

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 23 juin 2022
Par Melle Imelda RACZKIEWICZ**

**MOLECULES ANTIVIRALES D'ORIGINE NATURELLE ACTIVES CONTRE
LES CORONAVIRUS**

Membres du jury :

- Présidente :** **Dr RIVIERE Céline**, Maître de Conférences des Universités,
Université de Lille
- Directrice :** **Pr GOFFARD Anne**, Professeur des Universités – Praticien
Hospitalier, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CHU de Lille
- Asseseurs :** **Dr BROCHOT Etienne**, Maître de Conférences des Universités –
Praticien Hospitalier, CHU d'Amiens
Dr SERON Karin, Chargée de recherche, Centre d'Infection et
d'Immunité de Lille
Dr ZAWADZKI Christophe, Praticien Hospitalier, CHU de Lille

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27

M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne- Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie- Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie- Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maitres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86

M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86

Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux
opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont
propres à leurs auteurs.**

REMERCIEMENTS

A la présidente de mon jury

Madame le Docteur Céline Rivière
Maître de Conférences des Universités
Université de Lille – Faculté de Pharmacie

Vous me faites l'honneur de présider le jury.
Merci pour ce projet et cette collaboration enrichissante !

A mes juges

Monsieur le Docteur Etienne Brochot
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de Virologie
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.
Je suis sûre que vous aurez un œil critique et averti sur ces travaux !

Madame le Docteur Karin Séron
Chargée de recherche
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Merci d'avoir accepté de me co-encadrer aux côtés d'Anne.
Ton sourire et ta bienveillance contribuent à une bonne entente.

Monsieur le Docteur Christophe Zawadzki
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hémostase
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.
Je vous témoigne ici tout mon respect.

A ma directrice de thèse

Madame le Professeur Anne Goffard

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Les mots me manquent pour t'exprimer toute ma gratitude.

Merci pour ta confiance, pour m'avoir rattrapée au vol.

Merci pour ta bienveillance et ton humanité.

Au laboratoire de Virologie Moléculaire et Cellulaire

A Jean,

Mon stage de master 1 m'avait laissé un souvenir impérissable.

Merci de m'accueillir de nouveau dans ton labo pour mon doctorat.

A Peggy,

Merci de m'avoir formée à la paillasse, au P2 jusqu'au P3 !

Merci pour ces midis et tes anecdotes à mourir de rire.

Aux manges-midis,

Esther et son post-it art,

Charline et son action/réaction à mes bourdes,

Virginie et ses blagues sur son téléphone,

Cyrine et ses pâtisseries,

Kari et son cheese cake vegan à la myrtille,

Malak and her real Lebanese tabbouleh,

Merci de me fait rire tous les jours, vous êtes au top !

A tout le labo,

La team corona et la team HEV :

Laurence, Sandrine et Yves, pour vos précieux conseils,

Cécile-Marie, pour ta douceur et ta gentillesse,

Muriel, pour partager ton bureau,

Lowiese et Claire, pour vos rires communicatifs,

Nath, pour le repas de Noël qui partirait aux oubliettes,
Adeline, pour être là, car quand t'es pas là, on est perdu,
Martin, pour tes gâteaux quand t'as trop de pommes,
Coline, pour tes babas au rhum,
Dylan, pour ton calme,
Soph, pour tes pas de dance,
Orféas, for your Greek accent,

Merci à tous !

Aux anciens du labo,

Thomas, Kevin, Nathan, Kari,

J'espère que les chemins que vous avez choisis
vous mèneront vers de beaux horizons.

Au laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire

A Monsieur le Professeur Claude Preudhomme,

Merci de m'avoir accueillie pour mon master 2.
Ce fut une expérience dont je ressors grandie !

A tous les biologistes,

Aux côtés desquels j'ai beaucoup appris.

A tous les techniciens,

Aïcha, Pauline, Marie-Pascale, Edith, Daniel et Carine,

Merci de m'avoir épaulée !
Je n'oublierai jamais.

A mes proches

A tous mes co-internes,

Et en particulier Tasnim et Eléonore,

Quand nos nerfs étaient à bout car, acide-base, c'est la base !

Camille,

Tu ne le sais pas mais tes blagues de canards laqués
sont arrivées à point nommé...
Au Than Than !!

Puis ceux dont j'ai croisé un bout de route : Pauline, Victoria, Fethi,
Adélaïde et j'en oublie...

A mes collègues de galère,

Farah et Julie,

Merci d'avoir rendu mes années de fac plus douces !

A mes amis,

Lisa,

Je ne te le dis pas assez, mais tu es une fille extraordinaire.
Tu m'as énormément appris.

Eva et Stéphane,

Vous êtes deux personnes en or.

Janine et Guy,

Merci d'avoir été comme une famille pour moi.

A ma famille

A ma mère,

Merci d'avoir toujours cru en moi.

A Peggy et Thomas, Jimmy et Dominique, et mes neveux et nièces,

Merci d'être toujours là.

A ma belle-famille,

Laurence et Fred,

Merci pour votre soutien infaillible.
Merci pour tout, vraiment.

A ma filleule,

Manon,

Je fais au mieux pour être une personne dont tu peux être fière
et qui puisse t'inspirer !

A toi

Walid,

Merci d'être fou avec Roro et de me faire rire.
Merci de me tirer vers le haut et d'être mon pilier dans la vie.
Merci pour ces belles années passées, et pour celles à venir...

A mes étoiles là-haut

Merci de m'éclairer quand tout est obscur.

ABBREVIATIONS

229Epp : pseudo-particules exprimant la protéine S du HCoV-229E
Ac : anticorps
ACE2 : *angiotensin-Converting Enzyme 2*
ADN : acide désoxyribonucléique
AMM : autorisation de mise sur le marché
ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN : acide ribonucléique
ATU : autorisation temporaire d'utilisation
CC50 : concentration cytotoxique 50
CD26 : cluster de différenciation 26
CDC : Centre de contrôle et de prévention des maladies
CMV : cytomégalovirus
COVID-19 : *Coronavirus Disease 2019*
Ctrl : contrôle
CYP : cytochromes
ERGIC : *ER (endoplasmic Reticulum) Golgi intermediate compartment*
EUL : *emerging use listing*
HAS : Haute Autorité de Santé
HC : hypericine
(H)CoV : coronavirus (humain)
HCoV-229E-luc : Virus recombinant HCoV-229E exprimant le gène de la luciférase
HCV : *Hepatitis C Virus*
HF : hyperforine
HIV-1 : *Human immunodeficiency virus 1*
HR1/2 : *heptad repeat 1 or 2*
HSV : Herpes simplex virus
IC_{50/90} : concentration inhibitrice 50 ou 90
Mb : membrane
MERS-CoV : *Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus*
Nsp : protéines non structurales
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : *open reading frame*
PI : post inoculation
RBD : *receptor binding domain*
RBM : *receptor binding motif*
RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
RT-qPCR : *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*
SARS-CoV-(2) : *Severe Acute Respiratory Syndrom Covonavirus (2)*
SARS2pp : pseudoparticules exprimant la protéine S du SARS-CoV-2
TMPRSS2 : *transmembrane protease serine 2*
UTR : *untranslated region*
VOCs : *variants of concern*
VOIs : *variants of interest*
VSV : virus de la stomatite vésiculaire

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	13
ABBREVIATIONS	19
SOMMAIRE	21
TABLE DES FIGURES	23
INTRODUCTION	25
I. Généralités	25
A) Les coronavirus	25
B) Epidémiologie	25
1) Distribution géographique des coronavirus humains	25
2) Réservoir et origine des coronavirus humains	27
3) Transmission	28
C) Clinique	28
1) Symptômes	28
2) Terrains particuliers	29
D) Diagnostic et dépistage	30
E) Structure de la particule virale	30
1) Organisation du génome viral	31
2) Protéines non structurales (nsp)	32
3) Protéines structurales	32
4) Protéines accessoires	36
F) Cycle de réplication viral des coronavirus	36
G) Vaccins	37
H) Variants	39
II. Traitements contre le SARS-CoV-2	40
A) Repositionnement de molécules	41
B) Traitements spécifiques	42
1) Inhibiteurs d'entrée	42
2) Inhibiteurs de la réplication	43
C) Molécules d'origine naturelle extraites de plantes	43
1) Activité antivirale des extraits de plantes	43
2) Millepertuis	44
D) Objectifs du projet	46
MATERIELS ET METHODES	47
A) Lignées cellulaires et culture cellulaire	47
B) Virus	47
C) Production de pseudo-particules	47
D) Test de viabilité cellulaire	48
E) Test d'inhibition de l'entrée des pseudo-particules	48
F) Test d'inhibition d'infection à HCoV-229E	48
G) Test d'inhibition d'infection à SARS-CoV-2	49
H) Test cinétique de l'inhibition de l'infection	49
I) Test de fusion	49
J) Western Blot	50
RESULTATS	51
A) Activité antivirale des principes actifs contre HCoV-229E	51
B) Activité antivirale des principes actifs contre SARS-CoV-2	52
C) Etude du mécanisme d'action	54
DISCUSSION	59
REFERENCES	63

TABLE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Distribution mondiale des HCoV.	26
<u>Figure 2</u> : Transmission inter-espèces des coronavirus humains.	28
<u>Figure 3</u> : Structure de la particule virale des coronavirus.	31
<u>Figure 4</u> : Organisation du génome du SARS-CoV-2.....	31
<u>Figure 5</u> : Fonctions des différentes protéines non structurales issues du clivage des polyprotéines pp1a et pp1b des coronavirus.....	32
<u>Figure 6</u> : Structure la glycoprotéine spike	33
<u>Figure 7</u> : Reconnaissance de la protéine S par le récepteur ACE2 et les héparanes sulfates.....	34
<u>Figure 8</u> : Schéma de la fusion virale avec la cellule hôte.....	35
<u>Figure 9</u> : Voies d'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte.....	37
<u>Figure 10</u> : Cycle viral des coronavirus.	38
<u>Figure 11</u> : Activité antivirale de l'hyperforine.....	51
<u>Figure 12</u> : Activité antivirale de l'hyperforine sur SARS-CoV-2.....	52
<u>Figure 13</u> : Activité antivirale de l'hypericine sur SARS-CoV-2.	53
<u>Figure 14</u> : Test de l'activité antivirale de l'hypericine en fonction de la lumière	54
<u>Figure 15</u> : Schéma du protocole de cinétique.	54
<u>Figure 16</u> : Etude du mécanisme d'action de l'hypericine et l'hyperforine par test de cinétique sur HCoV-229E.....	55
<u>Figure 17</u> : Effet de l'hypericine et de l'hyperforine sur l'entrée des SARS2pp et 229Epp.	55
<u>Figure 18</u> : Test de fusion cellulaire.....	56
<u>Tableau 1</u> : Récepteur cellulaire des coronavirus humains	34
<u>Tableau 2</u> : Les différentes technologies vaccinales contre le SARS-CoV-2	39
<u>Tableau 3</u> : Interactions médicamenteuses reportées avec <i>Hypericum perforatum</i> L.	45

INTRODUCTION

I. Généralités

A) Les coronavirus

Les coronavirus (CoV) font partis de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille de *Coronaviridae* et de la sous-famille de *Orthocoronavirinae*. En fonction de leur phylogénie, quatre genres ont été décrits : les *Alphacoronavirus* et *Betacoronavirus* responsables d'infections chez les mammifères, dont l'Homme ; et les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus* infectant les oiseaux (1).

B) Epidémiologie

1) Distribution géographique des coronavirus humains

Seuls 7 CoV sont capables d'infecter l'Homme (HCoV), et parmi lesquels on distingue les HCoV peu pathogènes (HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1), des HCoV hautement pathogènes (SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrom Covonavirus*), MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus*), SARS-CoV-2) (2). Initialement, les données virologiques sur les CoV intéressaient principalement la recherche vétérinaire puisqu'ils étaient à l'origine de lourdes conséquences économiques lorsque les élevages de porcs et de volailles étaient contaminés (3). En effet, c'est face à l'apparition des CoV hautement pathogènes et des pandémies associées que la recherche sur les CoV humains a explosé (4).

Fin 2002, le SARS-CoV a été isolé en Chine dans la province de Guangdong infectant plus de 8000 personnes à travers 25 pays. Depuis 2012, le MERS-CoV, initialement découvert à Jeddah en Arabie Saoudite, a infecté 2574 personnes et a tué 886 personnes (données de mars 2021). Enfin, le SARS-CoV-2, qui a émergé en décembre 2019 dans la province de Wuhan en Chine, a conduit à la pandémie mondiale en cours de la maladie COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) en touchant plus de 520 millions de personnes et en tuant plus de 6,3 millions de personnes (données de mai 2022) (5).

Les HCoV peu pathogènes ont une distribution mondiale (**Figure 1**) et sont principalement retrouvés pendant l'hiver dans les pays à climat tempéré, seul HCoV-NL63 a un pic d'activité pendant l'été (6).

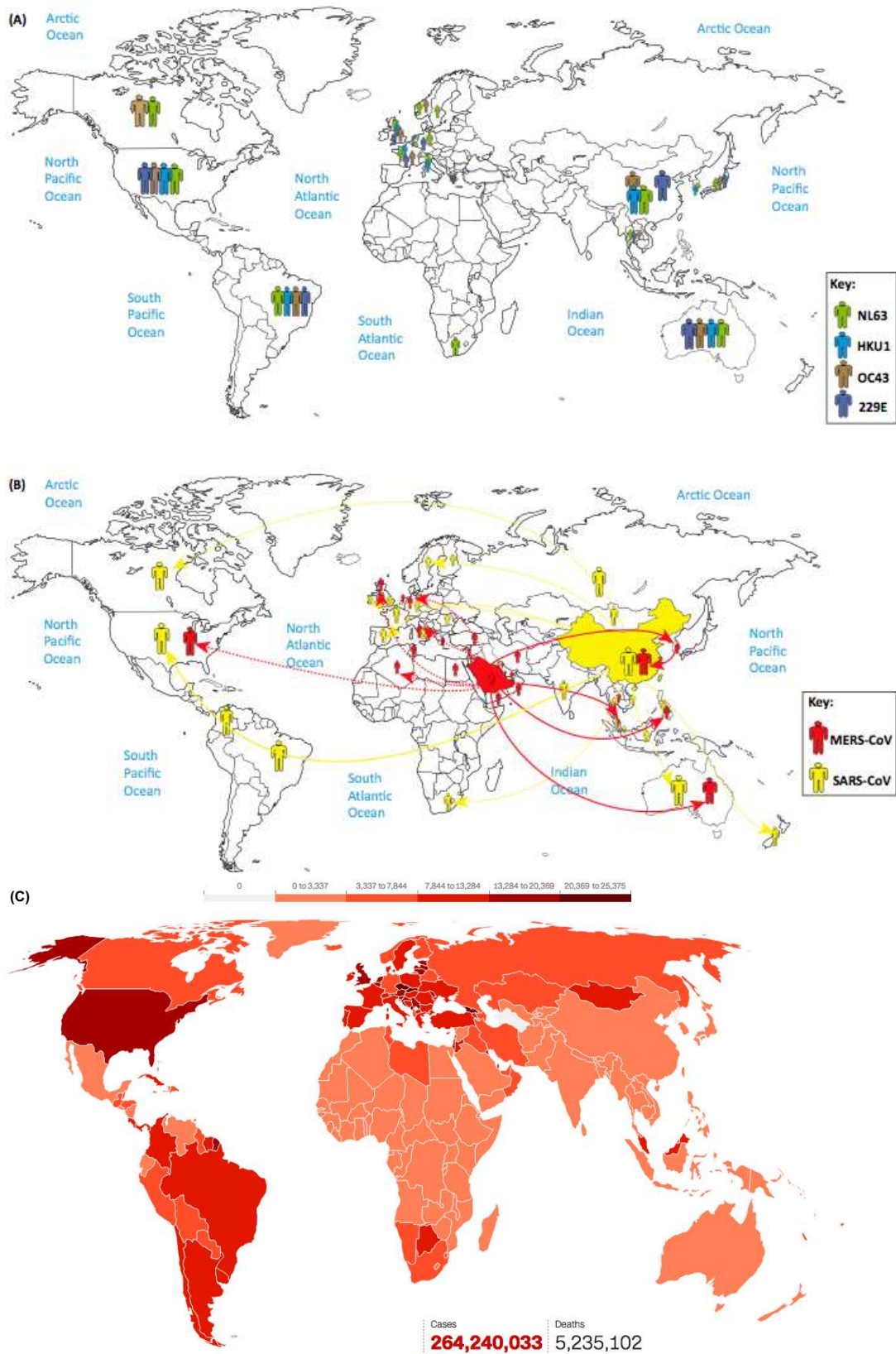


Figure 1: Distribution mondiale des HCoV. A) Distribution géographique des HCoV peu pathogènes. B) Distribution géographique de MERS- et SARS-CoV C) Distribution géographique de SARS-CoV-2 (6,7)

2) Réservoir et origine des coronavirus humains

Les HCoV peu pathogènes semblent avoir une origine zoonotique et n'avoir aucun réservoir animal. HCoV-229E est le premier HCoV à avoir été identifié. Il a été isolé pour la première fois en 1966. Puis en 1967 a été découvert le deuxième HCoV : HCoV-OC43. Tous deux sont endémiques sur la planète. Les deux derniers HCoV peu pathogènes ont été décrits plus récemment : en 2004 au Pays-Bas pour HCoV-NL63 et en 2005 à Hong-Kong pour HCoV-HKU1 (3,6).

Le réservoir du SARS-CoV serait la chauve-souris et l'hôte intermédiaire la civette (*Paguma larvata*) (**Figure 2**). Toutefois, des cas de contaminations directes entre la chauve-souris et l'Homme ont été observés avec des virus SARS-like montrant que la civette n'est pas un hôte intermédiaire obligatoire (8).

Concernant le MERS-CoV, la maladie est principalement retrouvée dans la péninsule arabique où vivent les dromadaires. Même si le MERS-CoV a pu être isolé dans des prélèvements nasaux de ces derniers, il existe de nombreux cas d'infection à MERS-CoV en l'absence de contact avec ces animaux (9,10). C'est pourquoi, il a été suggéré que la chauve-souris soit son réservoir naturel, au regard des études montrant la similitude du récepteur utilisé pour l'entrée virale (CD26 : cluster de différenciation 26). Toutefois, à ce jour, le MERS-CoV n'a encore jamais été isolé chez la chauve-souris (11). Une transmission interhumaine est également possible (12).

Finalement, pour le SARS-CoV-2, deux hypothèses ont été émises quant à son origine. La première étant une origine zoonotique. En effet, Wuhan, l'épicentre de l'épidémie, est populaire pour ses marchés d'animaux sauvages vivants comme la civette ou encore le chien viverrin. Les premiers cas rapportés de contamination par ce dernier étaient directement liés à ces lieux de vente d'animaux. Des virus apparentés au SARS-CoV-2 ont été isolés chez la chauve-souris en Asie du Sud Est. Et le virus le plus proche, RaTG13, a été retrouvé chez des chauve-souris de Yunnan laissant ainsi penser ces dernières seraient son réservoir. Néanmoins, des études phylogénétiques entre RaTG13 et le SARS-CoV-2 ont montré une divergence génétique de 4%, ce qui reflète des décennies d'évolution. Bien que RaTG13 ne soit pas le progéniteur du SARS-CoV-2, une origine zoonotique ne peut pas être écartée : en effet, il est possible que l'espèce ou la population animale n'ait pas encore été trouvée. L'autre théorie serait la fuite du virus d'un laboratoire de recherche. A ce jour, le seul exemple documenté d'un virus provoquant une pandémie et provenant d'un laboratoire de recherche est le virus H1N1. Il n'existe en

effet aucune donnée appuyant la thèse selon laquelle le SARS-CoV-2 se serait échappé d'un laboratoire ; d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), aucun cas de COVID-19 au sein de l'Institut de Virologie de Wuhan n'a été déclaré, laboratoire travaillant sur différents coronavirus. En outre, tout le personnel du laboratoire a été déclaré séronégatif en mars 2020 (13).

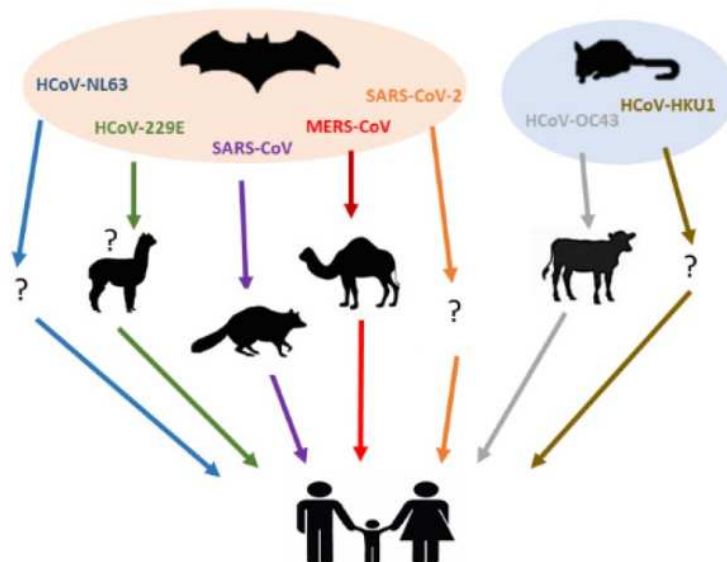


Figure 2 : Transmission inter-espèces des coronavirus humains (14).

3) Transmission

Les HCoV se transmettent principalement par voie respiratoire. Lorsqu'un patient infecté tousse, et éternue, il libère des microgouttelettes ou des aérosols contaminés qui vont infecter une autre personne à moins d'1 mètre pour les premières et à plus d'1 mètres pour les seconds (15). C'est pourquoi des gestes barrière ont été mis en place afin de limiter la propagation du virus : port du masque, nettoyage régulier des mains et distanciation sociale (16).

C) Clinique

1) Symptômes

Les HCoV peu pathogènes (HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1) engendrent après 2 à 5 jours d'incubation des symptômes principalement bénins : des atteintes respiratoires hautes (rhinites, laryngites) ou basses (bronchites, pneumopathies) parfois associées à de la fièvre. Il est difficile de les distinguer des autres pathogènes à l'origine d'infections du tractus respiratoire comme le virus de la grippe (influenza A) et les rhinovirus (6,17,18).

Les symptômes provoqués par les HCoV hautement pathogènes (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2) varient d'une forme asymptomatique à un tableau de

détresse respiratoire associé à des défaillances multiviscérales et dont l'issue peut être fatale. Les taux de mortalité pour le SARS CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2 sont respectivement de 9%, 36% et 1% (6,12,19,20).

Les patients atteints de COVID-19 peuvent être séparés en trois groupes selon la sévérité de la maladie : **1) COVID-19 non sévère** lorsqu'aucun signe clinique d'un COVID sévère ou COVID critique n'a été identifié ; **2) COVID-19 sévère** si la saturation en oxygène est inférieure à 90% associées à des signes de pneumonies voire de détresse respiratoire ; **3) COVID critique** lorsqu'il y a une détresse respiratoire aiguë associée à un sepsis et choc septique nécessitant une hospitalisation en réanimation (21).

2) Terrains particuliers

Les comorbidités ou traitements en cours sont des facteurs importants pour la prise en charge de la maladie à COVID-19. Les données actuelles montrent que le facteur le plus fortement associé à un risque d'hospitalisation ou de décès est l'âge du patient. En outre, les autorités compétentes comme l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS)-Maladies infectieuses émergentes, ont statué sur les comorbidités identifiées comme à risque d'hospitalisation ou de décès, indépendamment de l'âge. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), par exemple, a publié un rapport de l'étude EPI-PHARE (en collaboration avec la Caisse Nationale d'Assurance Maladie) en juillet 2021 dans lequel elle listait les comorbidités particulièrement à risque de complication de la maladie COVID-19 (22) :

- La trisomie 21
- Le retard mental
- La transplantation rénale
- La transplantation pulmonaire
- L'insuffisance rénale en dialyse
- Le cancer actif du poumon
- Le diabète de type 2
- L'obésité
- L'hypertension artérielle compliquée
- Les maladies cardiovasculaires
- Les maladies respiratoires chroniques (ex : mucoviscidose)
- Les maladies neuro-dégénératives (ex : schizophrénie)
- Cancers et maladies hématologiques malignes actifs et depuis moins de 3 ans.

Même si la maladie COVID-19 est la plupart du temps bénigne, il convient de dépister massivement la population afin de protéger ces personnes à risque.

D) Diagnostic et dépistage

Le diagnostic des infections à HCoV, notamment hautement pathogènes, s'avère essentiel pour la gestion de la clinique et le contrôle épidémiologique des HCoV.

Différentes méthodes de diagnostic pour détecter le SARS-CoV-2 ont été développées, mais la méthode de référence reste la RT-qPCR (réaction de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne quantitative) du fait de sa haute sensibilité. Elle repose sur l'amplification de l'ARN viral des HCoV dans les échantillons biologiques de patients (prélèvement oro- ou naso-pharyngé principalement). D'autre part, les tests antigéniques sont également très utilisés, ils permettent en effet d'obtenir un résultat très rapidement. Bien que ces tests aient une bonne spécificité, leur limite reste leur sensibilité qui entraînent des faux négatifs. Des tests sérologiques ont également été développés mais sont moins utilisés que la RT-qPCR et les tests antigéniques car la cinétique d'apparition des anticorps ne permet pas un diagnostic lors de la phase aiguë de la maladie, donc lorsque le patient est contagieux. D'autres méthodes sont disponibles, mais restent néanmoins anecdotiques, comme la PCR digitale où l'échantillon est fractionné en nombreuses gouttelettes, et dans chacune d'entre elles une réaction PCR est effectuée. Cette méthode offre une très grande sensibilité, mais reste toutefois plus coûteuse que la RT-qPCR (23).

E) Structure de la particule virale

L'enveloppe virale des CoV est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les protéines virales : la protéine de spicule (ou spike, S), la protéine de membrane M et la protéine E pour l'enveloppe. Le terme « coronavirus » fait référence à son aspect en couronne, en microscopie électronique, conférée par l'organisation trimérique de protéine S. A l'intérieur de l'enveloppe, la protéine de la nucléocapside N est liée à l'ARN viral formant une capsidale hélicoïdale (**Figure 3**).

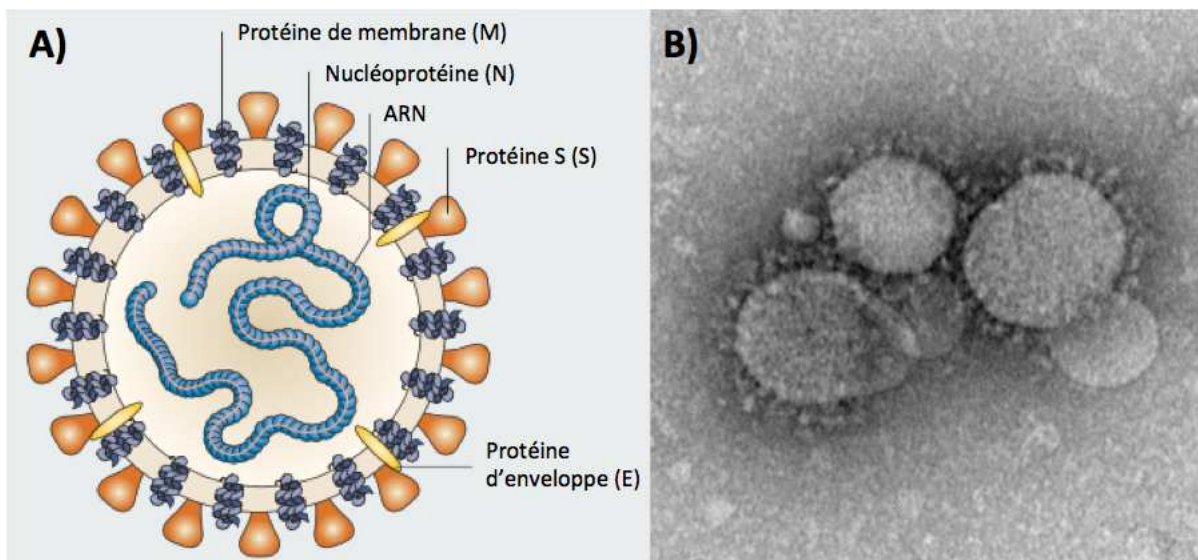


Figure 3 : Structure de la particule virale des coronavirus. A) Représentation schématique de la particule virale. B) Virion du MERS-CoV observé en microscopie électronique par coloration négative (24,25).

1) Organisation du génome viral

Les CoV ont la particularité d'avoir le plus long génome parmi les virus humains à ARN : en effet, il est constitué de 27 000 à 32 000 bases, selon les virus. Il s'agit d'un ARN simple brin de polarité positive coiffé en 5' et polyadénylé en 3'.

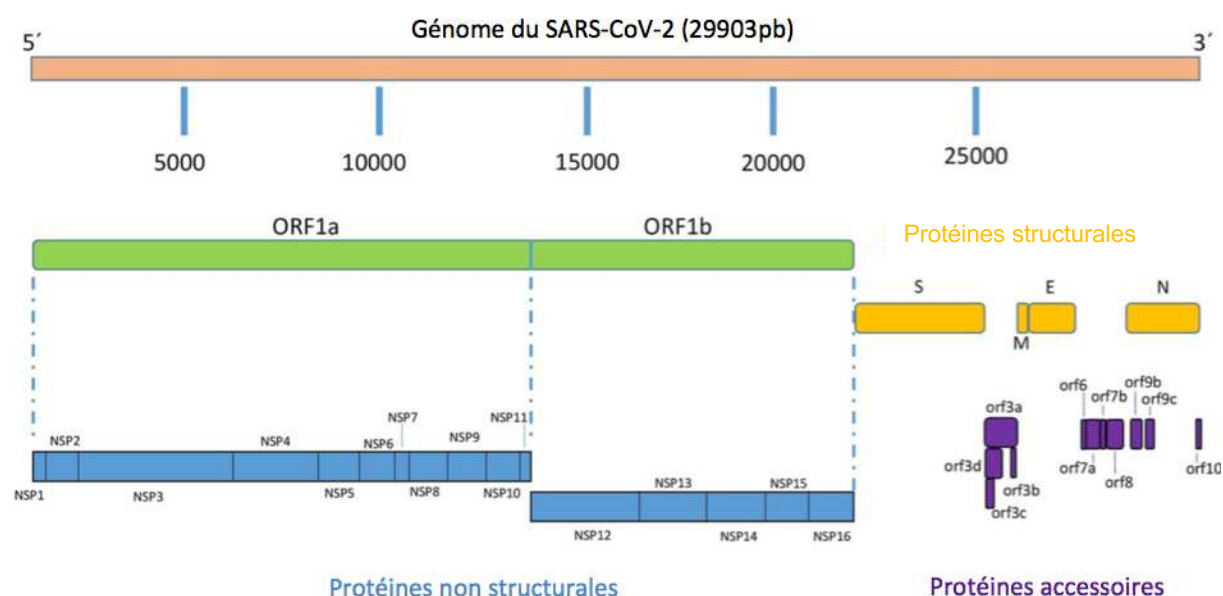


Figure 4 : Organisation du génome du SARS-CoV-2. Le génome est constitué de deux parties non codantes en 5' et 3' appelées UTR (*untranslated regions*), de deux cadres de lecture ORF1a et ORF1b. Les gènes des protéines structurales, à l'extrémité 3' sont espacés par les gènes codants pour les protéines accessoires (26).

Le génome est constitué de plus de dix cadres de lectures ouverts (ORF : *open reading frame*) avec, généralement, pour chacun d'entre eux, un codon d'initiation de traduction et un codon de terminaison. Les ORF1a et ORF1b occupent à eux seuls plus de deux tiers du génome et codent des polyprotéines (pp1a et pp1ab). Celles-ci sont les précurseurs d'une quinzaine de protéines non structurales (nsp) impliquées dans la réplication : elles seront produites après clivage de pp1a et

pp1ab. Ces protéines non structurales vont former le complexe réplicase-transcriptase en s'assemblant. Le dernier tiers du génome code les protéines structurales S, M, N et E. Cet ordre dans l'organisation du génome 5'-réplicase-S-M-N-E-3' est conservé parmi tous les CoV (**Figure 4**) (27).

2) Protéines non structurales (nsp)

Les 16 nsp sont le résultat du clivage des deux polyprotéines pp1a et pp1b par deux cystéine-protéases, nsp3 (papain-like protease : PL^{PRO}) et nsp5 (chymotrypsin-like protease, M^{PRO}). Ces nsp sont impliquées dans le complexe de réplication associé à l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp ou nsp12) avec des fonctions qui leur sont propres (**Figure 5**) (28).

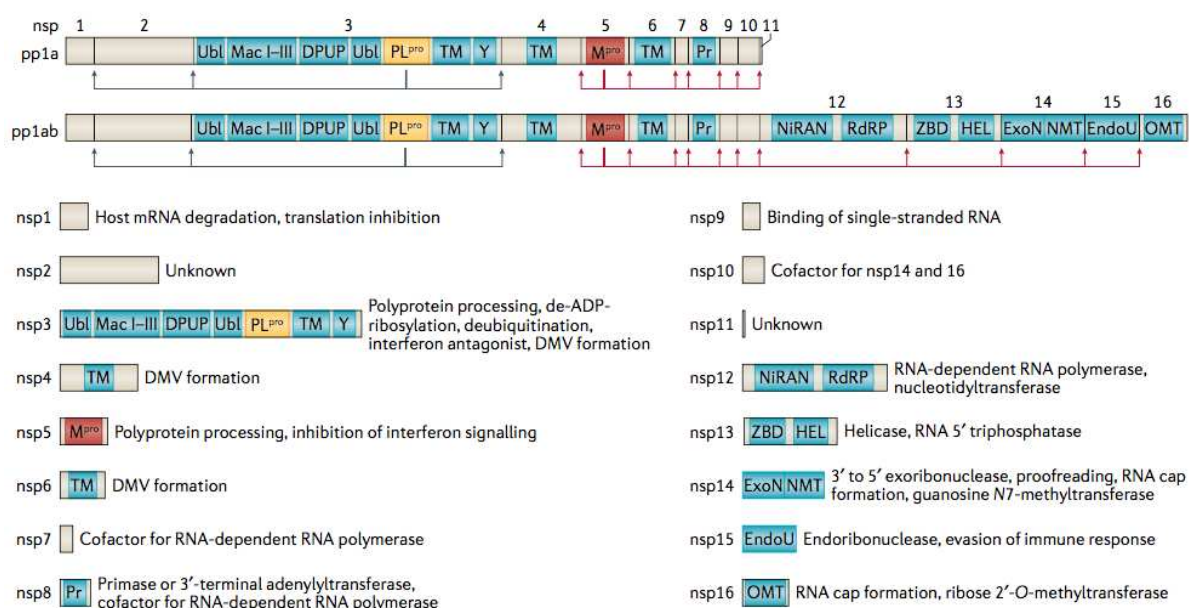


Figure 5 : Fonctions des différentes protéines non structurales issues du clivage des polyprotéines pp1a et pp1b des coronavirus (28).

3) Protéines structurales

a) Protéine S

La protéine S est une protéine transmembranaire de type I hautement glycosylée intervenant dans l'attachement du virus aux cellules hôtes et la fusion des membranes virale et cellulaire (**Figure 6**).

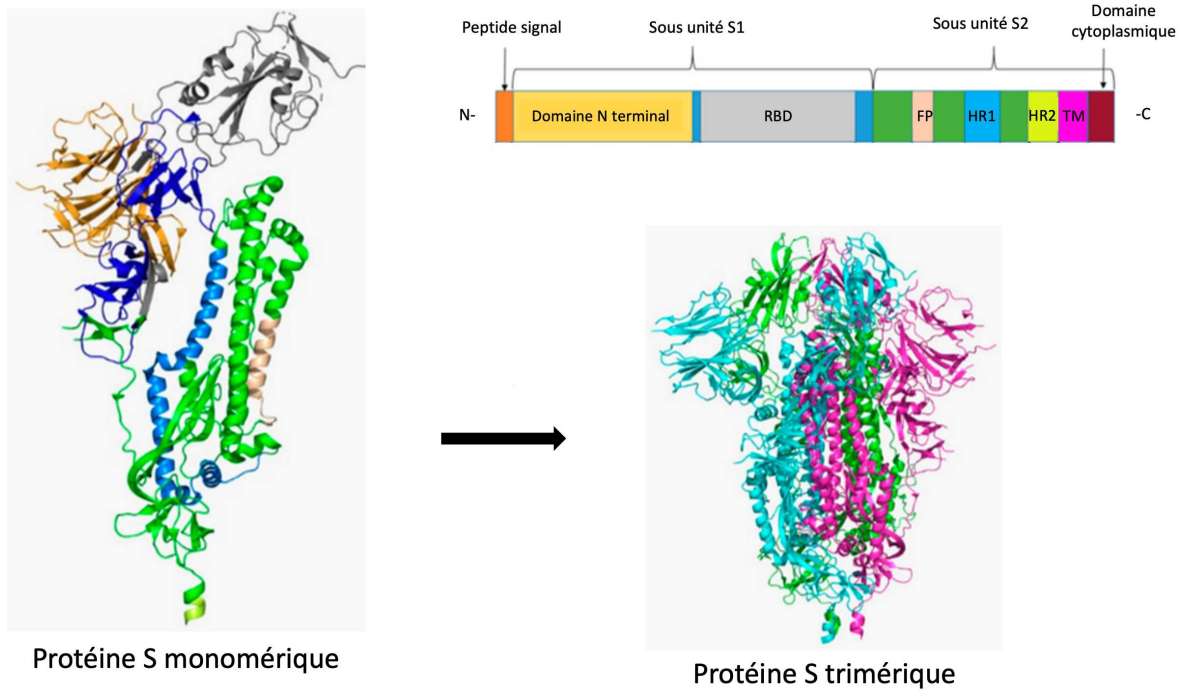


Figure 6 : Structure la glycoprotéine spike (29).

Avant la glycosylation, les monomères ont une masse de 128 à 160 kDa, tandis que celle des formes glycosylées est de l'ordre de 150 à 200 kDa. Selon les souches, elle possède entre 21 et 35 sites de glycosylations, et concernant le SARS-COV-2, il existe 2 sites potentiels de O-glycosylation et 22 sites de N-glycosylation (30–32).

La majeure partie de la glycoprotéine se trouve à l'extérieure du virion : il s'agit de la partie N-terminale. La partie C-terminale est un petit segment qui constitue le domaine transmembranaire et l'endodomaine (30,33).

Sur le plan fonctionnel, la protéine S peut être divisée en deux sous-unités : la sous-unité S1 impliquée dans la reconnaissance du récepteur et la sous-unité S2 importante pour la fusion des membranes virale et cellulaire et l'ancrage de la protéine S sur la particule virale.

La sous-unité S1, située à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine S, contient deux domaines de liaison au récepteur (RBD : *Receptor Binding Domain*) : le domaine NTD du côté N-terminal et le domaine CTD du côté C-terminal. Au sein du RBD, les résidus permettant l'interaction avec ceux du récepteur qui constituent le motif de liaison au récepteur (RBM : *Receptor Binding Motif*) (**Figures 6 et 7, Tableau 1**). A proximité de ce dernier, sont exprimés des héparanes sulfates qui, en se liant à la protéine S, entraînent un changement conformationnel de celle-ci. Elle sera dans une conformation dite « ouverte », facilitant la liaison au récepteur (**Figure**

7). L'implication de ces héparanes sulfates ont été notamment décrits pour SARS-CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2 (34,35)

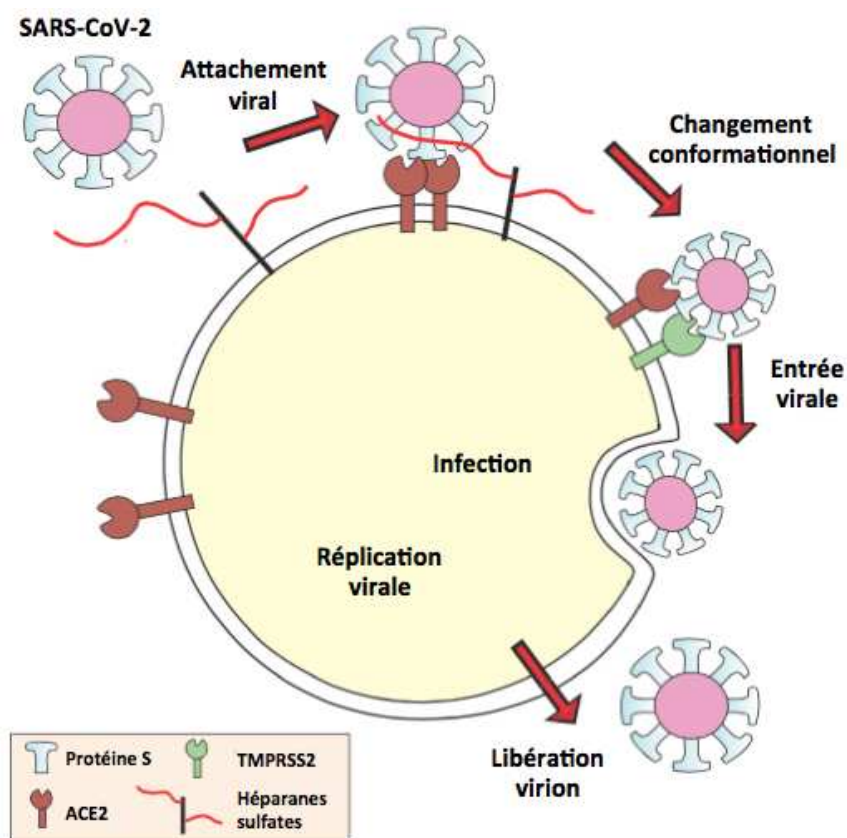


Figure 7 : Reconnaissance la protéine S par le récepteur ACE2 et les héparanes sulfates. Le RBD de la protéine S interagit avec les héparanes sulfates situés à proximité du récepteur ACE2. Ceci permet un changement conformationnel de la protéine S afin de faciliter la liaison à ACE2 (34).

Tableau 1 : Récepteur cellulaire des coronavirus humains (31,36,37).

ESPECES	RECEPTEUR
SARS-CoV	ACE2
SARS-CoV-2	ACE2
MERS-CoV	DPP4
HCoV-229E	Aminopeptidase N (APN)
HCoV-NL63	ACE2
HCoV-OC43	Neu 5, 9 Ac2 (acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique)
HCoV-HKU1	Neu 5, 9 Ac2 (acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique)

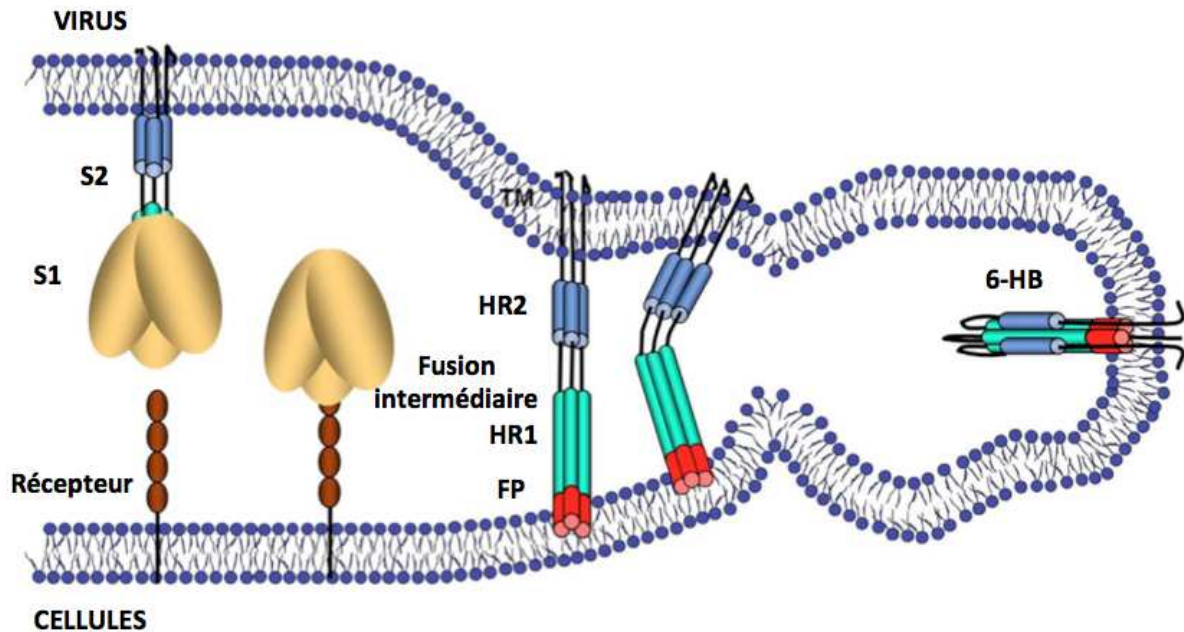


Figure 8 : Schéma de la fusion virale avec la cellule hôte. Le domaine S1 de la glycoprotéine S va reconnaître le récepteur présent sur la membrane cellulaire. Puis, après clivage par les protéases, les domaines S1 et S2 sont dissociés. Le domaine S2 va s'insérer dans la membrane de la cellule hôte grâce au peptide de fusion. Enfin, les membranes cellulaire et virale vont s'approcher pour fusionner grâce aux *heptad repeat 1 et 2* (HR1 et HR2) (38). FP : peptide de fusion, 6-HB : *6-helix bundle*.

La sous-unité S2 est quant à elle impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires. Lorsque la glycoprotéine S est clivée par les protéases membranaires ou endosomales (*cf* cycle viral), les domaines S1 et S2 sont dissociés. La sous-unité S2, qui contient le peptide de fusion, va s'insérer dans la membrane de la cellule et les *heptad repeat 1 et 2* (HR1 et HR2) vont permettre le rapprochement des membranes cellulaire et virale. La protéine subit un changement conformationnel en formant un faisceau à 6 hélices (*6-helix bundle*) (38) (**Figure 8**).

b) Protéine M

La glycoprotéine M est la protéine structurale la plus abondante au sein de la particule virale. Elle est caractérisée par un très court endodomaine à son extrémité N-terminale, suivi de trois domaines transmembranes avec une longue extrémité C-terminale représentant plus de la moitié de la protéine. Du fait de son interaction avec les autres protéines structurales, elle joue un rôle central dans l'assemblage de la particule virale (27).

c) Protéine N

La protéine N, dont la taille est d'environ 50 kDa, possède des sites riches en arginine et en lysine permettant de se lier l'ARN. En effet, son rôle est d'encapsider le génome viral dans une nucléocapside hélicoïdale (30).

d) Protéine E

La protéine E est la protéine la moins abondante au sein de la particule virale. Il s'agit d'une petite protéine de 8 à 12 kDa. Son rôle reste encore à démontrer, mais au regard de son activité de canal ionique, il a été suggéré qu'elle participe à la sécrétion de nouveaux virions (39,40).

4) Protéines accessoires

Outre les protéines structurales et non structurales, il existe les protéines accessoires. Celles-ci ne semblent pas être essentielles pour la réplication virale, toutefois, elles joueraient un rôle primordial dans la pathogenèse des CoV et notamment dans les interactions hôte-virus (41). En effet, parmi les *variants of concern* du SARS-CoV-2 (VOCs) (*cf* I. G) Vaccins), des mutations au sein de ces protéines accessoires ont été retrouvées et leur impact sur la physiopathogénèse de l'infection sont en cours d'étude (42).

F) Cycle de réplication viral des coronavirus

L'entrée peut se faire selon deux voies : **1)** si certaines protéases, comme TMPRSS2 (*transmembrane protease serine 2*), sont exprimées à la surface de la cellule hôte, l'enveloppe virale et la membrane cellulaire fusionnent, **2)** mais lorsque ces protéases sont absentes, le virus entre par voie endosomale durant laquelle les protéases endosomales (furine, cathepsine) vont initier la fusion de l'enveloppe virale avec celle de l'endosome (**Figure 9**).

Le virus libère alors son génome dans le cytoplasme de la cellule-hôte pour être traduit en nsp. Celles-ci vont former les complexes de réplication permettant la synthèse d'ARN génomique qui sera ultérieurement incorporé dans les nouveaux virions. Les protéines structurales sont traduites à partir d'ARN subgénomiques. Enfin, les nouveaux virions bourgeonnent à partir de la membrane du compartiment réticulum endoplasmique et le Golgi (ERGIC) avant d'être sécrétés (**Figure 10**).

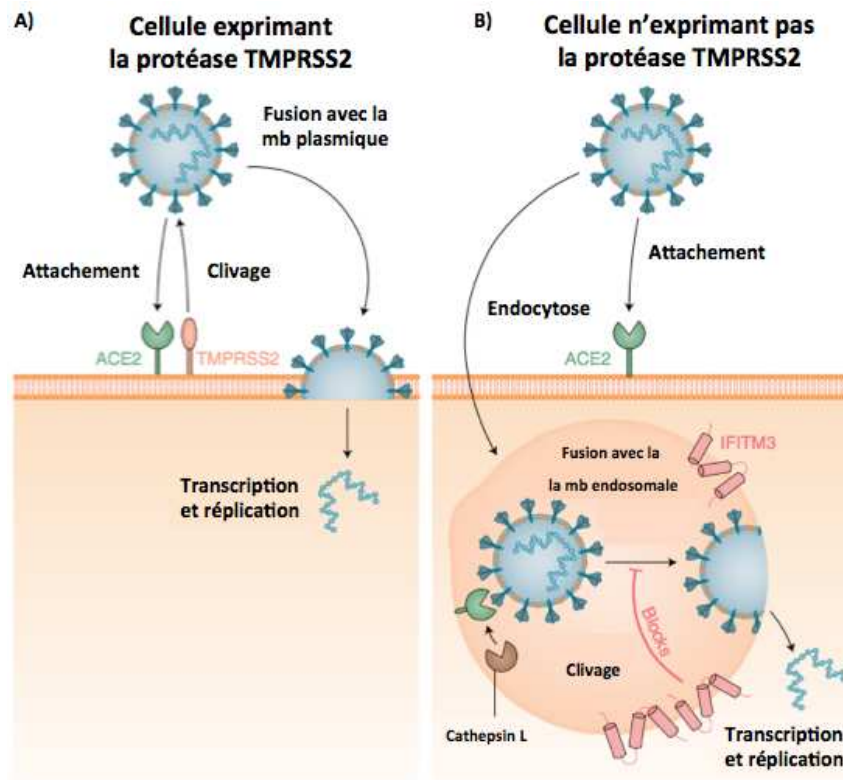


Figure 9 : Voies d'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte. **A)** Lorsque la protéase TMPRSS2 est exprimée à la surface de la membrane de la cellule hôte, elle va cliver la glycoprotéine S initiant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. **B)** Si la cellule hôte n'exprime pas la protéase TMPRSS2, alors le virus entre par voie endosomale et c'est le pH acide de l'endosome qui active le clivage de la glycoprotéine S par les cathepsines. La membrane virale fusionne alors avec la membrane cellulaire (43). Mb : membrane

G) Vaccins

La vaccination a une place majeure dans la gestion des maladies infectieuses puisqu'elle a permis historiquement d'endiguer les pandémies de variole ou de poliomyélite mais aussi de lutter contre les épidémies de grippe ou plus récemment de virus Ebola en Afrique de l'Ouest (44–46). La vaccination conduit à une immunisation active sans pathologie. En effet, le vaccin est une source d'antigènes induisant une réponse immunitaire spécifique (humorale ou cellulaire) lorsqu'ils sont administrés chez l'humain ou les animaux. Les lymphocytes B et T naïfs rencontrent l'antigène pour la première fois lors de la réponse primaire : les lymphocytes B vont subir dans les organes lymphoïdes secondaires une hypermutation somatique puis une commutation isotypique aboutissant à la production de plasmocytes produisant des anticorps affins contre l'antigène et de lymphocytes B mémoires. Les lymphocytes T vont se différencier en lymphocytes T effecteurs cytotoxiques ou producteurs de cytokines ou en lymphocytes T mémoires. Ainsi, lorsqu'un individu vacciné rencontrera l'agent infectieux ou lors d'une seconde injection vaccinale, sa réponse immunitaire dite secondaire sera plus forte et plus rapide grâce à l'activation des lymphocytes T et B mémoires (47).

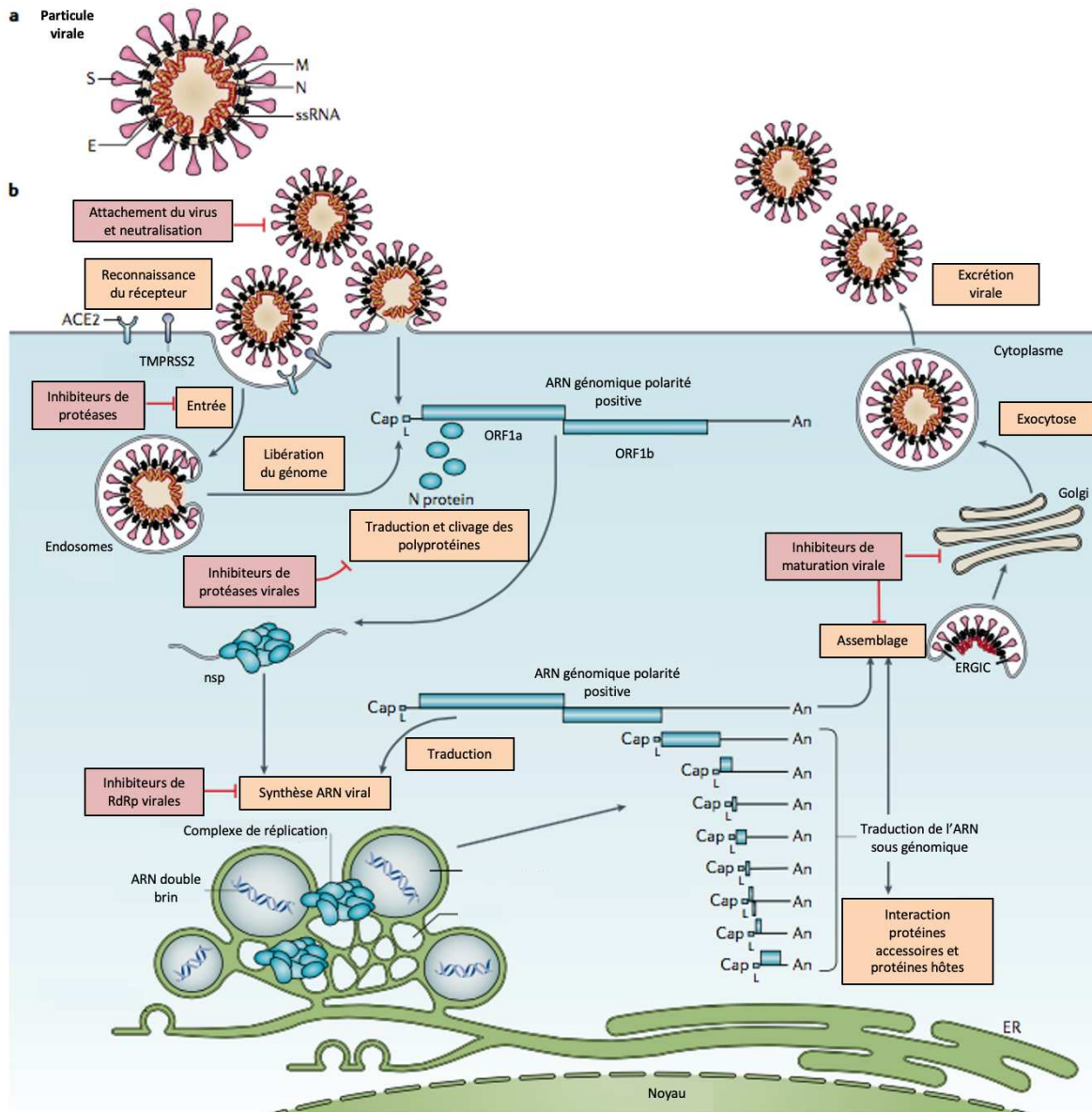


Figure 10 : Cycle viral des coronavirus (28). An : queue polyadénylée ; Cap : coiffe ; ER : réticulum endoplasmique ; ERGIC : *ER golgi intermediate compartment* ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendant ; ssRNA : ARN simple brin.

Les vaccins ont une efficacité directe, c'est-à-dire qu'ils protègent la population vaccinée en réduisant en son sein l'incidence de la maladie ainsi que l'apparition de forme grave, et *in fine* la mortalité liée à la maladie. Toutefois, certains individus vulnérables (allergiques à un composant du vaccin, ou souffrants de certaines affections contre indiquées) peuvent se voir refuser la vaccination. C'est pourquoi il est important que la couverture vaccinale de la population soit maximale. Effectivement, plus la proportion d'individus vaccinés dans la population est grande, moins l'agent infectieux circule car la création de longue chaîne de transmission n'est plus possible : il s'agit de l'immunité grégaire ou collective (48–50).

Six grandes technologies vaccinales sont actuellement disponibles contre le SARS-CoV-2 : 1) les vaccins inactivés 2) les vaccins vivants atténués 3) les vaccins

à vecteur viral 4) les vaccins vivants purifiés 5) les vaccins à ADN ou ARN 6) les nanovaccins (51,52).

Dans le cadre d'une autorisation d'utilisation d'urgence au titre de protocole EUL (*emerging use listing*), l'OMS a autorisé l'utilisation de 10 vaccins dont ceux de Pfizer (BNT162b2), d'AstraZeneca/Oxford et Ad26.CoV2.S développé par Janssen, 20 autres sont en cours d'évaluation par l'OMS (53).

Tableau 2 : Les différentes technologies vaccinales contre le SARS-CoV-2 (51,52)

TECHNOLOGIE	TYPE DE VACCIN	EXEMPLE
Agent pathogène entier	<i>Vaccins inactivés</i>	CoronaVac (Sinovac Biotech)
	<i>Vaccins vivants atténués</i>	TNX-1800 (Tonix Pharmaceuticals)
	<i>Vaccins à vecteur viral</i>	AZD1222 (AstraZeneca) ChAdOx1_nCoV-19 (AstraZeneca) JNJ-78436735 (Johnson & Johnson) Sputnik V (Gamaleya Research Institute)
Sous unité du pathogène	<i>Vaccins vivants purifiés</i>	COVID-19 S Trimer (GlaxoSmithKline and Clover Biopharmaceuticals) Abdala (CIGB)
Approche génétique	<i>Vaccins à ADN</i>	GX-19 (Genexine consortium)
	<i>Vaccins à ARN</i>	BNT162 (Pfizer BioNTech) mRNA-1273 (Moderna)
Nanovaccin		NVX-CoV2373 (Novavax)

H) Variants

Bien que les CoV aient des mécanismes de relecture génétique, leur taux de mutation reste élevé par rapport aux autres virus à ARN simple brin : ceci étant facilité par la taille de leur génome. Leur évolution est donc déterminée par l'apparition de mutations et de recombinaisons génétiques conditionnant ainsi leur virulence, leur antigénicité et le tropisme cellulaire (54). L'apparition de variants a induit un échappement à l'effet neutralisant des anticorps développés suite à la vaccination ou lors d'une infection naturelle. En effet, les mutations acquises, notamment au sein de la protéine S, ont conduit à une diminution de l'affinité des anticorps neutralisants pour cette dernière (55).

Le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies (CDC) et l'OMS ont défini deux groupes de variants : les variants préoccupants (VOCs : *variants of concern*) et les variants à suivre (VOIs : *variants of interest*). C'est grâce au dépistage massif et au séquençage des échantillons que l'on peut suivre l'arrivée de nouveaux variants.

Les VOCs sont au nombre de 5 à ce jour : le variant *Alpha*, devenu majoritaire très rapidement au début de la pandémie, en mars 2020 ; les variants *Beta* et *Gamma* apparus début 2021 ; le variant *Delta* devenu majoritaire en mai 2021 ; et enfin le variant *Omicron* identifié en novembre 2021. Les VOCs sont les variants ayant un impact majeur sur la pandémie à SARS-CoV-2 :

- Ils augmentent la transmissibilité ou ont un impact épidémiologique sur la maladie COVID-19
- Ils augmentent la gravité ou le tableau clinique
- Ils diminuent l'efficacité des mesures de contrôle (vaccination, gestes barrières, thérapeutique ou tests diagnostiques)

Les VOIs sont quant à eux caractérisés par un changement phénotypique par rapport au virus de référence ou par l'apparition de mutations détectées dans plusieurs pays ou alors pouvant être à l'origine d'une transmission communautaire ou clusters (56).

II. Traitements contre le SARS-CoV-2

Malgré la vaccination, le développement de traitements spécifiques contre l'infection à SARS-CoV-2 est nécessaire, notamment pour la prise en charge de patients à risque de formes graves et face à l'apparition de nouveaux variants. De nombreuses études cliniques sont en cours : le 11 février 2022, 7518 études sont recensées sur le site clinicaltrials.gov avec 842 en phase III et 241 en phase IV. Cette partie a pour objectif de résumer les différentes molécules pour lesquelles la Haute Autorité de Santé (HAS) et / ou l'ANSM ont rendu un avis **favorable** ou **défavorable** dans la prise en charge des patients atteints de la maladie COVID-19 (57).

A) Repositionnement de molécules

Au regard de l'ampleur de la pandémie, le repositionnement de molécules déjà existantes a semblé être une stratégie rapide pour trouver un traitement. Bien qu'efficaces *in vitro*, certaines d'entre elles n'ont pas passé le stade des essais cliniques avec des résultats concluants. Suite à l'essai clinique SOLIDARITY, aucun des 4 médicaments de repositionnement (**Hydroxychloroquine, lopinavir/ritonavir, remdesivir, et l'interféron-β-1a**) n'a pas montré une réduction significative de la mortalité, de l'initiation de la ventilation ou encore de la durée d'hospitalisation. S'appuyant sur les résultats de SOLIDARITY et d'autres essais cliniques (ACTT-1 etc.), l'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) du **remdesivir** obtenue en juillet 2020 pour le traitement du COVID-19 a été arrêtée en octobre 2020. **L'ivermectine**, antiparasitaire agissant par paralysie musculaire des nématodes et arthropodes, n'est pas recommandé en cas d'infection à SARS-CoV-2. En effet, les concentrations actives observées *in vitro* sont beaucoup plus élevées que celles utilisées sur les nématodes. Il semble donc difficile d'atteindre *in vivo* des concentrations pulmonaires actives. Le **molnupiravir**, antiviral à large spectre initialement destiné à traiter la grippe et les hépatites à HCV (*Hepatitis C Virus*), s'est vu refuser son autorisation d'accès précoce en décembre 2021. La HAS a considéré qu'il existait déjà un traitement approprié et innovant pour l'indication à laquelle il était destiné, à savoir le traitement des formes légères et modérée de la maladie de COVID-19 : il s'agit de l'association du casirivimab et de l'imdevimab (cf II. B) 1) Inhibiteurs d'entrée) (58–60).

L'utilisation des **glucocorticoïdes** a été mise en avant au regard de leurs effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. Ils sont depuis longtemps très largement utilisés dans le cas d'affections rhumatologiques, affections de la peau, d'hypersensibilité, d'asthme ou encore de bronchopathie chronique obstructive. Dans le cadre d'une infection à SARS-CoV-2, la réponse immunitaire est dérégulée et induit un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Le **dexaméthasone**, glucocorticoïde d'action prolongée, a montré un impact positif sur la sortie de l'hospitalisation chez les patients sous oxygénothérapie et d'autre part une réduction de la mortalité à 28 jours (61,62).

Quant à l'**héparine**, celle-ci a été proposée comme thérapeutique : en plus de son effet anti inflammatoire et anticoagulant, elle pourrait théoriquement jouer le rôle de leurre antigénique, en agissant comme un inhibiteur compétitif de l'entrée virale et ainsi diminuer l'infection (35). A ce jour, aucunes données publiées n'a permis de

conclure à une amélioration de la survie des patients hospitalisés traités à l'héparine ou une amélioration de la survie en utilisation prophylactique (63,64).

Finalement, l'anticorps monoclonal **tocilizumab** a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne en décembre 2021 suite à l'essai clinique RECOVERY qui a permis de conclure à un intérêt chez les patients hospitalisé en hypoxie et avec preuve d'inflammation. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre les récepteurs solubles de l'IL6 humaine (cytokine pro-inflammatoire). Il est à ce jour utilisé dans le cadre de diverses pathologies inflammatoires (65).

B) Traitements spécifiques

1) Inhibiteurs d'entrée

Pour les patients à très haut risque de forme sévère de COVID-19 (*cf* I. C) 2) Terrains particuliers) ou les patients immunodéprimés séronégatifs après un schéma vaccinal complet, l'association **casirivimab** et **imdevimab** peut être administrée par voie systémique. Ce sont des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine S du SARS-CoV-2. Au regard des conclusions de l'ANSM quant à l'efficacité et la sécurité présumées de cette spécialité, la HAS a émis un avis positif pour la demande d'autorisation d'accès précoce pré-AMM. D'autre part, cette association d'anticorps monoclonaux dispose également d'une ATU de cohorte pour les sujets à risque de complications du COVID-19 (obésité, BPCO, etc..) et les sujets de plus de 80 ans (58).

L'association **tixagévimab** et **cilgavimab** s'est vue accordée l'autorisation d'accès précoce pré-AMM en décembre 2021 en prophylaxie chez les patients adultes non répondeurs après schéma vaccinal complet ou non éligibles à la vaccination et à risque de forme sévère. Il s'agit d'anticorps monoclonaux recombinant IgG1k isolés à partir de cellules de patients convalescents spécifiquement dirigés contre deux épitopes distincts et situés sur des régions non chevauchantes du RBD de la glycoprotéine S inhibant ainsi l'entrée virale (66).

L'anticorps monoclonal **sotrovimab** a obtenu une autorisation d'accès précoce post-AMM après avoir obtenu une AMM en décembre 2021 pour le traitement des adultes et adolescents atteints de la maladie COVID-19 ne nécessitant pas d'oxygénothérapie mais à risque de développer une forme sévère. Le sotrovimab est un anticorps monoclonal IgG1k d'origine humaine dirigé contre un site hautement conservé du RBD du SARS-CoV-2. Il semble donc avoir une efficacité conservée contre les variants (67).

L'anticorps polyclonal **XAV-19**, une **Immoglobine G porcine anti-SARS-2**, s'est vu refuser l'autorisation d'accès précoce dans le cas de traitement des atteintes pulmonaire modérées dues à la maladie COVID-19 chez les patients adultes nécessitant une oxygénothérapie à bas débit au regard des résultats de l'essai clinique Polycor. XAV-19 n'a en effet pas réussi à démontrer la diminution du risque d'échec respiratoire (68).

2) Inhibiteurs de la réplication

L'association **nirmatrelvir** (PF-07321332) / **ritonavir** (Paxlovid) a obtenu un avis favorable à l'autorisation d'accès précoce pré-AMM en janvier 2022 dans le cadre du traitement de la COVID-19 chez les adultes ne nécessitant pas d'oxygénothérapie mais à risque d'évoluer vers une forme grave. La molécule PF-07321332 est un nouvel antiviral anti-SARS-CoV-2 administré *per os*. Il s'agit d'un inhibiteur peptidomimétique spécifique de la protéase M^{PRO} des CoV y compris celle du SARS-CoV-2. L'inhibition de la protéase M^{PRO} la rend incapable de traiter les précurseurs polyprotéiques pp1a et pp1b, notamment, inhibant ainsi la réplication virale. L'association avec le ritonavir, puissant inhibiteur du CYP3A4, permet d'inhiber le métabolisme du PF-07321332 par le CYP3A4 et donc de prolonger sa demi-vie (69).

C) Molécules d'origine naturelle extraites de plantes

1) Activité antivirale des extraits de plantes

Parallèlement au développement d'agents antiviraux d'origine synthétique, la recherche de substances naturelles à visée thérapeutique s'avère être une alternative de choix dans la réponse à la pandémie à SARS-CoV-2. L'OMS estime que plus de 80% de la population a recours à des plantes médicinales en automédication. Par ailleurs, les plantes représentent en effet une source de molécules antivirales très actives (70). Quelques-unes ont déjà été identifiées comme étant actives *in vitro* contre le SARS-CoV : *Ungernia trisphaera* Bunge (*Lycoris radiata* Mig.), *Artemisia annua* L., *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farw., *Lindrera aggregata* (Sims) Kosterm., entre autres. Des études *in silico* semblent déjà indiquer que de nombreux extraits de plantes pourraient être actifs contre le SARS-CoV-2 (71,72). Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur différents extraits de plantes potentiellement actifs sur les HCoV : le phéophorbide A, isolé d'un extrait de plante médicinale ivoirienne, est l'une des premières molécules d'origine naturelle

ayant été identifiées comme actives contre le SARS-CoV-2, et plus généralement sur les virus enveloppés (73).

2) Millepertuis

Après avoir criblé de nombreuses molécules d'origine naturelle sur HCoV-229E, l'hyperforine et l'hypericine semblent être de nouveaux antiviraux prometteurs. Ce sont des principes actifs principalement retrouvés dans les millepertuis.

Les millepertuis forment le genre *Hypericum* et appartiennent à la famille des Hypericaceae. Environ 500 espèces de millepertuis ont été répertoriées à ce jour mais la plus connue est le millepertuis perforé (*Hypericum perforatum* L.) (74). Les constituants majoritaires des *Hypericums* sont les naphotodiantrones (hypericine et son analogue la pseudohypericine) et des phloroglucinols (hyperforine et adhyperforine) (75).

a) Hyperforine

Le millepertuis est très consommé sous forme de gélules, comprimés, ou en infusion pour ces vertus antidépressives portées par l'hyperforine. L'EMA lui reconnaît un usage bien établi dans cette indication sous forme d'extrait sec (76). En effet, elle inhibe les monoamines oxydases et empêche donc la dégradation des neurotransmetteurs (sérotonine, noradrénaline et dopamine) dont les taux sont diminués en cas de dépression. Son efficacité est comparable à des antidépresseurs synthétiques très largement utilisés comme la fluoxétine ou la sertraline (77,78).

Son usage doit toutefois être surveillé puisque de nombreuses interactions médicamenteuses ont été identifiées : le millepertuis, et en particulier l'hyperforine, a été décrit comme inducteur enzymatique des cytochromes P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19) impliqués dans le métabolisme de nombreux médicaments (**Tableau 3**). Une dose journalière d'hyperforine supérieure à 1 mg/jour peut conduire à ces interactions (76).

Tableau 3 : Interactions médicamenteuses reportées avec *Hypericum perforatum* L. (76,79).

CLASSE MEDICAMENTEUSE	MEDICAMENT	POTENTIEL MECANISME D'INTERACTION
Anticancéreux (Cytostatiques)	Imatinib, Irinotecan	Induction du CYP3A4
Antirétroviraux	Indinavir, Nevirapine et d'autres antiprotéases	Induction du CYP3A4, induction de la glycoprotéine P
Immunosuppresseurs	Cyclosporine, Tacrolimus	Induction du CYP3A4, induction de la glycoprotéine P
Anticoagulants	Warfarine, Phenprocoumone	Induction du CYP2C9
Cardiovasculaire	Digoxine	Induction de la glycoprotéine P (efflux)
Opiacés	Méthadone	Induction du CYP3A4
Contraception orale oestro progestative	Ethinylestradiol(EE) / desogestrel, EE/Norethisterone, Levonorgestrel, Norethisterone	Induction du CYP3A4
Anti épileptique	Carbamazepine	Induction du CYP3A4
Anti asthmatique	Théophylline	Induction du CYP1A2
Hypolipémiant	Simvastatine, Atorvastatine	Induction du CYP3A4
Antidépresseur	Amytriptyline	Induction du CYP2C19
Anti histaminique	Féxofénadine	Induction du CYP3A4

b) Hypericine

L'hypericine est un pigment rouge retrouvé dans les parties aériennes de la plantes (les fleurs, les feuilles et la tige) des *Hypericums spp* (80). Cette molécule peut également être identifiée dans le champignon endophyte *Thielavia subthermophila* et les champignons du sous-genre *Dermocybe*. Son activité antivirale a d'abord été identifiée en 1988 par l'équipe de Meruelo, sur le virus de la leucémie murine de Friend (81). Puis rapidement, des études ont montré une action antivirale contre les virus HIV-1 (*Human immunodeficiency virus 1*), VSV (virus de la stomatite vésiculaire), HSV (Herpes simplex virus), et CMV (cytomegalovirus) avec deux observations : son activité antivirale est dépendante de l'activation par la

lumière et elle est principalement active sur les virus enveloppés (80,82,83). L'hypericine est une molécule photosensible : lors de son état excité en présence de lumière, elle peut transférer un électron à un substrat ou au dioxygène produisant ainsi des espèces réactives de l'oxygène. Or, les lipides insaturés de la bicouche lipidique de l'enveloppe des virus sont oxydés par l'oxygène singulet ce qui altère la membrane virale et permet de prévenir la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane lipidique de la cellule hôte (84).

D) Objectifs du projet

Les travaux de ma thèse visent à étudier les activités antivirales des principes actifs du millepertuis déjà décrits, l'hyperforine et l'hypericine, contre d'une part un HCoV peu pathogène, HCoV-229E, et d'autre part le SARS-CoV-2, HCoV hautement pathogène, et d'élucider leurs mécanismes d'action.

MATERIELS ET METHODES

A) Lignées cellulaires et culture cellulaire

Les lignées cellulaires Huh-7, Vero-81 et Vero-E6 ont été cultivées dans du milieu DMEM + glutaMAX-1 et 10% de sérum de veau fœtal à 37°C et 5% de CO₂. Les Vero-81 ont été sous clonées pour optimiser le niveau d'infection. Les Huh-7/TMPRSS2 ont été obtenues après transduction avec un lentivirus d'expression TMPRSS2 et sélectionnées par ajout de puromycine à 2 µg/mL.

B) Virus

Les souches suivantes ont été utilisées pour les tests d'infection : HCoV-229E-Luc (gracieusement donné par le Pr. V. Thiel) et SARS-CoV-2 variant alpha, caractérisé au CHU de Lille (85).

C) Production de pseudo-particules

Pour générer des pseudo-particules virales exprimant la protéine Spike de HCoV-229E ou du SARS-CoV-2, des cellules HEK293TT ont été co-transfectées avec des vecteurs d'expression pour la glycoprotéine Spike du SARS-CoV-2 ou du HCoV-229E (300 ng), les protéines de capsid et la polymérase Gag-Pol (300 ng) du murine leukemia virus (MLV) et un mini génome codant pour un gène rapporteur de la Firefly-luciferase (400 ng).

La veille de la transfection, les cellules HEK293TT ont été réparties dans des plaques 6 puits coatée à la poly-D-lysine (500 000 cellules/puits). Elles ont été transfectées à l'aide de l'agent de transfection Turbofect (Thermo Scientific ®) avec un ratio d'1 µg d'ADN plasmidique pour 3 µL d'agent de transfection dans un volume final de 100 µL de milieu Opti-MEM. Après 48 h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le surnageant contenant les pseudo-particules exprimant la protéine S du SARS-CoV-2 (SARS2pp) a été récolté et filtré sur des membranes avec des pores de 0,45 µm. Les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la S du HCoV-229E (229Epp) ont quant à elles été incubées à 33°C pendant 72 h avant de récolter le surnageant. Les cellules ont été lysées avec 400 µL / puits de solution de lyse (1% de triton X-100 dans du phosphate-buffered saline PBS 1X (froid) supplémenté par des inhibiteurs de protéases (Roche)). Des cellules HEK293TT exprimant le récepteur ACE2 ont été préalablement réparties la veille en plaque 96 puits (4500 cellules / puits) puis ont été infectées avec les SARS2pp et enfin lysées

48 h plus tard. Des cellules Huh-7/TMPRSS2, préalablement ensemencés la veille à 1×10^4 cellules par puits, ont été transduites avec les 229Epp et lysées 48 h plus tard. L'activité luciférase des lysats cellulaires a été détectée à l'aide du kit Luciferase Assay (Promega) en suivant les préconisations du fabricant, et à l'aide du luminomètre Berthold.

D) Test de viabilité cellulaire

Les cellules Huh-7 ou Vero-E6 ont été ensemencées respectivement à 8×10^3 et 15×10^3 cellules par puits en plaque 96 puits et incubées à 24 h à 37°C sous 5% CO_2 avant d'ajouter la molécule d'intérêt à concentration croissante. Après 24 h d'incubation, un test au MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] a été effectué (Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega). La densité optique à 490 nm du formazan a été détectée par un lecteur de plaque ELX 808 (Bio-Tek Instruments Inc).

E) Test d'inhibition de l'entrée des pseudo-particules

Les cellules HEK293TT exprimant le récepteur ACE2 ont été ensemencées à 4500 cellules par puits la veille dans une plaque 96 puits préalablement traitée à la poly-D-lysine. Les cellules Huh-7 ont été ensemencées à 1×10^4 cellules par puits la veille dans une plaque 96 puits. Les cellules HEK293TT/ACE2 et Huh-7/TMPRSS2 ont été respectivement transduites avec des pseudo-particules virales exprimant la glycoprotéine S du SARS-CoV-2 (SARS2pp) ou du HCoV-229E (229Epp) pendant 2 h en présence d'hypericine ou d'hyperforine à dose croissante (2,5 ; 5 et $10 \mu\text{M}$). Puis le milieu a été changé et après 48 h d'incubation, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée en ajoutant le substrat Firefly luciferase suivant les préconisations du fabricant.

F) Test d'inhibition d'infection à HCoV-229E

Les cellules Huh-7/TMPRSS2 ont été ensemencées la veille à 15×10^3 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Elles ont été infectées avec le virus HCoV-229E recombinant à la Renilla Luciférase (HCoV-229E-Rluc) pendant 1 h en présence de l'hypericine ou de l'hyperforine à dose croissante. L'inoculum a ensuite été remplacé par du milieu contenant les molécules aux mêmes concentrations. Puis, les cellules ont été lysées 7 h après l'inoculation et le substrat Renilla luciférase a été ajouté suivant les préconisations du fabricant avant de mesurer l'activité luciférase.

G) Test d'inhibition d'infection à SARS-CoV-2

Les cellules Vero-81 ont étéensemencées à 8×10^4 cellules par puits dans une plaque 48 puits la veille du test. Elles ont été infectées avec le virus SARS-CoV-2 variant alpha pendant 16 h en présence d'hypericine ou d'hyperforine à dose croissante (de 0,3125 à 40 μM). L'inhibiteur de protéase GC376 a été utilisé à 10 μM en tant que contrôle. Les cellules ont été lysées avec du tampon Laemmli 2X + DTT à 50 μM et les lysats ont été chauffés 30 min à 95°C puis analysés en western blot. Le pourcentage d'infection a pu être quantifié avec le logiciel Image J : les aires sous la courbe ont été normalisées en fonction de l'expression de la β -tubuline.

H) Test cinétique de l'inhibition de l'infection

Les cellules Huh-7/TMPRSS2 ont étéensemencées la veille à 2×10^4 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Elles ont été infectées avec le virus HCoV-229E recombinant à la Renilla Luciférase (HCoV-229E-Rluc). Les molécules actives (hypericine à 5 μM ou hyperforine 5 μM) ont été ajoutées à différents temps de l'infection : 1) avant l'inoculation 2) pendant l'inoculation 3) 1 h après l'inoculation 4) 2 h après l'inoculation ou 5) 3 h après l'inoculation. Puis, les cellules ont été lysées 7 h après l'inoculation et le substrat Renilla luciférase a été ajouté suivant les préconisations du fabricant avant de mesurer l'activité luciférase.

I) Test de fusion

Les cellules Vero-81 ont étéensemencées sur lamelle dans des plaques 24 puits à 15×10^4 cellules par puits. Après 16 h d'incubation, elles ont été transfectées avec 250 ng d'un vecteur d'expression pcDNA3.1 codant pour la protéine S du SARS-CoV-2 à l'aide de l'agent de transfection TransIT®-LT1 (Mirus Bio). Six heures après transfection, le milieu a été changé en ajoutant 2,5 μM d'hypericine ou d'hyperforine, du DMSO ou 50 μM de CMK (inhibiteur de fusion). Après 24 h d'incubation les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 3% pendant 20 min à température ambiante puis la formation de syncytia a été appréciée en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-S du SARS-CoV-2 (GenTex®, clone 1A9). Les noyaux ont été marqués avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Les lamelles ont été montées sur lame à l'aide de Mowiol®. Les images ont été obtenues par système Evos M5000 imaging (Thermo Fisher Scientific®).

J) Western Blot

Les protéines ont été dénaturées 10 min à 95°C avant dépôt sur le gel d'acrylamide. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide* (SDS-PAGE), composé d'un gel de concentration à 5 % (5 % d'acrylamide (ratio acrylamide/bisacrylamide 37,5/1), 125 mM de tris-HCl (trishydroxyméthylaminométhane) pH 6,8, 0,1 % de SDS, 0,1 % d'APS (ammonium persulfate), 0,1 % de TEMED (N,N,N',N'-tetraméthylethylenediamine)) et d'un gel de séparation à 10 % (10% d'acrylamide, 375 mM de tris-HCl pH 8,8 , 0,1 % de SDS, 0,1% d'APS, 0,1 % de TEMED). La migration s'est effectuée à 70 volts pendant 20 min puis à 150 volts pendant 1 h, dans du tampon de migration (25 mM de tris, 194 mM de glycine, 1% de SDS). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 90 min à 100 volts, dans du tampon de transfert (47,9 mM de Tris, 38,6 mM de glycine, 20 % d'éthanol absolu). Les sites d'interactions non spécifiques protéiques ont été bloqués par une solution de 5 % de lait écrémé, 0,1 % de Tween20 dans du PBS 1X pendant 1 h à température ambiante.

La protéine S a été immunodétectée avec un anticorps (Ac) primaire monoclonal de rat anti-spike clone 1A9 (GenTex®, 1/1000), dans la solution de blocage, par incubation une nuit à 4°C sous agitation. La membrane a été lavée trois fois par un tampon de lavage (0,1 % Tween 20 dans du PBS 1X) pendant 10 min. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de rat couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP) (au 1/10000), pendant 30 min à température ambiante sous agitation. La protéine N du SARS-CoV-2 a été immunodétectée avec un Ac primaire polyclonal de souris anti-N (Novus biologicals®, au 1/4000) puis révélée par un Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la HRP selon le même protocole.

La membrane a été lavée trois fois par le tampon de lavage pendant 10 min. La révélation a été réalisée à l'aide d'un substrat chimioluminescent (*enhanced chemiluminescent*, ECL) provenant du kit de révélation « Pierce ECL Western Blotting Substrate » et à l'aide d'un LAS 3000 (Fujifilm®). Les niveaux d'infection ont été déterminés à l'aide du logiciel Image J.

RESULTATS

A) Activité antivirale des principes actifs contre HCoV-229E

Les principes actifs (Hypericine et Hyperforine) ont d'abord été testés contre HCoV-229E-Rluc, grâce à une version recombinante du HCoV-229E exprimant le gène de la luciférase. En effet, les tests sur ce virus recombinant ne requièrent qu'un niveau 2 de sécurité, contrairement au SARS-CoV-2 où un niveau 3 est nécessaire, rendant les expérimentations plus contraignantes.

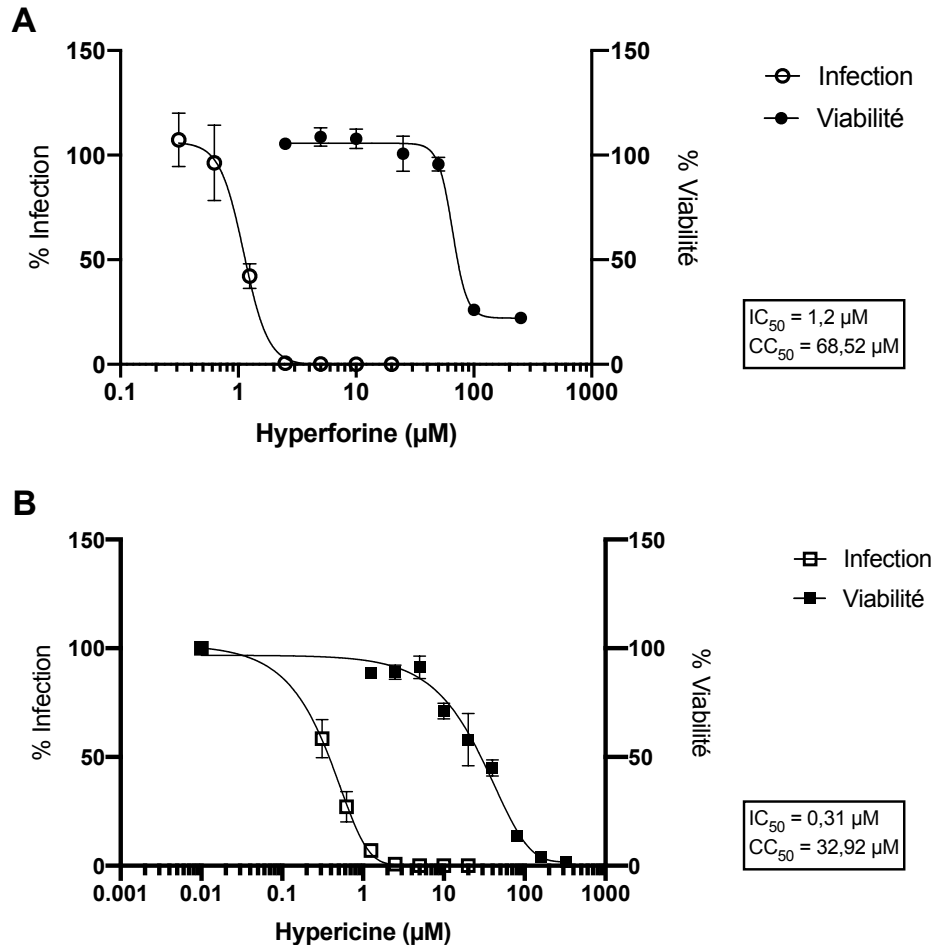


Figure 11 : Activité antivirale de l'hyperforine (A) et l'hypericine (B) sur HCoV-229E en Huh-7/TMPRSS2. Le virus a été inoculé en présence d'hyperforine ou d'hypericine à dose croissante avant d'être ajouté sur les cellules Huh-7 TMPRSS2. Pour les tests de viabilité, les cellules ont été incubées 24h avec des doses croissantes d'hyperforine ou d'hypericine. La viabilité a été appréciée grâce au réactif MTS (n = 3).

Les résultats de doses réponse montrent une diminution de l'activité luciférase dose-dépendante pour les deux molécules avec des IC_{50} de 1,2 µM pour l'hyperforine et 0,31 µM pour l'hypericine. Ces deux molécules sont donc très actives *in vitro* contre HCoV-229E. Parallèlement, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués, indiquant qu'aucune de ces deux molécules n'est toxique aux concentrations testées (la CC_{50} pour l'hypericine étant de 32,92 µM et 60,32 µM pour l'hyperforine) (**Figures 11,A ; 11,B**). Les index de sélectivité (CC_{50}/IC_{50}) calculés

pour l'hyperforine et l'hypericine sont respectivement de 57,1 et 106,2 suggérant une faible toxicité cellulaire.

B) Activité antivirale des principes actifs contre SARS-CoV-2

Dans un second temps, les expériences de doses réponses ont été menées sur le SARS-CoV-2. Les résultats indiquent pour l'hyperforine une activité antivirale dose-dépendante sur SARS-CoV-2 (**Figure 12,A**), avec une IC_{50} de 4,69 μM (**Figure 12,B**). L'hyperforine est donc très active *in vitro* contre le SARS-CoV-2. Parallèlement des tests de viabilité cellulaire ont révélé que l'hyperforine n'était pas toxique aux doses actives avec une CC_{50} de 66,55 μM (**Figure 12,B**) et un index de sélectivité de 14,2.

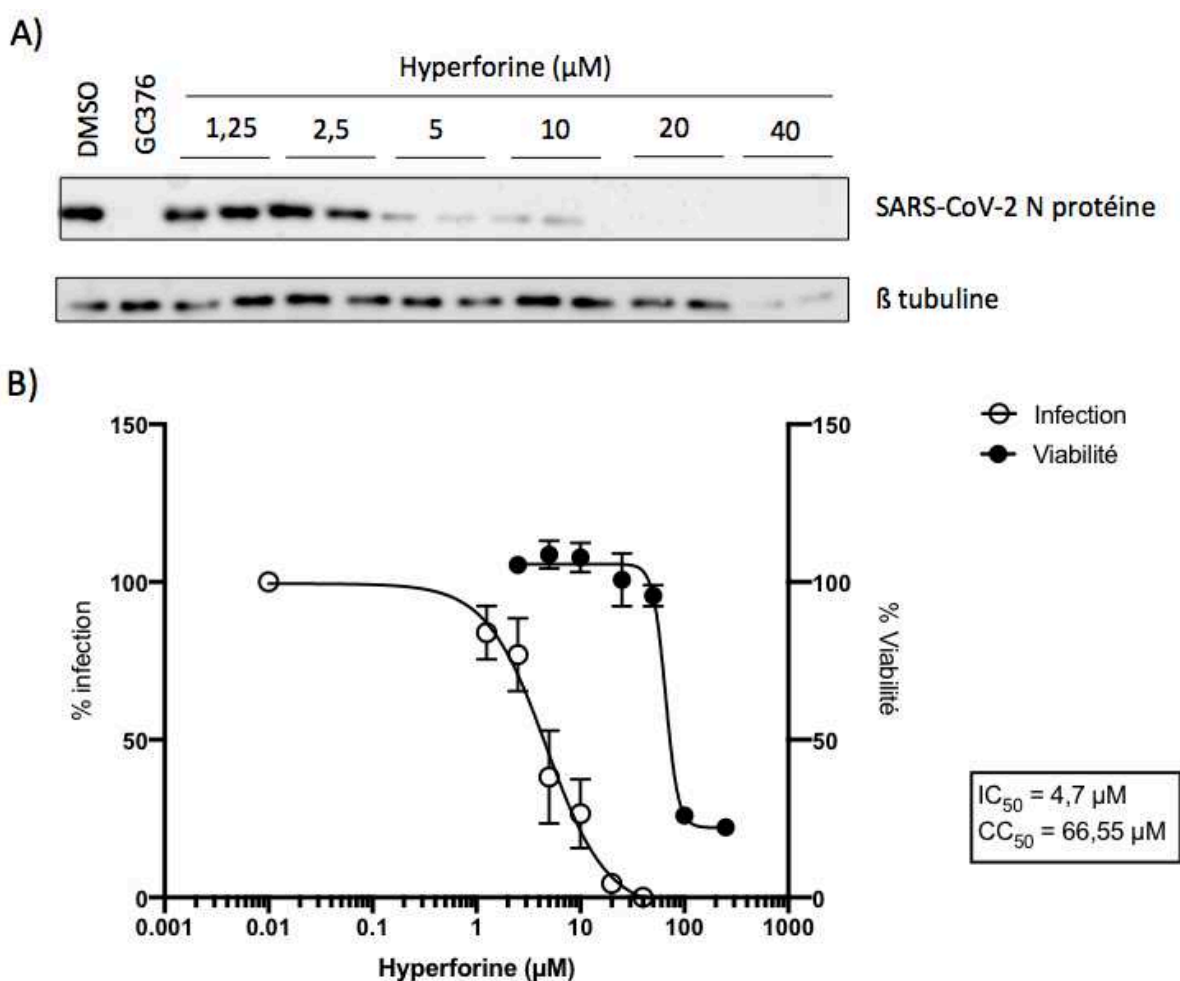


Figure 12 : Activité antivirale de l'hyperforine sur SARS-CoV-2. Le SARS-CoV-2 a mis en contact avec des doses croissantes d'hyperforine avant d'être ajouté sur des cellules Vero-81/TMPRSS2. La viabilité cellulaire a été appréciée avec le réactif MTS après que les cellules Vero-81 aient été incubées 24 h avec l'hyperforine à dose croissante. **A)** Dose réponse de l'hyperforine sur SARS-CoV-2 révélé en western blot (n = 1). **B)** Courbe de dose réponse de l'hyperforine sur SARS-CoV-2 et de toxicité cellulaire sur la lignée Vero-81 (n = 3).

Concernant l'hypericine, les tests de dose réponse sur SARS-CoV-2 ont été menés de deux manières différentes. Des résultats divergents ont été obtenus : **1)** la première expérience a été réalisée selon le protocole décrit dans le matériels et méthodes **2)** lors de la seconde expérience, avant d'être placées dans l'incubateur

les cellules ont été incubées 10 min à la lumière lors de l'inoculation sur les cellules du virus avec la molécule. La deuxième expérience montre une activité virale plus importante contre SARS-CoV-2 : à 2,5 μM , l'infection a été complètement inhibée. *A contrario*, lors du premier test sans incubation à la lumière, à 20 μM une infection est toujours observable. Les résultats indiquent que l'hypericine a une activité antivirale dose dépendante et photo-dépendante (**Figure 13**). Il faut noter que l'expression de la β -tubuline est hétérogène entre les répliquas et entre les conditions : quantifier l'inhibition de l'infection par l'hypericine est donc difficile. Ceci peut s'expliquer par sa toxicité qui pourrait être photo-dépendante également, mécanisme déjà décrit pour une autre molécule naturelle photo-activable, le phéophorbide a (73).

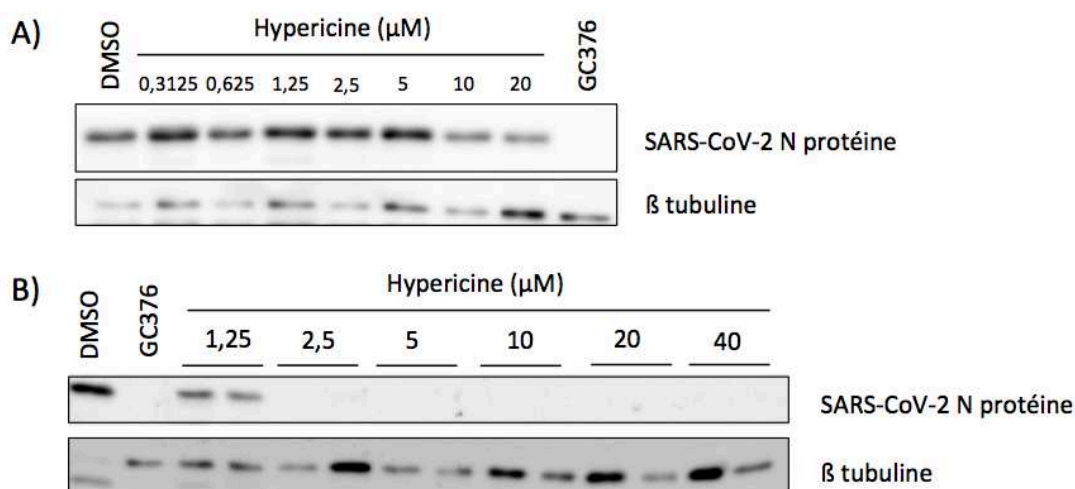


Figure 13 : Activité antivirale de l'hypericine sur SARS-CoV-2. Le SARS-CoV-2 variant alpha mis en contact avec de l'hypericine à doses croissantes puis ce mélange a été ajouté sur les cellules Vero-81/TMPRSS2. **A)** Les cellules ont directement été placées dans l'incubateur après avoir été infectées avec l'inoculum. **B)** Les cellules ont été incubées 10 min à la lumière après infection avec l'inoculum avant d'être placées dans l'incubateur.

Au regard des résultats obtenus en doses réponses sur SARS-CoV-2 et afin d'apprécier l'impact de la lumière sur l'activité antivirale de l'hypericine, des tests d'incubation à la lumière ont été effectués sur HCoV-229E. Brièvement, des cellules Huh-7/TMPRSS2 ont été inoculées avec HCoV-229E préalablement traité avec 2 μM d'hypericine et incubé 30 min à la lumière puis dilué 10 fois avant l'inoculation (2 μM > 0,2 μM). En contrôle (ctrl), HCoV-229E a été inoculé en présence de 0,2 ou 2 μM d'hypericine. L'incubation du virus et hypericine à la lumière a permis d'inhiber l'infection de 2-Log₁₀ supplémentaires par rapport aux conditions sans préincubation. Les résultats montrent que l'hypericine a une activité antivirale dépendante de la lumière, confirmant les données obtenues en dose réponse sur SARS-CoV-2 (**Figure 14**).

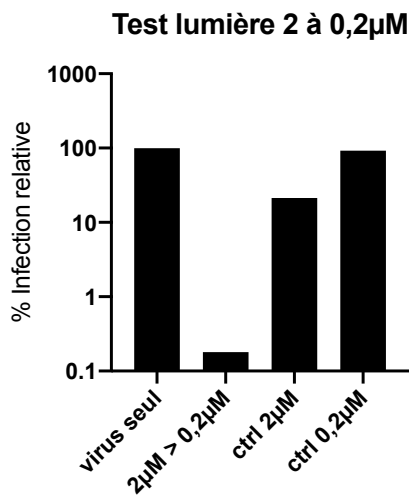


Figure 14 : Test de l'activité antivirale de l'hypericine en fonction de la lumière. Le virus HCoV-229E (stock 10X) a été incubé 30 min à la lumière en présence de 2 µM d'hypericine. Après incubation, le mélange a été dilué 10 fois puis inoculé sur des cellules Huh-7/TMPRSS2. En contrôle, le virus a été inoculé avec 2 µM (ctrl 2 µM) ou 0,2 µM (ctrl 0,2 µM) d'hypericine sans préincubation à la lumière.

C) Étude du mécanisme d'action

Afin d'étudier le mécanisme d'action de chaque molécule, des tests de cinétique ont été effectués sur HCoV-229E-Luc. Les molécules à 5 µM ont été ajoutées à différents temps de l'infection : avant l'inoculation, pendant, ou après l'inoculation : 1 h, 2 h ou 3 h post inoculation (PI) (**Figure 15**).

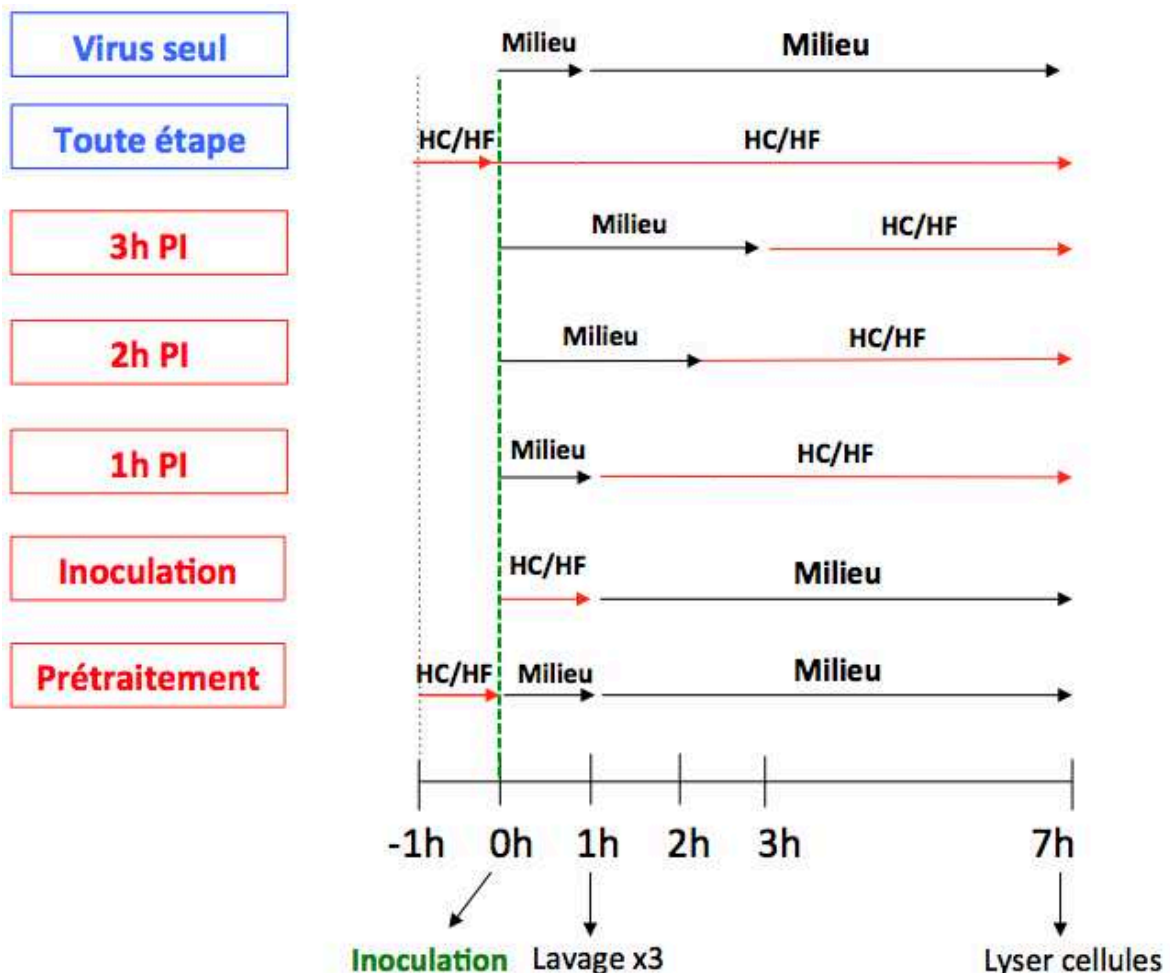


Figure 15 : Schéma du protocole de cinétique. Les molécules hypericine (HC) ou hyperforine (HF) ont été ajoutées soit avant l'inoculation sur les cellules Huh-7/TMPRSS2, soit pendant l'inoculation du virus HCoV-229E-Luc, soit après inoculation (1 h, 2 h ou 3 h post inoculation (PI)). Après 7 h d'incubation, les cellules ont été lysées avec du substrat *Renilla lysis buffer* et les activités luciférases ont été mesurées au luminomètre Berthold. En contrôle, soit les cellules ont été inoculées avec du virus sans molécule (condition virus seul) ou soit elles ont été traitées avec les molécules depuis le prétraitement jusqu'à la lyse des cellules (condition toute étape). Les concentrations utilisées sont celles de l'IC₉₀ soit environ 5 µM pour l'HC et l'HF.

L'hyperforine est plus active après la phase d'inoculation avec un pic d'activité à 1 h PI. L'hypericine est active dès la phase de pré-traitement jusqu'à 1 h PI. Ainsi, alors que l'hypericine agirait lors de l'entrée virale, l'hyperforine serait active plus tardivement : soit à la fin de l'entrée, soit lors de la traduction ou de la réplication (**Figure 16**). Ces tests seront prochainement effectués sur SARS-CoV-2.

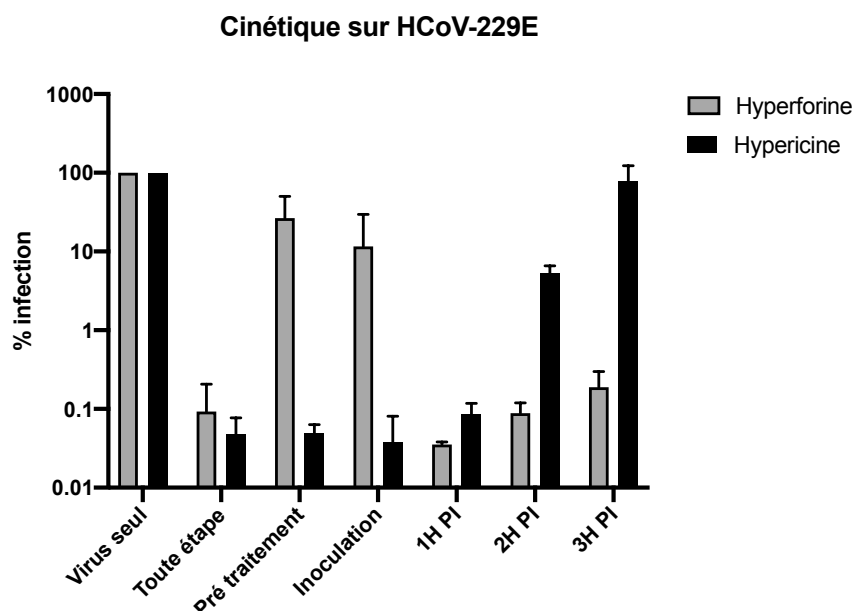


Figure 16 : Étude du mécanisme d'action de l'hypericine et l'hyperforine par test de cinétique sur HCoV-229E. Les molécules ont été ajoutées à différents temps de l'infection : avant, pendant ou après l'inoculation du virus sur les cellules Huh-7/TMPRSS2. Après 7 h d'infection, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été mesurée.

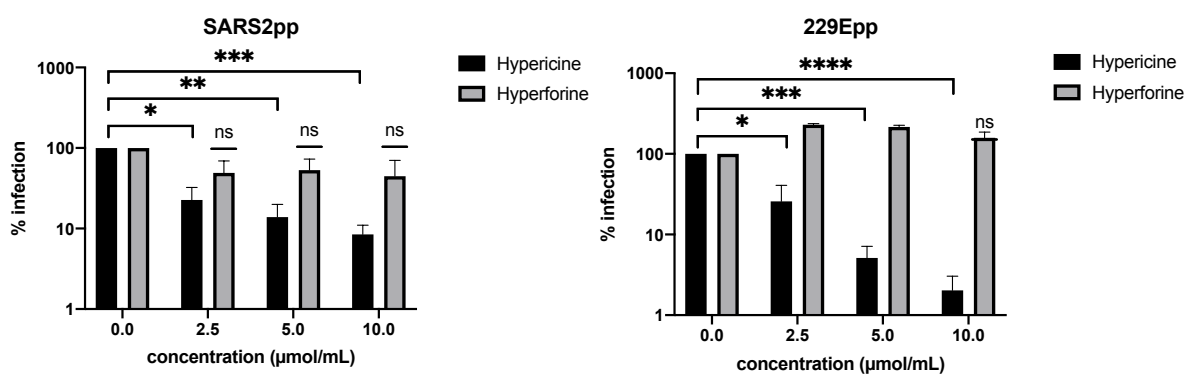


Figure 17 : Effet de l'hypericine et de l'hyperforine sur l'entrée des SARS2pp et 229Epp. Les molécules hyperforine et hypericine ont été incubées à doses croissantes avec les SARS2pp ou 229Epp. Puis le mélange a été déposé sur des cellules permissives (HEK293TT-ACE2 et Huh-7/TMPRSS2) pendant 2h à 37°C. Les cellules ont été lysées 48h post-infection et l'activité luciférase a été quantifiée. (T-test : * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$; **** $P < 0,000001$).

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment, l'activité de l'hypericine et l'hyperforine sur l'entrée virale a été évaluée par un test d'inhibition de l'entrée de pseudo-particules virales (**Figure 17**). En effet, les pseudo-particules exprimant les protéines S à leur surface permettent de mimer l'entrée des CoV dans les cellules.

Les résultats indiquent que l'hypericine est active sur les 229Epp et SARS2pp en inhibant leur infection jusqu'à respectivement 3-Log₁₀ et 1-Log₁₀ de façon dose-dépendante. L'hyperforine est inactive sur 229Epp et SARS2pp. Ainsi ces résultats confirment ceux obtenus en cinétique, à savoir que l'hypericine agit sur l'entrée virale, *a contrario* de l'hyperforine.

Nos résultats précédents montrent que l'hypericine inhibe l'entrée virale. La protéine S des CoV joue un rôle majeur dans l'entrée virale, notamment en permettant la fusion des membranes virale et cellulaire. Pour déterminer si la cible virale de l'hypericine est cette protéine S en particulier, un test de fusion cellulaire a été effectué : lorsque les cellules Vero-81, exprimant le récepteur ACE2, sont transfectées avec la glycoprotéine S, des syncytia se forment. Ces derniers apparaissent lors de la fusion cellulaire. Les résultats révèlent, comme attendu, que le traitement à l'hyperforine n'empêche pas la formation de syncytia indiquant que cette dernière n'agit pas sur la glycoprotéine S (**Figure 18**).

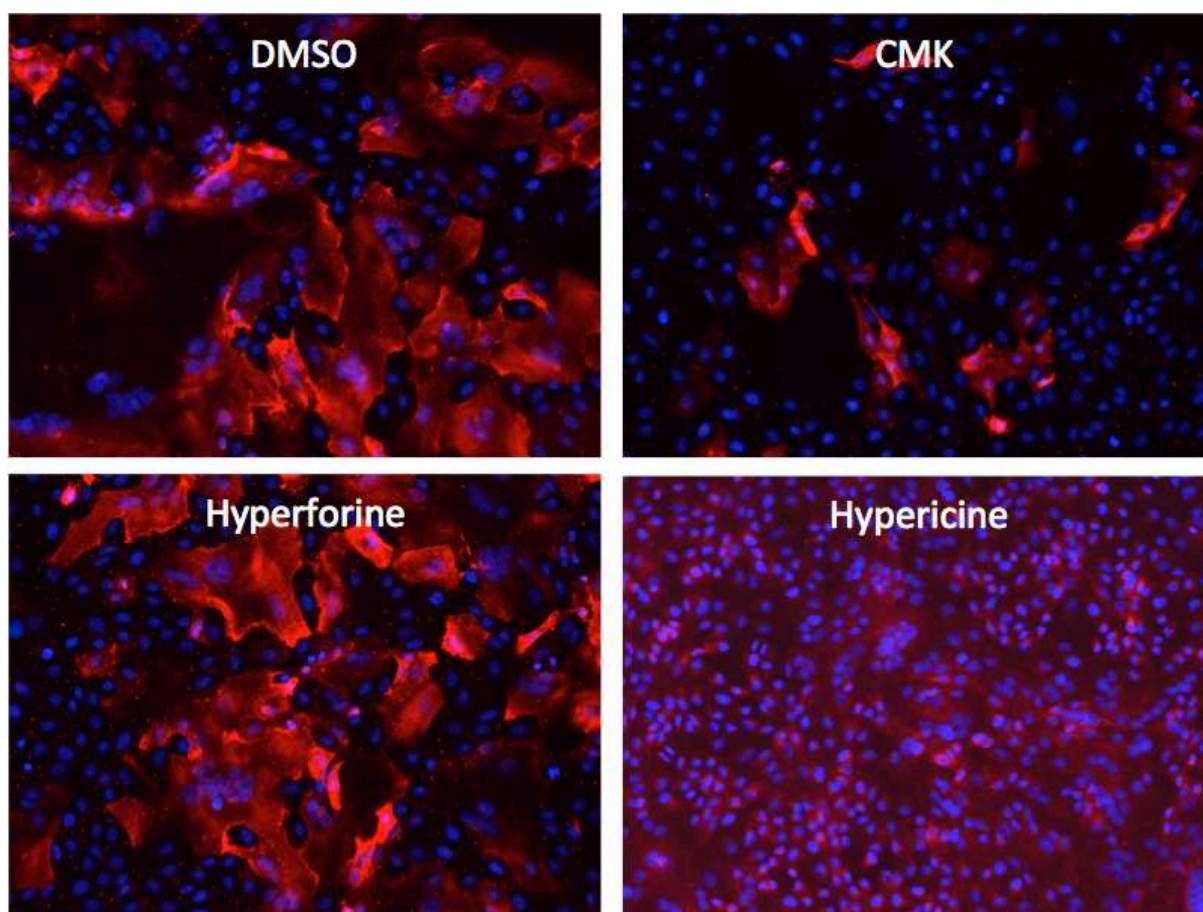


Figure 18 : Test de fusion cellulaire. Les cellules Vero-81 ont été transfectées avec la protéine S du SARS-CoV-2 puis 6 h après transfection, le milieu a été remplacé en ajoutant les molécules à 10 µM. A 24 h post-transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec anticorps anti-S afin de révéler les syncytia.

Concernant l'hypericine, il semblerait que des synticia soient visibles. Toutefois, la morphologie des cellules est différente comparativement aux contrôles : les cellules s'arrondissent, perdent leur adhérence. De plus, le marquage anti-S est plus diffus, rendant l'interprétation difficile. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'hypericine, bien qu'étant active sur l'entrée virale, n'agit pas directement sur la protéine S. De plus, ces résultats soulignent, comme attendu, que l'hyperforine ne cible pas l'entrée virale et *de facto* la protéine S.

DISCUSSION

Les différentes pandémies à HCoV hautement pathogènes ont mis en lumière la nécessité de trouver des antiviraux à large spectre contre ces virus. C'est pourquoi, depuis le début de la pandémie à COVID-19, une course contre la montre pour trouver un traitement spécifique contre le SARS-CoV-2 mobilise des équipes partout dans le monde. Même si l'OMS estime qu'environ 80% de la population a recours à l'utilisation de plantes médicinales pour se soigner, les plantes sont une source de molécules actives relativement peu exploitée (70).

Au laboratoire, le criblage de nombreuses molécules d'origine naturelle sur le virus HCoV-229E en collaboration avec le laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie (UMRt 1158 BioEcoAgro), nous a permis d'identifier l'hyperforine et l'hypericine comme de bons candidats potentiels. Il s'agit de deux molécules retrouvées dans le millepertuis perforé (*Hypericum perforatum* L.). Cette plante est principalement consommée pour son indication dans le traitement des épisodes dépressifs mineurs à modérés, même si d'autres intérêts thérapeutiques semblent pouvoir lui être attribués. Une activité antivirale a déjà été décrite pour l'hypericine sur les virus enveloppés comme celui de la grippe, du HSV-1, du HSV-2, du VSV et du HIV-1, entre autres (75,83).

L'hyperforine fait partie des dérivés de phloroglucinols (ou benzène-1,3,5-triol). Ces dérivés sont isolés soit de plantes (comme la fougère *Dryopteris crassirhizoma* ou l'arbuste *Callistemon rigidus*), d'algues ou de microorganismes (*Pseudomonas*). Plusieurs études ont montré que différents dérivés de phloroglucinols pouvaient avoir une activité antivirale contre HIV, HSV, le virus de la grippe (H5N1) ou encore le virus Zika (86–88). Quoiqu'il en soit, nos travaux suggèrent pour la première fois une activité antivirale de l'hyperforine. Celle-ci est active contre HCoV-229E et SARS-CoV-2 avec des IC₅₀ respectivement de 1,18 µM et de 4,69 µM et sans cytotoxicité à ces concentrations (CC₅₀ de l'ordre de 60 µM). Ces résultats ont été confirmés en titre infectieux (données non montrées). Les index de sélectivité calculés pour l'hyperforine (57 sur HCoV-229E et 14 sur SARS-CoV-2) soulignent son innocuité potentielle. D'autre part, il s'agit de la première étude montrant une activité antivirale de l'hypericine sur les HCoV. Nos travaux indiquent que l'hypericine est active sur HCoV-229E et SARS-CoV-2 avec une IC₅₀ de l'ordre

de 0,31 μM sur HCoV-229E. Il sera donc intéressant d'étudier le mécanisme d'action de ces deux molécules sur les HCoV.

L'hypericine fait partie des agents photosensibilisants qui sont très étudiés en cancérologie. Sous l'effet de la lumière, ces molécules s'activent et sont capables de produire des espèces réactives de l'oxygène agissant alors sur les lipides et membranes virales ou cellulaires (84). L'hypericine a une activité antivirale dépendante de la lumière qui a été décrite sur HIV-1, HSV ou VSV (80,82). Nos résultats montrent pour la première fois que l'hypericine semble également être active sur HCoV-229E et SARS-CoV-2 de façon photodépendante. En effet, l'incubation à la lumière du HCoV-229E avec l'hypericine, a permis d'inhiber l'infection de 2-Log₁₀ supplémentaires en comparaison avec un test sans lumière, et l'incubation du SARS-CoV-2 avec l'hypericine à la lumière diminue l'IC₅₀ de 10 μM environ à moins de 1 μM . Sur SARS-CoV-2, nous avons des difficultés à quantifier les IC₅₀ et CC₅₀ du fait de son activité dépendante de la lumière. Même si les tests de viabilité (tests au MTS et tests à la LDH (lactate deshydrogénase) (données non montrées)) tendent à indiquer que l'hypericine n'est pas cytotoxique, les cellules traitées avec cette dernière affichent un changement de morphologie notable en s'arrondissant, pouvant partiellement expliquer les résultats obtenus lors de l'immunofluorescence. Elles perdent *de facto* leur adhérence ce qui également peut expliquer les variations d'expression de tubuline entre les répliques en western blot (les lavages pouvant éliminer les cellules moins adhérentes et donc diminuer la quantité de cellules). Un dernier test pour apprécier la cytotoxicité de ce composé pourra être mis en œuvre à l'aide du rouge neutre : il se base sur la capacité des cellules vivantes à l'incorporer. L'assimilation de ce dernier est modifiée lorsque les membranes lysosomales ou membranaires de la cellule sont altérées (89).

Bien que nous ayons identifié une activité antivirale *in vitro*, l'hypericine semble difficilement administrable *in vivo* en routine. Sa lipophilie, d'une part, lui confère une faible biodisponibilité et, d'autre part, son activité photodépendante nécessite l'apport de lumière lors de l'administration. En effet, lors d'un essai clinique effectué dans le cadre d'infection à HIV-1, aucune activité antivirale n'a pu être observée *in vivo*, alors qu'*in vitro*, l'hypericine inhibait sa réplication. De plus, des cas de photosensibilité, parfois graves, n'ont pas permis à de nombreux patients d'aller jusqu'à la fin de l'essai clinique (83,84). Toutefois, l'activité antivirale de l'hypericine pourrait être mise à profit pour décontaminer l'environnement (l'air ou les surfaces) et

en ce sens il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'activité antivirale sur les HCoV de l'hypericine.

Des tests de cinétique sur HCoV-229E ont été mis en œuvre pour étudier le mécanisme d'action de l'hyperforine et l'hypericine. Les résultats montrent que l'hypericine est active lors de l'entrée virale, alors que l'hyperforine agit plus tardivement : soit en fin d'entrée virale, soit à la traduction ou soit à l'étape de réplication virale. Ces résultats nécessitent d'être confortés par l'utilisation d'inhibiteur de chaque étape, et d'être confirmés sur SARS-CoV-2.

Afin d'étudier l'entrée virale, des tests sur pseudo-particules ont été effectués et une inhibition de l'entrée des 229Epp et SARS2pp par l'hypericine a été observée. L'hyperforine ne semble pas être active contre les 229Epp et les SARS2pp. Parallèlement le test de fusion cellule-cellule avec la protéine S a montré que l'hyperforine, comme attendu, n'inhibe pas la formation de syncytia et donc la fusion cellulaire. Cependant pour l'hypericine, il est difficile de conclure sur ce point. L'hypericine étant un pigment, elle peut interférer lors du marquage : une condition cellules traitées à l'hypericine mais non transfectées avec la glycoprotéine S pourra permettre de répondre à cette problématique. Pour aller plus loin dans la caractérisation du mécanisme d'action, et notamment au niveau de l'entrée virale, deux tests supplémentaires pourront être menés. Le premier consiste à incuber le virus et les cellules avec ou sans les molécules à 4°C pendant 1 h, ceci bloque l'endocytose mais le virus peut toutefois toujours s'attacher à la surface membranaire. L'inhibition de l'attachement viral pourra être alors apprécié par RT-qPCR. Lors du deuxième test, les cellules sont traitées par NH₄Cl afin d'inhiber l'entrée par voie endosomale, et la fusion du virus à la cellule induit par l'ajout de trypsine.

A ce jour, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude du mécanisme d'action de l'hyperforine qui semble être un meilleur candidat en tant qu'antiviral potentiel que l'hypericine, avec une IC₅₀ faible et une absence de toxicité aux concentrations actives. Déjà active sur HCoV-229E et SARS-CoV-2, il s'agira de déterminer si elle l'est également sur d'autres virus enveloppés (MERS-CoV, virus Sinbis, Virus de la fièvre jaune, HCV) ou non enveloppés (Coxsackievirus B4) disponibles au laboratoire.

Finalement, dans le cadre de la collaboration avec l'UMRt 1158, nous avons pu récolter différentes espèces d'*Hypericum* : il sera possible de les cribler sur HCoV-229E et SARS-CoV-2 afin de déterminer les espèces les plus actives. Ainsi, après fractionnement bioguidé réalisé par différentes techniques chromatographiques, nous pourrions isoler des fractions plus actives et éventuellement identifier des analogues d'hypericine ou d'hyperforine plus actifs.

REFERENCES

1. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44.
2. Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Plaçais L, Richier Q. COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages. *Rev Med Interne.* juin 2020;41(6):375-89.
3. Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. Coronavirus humains (HCoV). *Pathologie Biologie.* mars 2009;57(2):149-60.
4. Bessis S. Pandémie de COVID-19. *Med Mal Infect.* sept 2020;50(8):8S20-4.
5. Home. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/>
6. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502.
7. COVID-19 Map. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
8. Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 28 nov 2013;503(7477):535-8.
9. Hemida MG, Chu DKW, Poon LLM, Perera RAPM, Alhammadi MA, Ng HY, et al. MERS coronavirus in dromedary camel herd, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis.* juill 2014;20(7):1231-4.
10. Samara EM, Abdoun KA. Concerns about misinterpretation of recent scientific data implicating dromedary camels in epidemiology of Middle East respiratory syndrome (MERS). *mBio.* 8 juill 2014;5(4):e01430-01414.
11. Wang Q, Qi J, Yuan Y, Xuan Y, Han P, Wan Y, et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe.* 10 sept 2014;16(3):328-37.
12. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet.* 5 sept 2015;386(9997):995-1007.
13. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell.* 16 sept 2021;184(19):4848-56.
14. Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* 15 mars 2020;16(10):1686-97.
15. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* déc 2020;41(12):1100-15.
16. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel

Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 29 janv 2021;13(2):202.

17. Pene F, Merlat A, Vabret A, Rozenberg F, Buzyn A, Dreyfus F, et al. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 1 oct 2003;37(7):929-32.
18. Hendley JO, Fishburne HB, Gwaltney JM. Coronavirus infections in working adults. Eight-year study with 229 E and OC 43. *Am Rev Respir Dis*. mai 1972;105(5):805-11.
19. Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 19 avr 2003;361(9366):1319-25.
20. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 8 nov 2012;367(19):1814-20.
21. CDC. Healthcare Workers. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>
22. Covid-19 : facteurs de risques hospitalisation décès - 2ème vague. EPI-PHARE. 2021 <https://www.epi-phare.fr/rapports-detudes-et-publications/covid-19-facteurs-risques-2/>
23. Gao J, Quan L. Current Status of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2 Infection and Future Developments: A Review. *Med Sci Monit*. 17 déc 2020;26:e928552.
24. CDC. MERS-CoV Photos. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 <https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/photos.html>
25. Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. déc 2013;11(12):836-48.
26. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol*. 2021;12:708264.
27. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol*. mars 2021;61(3):180-202.
28. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 28 oct 2020;1-16.
29. Nassar A, Ibrahim IM, Amin FG, Magdy M, Elgharib AM, Azzam EB, et al. A Review of Human Coronaviruses' Receptors: The Host-Cell Targets for the Crown Bearing Viruses. *Molecules*. 26 oct 2021;26(21):6455.
30. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;66:193-292.

31. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*. 20 juin 2012;4(6):1011-33.
32. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 17 juill 2020;369(6501):330-3.
33. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 29 2016;3(1):237-61.
34. Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell*. 12 nov 2020;183(4):1043-1057.e15.
35. Hippensteel JA, LaRiviere WB, Colbert JF, Langouët-Astrié CJ, Schmidt EP. Heparin as a therapy for COVID-19: current evidence and future possibilities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 août 2020;319(2):L211-7.
36. Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv Virus Res*. 2016;96:29-57.
37. Reguera J, Mudgal G, Santiago C, Casanovas JM. A structural view of coronavirus–receptor interactions. *Virus Research*. 19 déc 2014;194:3-15.
38. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*. avr 2012;4(4):557-80.
39. Weiss SR, Leibowitz JL. Chapter 4 - Coronavirus Pathogenesis. In: Karl Maramorosch AJS and FAM, éditeur. *Advances in Virus Research*. Academic Press; 2011. p. 85-164. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123858856000092>
40. Juckel D, Dubuisson J, Belouzard S. Les coronavirus, ennemis incertains. *Med Sci (Paris)*. 1 juin 2020;36(6-7):633-41.
41. Liu DX, Fung TS, Chong KKL, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res*. sept 2014;109:97-109.
42. CoVariants: Variants <https://covariants.org/variants>
43. Hoffmann M, Pöhlmann S. How SARS-CoV-2 makes the cut. *Nat Microbiol*. juill 2021;6(7):828-9.
44. Ollmann Saphire E. A Vaccine against Ebola Virus. *Cell*. 2 avr 2020;181(1):6.
45. Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiology*. mai 2015;10(5):791-808.
46. Meyer H, Ehmann R, Smith GL. Smallpox in the Post-Eradication Era. *Viruses*. 24 janv 2020;12(2):E138.
47. Canoui E, Launay O. [History and principles of vaccination]. *Rev Mal Respir*. janv 2019;36(1):74-81.

48. Hanslik T, Boëlle PY. [Benefit-risk assessment of vaccination strategies]. *Med Sci (Paris)*. avr 2007;23(4):391-8.
49. Le rappel vaccinal réduit fortement le risque de décès lié au Covid-19 | Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques. <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/communique-de-presse/le-rappel-vaccinal-reduit-fortement-le-risque-de-deces-lie-au-covid-19>
50. Actualité - Caractéristiques associées au risque résiduel de forme sévère de Covid-19 après un schéma vaccinal complet en France - ANSM. <https://ansm.sante.fr/actualites/caracteristiques-associees-au-risque-residuel-de-forme-severe-de-covid-19-apres-un-schema-vaccinal-complet-en-france>
51. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int J Biol Sci*. 2021;17(1):8-19.
52. Soleimanpour S, Yaghoubi A. COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go? *Expert Rev Vaccines*. janv 2021;20(1):23-44.
53. COVID-19 vaccines. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines>
54. Ghosh S, Malik YS. Drawing Comparisons between SARS-CoV-2 and the Animal Coronaviruses. *Microorganisms*. nov 2020;8(11):1840.
55. Singh DD, Parveen A, Yadav DK. SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:777212.
56. Coronavirus : circulation des variants du SARS-CoV-2. <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-circulation-des-variants-du-sars-cov-2>
57. Médicaments dans le cadre de la Covid-19. Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3303843/fr/medicaments-dans-le-cadre-de-la-covid-19
58. RONAPREVE (casirivimab-imdevimab). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3318295/fr/ronapreve-casirivimab-imdevimab
59. VEKLURY (remdesivir). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3201793/fr/veklury-remdesivir
60. Veille des études cliniques publiées pour certains médicaments de la Covid-19. Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3186049/fr/veille-des-etudes-cliniques-publiees-pour-certains-medicaments-de-la-covid-19
61. DEXAMETHASONE MYLAN (dexaméthasone). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3234890/fr/dexamethasone-mylan-dexamethasone
62. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Sterne JAC, Murthy S, Diaz JV, Slutsky AS, Villar J, et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 6 oct 2020;324(13):1330-41.

63. REMAP-CAP Investigators, ACTIV-4a Investigators, ATTACC Investigators, Goligher EC, Bradbury CA, McVerry BJ, et al. Therapeutic Anticoagulation with Heparin in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 26 août 2021;385(9):777-89.
64. Sholzberg M, Tang GH, Rahhal H, AlHamzah M, Kreuziger LB, Áinle FN, et al. Effectiveness of therapeutic heparin versus prophylactic heparin on death, mechanical ventilation, or intensive care unit admission in moderately ill patients with covid-19 admitted to hospital: RAPID randomised clinical trial. *BMJ.* 14 oct 2021;375:n2400.
65. ROACTEMRA (tocilizumab) (Covid-19). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3318928/fr/roactemra-tocilizumab-covid-19
66. EVUSHELD (tixagévimab/cilgavimab), 150 mg / 150 mg. Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3324748/fr/evusheld-tixagevimab/cilgavimab-150-mg/-150-mg
67. XEVUDY (sotrovimab) Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3308138/fr/xevudy-sotrovimab
68. XAV-19 (Immunoglobuline G porcine anti-SARS-Cov-2). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3312591/fr/xav-19-immunoglobuline-g-porcine-anti-sars-cov-2
69. PAXLOVID (PF-07321332/ritonavir). Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3311133/fr/paxlovid-pf-07321332/ritonavir
70. Denaro M, Smeriglio A, Barreca D, De Francesco C, Occhiuto C, Milano G, et al. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update. *Phytother Res.* avr 2020;34(4):742-68.
71. Islam MT, Sarkar C, El-Kersh DM, Jamaddar S, Uddin SJ, Shilpi JA, et al. Natural products and their derivatives against coronavirus: A review of the non-clinical and pre-clinical data. *Phytother Res.* oct 2020;34(10):2471-92.
72. Anand AV, Balamuralikrishnan B, Kaviya M, Bharathi K, Parithathvi A, Arun M, et al. Medicinal Plants, Phytochemicals, and Herbs to Combat Viral Pathogens Including SARS-CoV-2. *Molecules.* 22 mars 2021;26(6):1775.
73. Meunier T, Desmarests L, Bordage S, Bamba M, Hervouet K, Rouillé Y, et al. A photoactivable natural product with broad antiviral activity against enveloped viruses including highly pathogenic coronaviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 22 nov 2021. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.01581-21>
74. de Carvalho Meirelles G, Bridi H, von Poser GL, Nemitz MC. Hypericum species: An analysis on the patent technologies. *Fitoterapia.* nov 2019;139:104363.
75. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1 mai 2001;53(5):583-600.

76. EMA. Hyperici herba. European Medicines Agency. 2021
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/hyperici-herba>
77. Behnke K, Jensen GS, Graubaum HJ, Gruenwald J. Hypericum perforatum versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression. *Adv Ther.* févr 2002;19(1):43-52.
78. Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S, Pawlowska M. Comparison of an extract of hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clin Ther.* avr 2000;22(4):411-9.
79. Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol.* mars 2006;62(3):225-33.
80. Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B, Fedoročko P. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Front Plant Sci.* 6 mai 2016;7:560.
81. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juill 1988;85(14):5230-4.
82. Mariewskaya KA, Tyurin AP, Chistov AA, Korshun VA, Alferova VA, Ustinov AV. Photosensitizing Antivirals. *Molecules.* 29 juin 2021;26(13):3971.
83. Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grünberger W. Hypericin--the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des.* 2005;11(2):233-53.
84. Wiehe A, O'Brien JM, Senge MO. Trends and targets in antiviral phototherapy. *Photochem Photobiol Sci.* 1 nov 2019;18(11):2565-612.
85. van den Worm SHE, Eriksson KK, Zevenhoven JC, Weber F, Züst R, Kuri T, et al. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One.* 2012;7(3):e32857.
86. Khan F, Tabassum N, Bamunuarachchi NI, Kim YM. Phloroglucinol and Its Derivatives: Antimicrobial Properties toward Microbial Pathogens. *J Agric Food Chem.* 27 avr 2022;70(16):4817-38.
87. Cao JQ, Wu Y, Zhong YL, Li NP, Chen M, Li MM, et al. Antiviral Triketone-Phloroglucinol-Monoterpene Adducts from *Callistemon rigidus*. *Chem Biodivers.* juill 2018;15(7):e1800172.
88. Wang J, Yan YT, Fu SZ, Peng B, Bao LL, Zhang YL, et al. Anti-Influenza Virus (H5N1) Activity Screening on the Phloroglucinols from Rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma*. *Molecules.* mars 2017;22(3):431.
89. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125-31.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : RACZKIEWICZ
Prénom : Imelda

Titre de la thèse : Molécules antivirales d'origine naturelle actives contre les coronavirus

Mots-clés : SARS-CoV-2, HCoV-229E, molécule naturelle, antiviral

Résumé :

OBJECTIF : La pandémie de SARS-CoV-2 a mis en évidence la nécessité de disposer d'antiviraux à large spectre contre les coronavirus humains (HCoV). Nous avons criblé des molécules naturelles contre HCoV-229E et identifié deux molécules actives, l'hyperforine (HF) et l'hypericine (HC), retrouvées dans *Hypericum perforatum* L. (millepertuis perforé). L'objectif du projet est de caractériser leur activité antivirale contre les HCoV et de déterminer leur(s) mécanisme(s) d'action.

MÉTHODES : Des expériences de dose-réponse ont été réalisées sur HCoV-229E et SARS-CoV-2 en inoculant les cellules en présence d'HF et d'HC à des doses croissantes. Les activités antivirales ont été analysées en mesurant l'activité luciférase ou en détectant les protéines virales par western blot. Des tests de cinétique ont été effectués en ajoutant les composés à différents temps au cours de l'infection. La cytotoxicité a été déterminée par test MTS.

RÉSULTATS : Nous avons montré que l'HF présente une activité dose dépendante sur HCoV-229E (IC₅₀ de 1,2 µM), et sur SARS-CoV-2 (IC₅₀ de 4,7 µM), sans aucune cytotoxicité. Les tests de cinétique indiquent que l'HF est plus active après l'étape d'entrée, alors que l'HC semble être active à l'étape l'entrée. L'HC a une activité antivirale dépendante de la lumière. Sa toxicité semble également dépendre de la lumière, d'où les difficultés à quantifier les CC₅₀ et IC₅₀.

CONCLUSIONS : Nous avons montré que l'HC et l'HF sont très actives sur le HCoV-229E et sur le SARS-CoV-2 à des étapes différentes du cycle infectieux. Des expériences sont en cours pour mieux caractériser leur mécanisme d'action.

Membres du jury :

Présidente : **Dr RIVIERE Céline**, Maître de Conférences des Universités, Université de Lille

Directrice : **Pr GOFFARD Anne**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CHU de Lille

Assesseurs : **Dr SERON Karin**, Chargée de recherche, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Dr ZAWADZKI Christophe, Praticien Hospitalier, CHU de Lille

Membre extérieur : **Dr BROCHOT Etienne**, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier, CHU d'Amiens.