 cellular proteases available, fusion can occur after endocytosis of the virus or directly at the cell
148 surface. It has been demonstrated that HCoV-229E and SARS-CoV-2 fusion at the plasma
149 membrane depends on the expression of the TMPRSS2 protease (12, 20), and for many
150 coronaviruses the entry via fusion at the plasma membrane has been shown to be the most
151 relevant pathway *in vivo* (21). To determine if Pba was able to inhibit both entry pathways, its
152 antiviral activity was tested in Huh-7, and Huh-7-TMPRSS2 cells, the latter being obtained after
153 transduction with a TMPRSS2 lentiviral expression vector. Two inhibitors of the entry pathway
154 were used as a control, E64D as inhibitor of the endocytic pathway and Camostat as inhibitor of
155 the TMPRSS2 protease. As shown in Figure S2, E64D specifically inhibited HCoV-229E
156 infection in Huh-7 cells whereas Camostat inhibited infection in Huh-7-TMPRSS2 cells.
157 Complete inhibition of infection was observed when a combination of the two inhibitors was
158 used, showing that both entry pathways can be used *in vitro*. No difference in antiviral activity of
159 Pba against HCoV-229E infection was observed in the presence or absence of TMPRSS2 (Figure
160 3A). Similar results were obtained with SARS-CoV-2 in Vero cells (our unpublished
161 observation). These results show that Pba exhibits antiviral activity whatever the entry pathway
162 used.

163 To gain insights into the mechanism of action of Pba, a time-of-addition assay with Pba was
164 performed during HCoV-229E or SARS-CoV-2 infection. Therefore, Pba was added at different
165 time points before, during or after inoculation. All experiments were performed under BSC's
166 light exposure. For both viruses, no inhibition of infection was observed when Pba was added to

167 the cells before inoculation (pre-treatment of the cells), whereas a strong inhibition of infection
168 was noticed when Pba was present during the virus inoculation step (Figure 3B and 3C). When
169 Pba was added only after inoculation, its inhibitory effect rapidly dropped and normal levels of
170 infectivity were observed again when Pba was added more than 2 h after inoculation.
171 Chloroquine is a well-known inhibitor of SARS-CoV-2 replication *in vitro*, as it inhibits virus-
172 cell fusion after endocytosis by preventing endosomal acidification. As shown in Figure 3C, the
173 Pba and chloroquine inhibition curves were rather similar, showing that Pba could inhibit virus
174 entry. It is worth noting that normal levels of infectivity were observed when Pba was added
175 more than 2 h after inoculation, whereas chloroquine-treated cells remained at around 60% of
176 normal levels which may be due to inhibition of the second round of entry since our experimental
177 conditions are compatible with reinfection. Taken together, these results suggest that Pba is
178 inhibiting virus entry.

179 Since no antiviral activity was observed with cells treated with Pba prior to inoculation, we
180 wondered whether Pba targets the virus instead of the cells. To test this hypothesis, HCoV-229E-
181 Luc was pre-incubated for 30 min at a concentration 10 times higher than that used during
182 inoculation. For this experiment, HCoV-229E-Luc was pre-incubated with Pba at 2 μ M for 30
183 min, then diluted to reach a concentration of Pba of 0.2 μ M for inoculation, a concentration
184 which does not severely impact HCoV-229E-Luc infection as shown above. In parallel, cells
185 were directly inoculated with HCoV-229E-Luc at 0.2 and 2 μ M as a control. The results clearly
186 show that when HCoV-229E-Luc was pre-treated with Pba at high concentration (2 μ M) before
187 inoculation at low concentration (0.2 μ M), the antiviral activity was much stronger than when
188 inoculation was performed in the presence of 0.2 μ M Pba without any pre-treatment (Figure 3D).
189 Taken together, these results indicate that Pba inhibits HCoV entry by a direct effect on the viral
190 particle.

191

192 **Pba is an inhibitor of viral fusion**

193 Virus entry can be divided into two different steps, firstly the viral attachment to the cell surface,
194 and secondly the fusion of the virus envelope with cellular membranes. To further define the
195 mode of action of Pba, experiments were performed with HCoV-229E, which can be manipulated
196 in a lower containment facility. To determine a potential effect at the attachment step, Huh-7-
197 TMPRSS2 cells were incubated with HCoV-229E in the presence or absence of Pba at 4°C for 1
198 h. These conditions block endocytosis but allow virus attachment to the cell surface. Cells were
199 rinsed with PBS and the amount of virions attached to the surface was determined by
200 quantification of viral genomes by qRT-PCR. As shown in Figure 4A, only a slight and non-
201 significant decrease in RNA levels was observed in the presence of Pba, indicating that Pba
202 barely affect virus attachment. The action of Pba on the fusion step was investigated in virus-cell
203 fusion assay by using trypsin as an exogenous protease to induce coronavirus membrane fusion at
204 the plasma membrane (22, 23). Huh-7 cells were treated with NH₄Cl to inhibit fusion in the
205 endocytic pathway and viruses were bound at the cell surface at 4°C. Then, fusion was induced
206 by a short trypsin treatment at 37°C. Entry at the cell surface was more efficient in presence of
207 trypsin compared to the control (Figure 4B), which is consistent with other reports (22, 23). In
208 addition, Pba at both 0.5 and 1 μM strongly inhibited infection levels in trypsin-mediated fusion
209 conditions in a similar range compared to the inhibition seen with the control. Taken together,
210 these results indicate that Pba inhibits entry at the fusion step and not by preventing attachment.
211 Two viral structures are involved in the virus-cell fusion, namely the spike protein and the viral
212 membrane itself. To find out if Pba targets the spike, a cell-cell fusion assay was performed. For
213 this, the SARS-CoV-2 spike protein was transiently expressed by plasmid transfection in Vero-81
214 cells. At 6 h post-transfection, the medium was replaced with medium containing either DMSO
215 or 1 μM Pba until 24 h p.t.. As shown in Figure 4C, spike induced cell-cell fusion (apparent as
216 syncytium formation) occurred equally well in control (DMSO)- and Pba-treated conditions,

217 indicating that Pba cannot prevent cell-cell fusion induced by the viral spike protein. Taken
218 together these results are not in favour of an effect of Pba on the viral spike fusion protein.

219

220 **The antiviral activity of Pba is increased upon light exposure and targets the viral**
221 **membrane**

222 Given that Pba is photoactivable, we wondered whether its antiviral effect is light-dependent. We
223 therefore inoculated Huh-7 cells with HCoV-229E in the presence of Pba under different light
224 exposure conditions. As shown in Figure S3, the antiviral activity of Pba increased upon light
225 exposure. However, even in the dark, antiviral activity was observed at 10 μ M. A typical feature
226 of photosensitizers is that the concentration required for its biological properties decreases upon
227 increase of time of exposure to the light. To see whether Pba behaves as other photosensitizers,
228 HCoV-229E was pre-incubated with Pba at various concentrations (0.02, 0.2 and 2 μ M) and
229 exposed to the normal white light of the laminar flow cabinet for different durations (ranging
230 from 5 to 80 min). It is important to note that light alone was not responsible of the antiviral
231 activity because there was no antiviral effect after a long exposure time (80 min) with Pba at
232 inactive concentration (0.02 μ M). As shown in Figure 5A, results clearly showed that with a
233 same concentration of Pba, increased inhibitory effect could be observed with longer light
234 exposure times. Similar results were observed with SARS-CoV-2 (Figure 5B). Together, these
235 data indicate that the anti-coronavirus properties of Pba depend on its dynamic photoactivation.

236 Photodynamic inactivation (PDI) of microorganisms typically results from the onset of reactive
237 oxygen species (ROS), including free radicals or singlet oxygen species ($^1\text{O}_2$), generated when
238 the light-activated photosensitizer falls back to its ground state, thereby transferring its energy to
239 molecular oxygen (resulting in the onset of $^1\text{O}_2$) or initiating photochemical reactions with ROS
240 generation. Two mechanisms of activation have been described, either type I reactions in which
241 the photosensitizer activates a substrate that generates reactive oxygen species (ROS), or type II

242 reactions in which the photosensitizer directly generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). Subsequently,
243 these species can damage various micro-organism structures, such as nucleic acids, proteins or
244 lipids (24, 25). To determine if the antiviral activity of Pba also depends on ROS or $^1\text{O}_2$
245 generation, infection was performed in the presence of quenchers that are able to trap these
246 generated oxygen species. Two $^1\text{O}_2$ quenchers were used, a water-soluble analogue of vitamin E,
247 Trolox, and NaN_3 (Figure 5C). HCoV-229E was mixed with the quenchers Trolox and NaN_3 both
248 at 10 mM, and Pba was added at the inoculation step. Then the cells were rinsed and fresh culture
249 medium was added for 6 h. The results clearly showed that both Trolox and NaN_3 were able to
250 reduce the action of Pba (Figure 5C), indicating that the antiviral activity of Pba is mediated by
251 the generation of $^1\text{O}_2$ after photoactivation.

252 Vigant *et al.* clearly demonstrated that the generation of $^1\text{O}_2$ by the lipophilic photosensitiser
253 LJ001 induces the phosphorylation of unsaturated phospholipid of viral membranes, and changes
254 the biophysical properties of viral membranes, thereby affecting membrane fluidity and/or
255 increasing rigidity (24). As a result, the change of fluidity and/or rigidity of the viral membrane
256 impairs its ability to undergo virus-cell fusion. We therefore wondered whether a similar action
257 of the photosensitizer on the lipids of the viral envelope might also explain our observation that
258 Pba is able to inhibit HCoV-229E fusion by targeting the viral particle. We hypothesized that the
259 Pba-induced membrane rigidity may render the virus less sensitive to a shrinkage effect induced
260 by an osmotic stress. Therefore, HCoV-229E was incubated with Pba either in the dark or under
261 light exposure for 30 min, and subjected to osmotic shock with 400 mM NaCl before fixation
262 with 4% PFA. Fixed viral particles were visualized by cryo-electron microscopy (CryoEM). As
263 shown in Figure 6, intact virions with their characteristic spikes at the surface can be observed in
264 untreated conditions (control). The addition of Pba either in the dark or under light condition did
265 not affect the overall morphology of virions in normal medium conditions. Interestingly, when
266 intact virions were subjected to an osmotic stress by increasing NaCl concentration from 100 mM

267 to a final concentration of 400 mM, the virions shape was altered due to a shrinkage of the viral
268 membrane. When virions incubated with Pba in the dark were subjected to osmotic shock, similar
269 alteration of viral shape was observed. However, in the presence of Pba and under light
270 condition, no membrane deformation was observed suggesting that the virus was more resistant
271 to osmotic shock. These results clearly show that light-activated Pba modify the mechanical
272 properties of the viral envelope by increasing its stiffness. This Pba-induced increase in the
273 envelope rigidity likely prevents the membrane deformation needed to undergo virus-cell fusion.
274 Knowing that there might be an effect of the light, the spike-induced cell-cell fusion assay as
275 shown in Figure 4C was repeated with short light exposure of the spike-transfected cells every 2
276 h after addition of Pba. Even with regular exposure to the light, no effect of Pba was seen on the
277 spike-mediated cell-cell fusion (data not shown), further excluding that Pba additionally targets
278 the spike protein.

279

280

281 **Pba is a broad-spectrum antiviral that targets viral membranes of several enveloped viruses**

282 In contrast to viral proteins, viral membranes are derived from the host cell and hence are not
283 virus specific. This suggests that Pba might have broader antiviral activity against enveloped
284 viruses. Indeed, antiviral activities against other viruses have already been reported for Pba or
285 related molecules. These include HCV, HIV (Human immunodeficiency virus), and IAV
286 (Influenza A virus) (26–28). To confirm the broad-spectrum activity of Pba, its antiviral activity
287 was tested on pseudotyped viral particles with envelope proteins of VSV (vesicular stomatitis
288 virus), HCV, SARS-CoV-2, and MERS-CoV. Pseudoparticles were pre-treated with 0.5, 1 or 2
289 μ M Pba and exposed or not to the light for 30 min prior to inoculation. The results clearly
290 showed that Pba inhibited pseudoparticle infection regardless of the nature of the viral envelope
291 protein, but only under light conditions (Figure 7A). Next, the antiviral activity of Pba was tested

292 for coxsackievirus (CVB4, non-enveloped), Sindbis virus (SINV, enveloped), hepatitis C virus
293 (HCV, enveloped), and yellow fever virus (YFV, enveloped). Whereas Pba was not active on the
294 non-enveloped virus CVB4, it showed a clear antiviral effect against the 3 enveloped viruses
295 HCV, YFV and SINV (Figure 7B). Taken together, these results confirm the light-dependent
296 activity of Pba on enveloped viruses and suggest that the lipid membrane is the most likely target
297 of the compound.

298

299 **Other chlorophyll-derived products and photosensitizers possess a light-dependent anti-** 300 **coronaviral activity**

301 Pba is a break-down product of chlorophyll. Chlorophyll is metabolized into different compounds
302 including Pba, pyropheophorbide a (pyroPba), and chlorin e6. We wondered if these products
303 would also have antiviral activity. Furthermore, we selected nine porphyrins or
304 metalloporphyrins structurally related to Pba (N-methyl protoporphyrin IX, N-methyl
305 mesoporphyrin IX, Zn-protoporphyrin IX, tin-mesoporphyrin IX, temoporfin, phthalocyanine,
306 hemin chloride, HPPH, and 5,15-DPP), and one photosensitizer without related structure (Rose
307 Bengale) to determine if similar antiviral activity against coronaviruses could be identified. The
308 toxicity and antiviral activity of these compounds were investigated (Figure S4). Chlorophyll b,
309 phthalocyanine and 5,15-DPP were not active at the tested concentrations. Three molecules,
310 hemin chloride, temoporfin and Rose Bengale had a moderate antiviral activity. The antiviral
311 activity of the six most active compounds was tested both under normal white light conditions
312 and in the dark, clearly showing that, similar to Pba, the antiviral activity of most molecules
313 tested was also light-dependent (Figure S3). Interestingly, N-methyl protoporphyrin IX and N-
314 methyl mesoporphyrin IX showed an antiviral activity in dark conditions, but much lower than
315 under light exposure. PyroPba was toxic at tested concentrations, thus dose-response experiments
316 with lower concentrations were performed to determine precise CC_{50} and IC_{50} . This was also

317 done for all the active compounds. The CC_{50} and IC_{50} of the different compounds were compared
 318 and only pyroPba was more active against HCoV-229E than Pba (Table 1) with an IC_{50} of 0.35
 319 μ M. However, this compound is also more toxic with a CC_{50} of 2.67 μ M and a selective index of
 320 7.6. Thus, our results show that porphyrin-related compounds have antiviral activity against
 321 HCoV-229E but that Pba and pyroPba are the most active under normal white light exposure.

322

323 **Table 1. Inhibitory and cytotoxic concentrations, and selective index of photosensitizers**
 324 **against HCoV-229E**

325

Molecules	IC_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M) 24 h	SI
Pba	0.54	6.08	11.2
PyroPba	0.35	2.67	7.6
Chlorin e6	0.72	21.4	29.7
HPPH	1.14	8.13	7.1
N-methyl protoporphyrin IX	1.21	ND > 80	>66.1
N-methyl mesoporphyrin IX	1.25	ND > 80	>64
Zn protoporphyrin IX	0.79	16.64	21.0
Rose Bengale	2.86	ND > 80	27.9

326

327

328 **Pba reduces SARS-CoV-2 and MERS-CoV replication in human primary airway epithelial**
 329 **cells**

330 As shown above, Pba is able to inhibit SARS-CoV-2 and MERS-CoV infection under white light
 331 exposure in cell culture. To determine if Pba could be used *in vivo*, its antiviral activity was tested
 332 in a preclinical model, the human primary airway epithelial cells. These cells, MucilairTM, are
 333 primary bronchial epithelial cells reconstituted in a 3D structure to mimic bronchial epithelium
 334 with an air-liquid interface. MucilairTM cells were inoculated with SARS-CoV-2 or MERS-CoV
 335 in the presence of Pba at 0.25 or 2.5 μ M. Remdesivir at 5 μ M was used as a positive control. At
 336 72 h post-inoculation, viral titers were determined and viral RNA levels were quantified. Viral
 337 RNA levels of SARS-CoV-2 and MERS-CoV were significantly decreased in cells in the

338 presence of Pba at 0.25 and 2.5 μM , respectively (Figure 8A). Similarly, viral titers of both
339 viruses were decreased of more than 1xLog10 in the presence of Pba at 2.5 μM (Figure 8B). In
340 parallel, the toxicity of Pba was measured in MucilairTM by measuring lactate deshydrogenase
341 (LDH) secretion and trans-epithelial electrical resistance. Cells were incubated with the molecule
342 in the same condition as the infection assay. Cells treated with lysis buffer were used as a control.
343 No toxicity was observed up to 72h in the cells treated with Pba compared to the control (Figure
344 8C and 8D). In cells treated with lysis buffer, no LDH secretion was observed at 48h and 72h
345 because the cells were dead. Taken together, these results confirm the antiviral activity of Pba
346 against highly pathogenic human CoVs and its potential activity *in vivo*.

347

348 **Discussion**

349 By screening plant extracts for their antiviral activity against coronaviruses, the present study
350 identified Pba as the active antiviral compound in the crude methanol extract from
351 *M. opositifolius* after bioguided fractionation. It was demonstrated that Pba is active against
352 various human CoVs, including SARS-CoV-2, HCoV-229E and MERS-CoV, as well as other
353 enveloped viruses, including HCV, SINV and YFV, and various pseudotyped particles.
354 Furthermore, we characterized Pba as a broad-spectrum antiviral photosensitizer causing PDI of
355 all tested enveloped viruses by production of singlet oxygen species that most probably increase
356 the rigidity of the lipid bilayer of the viral envelope.

357 Pba is a product of chlorophyll breakdown which is abundantly present in various plants (such as
358 spinach) and marine algae. In general, the chlorophyll content in plants may vary and depends on
359 the season, the part of the plant, the maturity of the organs and many other factors (29, 30).
360 Chlorophyll is degraded into Pba by chlorophyllase and some plants with high chlorophyllase
361 content may contain more Pba (31, 32). Pba is well documented for its potential as anti-cancer

362 agent in photodynamic therapy (PDT). It is known to have a low toxicity, to selectively
363 accumulate in tumours and to have a high adsorption at 665 nm (33, 34).

364 For many years, photosensitizers have mainly been used as antitumor therapy, for which many
365 photosensitizers have already been proven to be clinically safe and some are currently approved
366 for use in humans (35). Although reports on the PDI of viruses go back to 1960, where it was
367 shown that some photosensitive dyes, such as methylene blue, had an antiviral effect, it is only in
368 the last decades that photosensitizers have gained considerable interest as antimicrobial (bacteria,
369 fungi, and viruses) agents, due to their strong antimicrobial effects and low toxicity in normal
370 tissue (36, 37). A major advantage of those molecules is that, due to their direct damaging effect
371 on the micro-organism, they are insensitive to the onset of resistance of the microorganism
372 against the compound, the latter being a major problem in today's research on antivirals and
373 antibiotics. With the present study, we add Pba to the list of photosensitizers with considerable
374 antiviral effects, at least against enveloped viruses. This antiviral effect is not new, since the
375 antiviral activity of Pba has already been demonstrated before against several enveloped viruses,
376 including HCV, Influenza A, herpes simplex-2 virus, and HIV-1 (26–28). Zhang et al (28) also
377 showed a direct action on the viral particle, which is in line with our results. In our study, we
378 show that the coronavirus' envelope remains intact after treatment with Pba up to 10 μ M for 30
379 min in the light, that Pba treatment does not affect attachment, but that the virus-cell fusion is
380 impaired probably due to the rigidification of the virus membrane upon light exposure. In
381 addition, there seemed to be a slight antiviral effect at high concentrations (more than 10 μ M)
382 even in dark conditions. In contrast to our results, some papers show that Pba has a virucidal
383 activity by damaging the virus envelope, thereby inhibiting attachment (28). For HCV and HIV-
384 1, Pba and chlorophyll a derivatives were applied after virus infection and were shown to act on
385 replication corresponding to a mode of action different than the one reported in our study.
386 Furthermore, none of those reports showed a mechanism of action dependent on light exposure,

387 and hence did not show that the antiviral effect is mediated by PDI of the particle. It is important
388 to note that under usual experimental conditions, cell cultures were not protected from light, thus
389 is likely that the vast majority of the reports on antiviral activity of Pba were performed under
390 light exposure. Due to the lack of control conditions in the dark or information on the time of
391 (unnoticed) light exposure in the above mentioned reports on Pba, it is very hard to compare our
392 data with the literature at this moment. More in depth studies will be needed to understand and
393 compare the action of Pba on different viruses, in both light and dark conditions.

394 It is interesting to note that Pba (or highly related compounds such as pyroPba) has been isolated
395 from different plant species and different organisms including marine algae (38), rendering Pba a
396 very attractive antiviral due to its high availability. Moreover, it has been postulated that Pba can
397 transport a metal ion like zinc inside the cell and that zinc can inhibit viral replication (39) which
398 might be another advantage to use these molecules as antivirals. In our study, it was confirmed
399 that neither natural nor commercial Pba used in our experiments contained a metal ion, so future
400 studies should be performed with zinc Pba to demonstrate this hypothesis.

401 Here, we show that Pba inhibits virus-cell fusion, probably by targeting and photodynamically
402 damaging the viral membrane. With the help of cryo-EM, we demonstrated that the treatment of
403 virions with Pba and exposed to the light did not affect their shape despite an osmotic shock. This
404 is an indirect demonstration of an increased rigidity of the viral envelope upon Pba treatment.
405 This feature was already demonstrated using a biophysical approach with lipophilic
406 photosensitizers with antiviral activity (24, 40). It was postulated that the increased rigidity
407 impairs membrane bending required for viral fusion (41). Contrary to the cell membrane, the
408 viral envelope is not able to undergo regeneration, which renders the PDI virus specific and
409 insensitive to the onset of resistance. Very recently, Tummino *et al.* suggested that many
410 repurposed drugs targeted as SARS-CoV-2 antivirals are cationic amphiphilic drugs (CAD),

411 which induce phospholipolysis (42). CAD are host target antivirals that have an action on cell
412 phospholipids, provoke phospholipidosis and disrupt double membrane vesicles necessary for
413 viral replication. The mechanism of action of the CAD is different from the one of Pba. Pba is a
414 virus target antiviral, and it was never reported to have a phospholipidosis activity. Pba most
415 probably induces an oxidation of the viral envelope phospholipids and, as it was shown by
416 cryoEM in our study, does not induce phospholipidosis.

417

418 In the present study, several other compounds structurally related to Pba and to other known
419 photosensitizers were also screened for their anti-coronavirus activity in order to find out whether
420 other compounds would have a more potent effect. Several of those compounds, including
421 pyroPba, chlorin e6, or HPPH, N-methyl protoporphyrin IX, N-methyl mesoporphyrin IX, and
422 Zn-protoporphyrin IX had a light-dependent antiviral effect, but only pyroPba turned out to be
423 more active than Pba. However, pyroPba was also more toxic, and hence the final selectivity
424 index was not higher than that of Pba. Several chlorophyll derivatives like pyroPba and pheophytin
425 a have already been demonstrated to be active against IAV, herpes simplex-2 virus, HCV, RSV
426 (respiratory syncytial virus), and SARS-CoV-2 (26, 27, 43). The authors studied the mechanism
427 of action of pyroPba against IAV and showed that the molecule targets the membrane of the virus
428 and not the surface glycoproteins, a mechanism which is consistent with the one that we observed
429 for Pba in our study. A requirement for photo-activation of pyroPba was not investigated nor
430 mentioned by Chen *et al.* (43). Chlorophyllides, chlorophyll precursors, are another class of
431 chlorophyll derivatives that have been shown to have antiviral activity against several viruses
432 including hepatitis B virus (44–46). Other porphyrins have already been described for their
433 antiviral activity (25, 47). Interestingly, three photosensitizers which have been shown to be
434 active against VSV, including N-methyl protoporphyrin IX, N-methyl mesoporphyrin IX, and
435 Zn-protoporphyrin IX, were also identified in our screen (48). The authors clearly demonstrated

436 that these compounds inactivated VSV after photoactivation via singlet oxygen release. We did
437 not demonstrate the mechanism of action of these three molecules against HCoV-229E but we
438 also demonstrated that they are active after photoactivation. Very recently, protoporphyrin IX and
439 verteporfin were identified as inhibitors of SARS-CoV-2 (49, 50). Both studies showed that
440 protoporphyrin IX is active at an early step of infection, probably the entry step. Gu *et al.*
441 postulated that the interaction of the compounds with ACE2 might impair the interaction of the
442 virus with its receptor (49). Lu *et al.* showed that protoporphyrin IX is active against several
443 enveloped viruses but that the activity of protoporphyrin IX against IAV is not dependent on light
444 activation (50). Chlorin e6 is one of the most active compounds against HCoV-229E identified in
445 this study. The antiviral activity of chlorin e6 against enveloped viruses such as HBV (Hepatitis
446 B virus), HCV, HIV, DENV (dengue virus), MARV (Marburg virus), TCRV (tatarib virus) and
447 JUNV (Junin virus) has been already demonstrated (46). Interestingly the authors also showed
448 that the molecule is inactive against non-enveloped viruses, suggesting that it targets the viral
449 envelope.

450 As mentioned above, many other photosensitizers have been studied for their antiviral activity
451 (25, 41), and for some of them, the PDI was clearly demonstrated as the mechanism of action (41,
452 51). In light of the current SARS-CoV-2 pandemic, photosensitizers have received renewed
453 attention as antiviral strategies to face this pandemic, and the use of those substances for the
454 treatment of COVID-19 or the inactivation of SARS-CoV-2 on surfaces or in water has been
455 postulated (52, 53). Pba might have some advantages above the already described
456 photosensitizers, as it is a highly available natural product and active under normal light
457 conditions. Importantly, it does not require a very specific wavelength-dependent illumination
458 treatment, at least not when applied on surfaces/mucosae exposed to the environmental light, with
459 an absorption at 667 nm. However, the light-dependency of such molecules might render their
460 application as therapeutic agents for internal organs (such as lungs for SARS-CoV-2) more

461 challenging. Indeed, additional illumination will make its application as real therapy more
462 complex, though not impossible because PDT is already used for the treatment of lung cancer
463 (54). Efforts should be made for the development of specific device allowing PDT for COVID
464 patients. Nonetheless, we believe that broad-spectrum, low-toxic, non-resistance inducing
465 molecules such as Pba can certainly prove their value to reduce environment-to-person and
466 person-to-person transmission of microorganisms when applied as e.g a spray for
467 decontamination of surfaces or when formulated for topical application in nose and mouth. Very
468 recently, a study describing such topical application of synthetic SARS-CoV-2 fusion inhibitor
469 has demonstrated that the topical treatment of upper respiratory tract infections might prove its
470 value in reducing virus transmission, particularly in cases where many people gather (55). In
471 contrast to the SARS-CoV-2 fusion inhibitor described by de Vries *et al.* (55), Pba is a widely
472 commercially available natural molecule with broad-spectrum activity against many enveloped
473 viruses. Therefore, one should explore whether it can exert similar effects upon topical
474 administration to the nose or oral cavity. If so, Pba might help to make people less susceptible to
475 and/or less contagious upon upper respiratory infections with enveloped viruses, many of them
476 causing seasonal outbreaks of respiratory disease such as common colds and flu.

477 Given that 1) onset of resistance to this product is very unlikely, 2) the activity of the compound
478 is not dependent of envelope variants, 3) coronaviruses and other enveloped viruses can cause
479 major problems in animals and 4) there is a potential risk for virus transmission from those
480 animal to humans, the possibility to formulate Pba in such a way that also veterinary medicine
481 and facilities with large numbers of animals can benefit from the strong antiviral properties that
482 this molecule might have in the environment (decontamination of air, water and surfaces) should
483 additionally be explored.

484

485 **Materials and Methods**

486 **Chemicals**

487 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM, phosphate buffered saline (PBS),
488 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), were purchased from Life Technologies. Goat and foetal
489 bovine sera (FBS) were obtained from Eurobio. Pheophorbide a (Pba) >90% pure, pyroPba,
490 chlorin e6, HPPH, N-methyl protoporphyrin IX, N-methyl mesoporphyrin IX, and Zn
491 protoporphyrin IX were from Cayman chemicals (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany).
492 Remdesivir (GS-5734) was from Selleck Chemicals (Houston TX). Mowiol 4-88 was obtained
493 from Calbiochem. Rose Bengale, trolox and other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).
494 Stocks of compounds were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at 50 mM. Plant extracts
495 were resuspended in DMSO at 25 mg/mL.

496

497 **Antibodies**

498 Mouse anti-HCV E1 mAb A4 (56) and mouse anti-YFV E mAb 2D12 (anti-E, ATCC CRL-
499 1689) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus). Mouse anti-dsRNA mAb
500 (clone J2) was obtained from Scicons. Mouse anti-SARS-CoV-2 spike protein mAb were
501 obtained from GeneTex. Polyclonal rabbit anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies were from
502 Novus. Cyanine 3-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-labeled goat-anti rabbit IgG
503 antibodies were from Jackson Immunoresearch.

504

505 **Cells and culture conditions**

506 Huh-7, Vero-81 (ATCC number CCL-81) and Vero-E6 were grown in DMEM with glutaMAX-I
507 and 10% FBS in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Vero-81 cells were subcloned to obtain a
508 better overall infection rate. The primary human bronchial epithelial cells Mucilair™ were from
509 Epithelix (Geneva, Switzerland) and maintained in Mucilair™ culture medium (Epithelix) as
510 recommended by the manufacturer.

511

512 **Plant collection and extraction**

513 The fifteen plants were collected in the Bafing region (North-West Côte d'Ivoire, Touba
514 department). They were authenticated at the Centre National de Floristique (CNF), University of
515 Félix Houphouët Boigny de Cocody (Abidjan), where voucher specimens were deposited in an
516 Herbarium. *M. oppositifolius* voucher number is UCJ006172. Plants were cleaned and air-dried at
517 constant temperature (26°C) for 1 to 2 weeks at the Nangui Abrogoua University (Abidjan). They
518 were then powdered and stored in the dark until extractions. For each plant, 20 g of dried powder
519 were mixed with 100 mL methanol for 24 h. After filtration, the grounds were extracted again
520 twice in the same way. The 3 resulting filtrates were combined and dried under vacuum at 40°C.
521 These extracts were then dissolved in DMSO for antiviral assays.

522

523 **Bioguided fractionation of Mo extract and Pba identification**

524 For *Mallotus oppositifolius*, three other solvents were used to extract more compounds from these
525 plant leave: methylene chloride (MC) for the first extraction of the dried leaves, then methanol to
526 extract the first ground, and ethanol/water (50:50) to extract the second ground. The
527 corresponding extracts were tested against HCoV-229E-Luc. Since the MC extract was the most
528 active, it was fractionated by chromatography (CPC), leading to 10 fractions (F1-10) that were
529 tested again. F7 was selected for further fractionation by another chromatography (HPLC) and
530 led to 9 partitions (7.1-7.9). Partition 7.7 (the most active against HCoV-229E) purity and
531 identity was determined by UPLC-MS and NMR (more details in supplementary materials).

532

533 **Viruses**

534 The following viral strains were used: HCoV-229E strain VR-740 (ATCC), and a recombinant
535 HCoV-229E-Luc (kind gift of Pr. V. Thiel) (57); SARS-CoV-2 (isolate SARS-CoV-

536 2/human/FRA/Lille_Vero-81-TMPRSS2/2020, NCBI MW575140) was propagated on Vero-81-
537 TMPRSS2 cells. MERS-CoV was recovered by transfecting the infectious clone of MERS-CoV-
538 EMC12 (kindly provided by Dr Luis Enjuanes) in Huh-7 cells. A cell culture-adapted strain
539 (JFH1-CSN6A4) of HCV was produced as previously described (58). A recombinant Sindbis
540 virus (SINV) expressing HCV E1 glycoprotein was employed as previously described (59).
541 Yellow fever virus strain 17D (YFV) was obtained from Dr Philippe Desprès (Institut Pasteur de
542 Paris, France). Coxsackievirus B4 strain E2 (CVB4) was provided by Dr Didier Hober
543 (Université de Lille, France).

544

545 **Cell toxicity assay**

546 6×10^4 Huh-7, Vero-E6 and Vero-81 cells were seeded in 96-well plates and incubated for 16 h at
547 37°C 5% CO₂ incubator. The cells were then treated with increasing concentrations of the
548 compound of interest. One hour after inoculation, cells were taken out of the incubator to be
549 exposed to the white light of the biosafety cabinet (BSC) for 10 min, after which cells were
550 further incubated in the dark at 37°C 5% CO₂ for 23 h. The BSC's light source lamp consists of
551 one fluorescent tube of 36W, 3350 lumen white light. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-
552 (3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (Cell Titer
553 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega) was performed as recommended
554 by the manufacturer. The absorbance of formazan at 490 nm was detected using a plate reader
555 (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc). Each measure was performed in triplicate and each
556 experiment was repeated at least 3 times.

557

558 **Micilair™ toxicity assays**

559 ***LDH secretion assay***

560 Mucilair™, three wells per condition, were incubated with Pba in 100 µl Mucilair™ culture
561 medium, or 50 µl of lysis solution (Cytotoxicity LDH assay kit-WST, Dojindo) at the apical
562 surface for 1 h. Pba or lysis solution was removed and the cells were placed in the incubator for
563 72 h. At 24 h, 48 h and 72 h. LDH secretion was measured in the basolateral medium according
564 to the manufacturer's instructions, by recording the absorbance of WST-formazan at 490 nm as
565 described. The results are expressed relative to the LDH secretion values obtained in the lysed
566 wells, for which a value of 100% toxicity was attributed.

567

568 *Trans-epithelial electrical resistance*

569 Mucilair™ were incubated with Pba and lysis solution as described above. Trans-epithelial
570 electrical resistance was measured using a volt/ohm meter and electrode (Millicell ERS2,
571 Millipore) at 24 h, 48 h and 72 h. 200 µl of prewarmed Mucilair™ culture medium was added at
572 the apical surface prior resistance measurement. Data are expressed relative to control untreated
573 cells.

574

575 **HCoV-229E infection inhibition assays**

576 *Luciferase assay*

577 HCoV-229E-Luc was first mixed with the crude extracts or the compounds at the appropriate
578 concentrations for 10 minutes. Huh-7 cells and Huh-7-TMPRSS2 cells were inoculated with
579 HCoV-229E-Luc at a MOI of 0.5 in a final volume of 50 µL for 1 h at 37°C in the presence of
580 the plant crude extracts or the different compounds. The virus was removed and replaced with
581 culture medium containing the extracts or the different compounds for 6 h at 37°C. Cells were
582 lysed in 20 µL of Renilla Lysis Buffer (Promega, Madison, USA) and luciferase activity was
583 quantified in a Tristar LB 941 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)
584 using Renilla Luciferase Assay System (Promega) as recommended by the manufacturer.

585 This experiment was either performed under white light exposure, in which the virus and the
586 compounds were exposed to the light of the BSC lamp. To maximize light exposure, the tubes
587 were laid flat on the bench of the BSC. For dark condition, the light of the BSC and the room was
588 shut down and all the tubes and plates were covered with foil paper.

589 ***HCoV-229E titers***

590 Huh-7 and Huh-7-TMPRSS2 cells seeded in 24-well plates were inoculated with HCoV-229E at
591 a MOI of 0.5 in the presence of Pba at different concentrations for 1 h at 37°C. The inoculum was
592 removed and replaced with culture medium containing Pba and the cells were incubated at 37°C
593 for 8 h (for TMPRSS2 condition) or 10 h (without TMPRSS2). Supernatants were collected and
594 serial dilutions were performed and used to infect naive Huh-7 cells in 96-well plates. Six days
595 after infection, cytopathic effect was determined in each well to calculate TCID₅₀ titers by using
596 the Reed and Muench method.

597

598 **SARS-CoV-2 and MERS-CoV infection inhibition assays**

599 Vero-E6 and Huh-7 cells seeded in 24-well plates 24 h before inoculation were inoculated with
600 SARS-CoV-2 and MERS-CoV, respectively, at a MOI of 0.3 in the presence of Pba at different
601 concentrations for 1 h at 37°C. Then, the inoculum was removed by 3 washings with DMEM and
602 fresh medium containing different Pba concentrations was added for 16 h at 37°C. Cell
603 supernatants were collected and the amount of infectious virus was determined by infectivity
604 titration. Therefore, Vero-E6 (SARS-CoV-2) and Huh-7 (MERS-CoV), seeded in 96-well plates,
605 were inoculated with 100 µL of 1/10 serially diluted supernatants (ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁸).
606 Cells were incubated with the virus dilutions for 5 days at 37°C and 5% CO₂. Then, the 50%
607 tissue culture infectious dose (TCID₅₀) was determined by assessing the CPE in each well by
608 light microscopy and the 50% end point was calculated according to the method of Reed and
609 Muench.

610

611 **Time-of-addition assay**

612 To determine at which stage of the replication cycle Pba executed its effect, a time-of-addition
613 assay was performed for which 1 μ M Pba (and 10 μ M chloroquine as a control for SARS-CoV-2)
614 was added at different time points before (referred to as the condition 'pre-treatment cells'),
615 during (referred to as the condition 'inoculation'), or after inoculation. For the latter condition,
616 Pba and chloroquine were not added before and during inoculation, but only directly after
617 removal of the inoculum (referred to as the condition 'p.i. - end'), or from 1 h or 2 h after
618 removal of the inoculum onwards (referred to as the condition '1 h p.i.-end' and '2 h p.i.-end,
619 respectively) and were left in the medium for the rest of the incubation time (i.e until 6 h p.i. for
620 HCoV-229E and 16 h p.i. for SARS-CoV-2). For this experiment, Huh-7-TMPRSS2 or Vero-81
621 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc or SARS-CoV-2 at a MOI of 0.5 and 0.05,
622 respectively. One hour after inoculation, cells for all conditions were washed 3 times to remove
623 the unbound particles. HCoV-229E-luc, luciferase activity was quantified as described ahead. For
624 SARS-CoV-2, cells were washed once with PBS and lysed in 200 μ L of non-reducing 2x
625 Laemmli loading buffer. Lysates were incubated at 95°C for 30 min to inactivate the virus and
626 lysates were kept at -20°C until western blot analysis (see below). For each time point, DMSO
627 was taken as a control, and all experiments were repeated 3 times.

628

629 **Western blot detection of the SARS-CoV-2 nucleocapsid expression**

630 Sixteen hours after inoculation, cells were washed once with PBS and lysed in 200 μ L of non-
631 reducing 2x Laemmli loading buffer. Lysates were incubated at 95°C for 30 min to inactivate the
632 virus and the proteins were subsequently separated on a 12% polyacrylamide gel by SDS-PAGE.
633 Next, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham), and the membranes
634 were subsequently blocked for 1 h at RT in 5% (w/v) non-fat dry milk in PBS with 0.1% (v/v)

635 Tween-20. Membranes were incubated overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-SARS-CoV-
636 2 nucleocapsid antibodies in 5% (w/v) non-fat dry milk in PBS with 0.1% (v/v) Tween-20. After
637 being washed 3 times with PBS with 0.1% (v/v) Tween-20, membranes were incubated for 1 h at
638 RT with HRP-labeled goat-anti rabbit IgG antibodies, after which membranes were washed 3
639 times. N proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce™ ECL, ThermoFisher
640 Scientific). Quantification was performed by using Image J and its gel quantification function.

641

642 **Infection assay with other viruses**

643 Vero (YFV, SINV, CBV4) or Huh-7 (HCV) cells grown on glass coverslips were infected with
644 viral stocks diluted so as to obtain 20–40% infected cells in control conditions. The cells were
645 fixed at a time that allowed for a clear detection of infected cells vs non-infected cells, and
646 avoided the detection of reinfection events, thus limiting the analysis to a single round of
647 infection (30 h p.i. for HCV, 20 h p.i. for YFV, 6 h p.i. for SINV, 4 h p.i. for CVB4). The cells
648 were fixed for 20 min with 3% PFA. They were then rinsed with PBS and processed for
649 immunofluorescence as previously described (60) using primary mouse antibodies specific to
650 HCV E1 (for both HCV and SINV), YFV E, or dsRNA (for CVB4), followed by a cyanine-3-
651 conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody for the detection of infected cells. Nuclei
652 were stained with DAPI. Coverslips were mounted on microscope slides in Mowiol 4-88-
653 containing medium. Images were acquired on an Evos M5000 imaging system (Thermo Fisher
654 Scientific) equipped with light cubes for DAPI, and RFP, and a 10× objective. For each coverslip,
655 a series of six 8-bit images of randomly picked areas were recorded. Cells labelled with anti-virus
656 mAbs were counted as infected cells. The total number of cells was obtained from DAPI-labelled
657 nuclei. Infected cells and nuclei were automatically counted using macros written in ImageJ.
658 Infections were scored as the ratio of infected over total cells. The data are presented as the
659 percentage of infection relative to the control condition.

660

661 **Effect of Pba on pseudotyped virion entry**

662 Particles pseudotyped with either SARS-CoV-2 S (SARS-2pp), MERS-CoV S proteins
663 (MERSpp), HCoV-229E-S (HCoV-229Epp), genotype 2a HCV envelope proteins (HCVpp), or
664 the G envelope glycoprotein of vesicular stomatitis virus (VSV-Gpp) were produced as
665 previously described (22, 61). Pseudotyped virions were pre-treated with Pba for 30 min at room
666 temperature under the BSC's light or covered in foil and then used to inoculate Huh-7 cells in 96-
667 well plates for 3 h. The inoculum was removed and cells were further incubated with culture
668 medium for 45 h. Cells were lysed and luciferase activity was detected by using a Luciferase
669 Assay kit (Promega) and light emission measured by using a Tristar LB 941 luminometer
670 (Berthold Technologies).

671

672 **White light exposure kinetics**

673 HCoV-229E-Luc or SARS-CoV-2 were pre-treated with Pba at room temperature and exposed to
674 BSC's white fluorescent light during different period of time. To maximize light exposure, tubes
675 were laid flat under the BSC's light. Next, infection was quantified for each virus as described
676 previously.

677

678 **Fusion assay**

679 Cells were preincubated for 30 min in the presence of 25 mM NH₄Cl at 37°C to inhibit virus
680 entry through the endosomal route, and then were transferred to ice. In the meantime, the virus
681 was preincubated under light with Pba and 25 mM NH₄Cl for 10 min and then allowed to bind to
682 the cells at 4°C for 1 h in DMEM containing 0.2% BSA, 20 mM Hepes, and 25 mM NH₄Cl.
683 Cells were then warmed by addition of DMEM containing 3 µg/mL trypsin, 0.2% BSA, 20 mM
684 Hepes, and 25 mM NH₄Cl and were incubated for 5 min in a water bath at 37°C. The cells were

685 rinsed and further incubated for 30 min in culture medium containing 25 mM NH₄Cl, and then
686 the medium was replaced by normal culture medium. Seven hours after inoculation, luciferase
687 activity was detected by using a Renilla Luciferase Assay Kit (Promega).

688

689 **Cell-cell fusion assay by transient expression of the SARS-CoV-2 spike protein**

690 Vero-81 cells were seeded on coverslips in 24-wells 16 h before transfection. Cells were
691 transfected with 250 ng of a pCDNA3.1(+) vector encoding for the SARS-CoV-2 spike protein
692 using the TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio). Six hours post transfection (p.t.),
693 transfection medium was replaced by normal medium containing 1 μM Pba or DMSO. Twenty-
694 four hours p.t., cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 20 min at RT and syncytia
695 were visualized by immunofluorescence, by incubating the cells with a monoclonal anti-SARS-
696 CoV-2-spike antibody in 10% normal goat serum, followed by incubation with Cyanine-3-
697 conjugated goat anti-mouse IgG antibodies. Nuclei were visualized with 1 μg/ml of 4',6-
698 diamidino-2-phenylindole (DAPI), and coverslips were mounted in Mowiol[®] mounting medium.
699 Pictures were obtained with an Evos M5000 imaging system (Thermo Fisher Scientific).

700

701 **Attachment assay**

702 Huh-7-TMPRSS2 cells seeded in 24-well plates were inoculated with HCoV-229E at a MOI of 4
703 on ice in the presence of 4.1 or 8.2 μM Pba under the light of the BSC. 1 h after inoculation, cells
704 were washed 3 times with cold PBS, and lysed using LBP lysis buffer for RNA extraction
705 following manufacturer's instructions (NucleoSpin[®] RNA plus extraction kit, Macherey-Nagel).
706 Reverse transcription was then performed on 10 μL of RNA using High Capacity cDNA Reverse
707 Transcription kit (Applied Biosystems). 3 μL of cDNA were used for real-time reverse-
708 transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay using specific primers and probe

709 targeting the N gene (forward primer 5'-TTCCGACGTGCTCGAACTTT-3', reverse primer 5'-
710 CCAACACGGTTGTGACAGTGA-3' and probe 5'-6FAM-TCCTGAGGTCAATGCA-3') and
711 subjected to qPCR amplification with Taqman Master mix.

712

713 **Quencher Assay**

714 HCoV-229E-Luc was mixed with 10 mM Trolox or NaN₃ after which 0.5 or 1 μM Pba was
715 added and the mixture was exposed to light for 10 min. The mixture was used to inoculate Huh-
716 7-TMPRSS2 cells for 1h. Inoculum was replaced with DMEM and cells were kept in the dark at
717 37°C 5% CO₂ for 7 h and then lysed to quantify luciferase activity as described above.

718

719 **CryoEM**

720 HCoV-229E was produced by inoculating a confluent Huh-7 T75 Flask at MOI of 0.008 in
721 DMEM supplemented with 5% FBS and put at 33°C 5% CO₂ for 5 days. Supernatant was
722 harvested and treated with DMSO or 10 μM Pba, and further kept in the dark or exposed to light
723 for 30 min. Then NaCl was added to a final concentration of 400 mM final to induce an osmotic
724 shock. Viruses were fixed in 4% PFA. For cryo-EM experiments of the particles, lacey carbon
725 formvar 300 mesh copper grids were used after a standard glow discharged procedure. Plunge
726 freezing was realized using the EM-GP apparatus (Leica). Specimens were observed at -175 °C
727 using a cryo holder (626, Gatan), with a ThermoFisher FEI Tecnai F20 electron microscope
728 operating at 200 kV under low-dose conditions. Images were acquired with an Eagle 4k x 4k
729 camera (ThermoFisher FEI).

730

731 **Primary airway cell infection quantification**

732 The air interface of Mucilair™ (Epithelix) was rinsed with 100 μL of Mucilair™ culture medium
733 for 10 min 3 times to remove mucosal secretion. The cells were then inoculated at the apical

734 membrane with SARS-CoV-2 or MERS-CoV at a MOI of 0.2 in the presence of compounds for
735 1 h at 37°C. Inoculum was removed and the cells were rinsed with PBS. In parallel, compounds
736 were added in the basolateral medium. 72 h post-infection, viruses secreted at the apical
737 membrane were collected by adding 200 µL of medium in the apical chamber. Viral titers were
738 determined as described above. In parallel, cells were lysed with lysis buffer from the kit
739 NucleoSpin® RNA Plus (Macherey Nagel), and total RNA extracted following manufacturer's
740 instructions, eluted in a final volume of 60 µL of H₂O, and quantified.

741 For SARS-CoV-2, one-step qPCR assay was performed using 5 µL of RNA and Takyon Low rox
742 one-step RT probe Mastermix (Eurogentec) and specific primers and probe targeting E gene,
743 forward primer 5'-ACAGGTACGTAAATAGTTAATAGCGT-3', reverse primer 5'-
744 ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' and probe FAM-ACACTAGCCATC-
745 CTTACTGCGCTTCG-MGB.

746 For MERS-CoV and RPLP0 reference gene, 10 µM of RNA were used for cDNA synthesis using
747 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). 3 µL of cDNA were used
748 for real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay using specific
749 probes. For MERS-CoV, the following primers and probe targeting N gene were used, forward
750 primer 5'-GGGTGTACCTCTTAATGCCAATTC-3', reverse primer 5'-
751 TCTGTCCTGTCTCCGCAAT-3' and probe 5'-FAM-ACCCCTGCGCAAAAATGCTGGG-
752 MGBNFQ-3' and subjected to qPCR amplification with Taqman Master mix. For RPLP0,
753 Taqman gene expression assay (Life Technologies) was used according to the manufacturer
754 instruction. SARS-CoV-2 E and MERS-CoV N gene expression were quantified relative to
755 RPLP0 using $\Delta\Delta C_t$ method. A value of 1 was arbitrary assigned to infected cells without
756 compound.

757

758 **Statistical analysis and IC₅₀ and CC₅₀ calculation**

759 Values were graphed and IC_{50} calculated by non-linear regression curve fitting with variable
760 slopes constraining the top to 100% and the bottom to 0%, using GraphPad PRISM software.
761 Kruskal Wallis nonparametric test followed by a Dunn's multicomparison post hoc test with a
762 confidence interval of 95% was used to identify individual difference between treatments. P
763 values < 0.05 were considered as significantly different from the control.

764

765 **Acknowledgments**

766 We thank Volker Thiel for providing HCoV-229E-RLuc, Philippe Desprès for YFV, Luis
767 Enjuanes for MERS-CoV and Didier Hober for CVB4. We are also grateful to Robin Prath and
768 Nicolas Vandenamele for their technical help in the BSL3 facility. Authors are grateful to the
769 LARMN platform (University of Lille, France) and wish to thank N. Azaroual and V. Ultré for
770 their help on NMR analysis.

771

772

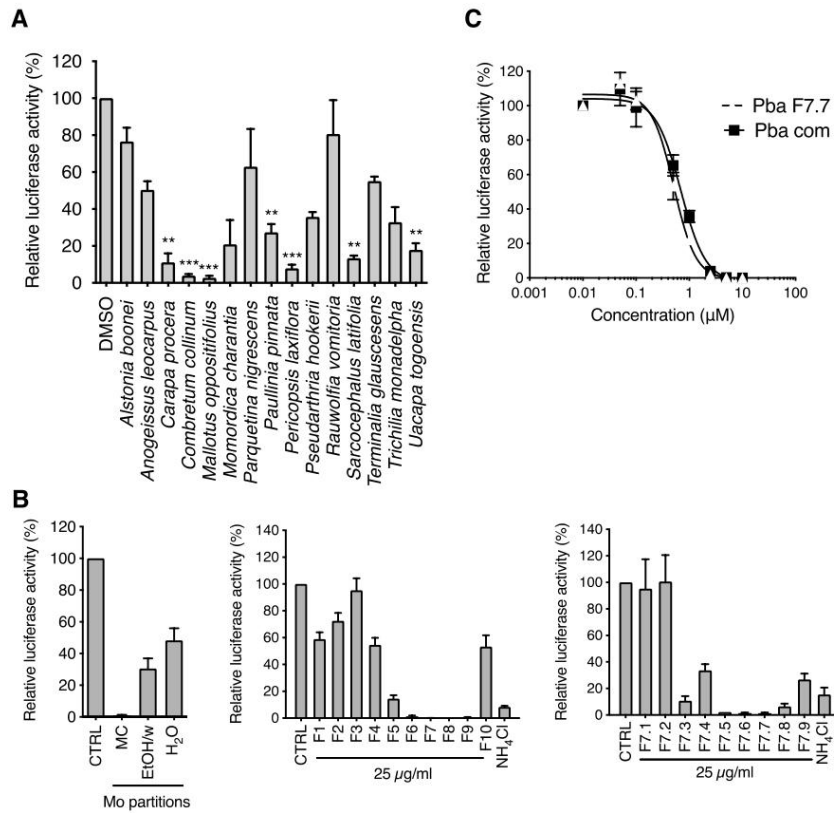
773 **References**

- 774 1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P,
775 Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. 2020. A Novel Coronavirus from
776 Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733.
- 777 2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu
778 T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang
779 G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with
780 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395:497–506.
- 781 3. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, Liu L, Shan H, Lei C, Hui DSC, Du B, Li L,
782 Zeng G, Yuen K-Y, Chen R, Tang C, Wang T, Chen P, Xiang J, Li S, Wang J, Liang Z,
783 Peng Y, Wei L, Liu Y, Hu Y, Peng P, Wang J, Liu J, Chen Z, Li G, Zheng Z, Qiu S, Luo J,
784 Ye C, Zhu S, Zhong N. 2020. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in
785 China. *N Engl J Med* 382:1708–1720.
- 786 4. Cui J, Li F, Shi Z-L. 2018. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev*
787 *Microbiol* 17:181–192.
- 788 5. Chen Y, Liu Q, Guo D. 2020. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and
789 pathogenesis. *J Med Virol* 92:418–423.
- 790 6. Riva L, Yuan S, Yin X, Martin-Sancho L, Matsunaga N, Pache L, Burgstaller-Muehlbacher
791 S, De Jesus PD, Teriete P, Hull MV, Chang MW, Chan JF-W, Cao J, Poon VK-M, Herbert
792 KM, Cheng K, Nguyen T-TH, Rubanov A, Pu Y, Nguyen C, Choi A, Rathnasinghe R,
793 Schotsaert M, Miorin L, Dejosez M, Zwaka TP, Sit K-Y, Martinez-Sobrido L, Liu W-C,
794 White KM, Chapman ME, Lendy EK, Glynne RJ, Albrecht R, Ruppin E, Mesecar AD,
795 Johnson JR, Benner C, Sun R, Schultz PG, Su AI, García-Sastre A, Chatterjee AK, Yuen
796 K-Y, Chanda SK. 2020. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale
797 compound repurposing. *Nature* 586:113–119.
- 798 7. Touret F, Gilles M, Barral K, Nougairède A, van Helden J, Decroly E, de Lamballerie X,
799 Coutard B. 2020. In vitro screening of a FDA approved chemical library reveals potential
800 inhibitors of SARS-CoV-2 replication. 1. *Sci Rep* 10:13093.
- 801 8. Belouzard S, Machelart A, Sencio V, Vausselin T, Hoffmann E, Deboosere N, Rouillé Y,
802 Desmarests L, Séron K, Danneels A, Robil C, Belloy L, Moreau C, Piveteau C, Biela A,
803 Vandeputte A, Heumel S, Deruyter L, Dumont J, Leroux F, Engelmänn I, Alidjinou EK,
804 Hober D, Brodin P, Beghyn T, Trottein F, Déprez B, Dubuisson J. 2021. Large scale
805 screening discovers clofoctol as an inhibitor of SARS-CoV-2 replication that reduces
806 COVID-19-like pathology. *bioRxiv* 2021.06.30.450483.
- 807 9. Jeong GU, Song H, Yoon GY, Kim D, Kwon Y-C. 2020. Therapeutic Strategies Against
808 COVID-19 and Structural Characterization of SARS-CoV-2: A Review. *Front Microbiol*
809 11:1723.
- 810 10. White KM, Rosales R, Yildiz S, Kehrer T, Miorin L, Moreno E, Jangra S, Uccellini MB,
811 Rathnasinghe R, Coughlan L, Martinez-Romero C, Batra J, Rojc A, Bouhaddou M, Fabius
812 JM, Obernier K, Dejosez M, Guillén MJ, Losada A, Avilés P, Schotsaert M, Zwaka T,
813 Vignuzzi M, Shokat KM, Krogan NJ, García-Sastre A. 2021. Plitidepsin has potent
814 preclinical efficacy against SARS-CoV-2 by targeting the host protein eEF1A. *Science*
815 371:926–931.
- 816 11. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL,
817 Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2
818 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450–454.
- 819 12. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens
820 TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. 2020. SARS-

- 821 CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven
822 Protease Inhibitor. *Cell* 181:271–280.
- 823 13. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DHW, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers
824 JAA, Zaki A, Fouchier RAM, Thiel V, Drosten C, Rottier PJM, Osterhaus ADME, Bosch
825 BJ, Haagmans BL. 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging
826 human coronavirus-EMC. *Nature* 495:251–254.
- 827 14. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes
828 KV. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. 6377.
829 *Nature* 357:420–422.
- 830 15. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. 2010. Efficient
831 activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the
832 transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84:12658–12664.
- 833 16. Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. 2013. Middle East Respiratory Syndrome
834 Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol*
835 87:12552–12561.
- 836 17. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. 2012. Mechanisms of coronavirus cell
837 entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4:1011–1033.
- 838 18. Huang F, Li Y, Leung EL-H, Liu X, Liu K, Wang Q, Lan Y, Li X, Yu H, Cui L, Luo H,
839 Luo L. 2020. A review of therapeutic agents and Chinese herbal medicines against SARS-
840 COV-2 (COVID-19). *Pharmacol Res* 158:104929.
- 841 19. Mani JS, Johnson JB, Steel JC, Broszczak DA, Neilsen PM, Walsh KB, Naiker M. 2020.
842 Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A
843 review. *Virus Res* 284:197989.
- 844 20. Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler
845 M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V, Pöhlmann S. 2013. TMPRSS2 activates the
846 human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral
847 target cells in the respiratory epithelium. *J Virol* 87:6150–6160.
- 848 21. Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. 2019.
849 TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine
850 models after coronavirus infection. *J Virol* 93:e01815-18.
- 851 22. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. 2009. Activation of the SARS coronavirus spike
852 protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*
853 106:5871–6.
- 854 23. Kawase M, Shirato K, Matsuyama S, Taguchi F. 2009. Protease-Mediated Entry via the
855 Endosome of Human Coronavirus 229E. *J Virol* 83:712–721.
- 856 24. Vigant F, Lee J, Hollmann A, Tanner LB, Akyol Ataman Z, Yun T, Shui G, Aguilar HC,
857 Zhang D, Meriwether D, Roman-Sosa G, Robinson LR, Juelich TL, Buczkowski H, Chou
858 S, Castanho MARB, Wolf MC, Smith JK, Banyard A, Kielian M, Reddy S, Wenk MR,
859 Selke M, Santos NC, Freiberg AN, Jung ME, Lee B. 2013. A mechanistic paradigm for
860 broad-spectrum antivirals that target virus-cell fusion. *PLoS Pathog* 9:e1003297.
- 861 25. Costa L, Faustino MAF, Neves MGPMS, Cunha A, Almeida A. 2012. Photodynamic
862 inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses* 4:1034–1074.
- 863 26. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara
864 N, Hotta H. 2014. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and
865 chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.
866 *Microbiol Immunol* 58:188–94.
- 867 27. Bouslama L, Hayashi K, Lee J-B, Ghorbel A, Hayashi T. 2011. Potent virucidal effect of
868 pheophorbide a and pyropheophorbide a on enveloped viruses. *J Nat Med* 65:229–233.
- 869 28. Zhang H-J, Tan GT, Hoang VD, Hung NV, Cuong NM, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong

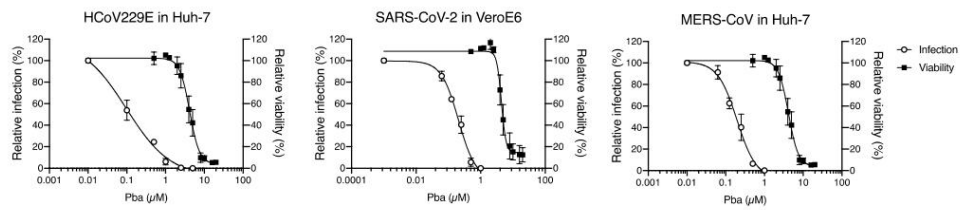
- 870 HHS. 2003. Natural Anti-HIV Agents. Part IV. Anti-HIV Constituents from *Vatica cinerea*.
871 *J Nat Prod* 66:263–268.
- 872 29. Yilmaz C, Gökmen V. 2016. Chlorophyll, p. 37–41. *In* Caballero, B, Finglas, PM, Toldrá,
873 F (eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford.
- 874 30. Solymosi K, Mysliwa-Kurdziel B. 2017. Chlorophylls and their Derivatives Used in Food
875 Industry and Medicine. *Mini Rev Med Chem* 17:1194–1222.
- 876 31. Humphrey AM. 1980. Chlorophyll. *Food Chem* 5:57–67.
- 877 32. Holden M. 1974. Chlorophyll degradation products in leaf protein preparations. *J Sci Food*
878 *Agric* 25:1427–1432.
- 879 33. Hajri A, Wack S, Meyer C, Smith MK, Leberquier C, Keding M, Aprahamian M. 2002.
880 *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Photofrin® and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in
881 Photodynamic Therapy of Colonic Cancer Cells. *Photochem Photobiol* 75:140–148.
- 882 34. Roeder B, Naether D, Lewald T, Braune M, Nowak C, Freyer W. 1990. Photophysical
883 properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. *Biophys Chem* 35:303–
884 312.
- 885 35. Hamblin MR. 2020. Photodynamic Therapy for Cancer: What’s Past is Prologue.
886 *Photochem Photobiol* 96:506–516.
- 887 36. Wiehe A, O’Brien JM, Senge MO. 2019. Trends and targets in antiviral phototherapy.
888 *Photochem Photobiol Sci* 18:2565–2612.
- 889 37. Mariewskaya KA, Tyurin AP, Chistov AA, Korshun VA, Alferova VA, Ustinov AV. 2021.
890 Photosensitizing Antivirals. *Mol Basel Switz* 26:3971.
- 891 38. Saide A, Lauritano C, Ianora A. 2020. Pheophorbide a: State of the Art. *Mar Drugs* 18:257.
- 892 39. Clark NF, Taylor-Robinson AW. 2020. COVID-19 Therapy: Could a Chlorophyll
893 Derivative Promote Cellular Accumulation of Zn²⁺ Ions to Inhibit SARS-CoV-2 RNA
894 Synthesis? *Front Plant Sci* 11:1270.
- 895 40. Hollmann A, Castanho MARB, Lee B, Santos NC. 2014. Singlet oxygen effects on lipid
896 membranes: implications for the mechanism of action of broad-spectrum viral fusion
897 inhibitors. *Biochem J* 459:161–170.
- 898 41. Vigant F, Santos NC, Lee B. 2015. Broad-spectrum antivirals against viral fusion. *Nat Rev*
899 *Microbiol* 13:426–437.
- 900 42. Tummino TA, Rezelj VV, Fischer B, Fischer A, O’Meara MJ, Monel B, Vallet T, White
901 KM, Zhang Z, Alon A, Schadt H, O’Donnell HR, Lyu J, Rosales R, McGovern BL,
902 Rathnasinghe R, Jangra S, Schotsaert M, Galameau J-R, Krogan NJ, Urban L, Shokat KM,
903 Kruse AC, García-Sastre A, Schwartz O, Moretti F, Vignuzzi M, Pognan F, Shoichet BK.
904 2021. Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2.
905 *Science* 373:541–547.
- 906 43. Chen D, Lu S, Yang G, Pan X, Fan S, Xie X, Chen Q, Li F, Li Z, Wu S, He J. 2020. The
907 seafood *Musculus senhoussei* shows anti-influenza A virus activity by targeting virion
908 envelope lipids. *Biochem Pharmacol* 177:113982.
- 909 44. Lamontagne J, Mills C, Mao R, Goddard C, Cai D, Guo H, Cuconati A, Block T, Lu X.
910 2013. Screening and identification of compounds with antiviral activity against hepatitis B
911 virus using a safe compound library and novel real-time immune-absorbance PCR-based
912 high throughput system. *Antiviral Res* 98:19–26.
- 913 45. Wang Y-T, Yang C-H, Huang K-S, Shaw J-F. 2021. Chlorophyllides: Preparation,
914 Purification, and Application. *Biomolecules* 11:1115.
- 915 46. Guo H, Pan X, Mao R, Zhang X, Wang L, Lu X, Chang J, Guo J-T, Passic S, Krebs FC,
916 Wigdahl B, Warren TK, Retterer CJ, Bavari S, Xu X, Cuconati A, Block TM. 2011.
917 Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses,
918 filoviruses, and arenaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 55:478–486.

- 919 47. Lebedeva NS, A Gubarev Y, O Koifman M, I Koifman O. 2020. The Application of
920 Porphyrins and Their Analogues for Inactivation of Viruses. *Mol Basel Switz* 25:4368ol.
- 921 48. Cruz-Oliveira C, Almeida AF, Freire JM, Caruso MB, Morando MA, Ferreira VNS,
922 Assunção-Miranda I, Gomes AMO, Castanho MARB, Da Poian AT. 2017. Mechanisms of
923 Vesicular Stomatitis Virus Inactivation by Protoporphyrin IX, Zinc-Protoporphyrin IX, and
924 Mesoporphyrin IX. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00053-17.
- 925 49. Gu C, Wu Y, Guo H, Zhu Y, Xu W, Wang Y, Zhou Y, Sun Z, Cai X, Li Y, Liu J, Huang Z,
926 Yuan Z, Zhang R, Deng Q, Qu D, Xie Y. 2020. Protoporphyrin IX and verteporfin potently
927 inhibit SARS-CoV-2 infection in vitro and in a mouse model expressing human ACE2. *Sci*
928 *Bull* <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.12.005>.
- 929 50. Lu S, Pan X, Chen D, Xie X, Wu Y, Shang W, Jiang X, Sun Y, Fan S, He J. 2021. Broad-
930 spectrum antivirals of protoporphyrins inhibit the entry of highly pathogenic emerging
931 viruses. *Bioorganic Chem* 107:104619.
- 932 51. Lim D-S, Ko S-H, Kim S-J, Park Y-J, Park J-H, Lee W-Y. 2002. Photoinactivation of
933 vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll derivatives from silkworm
934 excreta. *J Photochem Photobiol B* 67:149–156.
- 935 52. Almeida A, Faustino MAF, Neves MGPMS. 2020. Antimicrobial Photodynamic Therapy
936 in the Control of COVID-19. *Antibiotics* 9:320.
- 937 53. Sabino CP, Ball AR, Baptista MS, Dai T, Hamblin MR, Ribeiro MS, Santos AL, Sellera
938 FP, Tegos GP, Wainwright M. 2020. Light-based technologies for management of COVID-
939 19 pandemic crisis. *J Photochem Photobiol B* 212:111999.
- 940 54. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin
941 MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC,
942 Golab J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 61:250–281.
- 943 55. de Vries RD, Schmitz KS, Bovier FT, Predella C, Khao J, Noack D, Haagmans BL, Herfst
944 S, Stearns KN, Drew-Bear J, Biswas S, Rockx B, McGill G, Dorrello NV, Gellman SH,
945 Alabi CA, de Swart RL, Moscona A, Porotto M. 2021. Intranasal fusion inhibitory
946 lipopeptide prevents direct-contact SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Science*
947 371:1379–1382.
- 948 56. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. 1994. Formation
949 and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes
950 expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68:6147–6160.
- 951 57. van den Worm SHE van den, Eriksson KK, Zevenhoven JC, Weber F, Züst R, Kuri T,
952 Dijkman R, Chang G, Siddell SG, Snijder EJ, Thiel V, Davidson AD. 2012. Reverse
953 Genetics of SARS-Related Coronavirus Using Vaccinia Virus-Based Recombination.
954 *PLOS ONE* 7:e32857.
- 955 58. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y,
956 Wychowski C, Dubuisson J, Rouillé Y. 2010. Identification of GBF1 as a Cellular Factor
957 Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* 84:773–787.
- 958 59. Duvet S, Chirat F, Mir A-M, Verbert A, Dubuisson J, Cacan R. 2000. Reciprocal
959 relationship between α 1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough
960 endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells. *Eur J Biochem* 267:1146–1152.
- 961 60. Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, Roingard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S,
962 McKeating J, Patel AH, Maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J. 2006.
963 Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System
964 That Efficiently Replicates the Virus. *J Virol* 80:2832–2841.
- 965 61. Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, Foug S, Cosset
966 F-L, Dubuisson J. 2004. Characterization of functional hepatitis C virus envelope
967 glycoproteins. *J Virol* 78:2994–3002.



969

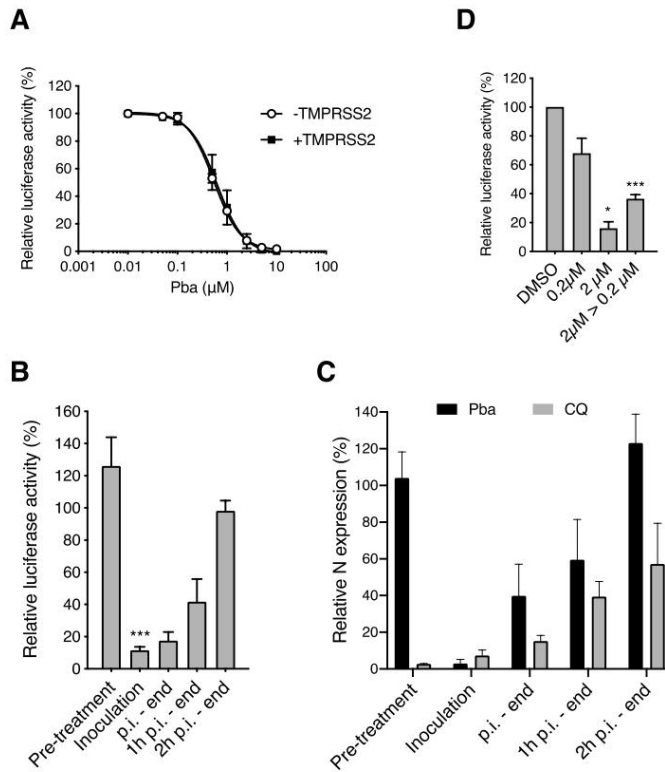
970 **Figure 1. Identification of Pba as active compound in *Mallotus oppositifolius* using bioguided**
 971 **fractionation of plant extracts.** (A) Huh-7 cells were inoculated with HCoV-229E in the presence of
 972 various plant extracts at 25 μg/mL. Cells were lysed 7 h post-inoculation and luciferase activity
 973 quantified. (B) Huh-7 cells were inoculated with HCoV-229E in the presence of sub-extracts of Mo
 974 (methylene chloride, MC; ethanol/water (50:50), EtOH/w; water, H₂O; left), fractions of Mo MC sub-
 975 extract (middle), or sub-fractions of F7 fraction (right panel) at 25 μg/mL. Cells were lysed 7 h post-
 976 inoculation and luciferase activity quantified. (C) Huh-7 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc
 977 in the presence of Pba extracted from Mo (Pba F7.7) or commercial Pba (Pba com) at different
 978 concentrations. At 1 h p.i., cells were washed and fresh compounds were added to the cells for 6 h after
 979 which cells were lysed to quantify luciferase activity. Data are expressed relative to the control DMSO.
 980 Results are expressed as mean ± SEM of 3 experiments.
 981



982

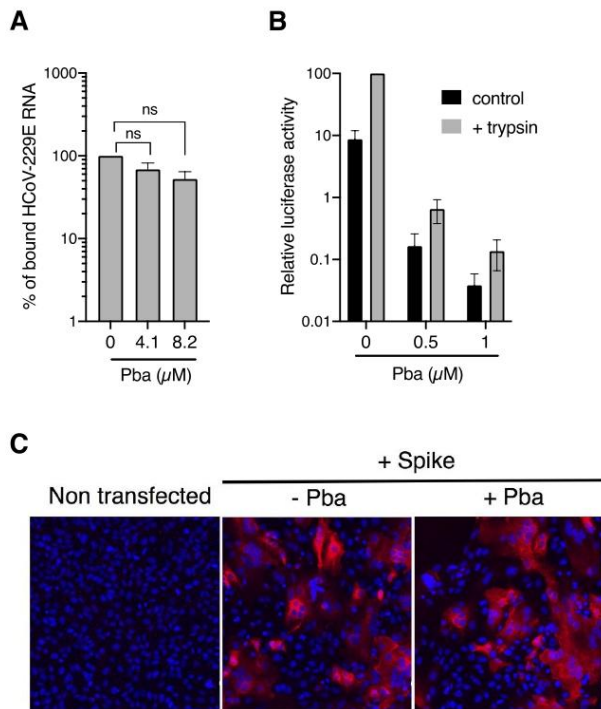
983 **Figure 2. Pba inhibits various HCoVs.** For infection assays, cells were inoculated with HCoV-229E
 984 (Huh-7 cells), SARS-CoV-2 (Vero-E6 cells) and MERS-CoV (Huh-7 cells) in presence of various
 985 concentrations of Pba. At 1 h p.i, cells were washed and fresh compounds were added to the cells for 9 h
 986 (HCoV-229E) or 16 h (SARS-CoV-2 and MERS-CoV) and the supernatants were collected for infectivity
 987 titration. For toxicity assays, cells were incubated with Pba at different concentrations for 24 h. MTS assay
 988 was performed to monitor cell viability. For both infection and toxicity tests, cells were exposed to the
 989 light of the cabinet for 10 min, once upon inoculation, once after a 1 h incubation. Results are expressed as
 990 mean ± SEM of 3 experiments.

991



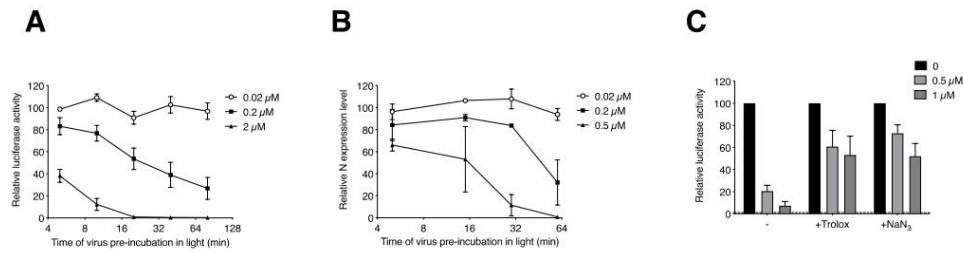
992

993 **Figure 3. Pba inhibits viral entry by a direct action on the viral particle.** (A) Huh-7 and Huh-7-
 994 TMPRSS2 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of various concentrations Pba. At
 995 1 h p.i, cells were washed and fresh compounds were added to the cells for 6 h after which the cells were
 996 lysed to quantify luciferase activity. Data are expressed relative to the control DMSO. (B) Pba at 2 μM
 997 was added at different time points during infection of Huh-7-TMPRSS2 cells by HCoV-229E-Luc, either
 998 1 h before inoculation (pre-treatment), or 1 h during inoculation (Inoculation), or for 6 h post-inoculation
 999 (p.i.-end), after 1 h post-inoculation till the end (1 h p.i.-end), or 2 h post-inoculation till the end (2 h p.i.-
 1000 end). Cells were lysed 7 h after the inoculation and luciferase activity quantified. (C) A similar experiment
 1001 was performed in Vero-81 cells inoculated with SARS-CoV-2 in the presence of Pba at 1 μM or
 1002 chloroquine at 10 μM at different time points. Cells were lysed 16 h post-inoculation and the viral
 1003 nucleocapsid protein was detected by Western blot. The graph represents the quantification of the band
 1004 intensity corresponding to the N protein, relative to the DMSO control for each time point. (D) Huh-7
 1005 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of 0.2 or 2 μM Pba, or with HCoV-229E-Luc
 1006 previously treated with 2 μM Pba and then diluted 10 times, leading to a concentration of 0.2 μM Pba for
 1007 the inoculation period (2 μM > 0.2 μM). The amount of virus used for inoculation was kept constant in the
 1008 different conditions and all the samples were exposed to the light for 10 min. At 7 h post-inoculation, cells
 1009 were lysed and luciferase activity was quantified. *, P<0.05; ***, P<0.005.
 1010



1011

1012 **Figure 4. Pba inhibits viral entry at the fusion step.** (A) Huh-7-TMPRSS2 cells were inoculated with
 1013 HCoV-229E for 1 h at 4°C in the presence of DMSO, or 4.1 and 8.2 μ M Pba. Cells were washed thrice
 1014 with ice-cold PBS, and total RNA was extracted. Bound HCoV-229E virions were detected by
 1015 quantification of HCoV-229E gRNA by qRT-PCR. Relative binding is expressed as the percentage of the
 1016 control (DMSO) for which the 100% value was arbitrarily attributed. Mean values \pm SEM (error bars) of
 1017 three independent experiments are presented. n.s., not significant. (B) HCoV-229E was incubated with
 1018 Pba at different concentration and was bound to Huh-7 cells for 1 h in the absence (control) or presence
 1019 (trypsin) of NH_4Cl at 4°C. In the later condition, fusion was induced by 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin for 5 min at 37
 1020 °C in the presence of NH_4Cl . Cells were lysed 7 h post-infection and luciferase activity quantified.
 1021 Infectivity is expressed as the percentage of the control (DMSO) for which the 100% value was arbitrarily
 1022 attributed. Mean values \pm SEM (error bars) of three independent experiments are presented. (C) Vero-81
 1023 cells transiently expressing SARS-CoV-2 spike protein were incubated with or without Pba at 1 μ M from
 1024 6 to 24 h p.i., after which syncytia were visualized by immunofluorescence. Images were acquired on an
 1025 Evos M5000 imaging system (Thermo Fisher Scientific).
 1026

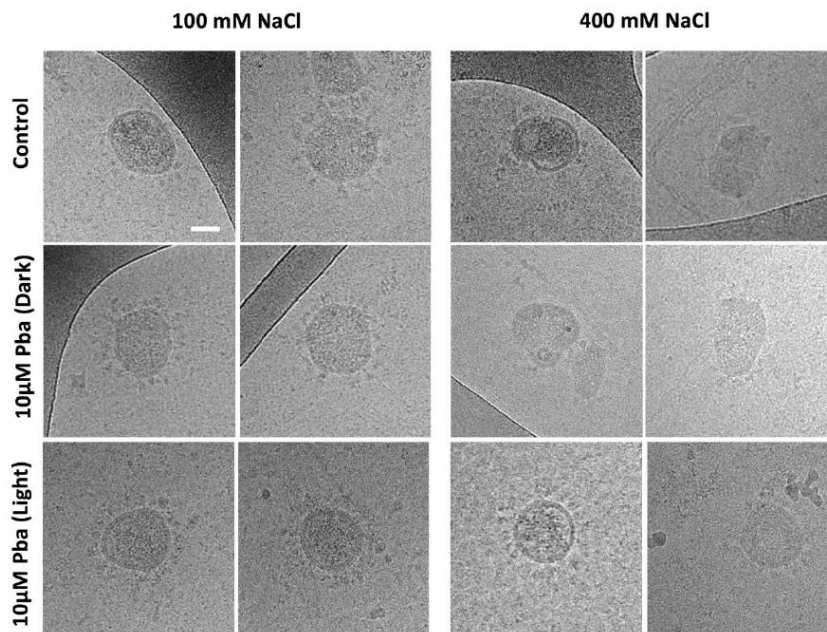


1027

1028

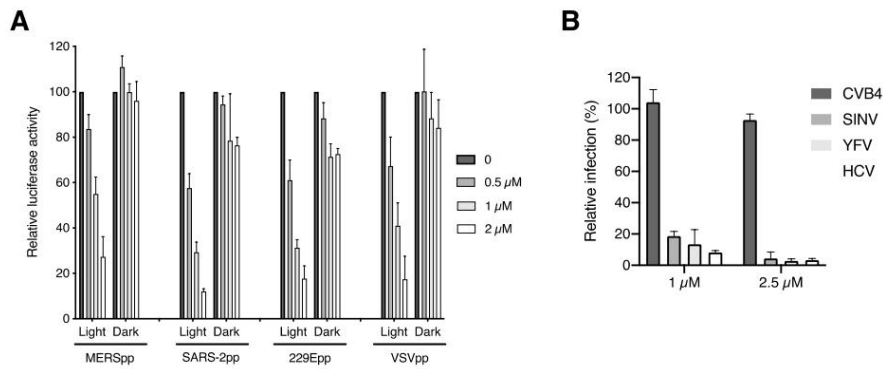
1029 **Figure 5. The antiviral activity of Pba depends on light exposure and its ability to generate singlet**
 1030 **oxygen species.** HCoV-229E-Luc (A) and SARS-CoV-2 (B) were incubated with Pba at given
 1031 concentration under the light of the laminar flow cabinet. At different time points of light exposure, the
 1032 mixture was used to inoculate Huh-7 cells or Vero-81 cells, respectively. At 7 h (HCoV-229E-Luc) or 16
 1033 h (SARS-CoV-2) post-inoculation, cells were lysed and infection quantified as described previously. (C)
 1034 Pba at 0.5 or 1 μM was mixed with 10 mM Trolox or 10 mM NaN₃ in DMEM and HCoV-229E-Luc was
 1035 added to the mixture prior to inoculation of Huh-7 cells for 1 h at 37°C. Inoculum and compounds were
 1036 removed and replaced with culture medium for 6 h. Cells were lysed and luciferase activity quantified.
 1037 Infectivity is expressed as the percentage of infection relative to the control (DMSO) to which the 100%
 1038 value was arbitrarily attributed. Mean values \pm SEM (error bars) of three independent experiments are
 1039 presented.
 1040

1041



1042

1043 **Figure 6. Pba renders virions resistant to osmotic shock.** HCoV-229E were incubated in the presence
1044 or absence of Pba at 10 μM with or without 30 min light exposure, after which the particles were
1045 subjected to normal medium conditions (100 mM NaCl) or to an osmotic shock of 400 mM NaCl for 30
1046 sec. Virions were fixed with PFA and samples were treated for CryoEM observation. Images are
1047 representative of 30 independent images of 2 independent experiments. Scale bar: 50 nm.
1048



1049

1050 **Figure 7. Pba is a broad-spectrum antiviral agent against enveloped viruses.** (A) MERSpp, HCoV-
 1051 229Epp, VSVpp, and SARS-2pp were preincubated with Pba at the indicated concentration either under
 1052 light for 30 min (Light) or without light (Dark) prior to inoculation of Huh-7 cells expressing ACE2 and
 1053 TMPRSS2 for 2 h. At 46 h post-inoculation, cells were lysed and luciferase activity was quantified.
 1054 Infectivity is expressed as the percentage relative to the control (DMSO) to which the 100% value was
 1055 arbitrarily attributed. Mean values \pm SEM (error bars) of three different experiments are presented. (B).
 1056 Different viruses were incubated with Pba at 1 and 2.5 μ M under light condition for 30 min prior to
 1057 inoculation. Cells were fixed at different time points depending on the virus (see Materials and Methods
 1058 section for details) and subjected to immunofluorescence labelling. Infectivity is expressed as the
 1059 percentage relative to the control (DMSO). Mean values \pm SEM (error bars) of three different experiments
 1060 are presented.
 1061

SUPPLEMENTARY DATAS

Materials and methods

Bioguided fractionation of Mo extract

Mallotus oppositifolius was extracted with three solvents of increasing polarity. For each solvent, 5 mL/g of dried powder was used for 24h. Each extraction was repeated 3 times and the resulting extracts were combined and vacuum dried. First, the three dried leaves were macerated in methylene chloride (MC), then the first ground was macerated in methanol, and finally ethanol/water (50:50) was used to extract the second ground. These 3 dried extracts were dissolved in DMSO and tested against HCoV-229E-Luc. The MC partition (most active) was fractionated by Centrifugal Partition Chromatography (CPC, Armen instruments[®]). CPC is a liquid/liquid chromatography based on the partition of a sample in a biphasic immiscible liquid system. The system consists of a rotor connected to two Shimadzu[®]-LC-20AP pumps, a CBM-20A controller, and a SPD-M20A diode array detector. The Arizona S system (heptane/ethyl acetate/methanol/water, 5:2:5:2) composed the mobile and stationary phases. Injections were carried out with 3 g of the MC extract solubilized in 50 mL of a mixture of mobile and stationary phases (5:5). The analysis took 60 min at 30 mL/min and 1200 rpm. The extrusion took 35 min at 50 mL/min with the same rotor speed. This method allowed to obtain 10 different fractions (F1-10) that were vacuum dried, dissolved in DMSO and then tested again on HCoV-229E-Luc.

Fraction F7 was the most active and selected for further fractionation by another chromatography. We used a preparative HPLC system composed of the same pumps, controller and detector as our CPC system. The stationary phase was a Vision HT HL C18 (5 μ m, 250 \times 10 mm) column (Grace). The mobile phase was a mixture of methanol and water

with the following gradient: 50-100% (0–15 min), and 100% methanol (15-30 min). F7 was dissolved in methanol and injected repeatedly (500 µL at 20 mg/mL). The flow rate was set at 3 mL/min. This process led to 9 partitions (7.1-7.9).

Structural elucidation of compound in F7.7

Partition 7.7 was the most active against HCoV-229E and further analysed by Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC-UV-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). UPLC-UV-MS analysis were performed on an Acquity UPLC[®]H-Class system (Waters, Guyancourt, France) coupled with a Diode Array Detector (DAD) and a QDa ESI-Quadrupole Mass Separation, using an ACQUITY UPLC[®] BEH C18 1.7µm (2.1x100mm) column (Waters, Milford MA). Gradient elution was performed with (A) 0.1% formic acid in water and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile at a flowrate of 0.3 mL/min, as following: 30-90% (0-3 min), 90-100% (3-7 min) before returning to the initial conditions (30% B).

Analytes were monitored using UV detection (190 to 790 nm) and MS-Scan from 100 to 1000 Da (both in positive and negative mode). All data were acquired and processed using Empower 3 software.

The structural elucidation of F7.7 was conducted with NMR. Monodimensional spectra (¹H and ¹³C) were recorded on a Bruker DPX-500 spectrometer. The chemical structure was established by comparison with literature data (1).

Cell toxicity assay

6×10⁴ Huh-7, Vero-E6 and Vero-81 cells were seeded in 96-well plates and incubated for 16 h at 37°C 5% CO₂ incubator. The cells were then treated with increasing concentrations of the compound of interest. One hour after inoculation, cells were either left in the incubator (dark condition) or taken out to be exposed to the white light of the biosafety cabinet (BSC) for

10 min (light condition), after which cells were further incubated in the dark at 37°C 5% CO₂ for 23 h. BSC's light source lamp consists of one fluorescent tube of 36W, 3350 lumen white light. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega) was performed as recommended by the manufacturer. The absorbance of formazan at 490 nm was detected using a plate reader (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc). Each measure was performed in triplicate and each experiment was repeated at least 3 times.

Reference

1. Cheng HH, Wang HK, Ito J, Bastow KF, Tachibana Y, Nakanishi Y, Xu Z, Luo TY, Lee KH. 2001. Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. *J Nat Prod* 64:915–919.

Figure S1

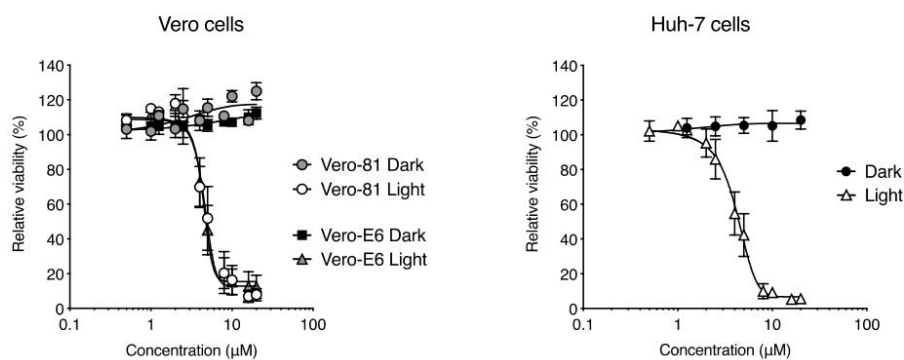


Figure S1. Toxicity of Pba depends on light exposure. Cells were incubated with Pba at different concentrations and either kept in the incubator for 24 h (Dark), or were taken out of the incubator after 1 h of incubation with Pba, and left for 10 min under light exposure, after which the cells were replaced in the incubator for 23 h (Light). Data are expressed relative to the control DMSO. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments.

Figure S3

A

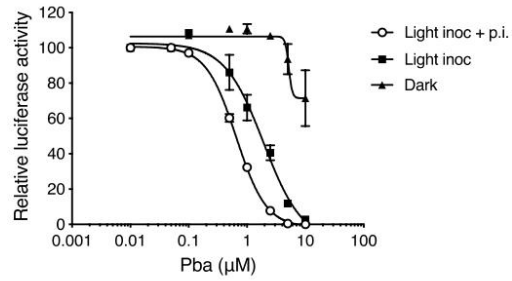


Figure S3. The antiviral activity of Pba is light-dependent. Huh-7 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of various concentrations of Pba either with the light of the laminar flow cabinet turned on (Light inoc) or off (Dark). One hour after inoculation, the inoculum was removed, either in light (Light inoc + p.i.) or dark conditions (Light inoc), and cells were further incubated with Pba for 6 h, after which luciferase activity was measured.

Figure S4

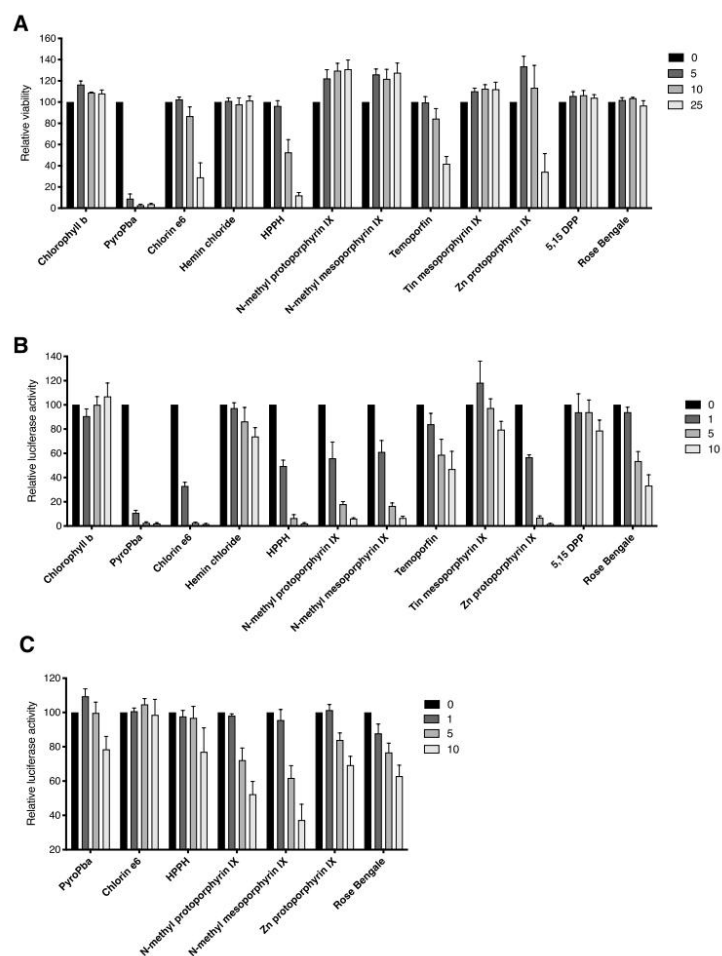


Figure S4. Activity of structurally-related Pba compounds and other photosensitizers on HCoV-229E infection. **A.** The toxicity on Huh-7 cells of the different compounds was determined by MTS assay. Huh-7 cells were incubated with the molecules at 5, 10, and 25 μ M under the light of the cabinet. The medium was removed after 1 h and exposed for 10 min to the light of the cabinet to mimic infection assay, then placed in the dark for 23 h and MTS assay was performed. **B** and **C.** Huh-7 cells were inoculated with HCoV-229E-Luc in the presence of indicated compounds at different concentrations either under light exposure (**B**) or in the dark (**C**). 1 h post inoculation, the inoculum was removed and replace with fresh medium containing the compounds and exposed or not for 10 min to the light of the cabinet. Cells were lysed 7 h p.i. to quantify luciferase. Data are expressed relative to the control DMSO. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments.