



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'activité anti-zika et anti-coronavirus d'une nouvelle classe de petites molécules à large spectre antiviral, inhibitrices des cyclophilines

Laurent Softic

## ► To cite this version:

Laurent Softic. Caractérisation de l'activité anti-zika et anti-coronavirus d'une nouvelle classe de petites molécules à large spectre antiviral, inhibitrices des cyclophilines. Virologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2021. Français. NNT : 2021PA120035 . tel-03675183

**HAL Id: tel-03675183**

**<https://theses.hal.science/tel-03675183v1>**

Submitted on 23 May 2022

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

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

# UNIVERSITE PARIS-EST

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, CRETEIL (ED 402)

INSERM U955-IMRB, Equipe 18 « Virus, Hépatologie, Cancer »



## **Caractérisation de l'activité anti-Zika et anti-Coronavirus d'une nouvelle famille de petites molécules à large spectre antiviral, inhibitrices des cyclophilines**

Par Laurent Softic

Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris-Est

Présentée et soutenue publiquement le 5 mars 2021

Devant un jury constitué de :

**Dr Sandrine Belouzard** : Rapportrice

**Pr Pierre-Emmanuel Ceccaldi** : Rapporteur

**Dr Muriel Couplier** : Examinatrice

**Dr Jean K. Millet** : Examineur

**Pr Jean-Michel Pawlotsky** : Directeur de thèse

**Dr Abdelhakim Ahmed-Belkacem** : Encadrant

## Résumé en français

Au cours des dernières années, l'émergence de nombreux virus (H5N1, SARS, Chikungunya, MERS, Ebola, Zika, SARS-CoV-2) a souvent défrayée la chronique, mettant l'accent sur notre vulnérabilité face aux risques de pandémies, dont le SARS-CoV-2 est un très bon exemple, car il n'existe aucun médicament pour lutter efficacement contre ces infections virales.

Pour répondre à cette problématique le laboratoire a développé des antiviraux à large spectre capable de bloquer l'infection de plusieurs virus non apparentés. La dépendance de nombreux virus aux cyclophilines, en ont fait une cible idéale pour le design d'un antiviral à large spectre. Nous avons conçu des petites molécules inhibitrices de cyclophilines (SMCypI pour « Small Molecules Cyclophilins Inhibitors ») par FBDD (« Fragment Based Drug Design »). Ces molécules se fixent dans les deux poches du site actif des cyclophilines et inhibent leur activité enzymatique (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase ou PPIase).

Le composé C31 (F759) a montré une activité antivirale pan-génotypique contre le VHC. Il rompt l'interaction entre la protéine virale NS5A et la cyclophiline A et possède une haute barrière à la résistance. L'activité antivirale du composé dépend de l'inhibition de l'activité enzymatique des cyclophilines et les deux phénomènes sont finement corrélés. Le C31 inhibe la réplication de plusieurs virus de la famille des *Flaviviridae* de façon plus ou moins importante : la Dengue, le virus de la Fièvre Jaune, Zika et le virus West Nile.

Afin d'améliorer l'activité antivirale du F759 sur le virus Zika, un crible de 25 SMCypI sur l'infection par la souche MR766, a permis d'identifier le composé F833 comme le plus actif. Il inhibe de plus deux logs la quantité d'ARN viral intracellulaire à 25 $\mu$ M. Une étude de relation structure activité des SMCypI criblés, montre que deux groupements chimiques particuliers sont déterminants pour l'activité anti-Zika. Contrairement au VHC, l'activité anti-PPIase est nécessaire mais pas suffisante pour inhiber la réplication, comme le montre l'incapacité de la CsA et de l'Alv, de puissants inhibiteurs de la PPIase, à inhiber la réplication du virus Zika. L'activité antivirale du

F833 a été caractérisée et il semblerait que le composé inhibe une étape post-entrée du cycle viral.

Un crible de 29 SMCypl a été réalisé sur l'infection par le coronavirus HCoV-229E. Contrairement au VHC et à l'instar du virus Zika, l'activité anti-PPiase est nécessaire mais pas suffisante pour inhiber la réplication du virus HCoV-229E. L'étude de la relation de structure activité des composés a permis d'identifier des groupements chimiques déterminants pour l'activité antivirale situés à l'interface des deux poches du site actif des cyclophilines.

Le composé F836 a été identifié comme le meilleur composé et inhibe la production d'ARN viral intracellulaire de plus de deux logs, de façon comparable à l'Alv. Le composé est actif sur une étape précoce du cycle pour les coronavirus : HCoV-229E, SARS-CoV2, OC43 et MERS-CoV. Il est actif sur HCoV-229E sur une étape post attachement, quel que soit le mode d'entrée du virus

L'étude sur la résistance du virus au composé a permis d'identifier une mutation dans la partie 5' non codante du génome, région de structures en tige boucle très conservée chez les coronavirus et zone d'interaction avec la protéine virale N. Cette mutation entraîne un changement au niveau de la structure secondaire de l'ARN viral.

Enfin le F836 favorise l'interaction de la protéine N du HCoV-229E et du SARS-CoV-2 avec la cyclophiline A.

Les SMCypl sont des candidats crédibles pour le développement d'antiviraux à large spectre et ils constituent un outil particulièrement intéressant dans la compréhension de l'implication des cyclophilines dans les cycles viraux.

Dans le contexte de la pandémie liée au SARS-CoV-2 nous avons montré l'intérêt que peuvent avoir les inhibiteurs de cyclophilines puisque l'Alv a des effets comparables à l'hydroxychloroquine *in vitro* et bloque la réplication du virus à une étape plus tardive, post entrée, du cycle viral. Nous avons également montré, en collaboration avec une équipe de dermatologues de l'hôpital Henri Mondor, l'intérêt

potentiel de l'ivermectine et de la moxydectine comme traitement prophylactique pour lutter contre l'infection par le SARS-CoV-2.

## Résumé en anglais

In recent years, the emergence of many viruses (H5N1, SARS, Chikungunya, MERS, Ebola, Zika, SARS-CoV-2) has often made headlines, emphasizing our vulnerability to pandemic risks, of which SARS-CoV-2 is a very good example, because there is no drug to effectively fight against these viral infections.

To respond to this problem, our team developed broad spectrum antivirals able to block infection by many unrelated viruses. The dependence of many viruses on cyclophilins has made it an ideal target for the design of a broad-spectrum antiviral. In collaboration with a team from Montpellier, the laboratory designed SMCypl (Small Molecules Cyclophilins Inhibitors) by FBDD (Fragment Based Drug Design). These molecules bind to both pockets of the active site of cyclophilins and inhibit their enzyme activity (Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase or PPIase)

Compound C31 (F759) has shown pan-genotypic antiviral activity against HCV. Compound C31 disrupt viral protein NS5A and cyclophilin A interaction and has a high barrier to resistance. The antiviral activity of SMCypl depends on the inhibition of the enzyme activity of cyclophilins and the two phenomena are finely correlated. C31 inhibits the replication of several viruses in the *Flaviviridae* family in a more or less important way : Dengue, Yellow Fever, Zika and West Nile virus.

In order to improve the antiviral activity of F759 on the Zika virus, a screening of 25 SMCypl on MR766 strain infection, enabled to identify the F833 compound as the most active. It inhibits the production of intracellular viral RNA with more than 2 logs at 25 $\mu$ M. A structure activity relationship study of screened SMCypl shows that two particular chemical groups are decisive for Zika replication inhibition. Unlike HCV, anti-PPIase activity is necessary but not sufficient to inhibit replication, as evidenced by the inability of CsA and Alv, powerful PPIase inhibitors, to inhibit Zika virus

replication. The antiviral activity of F833 has been characterized and it appears that the compound inhibits a post entry stage of the viral cycle.

A screening of 29 SMCypl was performed on HCoV-229E coronavirus infection. Unlike HCV and like the Zika virus, anti-PPIase activity is necessary but not sufficient to inhibit the replication of the HCoV-229E virus. The structure activity relationship study of the SMCypl screened helped to identify chemical groups that are critical to antiviral activity at the interface between the two pockets of cyclophilins active site.

The F836 has been identified as the best compound and inhibits the production of intracellular viral RNA with more than two logs, similar to alisporivir. The compound is active in an early stage of many coronaviruses life cycle : HCoV-229E, SARS-CoV-2, OC43 and MERS-CoV. It is active on HCoV-229E on a post attachment stage, regardless of the two entry mode of coronaviruses.

The virus resistance study, has enabled to identify a mutation in the 5' untranslated region (UTR) of the genome, a region of highly conserved stem loop structures and an area of interaction with the viral protein N. This mutation changes the secondary structure of viral RNA.

Finally, F836 promotes HCoV-229E and SARS-CoV-2 N protein interaction with cyclophilin A.

SMCypl are drugable compounds for the development of broad-spectrum antivirals and are a particularly interesting tool to understand the involvement of cyclophilins in viral life cycles.

In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, we have shown the value that cyclophilin inhibitors may have, given that Alv has effects comparable to hydroxychloroquine *in vitro* and blocks virus replication at a later stage of the viral life cycle (post entry). We have also shown, in collaboration with a dermatologists' team, the potential interest of Ivermectin and moxydectin as a prophylactic treatment to fight SARS-CoV-2 infection

## Liste des abréviations

**Alv** : Alisporvir

**BSAA** : « Broad-Spectrum Antiviral Agent », antiviral à large spectre

**CoV** : Coronavirus

**CsA** : Cyclosporine A

**Cyp** : Cyclophiline

**DAA** : « Direct-Acting Antiviral », antiviral à action directe

**DENV** : « Dengue Virus »

**EC50** : « Effective Concentration 50 », concentration efficace à 50 %

**ECP** : Effet cytopathique

**EMMPRIN** : « Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer »

**FDA** : « Food and Drug Administration »

**HAT** : « Human Airway Trypsin-like protease »

**HTA** : « Host-Targeting Agent », antiviral ciblant l'hôte

**IC50** : « Inhibitory Concentration 50 », concentration inhibitrice à 50 %

**IFN** : Interféron

**KO** : « Knock-Out »

**MERS** : « Middle-East Respiratory Syndrome »

**NFAT** : « Nuclear Factor of Activated T-cells »

**NS5A** : « Non-structural 5A » nsp : « non-structural protein », protéine non structurale

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PPIase** : Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase

**RBD** : « Receptor Binding Domain », domaine d'interaction avec le récepteur

**SARS** : « Severe Acute Respiratory Syndrome »

**SIDA** : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

**siRNA** : « small-interfering Ribonucleic Acid »

**SMCypI** : « Small-Molecule Cyclophilin Inhibitor », petite molécule inhibitrice des cyclophilines

**TMPRSS2** : « Transmembrane Protease Serine 2 », protéase transmembranaire à serine 2

**UTR** : « Untranslated Region », région non traduite

**VHB** : Virus de l'Hépatite B

**VHC** : Virus de l'Hépatite C

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**WNV** : « West-Nile Virus », virus du Nil Occidental

**WT** : « Wild-Type », sauvage

**YFV** : « Yellow Fever Virus », virus de la fièvre jaune

**ZIKV** : « Zika Virus »

## Liste des figures

**Figure 1** : Frise chronologique représentant les principales épidémies ou pandémies du XXème et XXIème siècle

**Figure 2** : Arbre phylogénique de la famille des *Flaviviridae* avec les trois genres : *Hepacivirus*, *Flavivirus* et *Pestivirus*

**Figure 3** : Répartition géographique du virus Zika entre 1947 et 2016

**Figure 4** : Structure et génome du virus Zika

**Figure 5** : Schéma de la structure de la protéine E du virus Zika

**Figure 6** : Cycle de vie du virus Zika

**Figure 7** : Classification et taxonomie de la famille des *Coronaviridae*

**Figure 8** : Répartition géographique des coronavirus NL63, HKU1, OC43 et 229E

**Figure 9** : Répartition géographique des coronavirus MERS et SARS

**Figure 10** : Schéma de la particule virale des coronavirus

**Figure 11** : Génome de la souche SARS-CoV

**Figure 12** : Génomes de coronavirus humains

**Figure 13** : Schéma de la protéine Spike

**Figure 14** : Schéma de la fusion de la membrane plasmique avec la membrane virale médiée par les domaines HR1 et HR2 de la protéine Spike

**Figure 15** : Schéma de la protéine N

**Figure 16** : Représentation des étapes de réplication et de transcription des coronavirus

**Figure 17** : Cycle de vie des coronavirus

**Figure 18** : Nombre de drogues approuvées par la FDA entre 1963 et 2016 pour 9 virus différents : HIV, HCV, HSV, Influenza, HBV, VZV, HCMV, RSV et HPV

**Figure 19** : Schéma représentatif du caractère immunosuppresseur de la CsA

**Figure 20** : Structure de la Cyclosporine A et de son dérivé non immunosuppresseur l'Alisporivir

**Figure 21** : Schéma représentatif des différentes étapes de fabrication des inhibiteurs de cyclophilines

**Figure 22** : Structure tridimensionnelle représentant le composé 24 lié au site catalytique et à la poche gardienne de la cyclophiline

**Figure 23** : Activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase qui catalyse l'interconversion cis-trans de la liaison peptidyl-prolyl en amont d'un résidu proline

**Figure 24** : Représentation « surfaces » du site actif de la CypA avec les deux poches catalytique et gardienne qui le compose

**Figure 25** : Représentation de la protéine NS5A du VHC

**Figure 26** : Schéma représentant la formation des DMV CypA et NS5A-dépendant dans le cycle de vie du VHC

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Protéines non structurales du virus Zika et leurs fonctions principales

**Tableau 2** : Tableau représentant les données de publications sur l'inhibition de la réplication des coronavirus par les inhibiteurs CsA et Alv

<b>Introduction</b> .....	13
I) Emergence et réémergence virale.....	13
A) Histoire des épidémies virales .....	13
B) Le virus Zika.....	16
1) Epidémiologie.....	17
2) Symptômes.....	18
3) Vecteurs et transmission.....	18
4) Structure et génome .....	19
a) Les protéines structurales .....	20
b) Les protéines non structurales .....	21
5) Cycle de vie.....	22
C) Les Coronavirus.....	24
1) Epidémiologie et symptômes des coronavirus humains .....	25
a) Les coronavirus bénins .....	25
b) Les coronavirus responsables d'infections respiratoires sévères.....	26
2) Transmission et émergence .....	28
3) Structure et génome .....	30
a) La région 5' non codante.....	32
b) Les protéines non structurales.....	32
c) Les protéines structurales .....	33
4) Cycle de vie des coronavirus .....	36
a) Attachement et entrée.....	36
b) Traduction, Réplication et Transcription.....	38
c) Assemblage et Relargage .....	39
D) Conclusion générale partie I .....	41
II) Les Antiviraux.....	42
A) Antiviraux à action directe.....	43
B) Antiviraux ciblant l'hôte.....	44
1) La Cyclosporine A .....	46
2) L'Alisporivir.....	47
3) Petites molécules non peptidiques, inhibitrices des cyclophilines SMCypl (« Small Molecules Cyclophilins Inhibitors ») .....	48
III) Les Cyclophilines .....	50
A) Structure et fonctions .....	50
B) Rôle des cyclophilines et conditions physiologiques.....	52

IV)	Cyclophilines et virus .....	53
A)	Flaviviridae et cyclophilines .....	54
B)	Coronavirus et cyclophilines .....	57
V)	Objectifs .....	61
<b>Matériels et Méthodes</b>	.....	<b>62</b>
I)	Modèles d'études .....	62
II)	Techniques utilisées.....	64
A)	RT-qPCR.....	64
B)	Immunofluorescence .....	65
C)	Mesure de l'effet cytopathique viro-induit (ECP).....	65
D)	Western Blot .....	66
III)	Caractérisation de l'activité antivirale des SMCypl .....	67
A)	Crible d'une librairie de « Small Molecule Cyclophilin Inhibitors » (SMCypl) .....	67
B)	Cytotoxicité des meilleurs composés .....	67
C)	Gammes de concentrations par RT-qPCR.....	68
D)	Gamme de concentrations en Immunofluorescence .....	68
E)	Titration des virus produits en présence de SMCypl.....	69
F)	Effet antiviral à large spectre du F836 sur les coronavirus.....	69
IV)	Mécanisme d'action antiviral des SMCypl.....	71
A)	Test de temps d'ajout (TTA).....	71
B)	Caractérisation de l'entrée du 229E dans les MRC5.....	71
C)	Test d'entrée.....	72
D)	Pseudo-particules HCoV-229E .....	73
E)	Résistance du HCoV-229E au F836 .....	73
F)	Identification de la cyclophiline impliquée dans le cycle du HCoV-229E .....	74
<b>Résultats</b>	.....	<b>75</b>
I)	Les Flaviviridae .....	75
A)	Caractérisation de l'activité anti-VHC du composé C31 et évaluation de son spectre antiviral sur les virus de la famille des <i>flaviviridae</i> .....	75
B)	Caractérisation de l'activité anti-Zika des SMCypl .....	90
1)	Crible des SMCypl et Relation de Structure Activité.....	90
2)	Caractérisation de l'activité antivirale du meilleur composé, le F833.....	96
3)	Détermination de l'étape du cycle viral ciblée par le F833.....	98
II)	Les Coronaviridae.....	100

A) Crible des SMCypl à 50 $\mu$ M et Relation de Structure Activité .....	100
B) Caractérisation de l'activité antivirale du F836 .....	107
C) Mécanisme d'action anti-229E du F836 .....	112
1) Détermination de l'étape du cycle viral ciblée par le F836.....	112
a) Le F836 bloque une étape précoce du cycle viral du HCoV-229E.....	112
b) Caractérisation de l'entrée du virus HCoV-229E dans les cellules MRC5 .....	114
c) Le F836 cible une étape commune aux deux voies d'entrée.....	116
d) Le F836 bloque une étape post-attachement du cycle viral du HCoV-229E .	117
2) Résistance du virus HCoV-229E au composé F836 .....	119
3) Identification de la cyclophiline impliquée dans le cycle du HCoV-229E.....	126
III) Repositionnement de drogues pour la lutte contre l'infection par le SARS-CoV-2..	128
A) Alisporivir .....	128
B) Ivermectine .....	134
<b>Discussion.....</b>	<b>166</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>178</b>

# Introduction

## I) Emergence et réémergence virale

### A) Histoire des épidémies virales

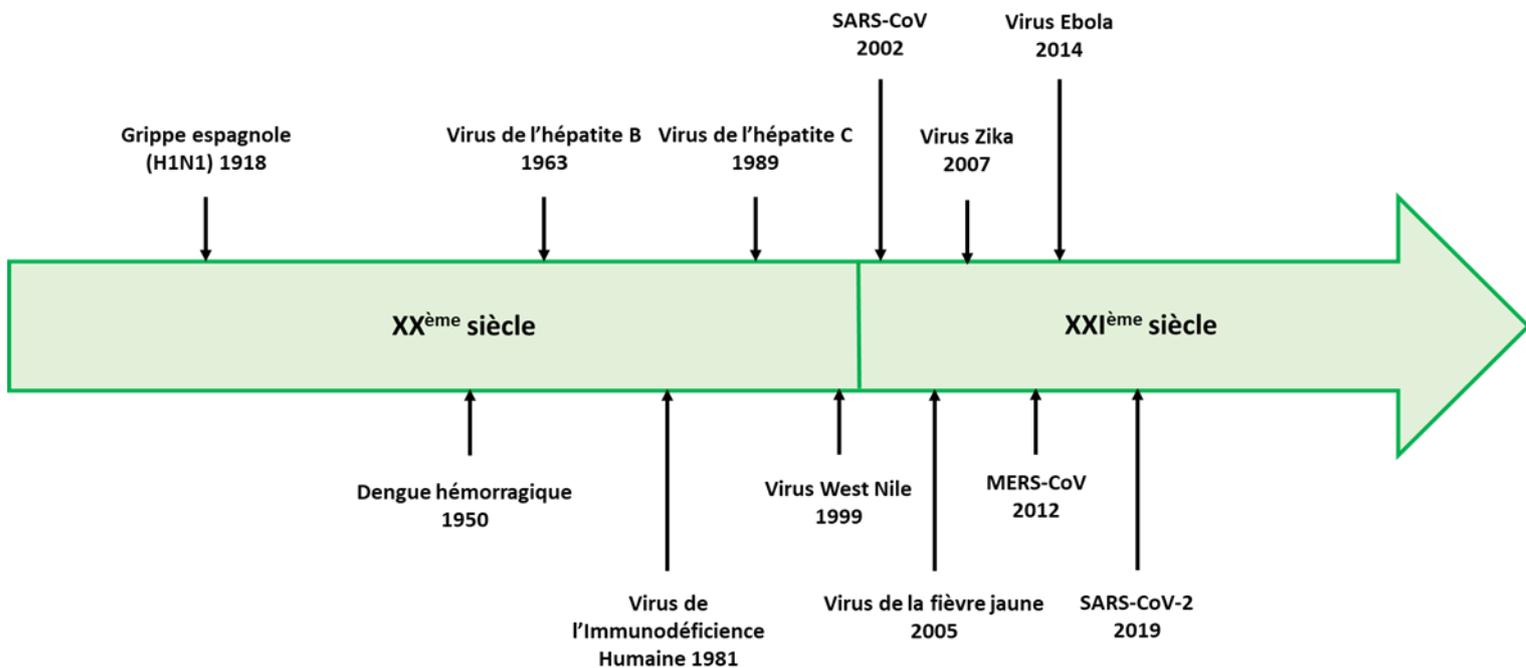


Figure 1: Frise chronologique représentant les principales épidémies ou pandémies du XX<sup>ème</sup> et XXI<sup>ème</sup> siècle

Au cours du XX<sup>ème</sup> et XXI<sup>ème</sup> siècle, l'Homme a été confronté à plusieurs épidémies ou pandémies mortelles (**Figure 1**).

Le début du XX<sup>ème</sup> siècle a été marqué par la pandémie de grippe espagnole (souche H1N1) de 1918 qui aurait contaminé près d'un tiers de la population mondiale et aurait tué entre 20 et 100 millions de personnes en l'espace d'une année faisant de cette pandémie, la plus meurtrière de tous les temps ([WHO](#)).

La dengue hémorragique, causée par un arbovirus de la famille des *Flaviviridae*, est apparue en 1950, aux Philippines et en Thaïlande. Avant 1970, seuls neuf pays avaient connu des épidémies de dengue sévère. Aujourd'hui le virus est endémique dans plus de 100 pays répartis principalement en Asie, en Amérique, en Afrique et sur le pourtour méditerranéen. Bien que 80% des cas soient asymptomatiques, on estime qu'il y aurait entre 100 et 400 millions d'infections par an dans le monde et plusieurs milliers de décès (WHO).

En 1963, le généticien Baruch Blumberg, découvre le virus de l'Hépatite B (VHB). Ce virus est aujourd'hui endémique sur tous les continents. En 2015 l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 257 millions le nombre de porteurs d'une hépatite B chronique et à 887 000 le nombre de décès cette année là. Il est également à noter que seulement 10,5% de la population infectée en a connaissance et 16,7% des personnes diagnostiquées sont sous traitement (WHO).

En 1981, aux États-Unis, de nombreuses personnes meurent des suites d'infections opportunistes inhabituelles. Très vite ce syndrome est appelé syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Sharp and Hahn 2011). Il faudra attendre 1983 pour l'identification du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) comme agent étiologique du SIDA. L'OMS estimait, à la fin de l'année 2019, à 38 millions le nombre de personnes infectées par ce virus et à 33 millions le nombre de décès survenus depuis la découverte du VIH (WHO).

Responsable de maladies du foie (fibrose, cirrhose et CHC), le virus de l'hépatite C (VHC) a été isolé en 1989 (Choo et al. 1989). L'OMS estime que 71 millions d'individus sont porteurs chroniques du virus de l'hépatite C et qu'environ 400 000 personnes succombent chaque année principalement de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire. (WHO).

Depuis la fin du XXème siècle, de nombreux virus de familles différentes ont émergé ou réémergé et causé des problèmes de santé publique majeurs :

- Les arbovirus de la famille des *Flaviviridae* ont largement participé à défrayer la chronique comme le virus West Nile (WNV) en 1999 aux Etats-

Unis, le virus de la fièvre jaune (YFV) en 2005, responsable de 52000 décès dans plusieurs pays d'Afrique, ou encore le virus Zika, responsable entre 2007 et 2017 de nombreuses épidémies dans le Pacifique et le continent Américain ; ([WHO](#))

- En Afrique, le virus Ebola (EBV) a sévit à plusieurs reprises entre 2014 et 2016. Environ 28000 cas ont été recensés avec un taux de létalité proche de 40%. Depuis 2018, une nouvelle épidémie est en cours en République Démocratique du Congo, où trois souches différentes ont été en circulation. ([WHO](#))
- Trois nouveaux coronavirus ont émergé au cours des vingt dernières années. Tout d'abord le « Severe Acute Respiratory Syndrome » (SARS-CoV), apparu en Chine en 2002 et causant la mort de 774 personnes pour 8096 cas déclarés. Dix ans plus tard, un nouveau coronavirus sévit au Moyen-Orient, le « Middle East Respiratory Syndrome » (MERS-CoV) et entraîna la mort de 704 personnes pour 2029 cas déclarés. Fin 2019 le « Severe Acute Respiratory Syndrome 2 » (SARS-CoV-2) émergea en Chine et entraîna rapidement une pandémie toujours en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit. Ce nouveau coronavirus est responsable d'une crise sanitaire et économique sans précédent.

Au cours de ma thèse, mes recherches se sont concentrées sur des virus appartenant à la famille de *Flaviviridae* (VHC et Zika) et des *Coronaviridae* (HCoV-229E et SARS-CoV-2). Dans la partie qui va suivre nous présenterons dans le détail l'épidémiologie, la transmission, la structure des particules virales, le génome et le cycle répliatif du virus Zika et du HCoV-229E.

## B) Le virus Zika

Découvert en 1947 et isolé à partir d'un singe en Ouganda, le virus Zika est principalement transmis par des moustiques de type Aedes. Cet arbovirus appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *flavivirus* (Figure 2). Il existe deux lignées principales, la lignée africaine et la lignée asiatique.

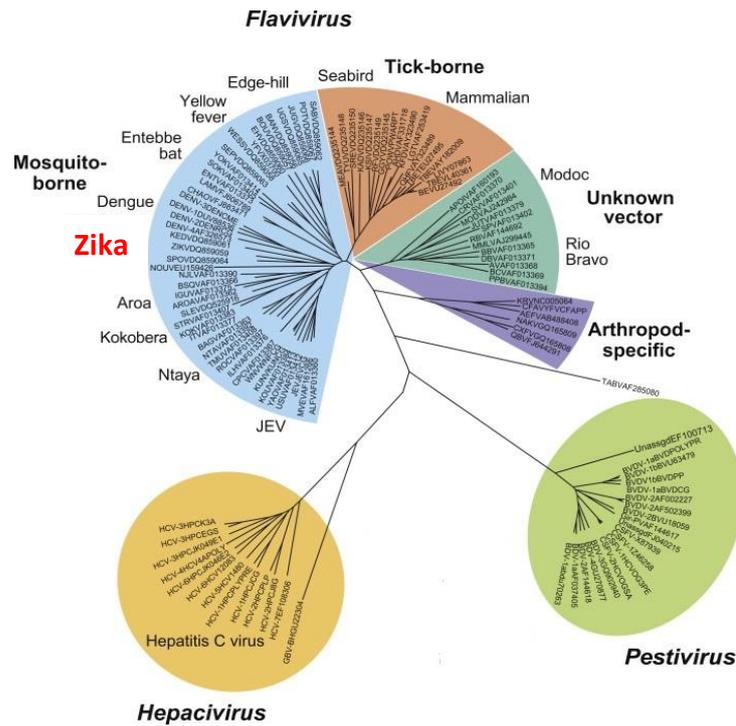


Figure 2 : Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae* avec les trois genres : *Hepacivirus*, *Flavivirus* et *Pestivirus*

Le virus Zika infecte de nombreux types cellulaires différents tels que : les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules dendritiques et les cellules neuronales progénitrices.

## 1) Epidémiologie

Le premier cas d'infection humaine a été découvert en 1952 en Afrique ([Zika Virus \(I\). Isolations and serological specificity](#)). Jusqu'en 2007 les cas d'infections humains étaient sporadiques et géographiquement limités à l'Afrique et l'Asie du sud-est mais en 2007 le virus Zika a provoqué une grande épidémie en Micronésie et dans des îles du Pacifique. En 2013, la Polynésie française et les îles Cook ont également été affectées. Entre 2014 et 2017 le virus est devenu endémique en Amérique du sud et centrale avec plus de 1 500 000 cas survenus principalement au Brésil qui, sur l'année 2015, a enregistré entre 440 000 et 1 300 000 nouveaux cas ([Bogoch et al. 2016](#))(**Figure 3**).

Le virus s'est rapidement disséminé sur la planète, passant d'une vingtaine de pays touchés en janvier 2012 à 73 en mai 2017. Fin 2017, seuls quelques cas sporadiques étaient rapportés, dont 2 cas autochtones au cours de l'été 2019 à Hyères dans le sud de la France ([Salinas et al. 2019](#)).

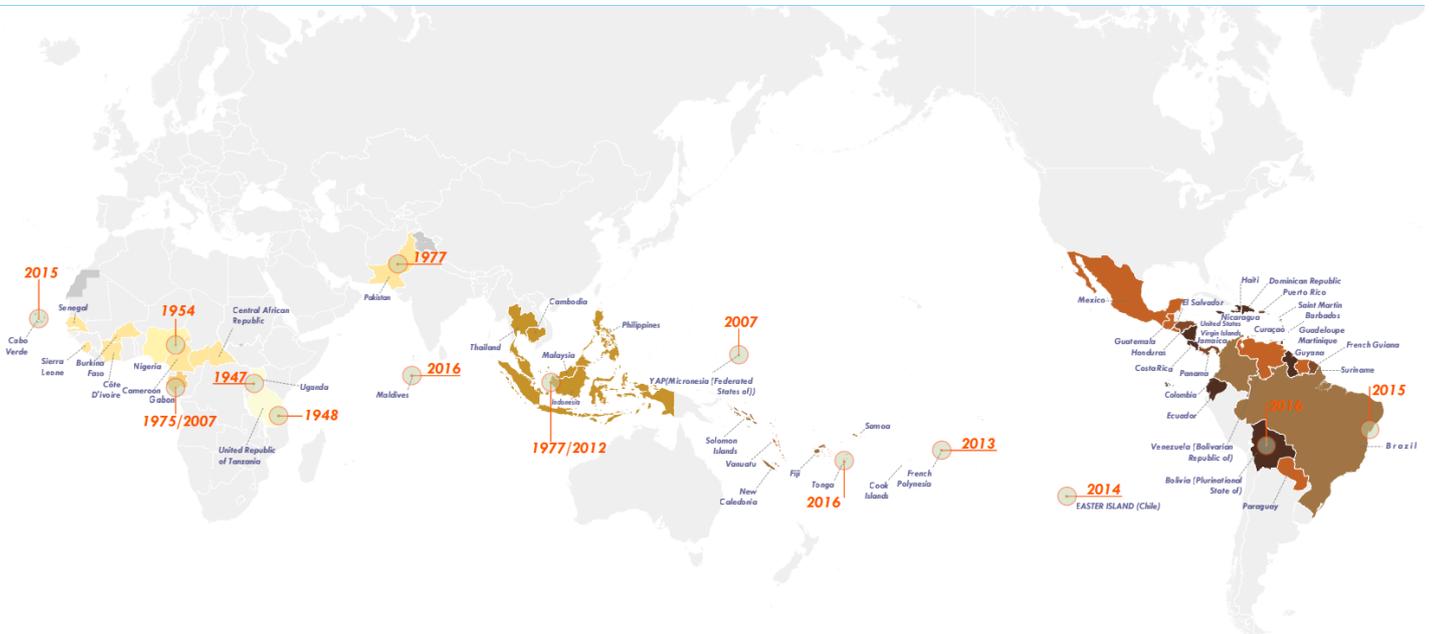


Figure 3: Répartition géographique du virus Zika entre 1947 et 2016 (OMS)

## 2) Symptômes

Seules 20% des personnes infectées développent des signes cliniques visibles, (maux de tête, fièvres modérées, éruption cutanée, douleurs musculaires et conjonctivite). Des études au Brésil ont démontré un lien entre le virus Zika et les microcéphalies pour des enfants nés de femmes infectées, le syndrome de Guillain Barré et les méningo-encéphalites chez les adultes infectés ([Araujo, Silva, and Araujo 2016](#); [Nascimento and Da Silva 2017](#); [Ventura et al. 2016](#)). Au plus fort de l'épidémie, le Brésil comptait 5280 cas de microcéphalies alors qu'entre 2010 et 2014 le pays n'enregistrait que 163 cas annuels ([Heukelbach et al. 2016](#)).

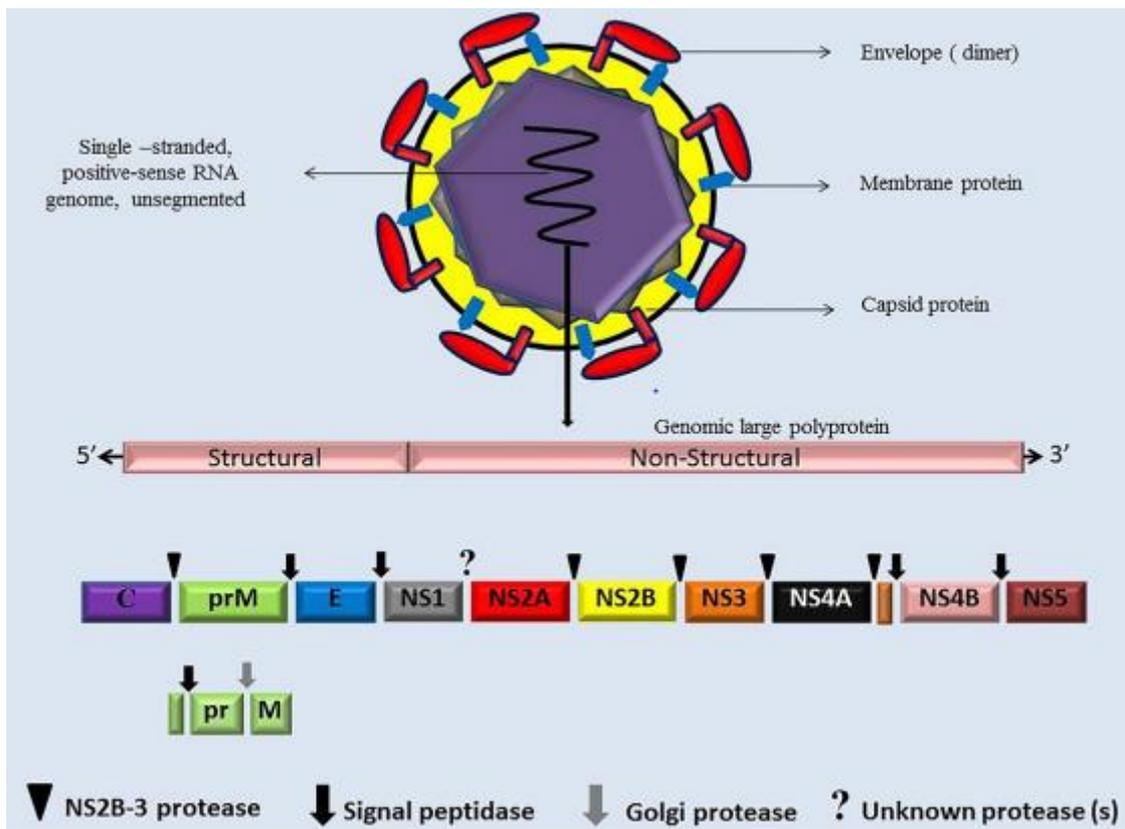
Il n'existe à cette heure aucun vaccin ni traitement pour lutter contre l'infection par le virus Zika.

## 3) Vecteurs et transmission

Les principaux vecteurs du virus Zika sont les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* mais le virus a également été isolé à partir d'autres espèces de moustiques *Aedes* : *furcifer*, *vittatus*, *taylori* et *hirsutus*.

Les moustiques femelles transmettent le virus par pique. Une transmission interhumaine par voie sexuelle, sanguine et materno-foétale ainsi qu'une transmission inter-espèce entre l'homme et le singe ont été observées ([Alam et al. 2017](#)).

#### 4) Structure et génome



**Figure 4 : Structure et génome du virus Zika (Javed et al. 2018)** - Le virus Zika possède un ARN simple brin de polarité positive avec un seul cadre ouvert de lecture d'environ 10kb codant 3 protéines structurales Capside C, pré Membrane prM et Enveloppe E , et 7 protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5

Le virus Zika est un virus enveloppé de 50nm de diamètre possédant une capsid icosaédrique et renfermant un ARN de polarité positive non segmenté d'environ 10,8 kb coiffé en 5' et non polyadénylé en 3'. Un seul cadre ouvert de lecture d'environ 10kb est encadré par des régions non traduites de 107 et 428 nucléotides (UTR pour « Untranslated Region ») en 5' et 3' respectivement. La polyprotéine résultante est successivement clivée en 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales (Göertz et al. 2018)(Figure 4).

### a) Les protéines structurales

La protéine de capside (C) est composée de 122 acides aminés et forme en complexe avec l'ARN viral, la nucléocapside. Celle-ci correspond à une copie d'ARN génomique entouré par 60 dimères de C. La protéine est constituée de 5 hélices alpha. Les hélices  $\alpha_1$  et  $\alpha_3$  interagissent avec la membrane du virion tandis que l'hélice  $\alpha_4$ , dans la région N-terminal, interagit avec l'ARN viral. La dimérisation de la protéine de capside est également essentielle pour l'étape d'assemblage (Barnard et al. 2021).

La protéine de membrane M ou de pré membrane prM est constituée de 178 acides aminés. Elle est située sous la couche de protéines d'enveloppe E de la particule virale et forme avec celle-ci une symétrie icosaédrique. La surface du virus est constituée de 60 trimères de l'hétérodimère de E et prM. Elle est principalement impliquée dans l'étape de fusion et dans la stabilisation de la structure de la particule virale (Javed et al. 2018).

La protéine d'enveloppe E, constituée d'environ 500 acides aminés contient 3 domaines : (i) le domaine I impliqué dans la structure de l'enveloppe ; (ii) le domaine II contenant un peptide de fusion et un domaine de dimérisation ; (iii) le domaine III, impliqué dans l'attachement aux récepteurs cellulaires (AXL, DC-SIGN, tyro3) (Yang, Gong, and de Val 2019) (Figure 5). Cette protéine virale joue un rôle majeur dans l'entrée et la fusion membranaire.



**Figure 5 : Schéma de la structure de la protéine E du virus Zika** – DI : Domaine I ; DII : Domaine II ; DIII : Domaine III ; PF : Peptide de Fusion ; S : « Stalk » ; TM : domaine Transmembranaire

## b) Les protéines non structurales

Les fonctions des protéines non structurales du virus Zika sont répertoriées dans le **tableau 1**.

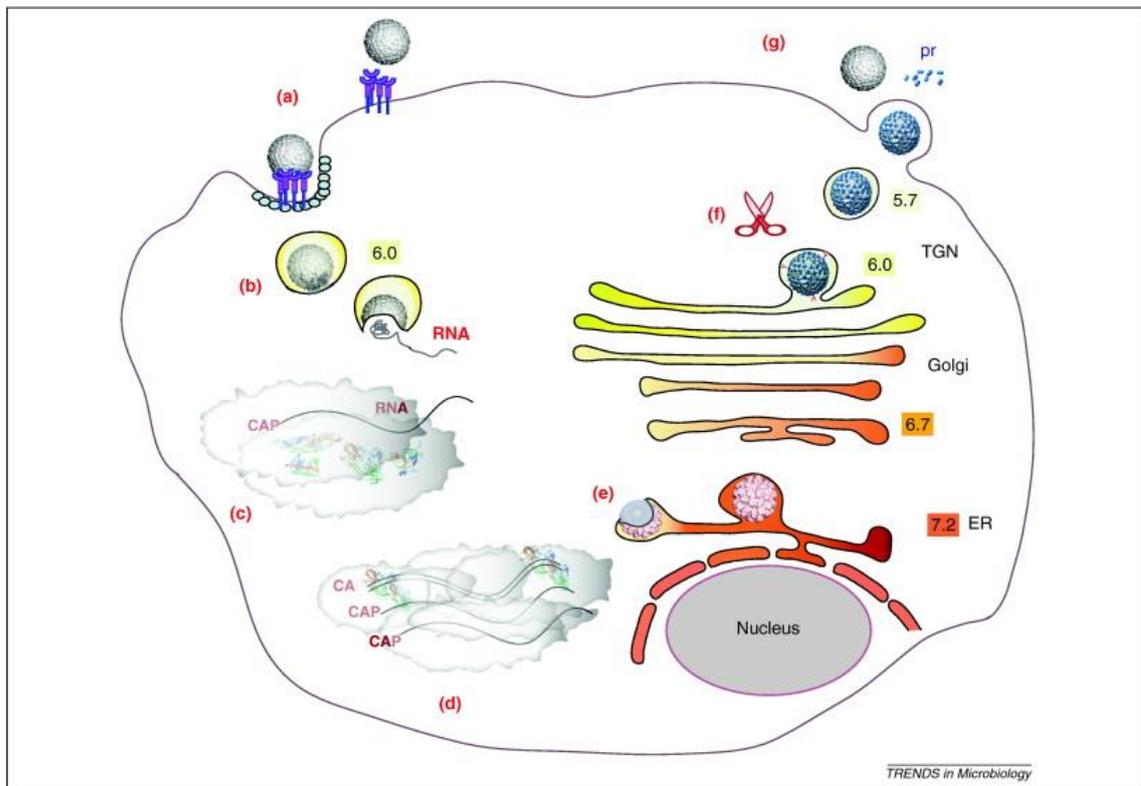
L'activité protéase de NS3 permet le clivage de polyprotéine, en association avec son co-facteur NS2B, permettant la libération des protéines structurales et non structurales. La protéine NS4A est impliquée dans la formation du complexe de réplication transcription. La protéine NS5 possède deux activités : l'activité ARN polymérase ARN dépendante en C-terminal et l'activité méthyltransférase en N terminal.

Les autres protéines participent aux étapes de réplication et de transcription du cycle viral et également à l'échappement immunitaire comme c'est le cas de la protéine NS1 qui peut être sécrétée de la cellule infectée et interagit avec des composants du système immunitaire ([Javed et al. 2018](#); [Valente and Moraes 2019](#)).

Protéines NS	Fonctions principales
NS1	Réplication et assemblage
NS2A	Réplication et échappement au système immunitaire
NS2B	Co facteur de NS3 pour le clivage de la polyprotéine
NS3	Sérine protéase, Clivage polyprotéine, activité hélicase et triphosphatase
NS4A	Réplication, co facteur de NS3
NS4B	Formation du complexe de réplication, réplication et échappement au système immunitaire
NS5	Activité ARN polymérase ARN dépendante, activité méthyltransférase

Tableau 1 : Protéines non structurales du virus Zika et leurs fonctions principales

## 5) Cycle de vie



**Figure 6: Cycle de vie du virus Zika** - a) Attachement et entrée du virus par endocytose b) Fusion de la membrane du virus avec la membrane de l'endosome et libération du génome dans le cytoplasme. c) Traduction de la polyprotéine. d) Réplication de l'ARN viral dans le complexe de réplication au niveau du RE. e) Assemblage du virion immature et bourgeonnement dans le RE. f) Maturation du virion dans l'appareil de Golgi par clivage de prM g) Sortie du virion par exocytose (Perera, Khaliq, and Kuhn 2008)

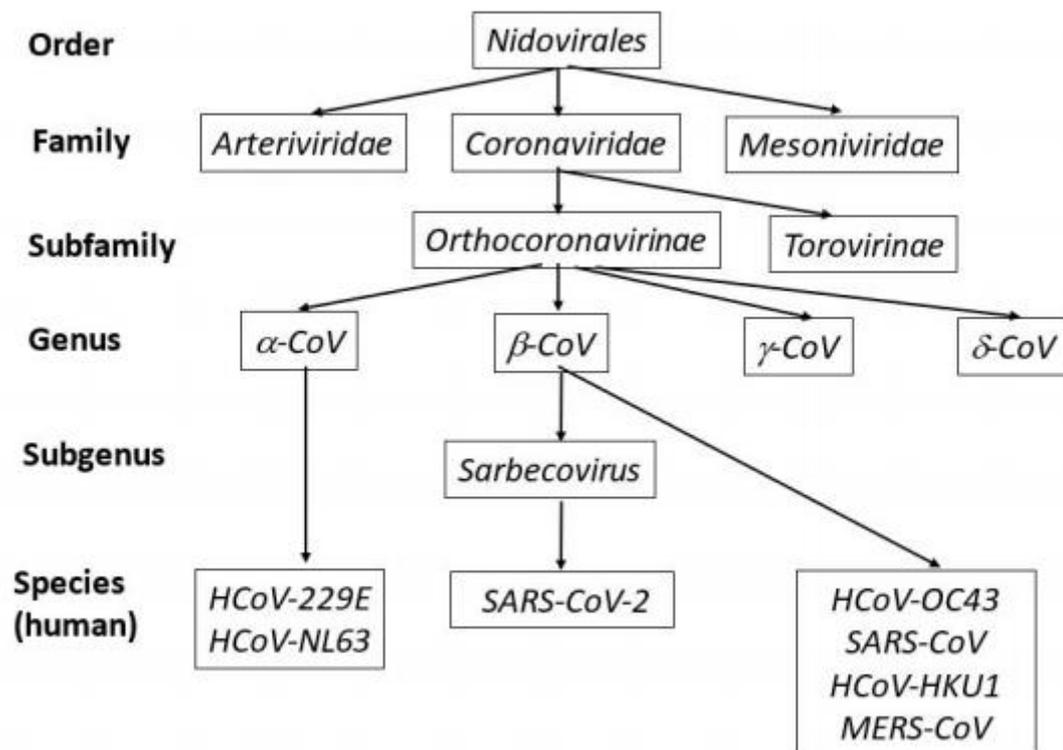
Après l'attachement du virion à la membrane plasmique de la cellule hôte via ses protéines d'enveloppe E, le virus entre par endocytose clathrine dépendante par l'intermédiaire des facteurs d'adhésions DC-SIGN, AXL et Tyro3 (Hamel et al. 2015). L'acidification du pH à l'intérieur de l'endosome entraîne un changement conformationnel de la protéine E et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome libérant ainsi l'ARN viral dans le cytoplasme (Bos et al. 2019). L'ARN de polarité positive est directement traduit en une polyprotéine par la machinerie cellulaire. La polyprotéine est ensuite clivée par la protéase NS3 et par des protéases cellulaires afin de donner les 3 protéines de structures et les 7 protéines non structurales (Bos et al. 2018; Medin and Rothman 2017).

Le brin d'ARN positif sera transcrit par l'ARN polymérase ARN dépendante en ARN négatif qui d'une part servira de matrice pour la synthèse des nouveaux brins ARN positifs et d'autre part sera traduit pour donner les protéines virales.

La réplication du génome viral a lieu à proximité du réticulum endoplasmique (RE) dans des complexes de réplication formés par les protéines non structurales. Les nouveaux ARN viraux simples brins de polarité positive transcrits sont assemblés dans le RE au sein des nouveaux virions formés. Après maturation dans l'appareil de Golgi, où a notamment lieu le clivage par une furine de la protéine de structure prM, les nouveaux virions sont libérés par exocytose ([White et al. 2016](#))(**Figure 6**).

## C) Les Coronavirus

Les coronavirus appartiennent à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous famille des *Orthocoronavirinae*, qui regroupe 4 genres : les alpha-coronavirus, les beta-coronavirus, les gamma-coronavirus et les delta-coronavirus (**Figure 7**).



**Figure 7 : Classification et taxonomie de la famille des *Coronaviridae*** (Malik 2020) – 4 genres différents dans la famille des coronavirus : alpha, beta, gamma et delta avec les 7 coronavirus infectant les humains (229E, NL63, SARS-CoV-2, OC43, SARS-CoV, HKU1, MERS)

La dénomination coronavirus provient du latin « corona » et est liée à l'apparence de couronne des virions observés au microscope électronique.

Les coronavirus infectent une grande diversité d'hôtes et sont responsables de pathologies variées. Ils peuvent induire des pathologies respiratoires chez le poulet (« Infectious Bronchitis Virus » IBV), des péritonites fatales chez les chats (« Feline Coronavirus » FCoV) ou encore des hépatites et encéphalites chez la souris (« Mouse Hepatitis Virus » MHV). Les 7 coronavirus infectant l'Homme appartiennent aux deux genres alpha-coronavirus (HCoV-229E, NL-63) et beta-coronavirus (HKU1,

OC43, SARS, MERS et SARS-CoV-2). Les beta-coronavirus sont subdivisés 4 lignages différents A, B, C et D.

## 1) Épidémiologie et symptômes des coronavirus humains

### a) Les coronavirus bénins

- Le coronavirus HCoV-229E (alpha-coronavirus) fut le premier découvert en 1966 et isolé à partir de lavage des voies respiratoires d'un patient atteint de rhume. Il est responsable d'écoulement nasal, d'éternuement, de maux de tête et dans 10 à 20% des cas de toux et de fièvre.
- Le coronavirus OC43 (beta-coronavirus lignée A) a été découvert en 1967. Il est responsable des mêmes symptômes que le virus HCoV-229E. Il n'existe aucune réactivité sérologique croisée entre HCoV-229E et OC43. Les infections par HCoV-229E et OC43 représentent 15 à 29% des rhumes.
- Le coronavirus NL63 (alpha-coronavirus) a été découvert en 2004 aux Pays-Bas et isolé à partir d'un enfant de 7 mois atteint d'une bronchiolite. Il est responsable de symptômes comme la toux, fièvre, tachypnée, hypoxie, et rhinite principalement chez les enfants et les personnes âgées. Le virus NL63 représente 4,7% des maladies respiratoires courantes.
- Le coronavirus HKU1 (beta-coronavirus lignée A) a été découvert en 2005 à Hong-Kong et isolé à partir d'un patient de 71 ans atteint d'une bronchiolite et d'une pneumonie. Il est responsable de symptômes comme la fièvre, écoulement nasal, la toux et la dyspnée.

Les 4 coronavirus décrits jusqu'ici sont présents sur tous les continents et sont responsable d'une grande partie des maladies respiratoires bénignes (Su et al. 2016) (Figure 8).

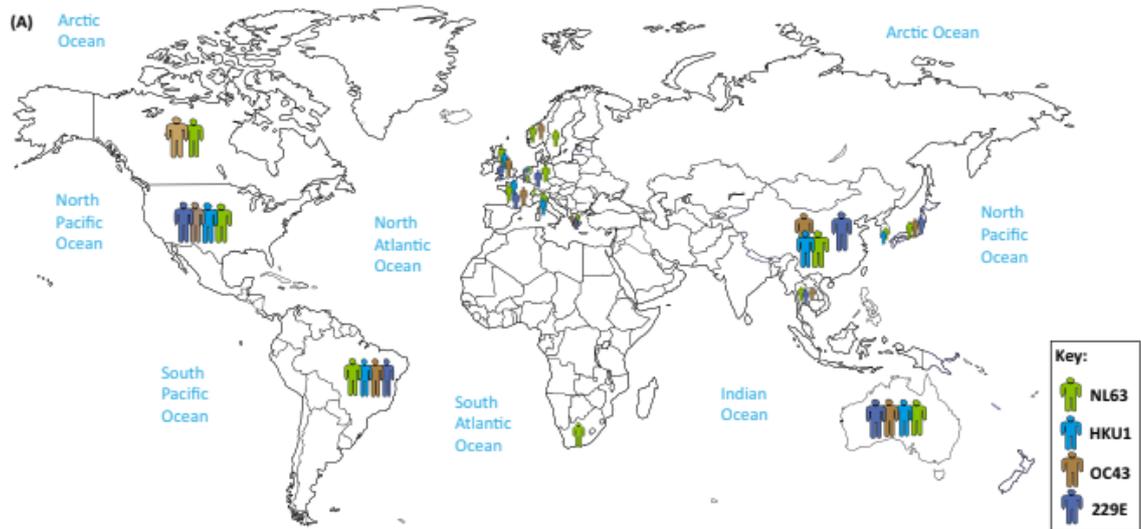


Figure 8 : Répartition géographique des coronavirus NL63, HKU1, OC43 et 229E (Su et al. 2016)

b) Les coronavirus responsables d'infections respiratoires sévères

- Le SARS (beta-coronavirus lignée B) a été à l'origine d'une épidémie en Chine en novembre 2002. Le virus s'est ensuite répandu dans les pays voisins en Asie puis en Amérique du nord et en Europe. Au total plus de 37 états ont été touchés par le virus en 9 mois (Figure 9). 8273 cas ont été enregistrés et 775 morts sont à déplorer. Le virus est responsable de nombreux symptômes communs aux virus respiratoires : fièvre, maux de tête, toux, dyspnée, détresse respiratoire (pouvant entraîner la mort). Dans certains cas le virus est capable d'infecter le tractus gastro intestinal, le foie, les reins et le cerveau (Su et al. 2016)

- Le MERS (beta-coronavirus lignée C) a été isolé chez un patient de 60 ans décédé des suites d'une maladie respiratoire en Arabie Saoudite en 2012. Le virus est depuis, endémique dans la péninsule arabique où la majorité des cas sont survenus (**Figure 9**). Au total 2107 cas ont été comptabilisés dans 27 pays et 733 morts ont été déclarées. Le virus est responsable des mêmes symptômes que le SARS auquel il faut ajouter l'insuffisance rénale aigue (Su et al. 2016)

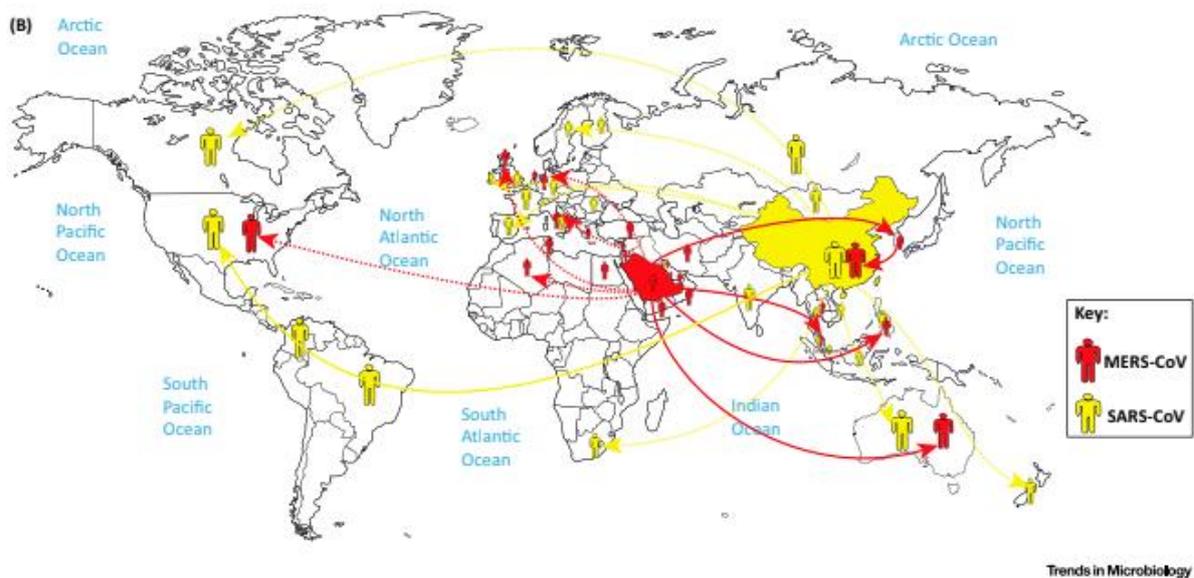


Figure 9 : Répartition géographique des coronavirus MERS et SARS (Su et al. 2016)

- Le premier cas de SARS-CoV-2 (beta-coronavirus, sous-genre sarbecovirus) a été déclaré en Chine en novembre 2019 par l'OMS. Le virus s'est rapidement répandu sur la planète comptant au jour du 23 janvier 2021, plus de 99 millions de cas détectés et plus de 2 millions de morts. Les symptômes sont la fièvre, la toux, douleur musculaire, détresse respiratoire, diarrhée, fatigue (Chakraborty et al. 2020; Wang et al. 2020)

## 2) Transmission et émergence

La transmission des coronavirus se fait principalement par aérosols des liquides biologiques issus de la toux d'une personne malade, et par contamination des surfaces.

Les coronavirus ont des origines diverses et variées. Peu de données existent sur l'origine des coronavirus bénins.

Le SARS et le MERS sont des zoonoses provenant respectivement de la civette palmiste à masque et du dromadaire. Cependant de nombreuses études suggèrent que ces vecteurs ne soient que des intermédiaires et que les chauves-souris seraient le réservoir naturel de ces virus.

Dans le cas du SARS-CoV des études ont montré la présence d'anticorps anti-SARS-CoV et l'existence d'un virus proche (SARSr-RH-Bat CoV) chez les chauves-souris de la famille des *Rhinolophidae*. Ces animaux sont vendus vivants sur le marché de Guangdong où a démarré l'épidémie. Deux autres virus proches du SARS-CoV ont été identifiés chez des chauves-souris. Une analyse de l'ORF8 de ces virus suggère que les chauves-souris sont leur réservoir naturel et qu'ils pourraient directement infecter les humains ([Ge et al. 2013](#); [Wu et al. 2016](#)).

Quant au MERS, l'existence de nombreux cas humains infectés n'ayant pourtant eu aucun contact avec des dromadaires suggère qu'une transmission interhumaine ou par un autre vecteur animal soit possible ([Samara and Abdoun 2014](#)). Des études sur la souche HKU4-bat CoV, la plus proche phylogénétiquement du MERS, ont montré que ce virus était capable d'utiliser le même récepteur d'entrée que le MERS ([Wang et al. 2014](#)). Le MERS isolé chez l'Homme et le dromadaire possède 99% d'identité ce qui suggère qu'ils ont été infectés par des virus provenant de la même source dans une courte période de temps.

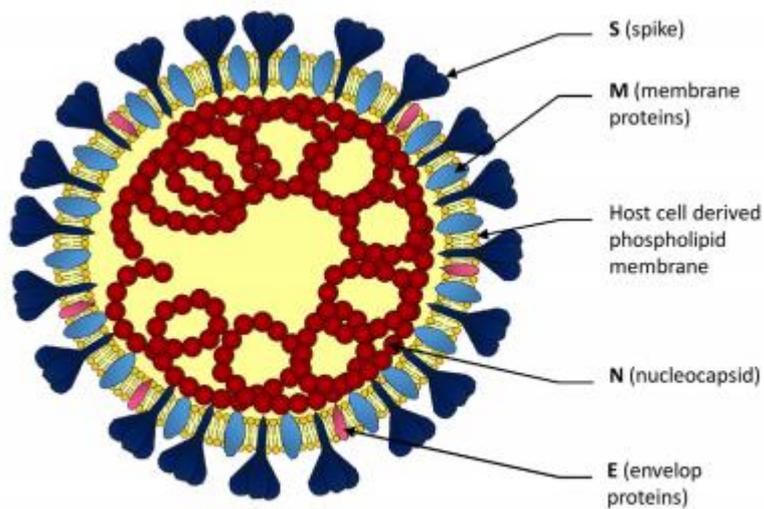
Les MERSr (« MERS-related ») coronavirus ont été identifiés chez 14 espèces différentes de chauve-souris. Compte tenu de cela et la haute plasticité dans l'utilisation des récepteurs (pas uniquement DDP4/CD26 pour les MERSr), la transmission inter espèces de la chauve-souris à un animal ou à l'Homme doit être fréquente.

Le SARS-CoV-2 est également considéré comme une zoonose. L'origine de celui-ci n'est pas encore très claire. Une étude a montré qu'il était le plus proche phylogénétiquement d'un coronavirus de chauve-souris, RaTG13 et qu'il était également très proche d'un coronavirus retrouvé chez une espèce de pangolin. La théorie admise jusqu'ici est similaire à celles qui ont été établies pour le SARS-CoV et le MERS. L'origine de ce virus est très probablement la chauve-souris qui serait le réservoir naturel avec un hôte intermédiaire qui serait le pangolin ([Lam et al. 2020](#); [H. Wang et al. 2020](#)).

Les coronavirus ont donc une aptitude importante à franchir les barrières d'espèces. La proximité des Hommes avec les animaux domestiques, hôtes intermédiaires des coronavirus, et les chauves-souris, réservoirs naturels, favorise ce phénomène et donc augmente la probabilité d'apparition d'un nouveau coronavirus humain.

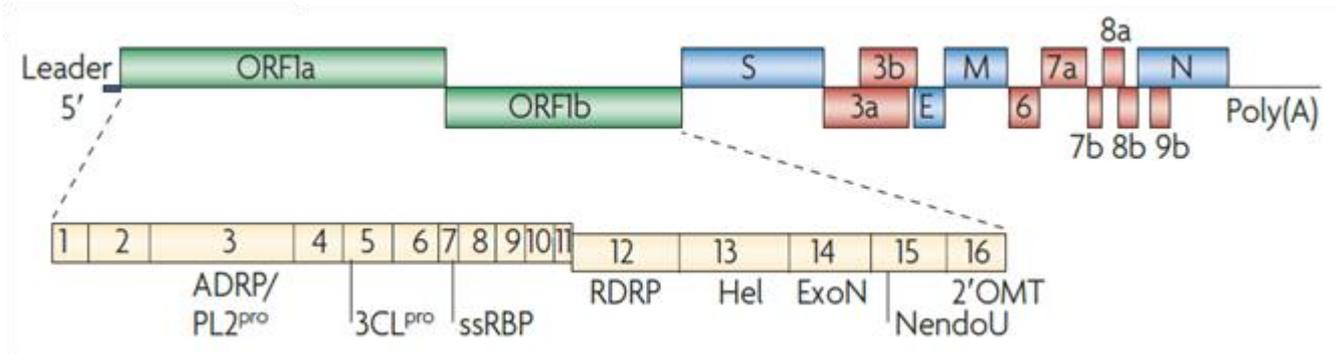
### 3) Structure et génome

Les coronavirus sont des virus enveloppés de 80 à 120nm de diamètre. Ils sont recouverts par la glycoprotéine de surface « Spike » (S), en forme de spicules, qui donne à la particule virale l'aspect d'une couronne. La particule virale est également constituée de la protéine de membrane M et la protéine d'enveloppe E. La nucléoprotéine N s'associe avec l'ARN en s'enroulant autour afin de former la nucléocapside de symétrie hélicoïdale (**Figure 10**).



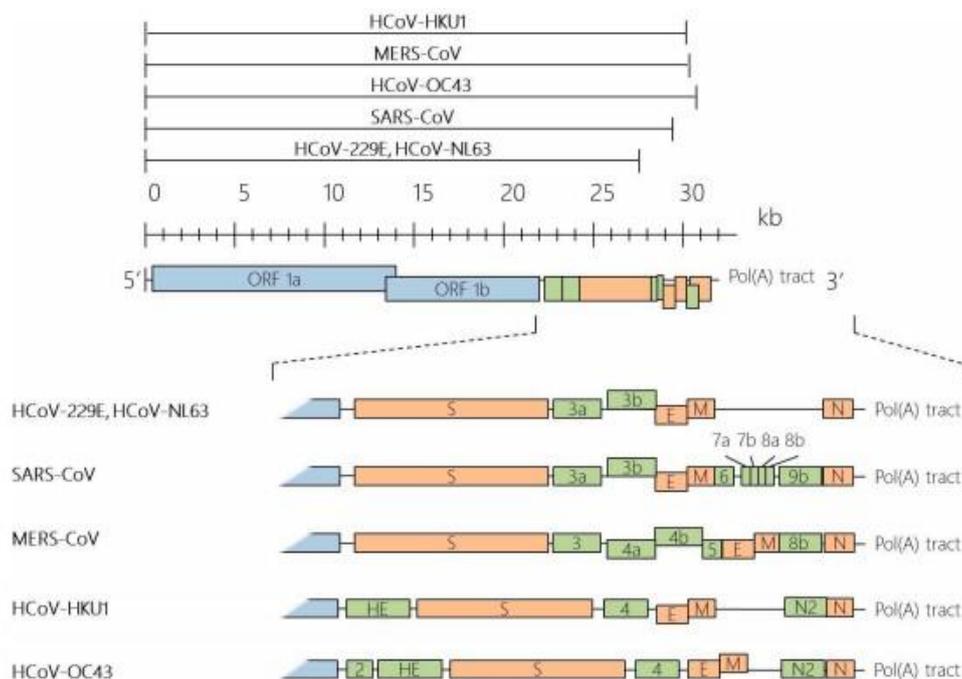
**Figure 10** : Schéma de la particule virale des coronavirus (Bleibtreu 2020) – La particule virale est constituée de 4 protéines structurales S, E, M et N. Le génome viral est encapsidé par la protéine N

Le génome des coronavirus est un ARN simple brin de polarité positive mesurant entre 26 et 32 kb, le classant comme le plus grand génome de virus à ARN. L'ARN viral est coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Les deux premiers tiers du génome sont occupés par deux cadres ouverts de lecture, l'ORF1a et l'ORF1b, chevauchants, l'ORF1ab codant l'ensemble des 16 protéines non structurales (Fehr and Perlman 2015; Kim et al. 2020; Lim et al. 2016; Malik 2020) (**Figure 11**). La traduction de l'ARN viral entraîne la synthèse de la polyprotéine 1a ou la polyprotéine 1ab dans le cas où le ribosome opère un décalage de lecture de type « -1 » grâce à une séquence glissante (Lim et al. 2016).



**Figure 11 : Génome de la souche SARS-CoV** – Les cadres ouverts de lecture 1a et 1b (vert) se chevauchent et donnent les 16 protéines non structurales. Quatre cadres donnent les protéines structurales S, E, M et N (bleu) et huit donnent les protéines accessoires (rouge) (Perlman and Netland 2009)

Le dernier tiers du génome occupe les ORF codant les protéines structurales des coronavirus, toujours dans le même ordre S, E, M et N et un nombre variable de protéines accessoires. Certains beta-coronavirus comme le MHV codent une protéine structurale supplémentaire, l'hémagglutinine-estérase (HE) (**Figure 12**).



**Figure 12 : Génomes de coronavirus humains** (Lim et al. 2016) – HE:Hémagglutinine Esterase ; S:Spike ; E :Enveloppe ; N :Nucléoprotéine ; 2 à 9b : protéines accessoires

a) La région 5' non codante

La région 5' UTR (« Untranslated Region ») des coronavirus est une région qui abrite des éléments structuraux, importants pour la réplication et la transcription. Cette région contient des structures en tige boucle, appelées SL1, SL2, SL4 et SL5 (« Stem-Loop 1/2/4/5) très conservées chez l'ensemble des coronavirus. Les structures SL1 et SL2, à l'extrémité 5', sont riches en adénines et en uraciles. Chez le HCoV-229E et le SARS-CoV, une répétition d'un motif structural UUYCGU dans les sous structures de SL5 correspondrait au signal d'emballage ([Chen and Olsthoorn 2010](#)).

b) Les protéines non structurales

Les protéines non structurales nsp (« non structural protein ») participent à la formation du complexe de réplication/transcription, aux étapes de réplication et transcription et à l'échappement immunitaire. Toutes les fonctions des protéines non structurales des coronavirus ne sont pas encore connues.

La protéine nsp1 est impliquée dans la dégradation des ARNm cellulaires bloquant ainsi la traduction de la cellule hôte afin de neutraliser la réponse immunitaire.

La polyprotéine est clivée par des protéases virales nsp3 et nsp5 pour donner les 16 nsp. Nsp3 par son activité 3PLpro (« Papain like proteinase ») clive entre nsp1/nsp2, nsp2/nsp3 et nsp3/nsp4, tandis que nsp5 par son activité 3CLpro (« Chymotrypsin like proteinase ») clive le reste de la polyprotéine. La protéine nsp4 est importante pour la structuration des DMV (« Double Membrane Vesicle ») qui protègent le complexe de réplication- transcription ([Fehr and Perlman 2015](#); [Malik 2020](#); [Perlman and Netland 2009](#)).

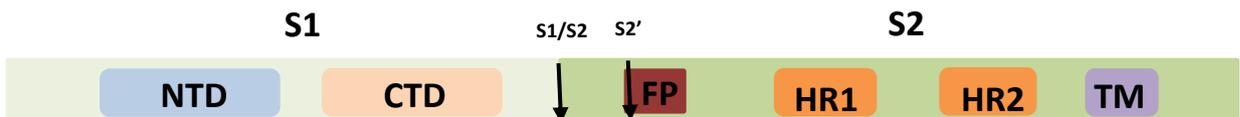
Toutes les autres protéines non structurales s'assemblent pour former le complexe de réplication-transcription et participent à la réplication de l'ARN et la transcription des ARN sous génomiques. La protéine nsp12, l'ARN polymérase ARN

dépendante (RdRp) forme un complexe avec deux cofacteurs nsp7 et nsp8 (Gao et al. 2020; Kirchdoerfer and Ward 2019). La protéine nsp8 agirait comme une primase afin d'initier la réplication. La protéine nsp13 possède une activité hélicase.

Les protéines nsp14 et nsp16 possédant respectivement une activité N7-méthyl-transférase et 2'-O-Méthyltransférase sont impliquées dans la formation de la coiffe. La protéine nsp14 possède également une activité 3'-5' Exoribonucléase nécessaire pour l'activité de relecture lors de la réplication. Le cofacteur nsp10 s'associe à nsp14 et nsp16 pour former un hétérodimère et stimuler l'activité exoribonucléase et 2'-O-méthyl-transférase (Fehr and Perlman 2015; Malik 2020; Perlman and Netland 2009).

### c) Les protéines structurales

La protéine S des coronavirus s'associe sous forme de trimère et est constituée de deux sous-unités, S1 (« Subunit 1 ») et S2 (« Subunit 2 »), impliquées respectivement dans l'attachement de la particule virale à son récepteur et dans la fusion des membranes cellulaires et virales. (Figure 13).



**Figure 13 : Schéma de la protéine Spike** – Sous unités S1 et S2 ; sites de clivage de la protéine ; NTD « N-terminal Domain » ; CTD « C-terminal Domain » ; FP « Fusion Peptide » ; HR1/2 « Heptad Repeat » 1/2 ; TM « Transmembrane » ; S1/S2 site de clivage entre les sous-unités S1 et S2 ; S2' 2ème site de clivage libérant le peptide de fusion

S1 contient deux sous-domaines, S1-NTD du côté N-terminal et S1-CTD du côté C-terminal. Le domaine de liaison au récepteur RBD (« Receptor Binding Domain) peut se situer dans le NTD, comme pour le MHV ou dans le CTD comme pour NL63, 229E, SARS-CoV et SARS-CoV-2. La variabilité des RBD pour chacun des

coronavirus explique les différents tropismes cellulaires observés dans cette famille virale (Bonavia et al. 2003; Fang Li 2017).

La sous unité 2 contient le peptide de fusion et les heptad repeat 1 et 2 (HR1 et HR2) nécessaires à la fusion des membranes virales et cellulaires (Fang Li 2017; Xia et al. 2018). Après la fixation du RBD sur son récepteur, la protéine Spike est clivée par une/des protéases cellulaires (TMPRSS2, HAT, furine, cathepsine B/L) conduisant à la libération du peptide de fusion qui peut ainsi s'insérer dans la membrane cellulaire. L'association des HR1 et HR2 permettent le rapprochement des membranes pour la fusion et la libération du génome viral dans le cytoplasme (Figure 14).

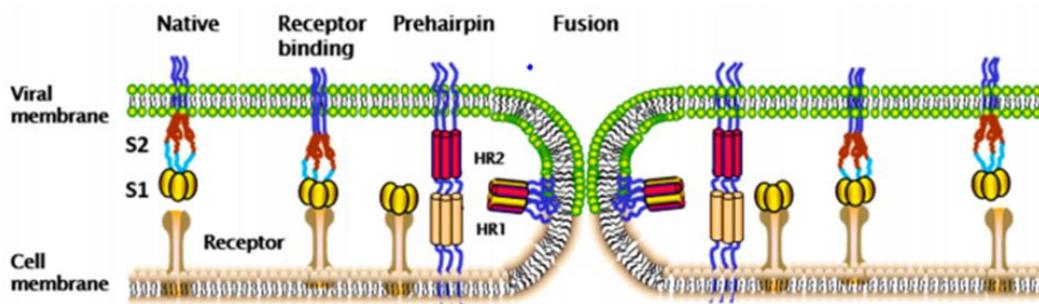
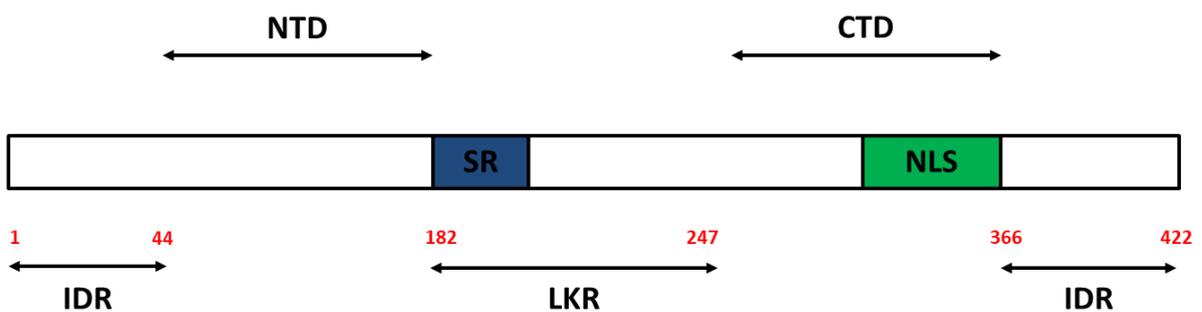


Figure 14 : Schéma de la fusion de la membrane plasmique avec la membrane virale médiée par les domaines HR1 et HR2 de la protéine Spike (Xia et al. 2018)– La sous unité S1 de la protéine Spike se fixe sur son récepteur membranaire. Au stade « prehairpin » S1 se dissocie de la sous unité S2 et libère le peptide de fusion qui vient s'insérer dans la membrane cellulaire résultant dans la formation de la structure finale de la protéine nommé « 6-helix coiled-coil bundle » (6HB)

La protéine S contient deux sites de clivage, le premier S1/S2 à la jonction entre les deux sous-unités et le second S2' se situe en amont du peptide de fusion (Figure 13) (Belouzard, Chu, and Whittaker 2009; Bonnin et al. 2018).

La protéine N est une phosphoprotéine de 422 acides aminés qui forme la nucléocapside en s'enroulant autour de l'ARN viral. Elle est composée d'un domaine N-terminal (NTD) et d'un domaine C-terminal (CTD) qui ont la capacité de se fixer à l'ARN viral. La protéine N du MHV interagit avec l'ARN génomique et avec les ARN sous génomiques au niveau de la séquence leader à l'extrémité 5' du génome au

niveau de la séquence UCUAA essentielle pour la transcription. Elle interagit également au niveau des séquences intergéniques et de régulation de la transcription (TRS) et elle jouerait un rôle structural au sein du complexe de réplication (Baric et al. 1988; Nelson, Stohlman, and Tahara 2000; Stohlman et al. 1988). La protéine N s'associe avec l'ARN au niveau du signal d'empaquetage de 69 nucléotides au sein de la région 3' de l'ORF1b (Molenkamp and Spaan 1997). Enfin, elle interagit également avec les régions non traduites (UTR) en 5' et en 3' de l'ARN génomique, favorisant la synthèse de brin de polarité négative et la circularisation du génome (Collisson et al. 2001; Cologna, Spagnolo, and Hogue 2000; Lo et al. 2019). Les deux régions NTD et CTD sont entrecoupées par des régions intrinsèquement désordonnées IDR (« Intrinsically Disordered Regions ») qui modulent l'activité de liaison à l'ARN des motifs NTD et CTD. L'IDR central appelé également LKR (« Linker Region ») et l'IDR situé en C-terminal sont tous deux impliqués dans l'oligomérisation de la protéine N. La LKR est une région riche en serine et en arginine qui contient potentiellement plusieurs sites de phosphorylation qui pourraient être impliqués dans la régulation des fonctions de la protéine N ainsi que l'interaction N-M (Chang et al. 2014; McBride, van Zyl, and Fielding 2014)(Figure 15).



**Figure 15 : Schéma de la protéine N** – IDR Intrinsically Disordered Regions ; LKR Linker region ; SR Ser-Arg rich region ; NLS Nuclear Localization Signal ; NTD N-terminal Domain ; CTD C-terminal Domain

La protéine transmembranaire M est la protéine structurale la plus abondante dans le virion. Elle existe sous la forme de dimère et peut adopter deux

conformations différentes lui permettant de favoriser la courbure de la membrane virale ainsi que se lier à la nucléocapside ([Neuman et al. 2011](#)).

La protéine M est la seule protéine structurale qui est capable de se lier aux 3 autres protéines structurales. Son interaction avec la protéine S est primordiale pour le maintien de Spike dans le ERGIC et pour son intégration dans les nouveaux virions formés. L'interaction avec la protéine N permet de stabiliser le complexe formé par la nucléoprotéine et l'ARN viral et participe à l'assemblage pour la formation des nouveaux virions. Son association avec la protéine d'enveloppe E est nécessaire pour la production et la libération des « Coronavirus-like particles » ([Vennema et al. 1996](#)).

La protéine E est la plus petite des protéines structurales et est présente en petite quantité dans le virion. Elle est composée d'un domaine N-terminal, d'un domaine C-terminal et possède une activité de canal ionique ([Wilson et al. 2004](#)). Cette activité serait d'ailleurs, dans le cas du SARS-CoV, nécessaire pour la pathogénèse mais pas pour la réplication. La protéine E participe à l'assemblage et au relargage des nouvelles particules virales formées.

#### **4) Cycle de vie des coronavirus**

##### **a) Attachement et entrée**

La première étape du cycle de vie est l'attachement du virus via le RBD de la protéine Spike avec le récepteur de la cellule. Les coronavirus se fixent sur de nombreux récepteurs différents notamment grâce à la diversité de leur RBD. Le 229E utilise comme récepteur l'aminopeptidase N (APN). NL63, SARS-CoV et SARS-CoV-2 se servent de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2). OC43 utilise le N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid et le MERS se sert du Dipeptidyl peptidase 4 (DDP4) ([Belouzard et al. 2012](#); [Fehr and Perlman 2015](#); [Hoffmann et al. 2020](#)).

L'entrée des coronavirus est un mécanisme complexe et assez varié. Il peut se faire selon deux voies : la voie endosomale et la voie non endosomale (fusion à la

membrane plasmique). Dans le premier cas, la fixation du virus sur son récepteur va entraîner son internalisation par endocytose. L'acidification du pH dans l'endosome entraîne l'activation des cathepsines B ou L qui vont cliver la protéine Spike, permettant la fusion de la membrane de l'endosome avec la membrane virale. Dans le deuxième cas l'entrée du virus se fait par fusion directe à la membrane plasmique. Cette voie nécessite cependant, dans la plupart des cas, l'activation protéolytique de Spike via des protéases transmembranaires comme TMPRSS2 ou HAT qui a l'instar des cathepsines clive Spike et permettent l'activation du processus de fusion ([Belouzard et al. 2012](#); [Kawase et al. 2009](#); [Shirato, Kawase, and Matsuyama 2017](#)).

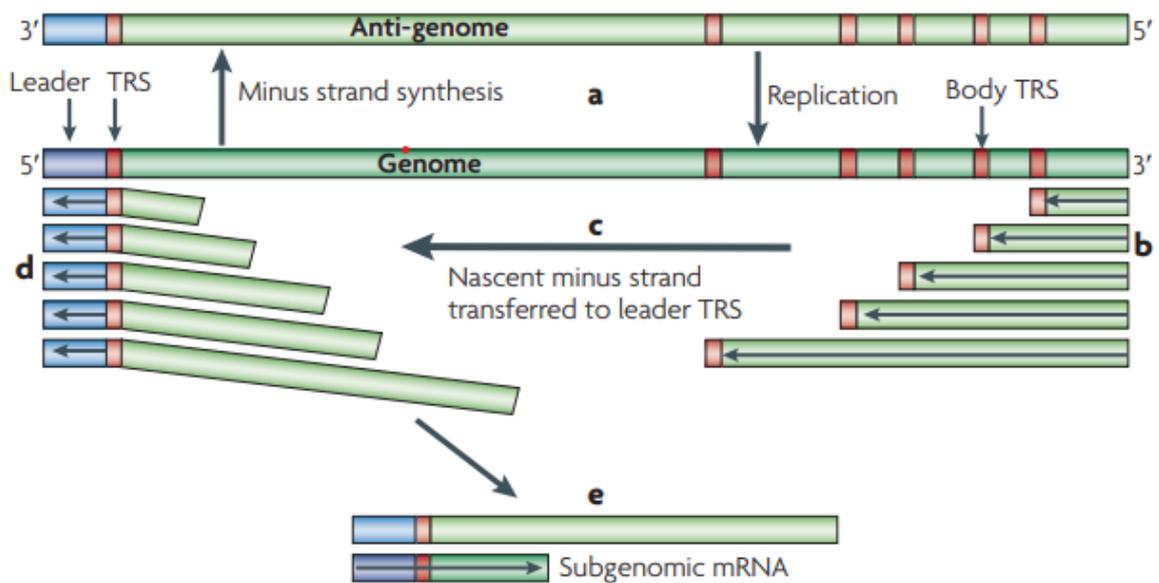
Les deux voies sont probablement envisageables pour l'ensemble des coronavirus et dépendent de la cellule cible. Dans le cas du HCoV-229E la présence de TMPRSS2 favorise son entrée par fusion à la membrane dans les cellules de l'épithélium respiratoire ([Bertram et al. 2013](#)). Le virus est également capable d'entrer par endocytose avec une fusion de la membrane du virus avec celle de l'endosome médiée par la cathepsine L ([Kawase et al. 2009](#)). Cependant une équipe japonaise a constaté que les échantillons cliniques de HCoV-229E utilisent préférentiellement la protéase transmembranaire TMPRSS2 plutôt que la cathepsine présente dans l'endosome. L'endosome étant le lieu principal de la reconnaissance des récepteurs Toll-like (déclenchant une réponse immunitaire innée), par conséquent, ils supposent que le virus aurait évolué pour contourner l'endosome en entrant à la membrane via TMPRSS2 ([Shirato, Kanou, et al. 2017](#)).

Dans le cas du SARS-CoV-2 un nouveau site de clivage S1/S2 a été découvert et contient quatre acides aminés supplémentaires par rapport à celui du SARS-CoV. L'acquisition de ces quatre acides aminés semble rendre le SARS-CoV-2 sensible au clivage par la furine. La protéine Spike du SARS-CoV-2 est donc sensible à un grand nombre de protéases, transmembranaires et endosomales laissant supposer que le virus est bien capable d'utiliser les deux types d'entrée pour infecter une cellule ([Jaimes, Millet, and Whittaker 2020](#)).

## b) Traduction, Réplication et Transcription

Une fois à l'intérieur de la cellule, le génome viral est traduit en deux polyprotéines pp1a et pp1ab. Le clivage par les protéases virales nsp3 et nsp5 libère les 16 protéines non structurales qui s'assemblent au niveau du RE pour former le complexe de réplication-transcription. L'antigénome (ARN simple brin de polarité négative) synthétisé par l'ARN polymérase ARN dépendante nsp12 servira de matrice pour former les nouveaux brins d'ARN de polarité positive empaquetés dans les nouveaux virions.

La transcription des coronavirus est discontinue. Plusieurs modèles ont été proposés dont celui de Sawicki ([Sawicki, Sawicki, and Siddell 2007](#)). Au cours de la synthèse du brin négatif la polymérase virale saute d'une séquence de régulation de la transcription (TRS pour « Transcription Regulatory Sequence ») jusqu'à la TRS située en aval de la séquence « Leader » à l'extrémité 5' du génome. A partir de ces petits ARN de polarité négative, des ARNm viraux sous génomiques de tailles décroissantes sont synthétisés. Les ARNm sous génomiques seront traduits pour donner les protéines structurales et accessoires nécessaires à la formation des nouveaux virions (**Figure 16**).

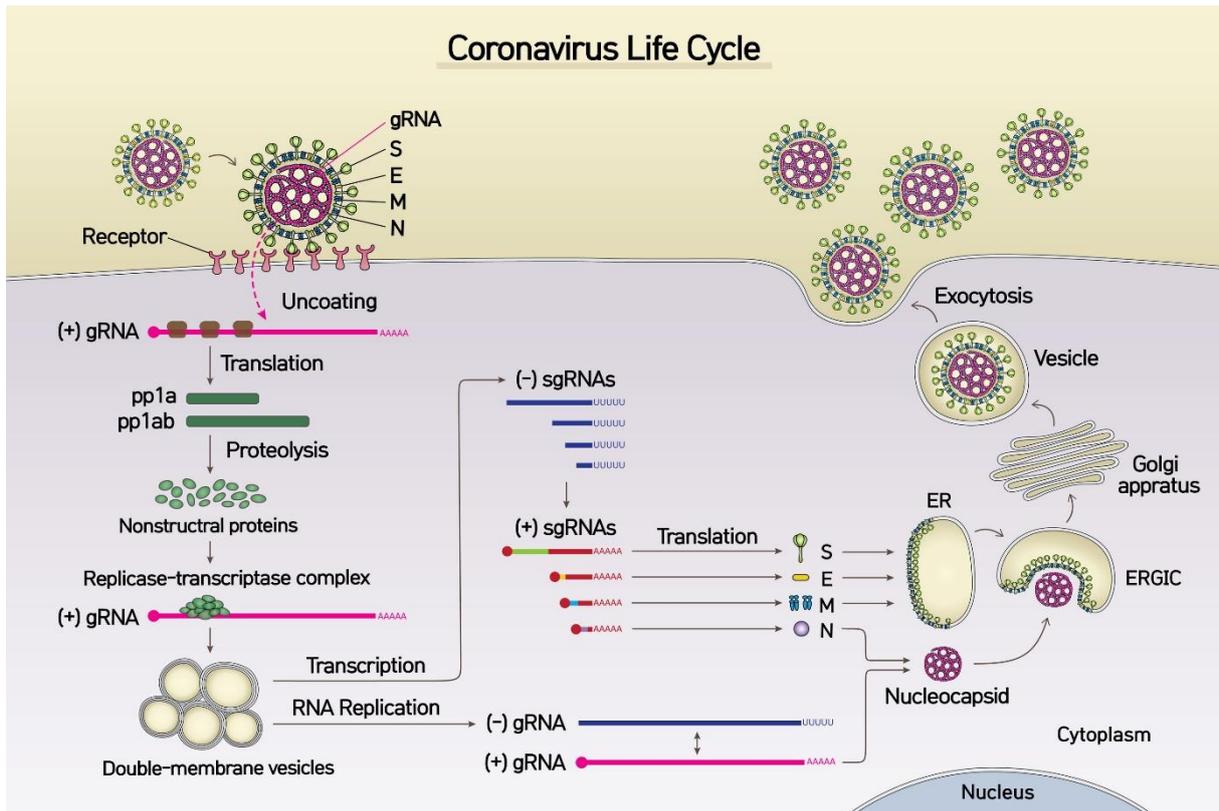


**Figure 16 : Représentation des étapes de réplication et de transcription des coronavirus - a)** La RdRp synthétise, à partir du génome (+), un antigénome (-) qui va servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes **b)** Lors de la synthèse de l'antigénome, la RdRp peut s'arrêter au niveau d'une TRS **c)** Le brin en cours de synthèse est transféré jusqu'à la séquence TRS en aval de la séquence Leader en 5' **d)** fin de la synthèse du brin (-) par la RdRp avec la séquence leader en 5' pour chaque nouveau brin **e)** Ces brin (-) servent de matrice pour la synthèse des ARNm subgénomiques viraux (Perلمان and Netland 2009)

### c) Assemblage et Relargage

Les protéines de structures S, E et M s'insèrent dans le RE et migrent le long de la voie de sécrétion jusqu'au compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi. Les ARNg viraux sont encapsidés par la protéine N et bourgeonnent aux membranes du ERGIC où se localisent S, E et M pour former les virions matures qui seront libérés dans le compartiment extracellulaire par exocytose.

La protéine M, qui interagit avec toutes les protéines structurales, joue un rôle essentiel et central dans l'organisation et la réalisation de l'étape d'assemblage, cependant les mécanismes sont encore mal connus (**Figure 17**).



**Figure 17 : Cycle de vie des coronavirus** - Le virus s'attache à son récepteur et entre par fusion à la membrane plasmique ou par endocytose. Une fois le génome libéré dans le cytoplasme, celui-ci est traduit en la polyprotéine pp1a ou pp1ab. Le clivage par les protéases virales entraîne la libération des 16 protéines non structurales qui vont s'assembler dans le complexe de réplication-transcription (RTC) protégé par des DMV au niveau du RE. La réplication permet la synthèse d'un antigénome de polarité négative qui va servir de matrice pour synthétiser des génomes complets (+). La transcription permet la synthèse des ARNm sous-génomiques qui seront traduits pour donner les protéines structurales. La protéine N encapside les génomes néo-synthétisés et les protéines S, E et M transitent dans le RE puis dans le ERGIC pour former les nouvelles particules immatures avec le bourgeonnement des ARN viraux encapsidés. Après passage par l'appareil de Golgi, les nouvelles particules virales matures sont libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose. ([IBS Institute of Basic Science, Seoul](#))

## **D) Conclusion générale partie I**

La liste, non exhaustive, des épidémies nous montre qu'il y a une accélération de l'émergence virale, surtout depuis la fin du XXème siècle. Cette augmentation - qui peut notamment s'expliquer par la croissance de la population mondiale, l'accroissement des flux migratoires et commerciaux et le dérèglement climatique - rends d'autant plus nécessaire le besoin de trouver des moyens efficaces pour lutter contre ces pathogènes. (Les progrès de la science dans l'identification de nouveaux pathogènes participent également de cette augmentation).

Plusieurs solutions s'offrent à nous pour lutter efficacement contre ces maladies virales : la lutte anti-vectorielle dans le cas des arbovirus afin d'éliminer ou limiter la transmission du vecteur à l'Humain, la vaccination afin d'immuniser la population et prévenir des futures réémergences virales et le développement d'antiviraux pour soigner les patients infectés par un virus. Dans la partie qui va suivre nous traiterons uniquement des antiviraux.

## II) Les Antiviraux

Seulement 90 antiviraux ont été approuvés sur les milliers décrits dans la littérature et ne sont dirigés que contre 9 infections virales : VIH, VHC, VHS (Virus Herpès Simplex), VI (Virus Influenza), VHB, VVZ (Virus Varicelle-Zona), CMV (Cytomegalovirus), VRS (Virus Respiratoire Syncytial) et PVH (Papillomavirus Humain) (De Clercq and Li 2016)(Figure 18). Deux tiers des molécules ciblent les virus du VIH et du VHC qui ont mobilisé une grande partie de la recherche en virologie depuis leur découverte dans les années 1980.

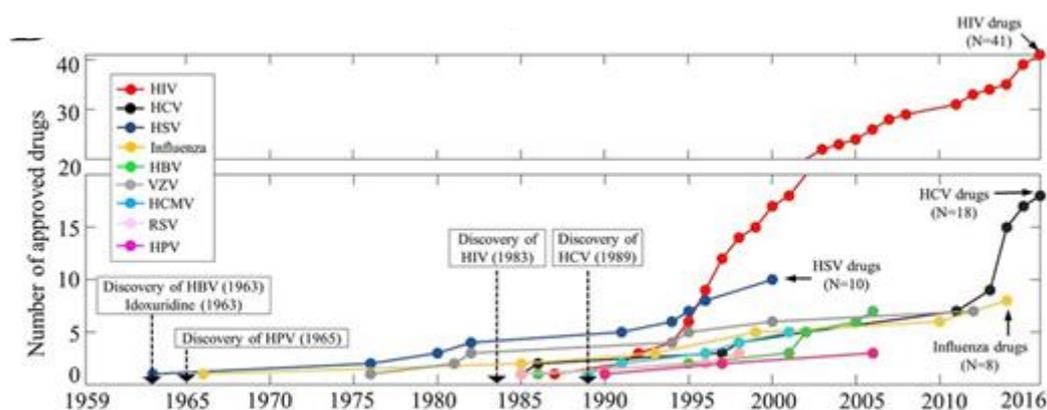


Figure 18 : Nombre de drogues approuvées par la FDA entre 1963 et 2016 pour 9 virus différents : HIV, HCV, HSV, Influenza, HBV, VZV, HCMV, RSV et HPV

Si certaines de ces molécules ont abouti à de véritables succès, comme les anti-protéases contre le VIH et des anti-polymérase contre le VHC, le processus de développement est très long et onéreux. En moyenne il faut compter entre 12 et 16 ans pour aller de la découverte d'une molécule à son autorisation d'être utilisée chez l'humain et le coût est très élevé pouvant même atteindre le milliard de dollars dans certains cas (DiMasi, Grabowski, and Hansen 2016; Nosengo 2016).

A l'instar de ces deux succès, les antiviraux actuellement disponibles sont quasi exclusivement dirigés contre des protéines spécifiques des virus cibles. Cette sélectivité au départ recherchée pour une meilleure tolérance, limite

considérablement leur spectre d'action antiviral alors qu'il existe aujourd'hui plus de 200 infections virales orphelines de traitements ([Arribas and Pe 2011](#); [De Clercq and Li 2016](#)).

Dans le contexte d'émergence et de réémergence virale que nous venons d'expliquer la stratégie de développement d'antiviraux ciblant des protéines spécifiques de chaque virus ne semble pas du tout adaptée face à l'urgence. Il y a donc nécessité de développer des molécules antivirales à large spectre qui soient capables d'inhiber la réplication de virus de la même famille ou de familles différentes. Une molécule avec une action pan-virale permettrait de réagir plus rapidement face à l'émergence d'un nouveau virus.

## **A) Antiviraux à action directe**

Les antiviraux à action directe ou DAA (« Direct-Acting Antivirals ») sont des molécules qui ciblent une protéine virale et donc une étape du cycle viral (attachement, fusion, décapsidation, réplication, assemblage) ou bien des molécules qui restaurent l'immunité. On peut notamment citer les inhibiteurs de la polymérase NS5B (« Non Structural 5 B ») du virus de l'Hépatite C, Sofosbuvir et Dasabuvir ou encore les inhibiteurs de protéases du VIH qui ont participé à la nette amélioration des traitements des patients.

Cependant, l'utilisation seule de DAA peut amener à la sélection de variants viraux contenant des mutations de résistance ([Iyidogan and Anderson 2014](#); [Perales et al. 2015](#); [Richman and Menendez-Arias 2014](#)).

Bien qu'ils ne soient pas conçus pour cela, plusieurs DAA ont montré une activité antivirale à large spectre. C'est le cas notamment du favipiravir ou T-705, un inhibiteur de polymérase, qui a été utilisé au Japon pour lutter contre les virus grippaux A, B et C mais qui semble efficace contre des virus à ARN de plusieurs familles différentes et notamment des virus Zika et Ebola ([Furuta et al. 2009](#); [Pires de](#)

[Mello et al. 2018](#); [Sissoko et al. 2016](#); [Smither et al. 2014](#)). Plus récemment le favipiravir a montré des effets modestes sur la réplication du virus SARS-CoV-2 *via* une augmentation du taux de mutation, létale, au niveau de la polymérase nsp12 (Figure 21). Une forte augmentation des transitions de cytosine en uracile et de guanine en adénine a été observée (facteur 10) en présence d'une concentration très élevée du composé, 500  $\mu\text{M}$ , et l' $\text{EC}_{50}$  sur la réplication du SARS-CoV-2 du favipiravir est de 207,1  $\mu\text{M}$  ([Shannon et al. 2020](#)).

La ribavirine est également un DAA avec une action antivirale à large spectre. Il s'agit d'un analogue nucléosidique qui a été initialement utilisé dans le cas d'infection par le VRS puis qui a été beaucoup utilisé dans le traitement de l'hépatite C chronique. De nombreux mécanismes d'action différents ont été décrits pour la ribavirine : immunomodulation des lymphocytes TH1/TH2, blocage de la synthèse de novo de GTP nécessaire pour la réplication virale, stimulation de l'Interféron. Malgré une efficacité sur de nombreux virus de familles différentes, cette molécule induit des effets secondaires responsables de 3 à 11% des arrêts prématurés de traitement et jusqu'à 35% chez les patients cirrhotiques dans le cas du VHC ([De Clercq and Li 2016](#); [Pradat et al. 2014](#)).

## **B) Antiviraux ciblant l'hôte**

Les antiviraux ciblant l'hôte ou HTA (« Host Targeting Agent ») sont des molécules qui ciblent des facteurs cellulaires ou des voies de signalisations utilisés par les virus au cours de leurs cycles de vie. En effet, tous les virus dépendent étroitement de la machinerie cellulaire pour accomplir les étapes clés de leur multiplication. Cette dépendance virale représente une cible de choix pour le développement d'antiviraux à large spectre.

Il existe deux types de molécules :

- celles qui favorisent la réponse immunitaire antivirale comme c'est le cas de l'Interféron de type I qui est maintenant bien décrit pour avoir une activité antivirale *via* une stimulation du système immunitaire (Crouse, Kalinke, and Oxenius 2015; Hoffmann, Schneider, and Rice 2015). L'imiquimod stimule la sécrétion de cytokines comme l'IFN, le TNF, IL1, IL6 et IL8 et stimule donc la réponse immunitaire lors de l'infection par le PVH (Wiley et al. 2002). L'imiquimod semble également efficace contre l'infection par le VRS (Salinas et al. 2020).
- celles qui inhibent l'activité de facteurs proviraux. Une grande partie des HTA en développement, comme les statines, ont pour cible la modulation du métabolisme lipidique dont de nombreux virus sont dépendants (Potena et al. 2004; Del Real et al. 2004; Shrivastava-Ranjan et al. 2018). Une récente étude computationnelle montre également une interaction possible entre certaines statines et la protéase Mpro du SARS-CoV-2 et particulièrement la rosuvastatine qui interagirait via 7 liaisons hydrogène avec la protéine virale (Reiner et al. 2020). L'arbidol inhibe l'entrée clathrine-dépendante de plusieurs virus, notamment d'arbovirus de la famille des *Flaviviridae*. Le composé empêchant la scission membranaire médiée par la dynamine 2, qui, en association aux clathrines, permet la formation de vésicules lors de l'endocytose (Blaising et al. 2013; Haviernik et al. 2018).

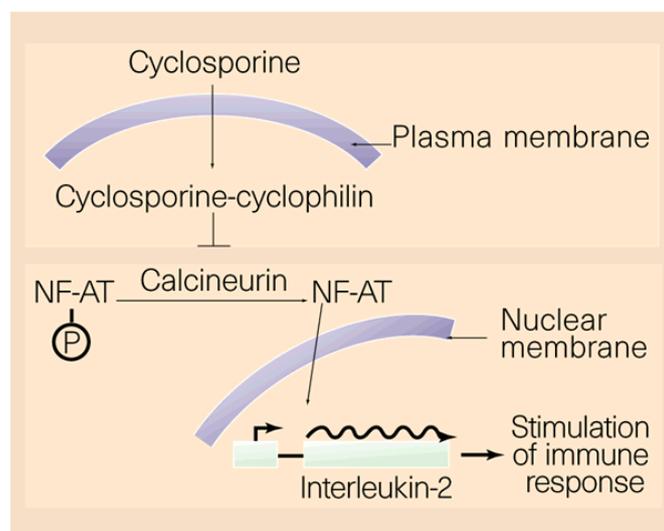
La dépendance de nombreux virus de familles très différentes (flavivirus, coronavirus, bunyavirus, adenovirus, paramyxovirus, rotavirus, papillomavirus) aux cyclophilines, une famille de 20 protéines chaperonnes humaines, en font une cible idéale pour le design d'un antiviral à large spectre

## 1) La Cyclosporine A

La Cyclosporine A est issue du champignon microscopique *Tolylocadium Inflatum* et fut découverte et isolée à partir d'échantillons de sol en Norvège dans le cadre d'une recherche de nouveaux antibiotiques d'origine naturelle par le laboratoire Sandoz. La CsA est un peptide cyclique de 11 Acides Aminés (**Figure 20**).

Au cours des années 1970, les propriétés immunosuppressives de la molécule ont été découvertes et ont permis de révolutionner le monde de la médecine dans le domaine de la transplantation puisque la cyclosporine A fut la première molécule à prévenir du rejet de greffe ([Starzl et al. 1981](#); [White, Pentlow, and Harold 1978](#)).

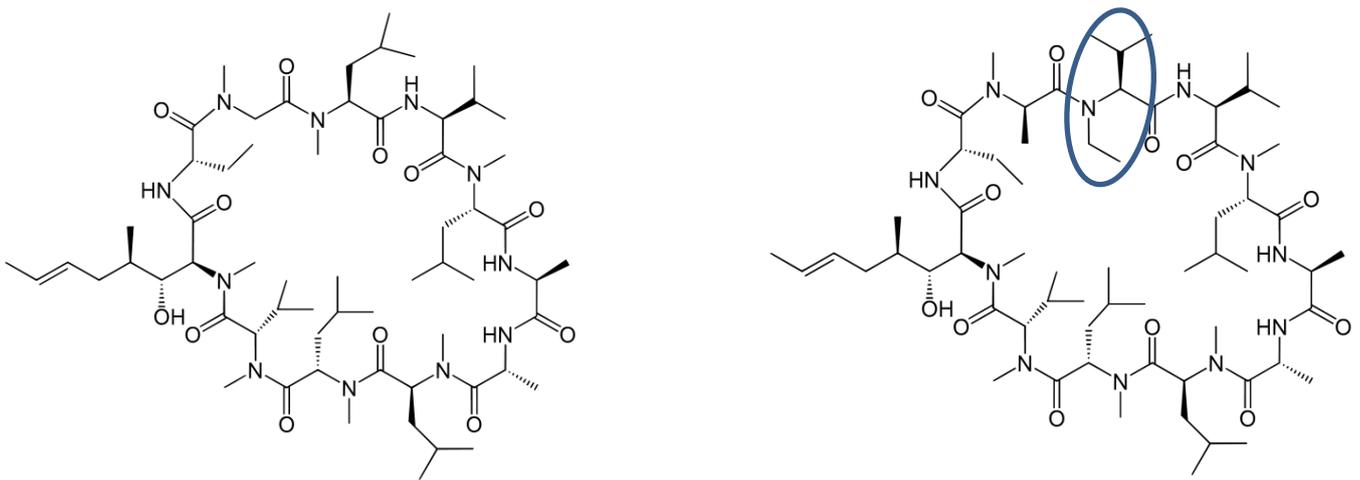
Le mécanisme d'immunosuppression de la CsA est connu et bien décrit. Il est lié à l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine par formation d'un complexe ternaire entre la cyclophiline A, la CsA et la calcineurine. Le facteur de transcription NFAT (« Nuclear Factor of Activated T-cells »), cible de la calcineurine, demeure ainsi sous sa forme phosphorylée. Il est alors incapable de pénétrer dans le noyau et d'activer la transcription de ses gènes cibles de l'immunité comme l'interleukine 2 ([Liu et al. 1991](#))(**Figure 19**).



**Figure 19 : Schéma représentatif du caractère immunosuppresseur de la CsA** – Le complexe ternaire CsA-CypA-Calcineurine, empêche la déphosphorylation de NFAT empêchant sa translocation dans le noyau et donc la synthèse de l'interleukine 2 ([Nabel 1999](#))

## 2) L'Alisporivir

Pour pallier ce problème, un dérivé non immunosuppresseur de la cyclosporine A a été développé : l'Alisporivir ou Debio-025. La molécule ne diffère que sur quelques atomes au niveau du site d'interaction de la cyclosporine A avec la calcineurine (**Figure 20**). L'alisporivir possède néanmoins la même affinité avec les cyclophilines.



**Figure 20** : Structure de la Cyclosporine A (à gauche) et de son dérivé non immunosuppresseur l'Alisporivir (à droite). Entourée en bleu, la modification à l'origine de la perte du caractère immunosuppresseur, site de liaison à la calcineurine

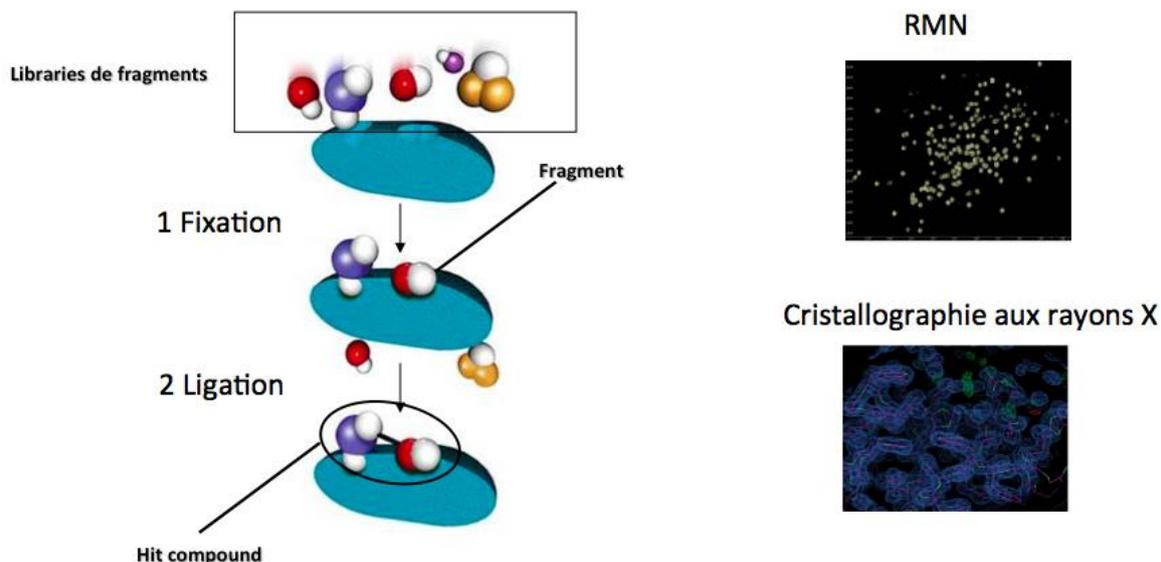
L'alisporivir a initialement été développé pour le traitement des patients atteints par le VIH mais il a atteint la phase 3 d'essai clinique dans le cas du traitement de cas chroniques d'infection par le VHC. Le composé diminue la charge virale de 3 à 4 logs chez les patients infectés par le VHC quel que soit le génotype avec une haute barrière à la résistance puisque la cible du médicament est une protéine de l'hôte. Lorsque l'alisporivir est administré seul, celui-ci est bien toléré par les patients et ne provoque que des effets secondaires modérés (maux de tête, fatigue, nausée et hyperbilirubinémie réversible). La phase 3 d'essai clinique a cependant été interrompue puisque la combinaison de l'alisporivir avec de la ribavirine et l'interféron alpha pégylé a entraîné 3 cas de pancréatite dont une

mortelle bien qu'aucun de ses cas ne soit apparu chez les patients traités uniquement avec l'alisporivir ou en combinaison avec la ribavirine ([Zeuzem et al. 2015](#)).

Malgré l'interruption de la phase 3 d'essai clinique, les inhibiteurs de cyclophilines et particulièrement l'alisporivir ont montré un intérêt certain dans le développement d'antiviraux. L'alisporivir reste cependant une macromolécule de 1216.66 g/mol qui a pour conséquence une faible perméabilité membranaire. De plus, elle présente des effets secondaires non liés à l'inhibition des cyclophilines comme par exemple l'inhibition des transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette »). Il y a donc nécessité de développer de nouvelles molécules inhibitrices des cyclophilines en tant que potentiel médicament.

### **3) Petites molécules non peptidiques, inhibitrices des cyclophilines SMCypl (« Small Molecules Cyclophilins Inhibitors »)**

Il y a quelques années, le laboratoire a développé une nouvelle famille de petites molécules non peptidiques inhibitrices de cyclophilines grâce à l'approche de « Fragment-based drug design » (FBDD) combinant la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie aux rayons X ([Ahmed-Belkacem et al. 2016](#)) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Schéma représentatif des différentes étapes de fabrication des inhibiteurs de cyclophilines - RMN :** Résonance Magnétique Nucléaire et Cristallographie aux rayons X

Cinquante-cinq fragments ont été sélectionnés par criblage virtuel d'une bibliothèque de plusieurs milliers de fragments. Leur analyse RMN a permis de démontrer que 14 de ces fragments se fixent sur la cyclophiline D et leurs structures à haute résolution en complexe avec celle-ci montre que : 4 fragments se lient au site catalytique, 5 fragments se lient à la poche gardienne, un fragment se lie à l'interface du site catalytique et de la poche gardienne et 4 fragments se lient à plusieurs sites de manière aspécifique.

Deux fragments capables de se fixer respectivement au site catalytique et à la poche gardienne ont été sélectionnés pour être reliés (**Figure 22**). La ligation de ces deux fragments, à l'aide d'un groupement urée, a donné naissance à la première petite molécule capable d'inhiber puissamment l'activité enzymatique des cyclophilines A, B et D

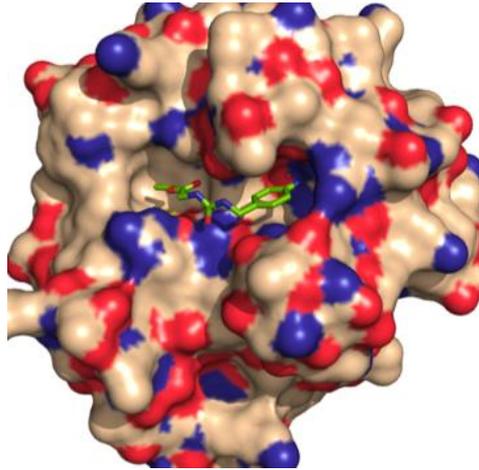


Figure 22 : Structure tridimensionnelle représentant le composé 24 lié au site catalytique et à la poche gardienne de la cyclophiline (Ahmed-Belkacem et al. 2016)

L'effet antiviral de ces molécules inhibitrices de l'activité PPIase a été évalué sur la réplication des flaviviridae et des coronaviridae. Elles inhibent l'activité PPIase et ont une forte activité antivirale.

### III) Les Cyclophilines

#### A) Structure et fonctions

Les cyclophilines sont des protéines chaperonnes qui, à l'instar de protéines FK506BPs (« FK506 binding proteins ») et des parvulines font partie de la famille des immunophilines. Ces protéines sont présentes dans tous les organismes étudiés, procaryotes ou eucaryotes et sont très conservées.

Chez l'Humain on compte 20 cyclophilines différentes qui possèdent toutes un domaine commun appelé « Cyclophilin Like Domain » (CLD) d'environ 109 acides aminés. Il est entouré par des domaines propres à chaque cyclophiline qui sont associés à leurs localisations dans la cellule et leurs fonctions (Wang and Heitman 2005).

Les cyclophilines possèdent une activité enzymatique peptidyl-prolyl cis trans isomérase (PPIase). Elles catalysent, en amont d'un résidu proline, l'interconversion de la liaison peptidique entre la forme *cis* et la forme *trans* (Figure 23).

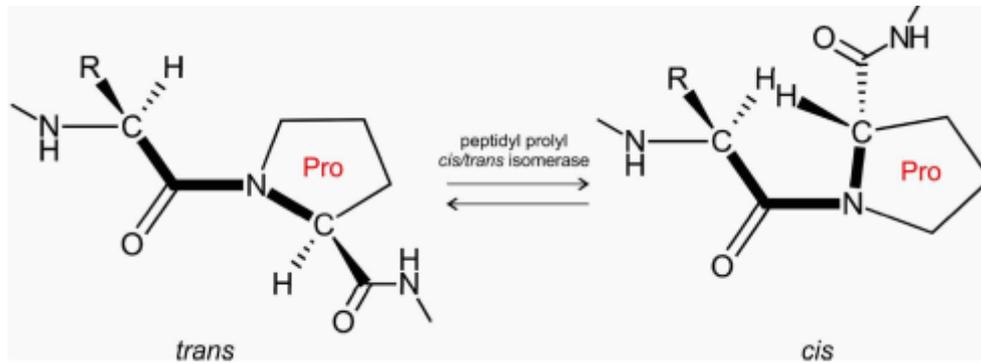


Figure 23 : Activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase qui catalyse l'interconversion cis-trans de la liaison peptidyl-prolyl en amont d'un résidu proline (Taler-Verčč et al. 2017)

Les liaisons peptidiques des protéines sont majoritairement sous la forme *trans* car énergétiquement plus favorable. Cependant la forme *cis* est nécessaire pour certaines fonctions biologiques importantes. Les cyclophilines, via leur activité PPIase, favorisent cette fonction biologique par l'isomérisation de la liaison peptidyl-prolyl de la forme *trans* à la forme *cis*, processus d'ordinaire lent. Les cyclophilines sont donc considérées comme des protéines chaperonnes et l'importance de l'activité PPIase explique le haut degré de conservation des résidus de la poche catalytique (Wang and Heitman 2005).

Le site actif des cyclophilines est composé de deux poches (Figure 24). Une poche catalytique, qui porte l'activité PPIase et qui est composée de 9 résidus amino-acidiques hydrophobes (R55, F60, M61, Q63, N102, F113, W121, L122, H126) qui sont très conservés chez l'ensemble des cyclophilines humaines. La seconde poche est appelée « gate keeper pocket » ou poche gardienne. Elle est plus profonde que la poche catalytique et les acides aminés qui la constituent sont moins conservés. Ces derniers ne permettent l'accès qu'à certains substrats, d'où le nom de poche gardienne (Davis et al. 2010).

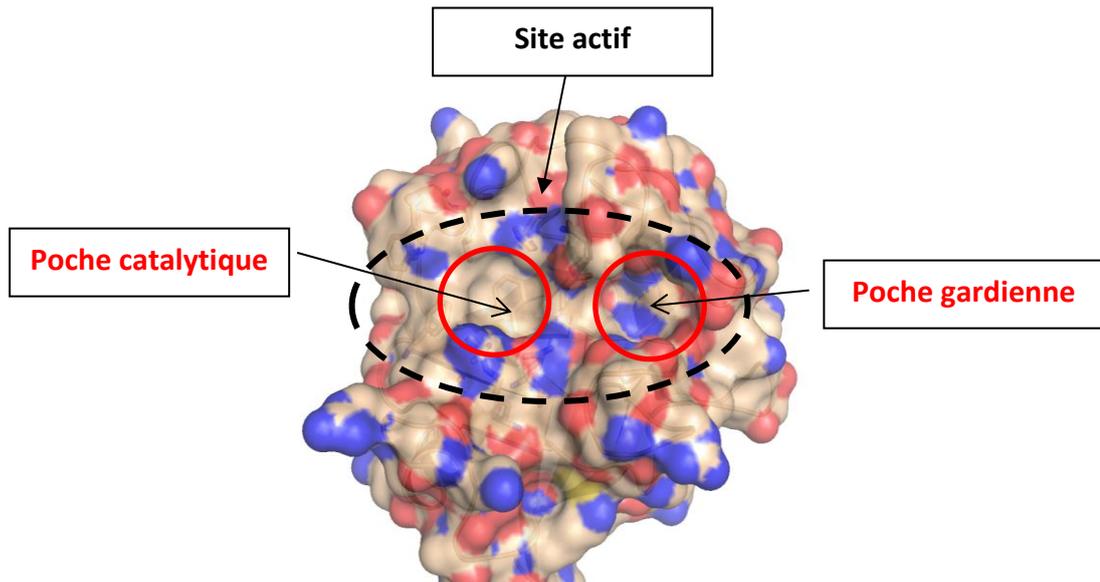


Figure 24 : Représentation « surfaces » du site actif de la CypA avec les deux poches catalytique et gardienne qui le compose (Ahmed-Belkacem et al. 2016)

## B) Rôle des cyclophilines et conditions physiologiques

Les cyclophilines A, B et D sont les plus abondantes et les mieux caractérisées.

La cyclophiline A (CypA) fut la première à être découverte. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme le repliement des protéines, la modulation de la réponse immunitaire via l'activation des lymphocytes T ou encore le transport des protéines à l'intérieur de la cellule (Fehr and Perlman 2015; Galat 1993; Perrucci et al. 2015; Wilde et al. 2018).

Elle est localisée principalement dans le cytosol où elle peut représenter jusqu'à 0,5% des protéines. La Cyp A également peut-être sécrétée et se fixer à son récepteur membranaire CD147 ou EMMPRIN (« Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer »).

La Cyclophiline B est également très abondante mais, contrairement à la CypA, elle est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique (Hasel et al. 1991; Wilde et al. 2018). La CypB peut également être sécrétée en réponse aux stimuli inflammatoires et se fixer sur le récepteur membranaire CD147/EMMPRIN.

La Cyclophiline D est exprimée dans tous les types cellulaires humains en quantité bien moindre que la cyclophiline A.

La Cyp D possède une séquence d'adressage à la mitochondrie dans laquelle elle joue un rôle fondamental dans la régulation de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, élément clé dans le processus d'apoptose ou de nécrose (Elrod et al. 2010; Elrod and Molkentin 2013).

Les connaissances sur les autres cyclophilines humaines sont beaucoup moins étoffées mais certaines fonctions sont connues pour certaines d'entre elles comme la Cyp60 qui régule l'expression du récepteur des cyclophilines extracellulaires CD147 (Pushkarsky et al. 2005).

Les cyclophilines sont localisées à des endroits très différents dans la cellule (cytosol, RE, mitochondrie, milieu extracellulaire) et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires : repliement des protéines, immunité et inflammation, mort cellulaire, voie de signalisation, machinerie cellulaire. Nombreuses de ses localisations, de ces fonctions ou de ces processus sont empruntés, détournés ou fuis par les virus au cours d'une infection virale afin de faciliter leur réplication.

#### **IV) Cyclophilines et virus**

De nombreuses études ont démontré l'implication des cyclophilines dans les cycles de virus de familles différentes, que ce soit des virus à ARN de polarité positive ou négative, ARN bicaténaire ou des virus à ADN double brin. Les cyclophilines peuvent être des facteurs antiviraux ou proviraux.

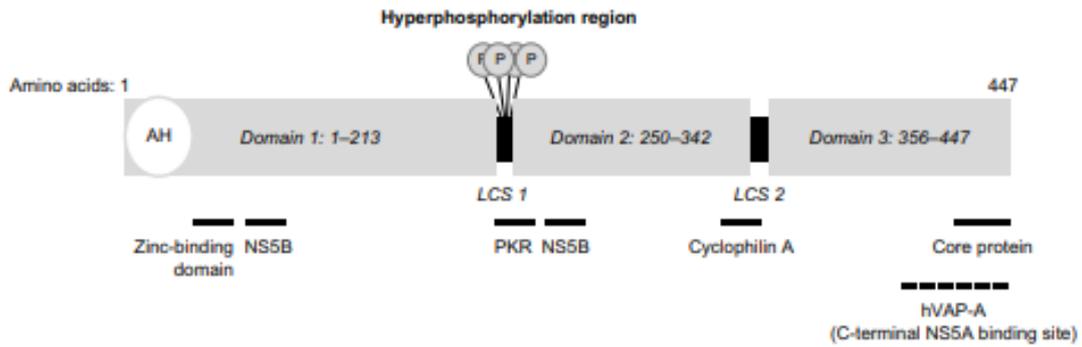
Cependant la plupart de ces études sont peu fournies et parfois unique pour démontrer l'implication potentielle d'une cyclophiline dans le cycle d'un virus. Dans

cette partie nous verrons l'état des connaissances de l'implication de ces protéines dans les deux familles virales d'intérêts de ma thèse : les *flaviviridae*, et les *coronaviridae*.

## A) Flaviviridae et cyclophilines

Le VHC est le virus de la famille des flaviviridae pour lequel l'état des connaissances vis-à-vis de l'implication des cyclophilines est le plus avancé. La première étude *in vitro* date de 2003 et démontre l'effet antiviral de la CsA sur des cellules Huh7 infectées par du plasma de patient infecté par le VHC ou sur un réplicon de génotype 1b, indépendamment de son activité immunosuppressive. Son activité antivirale a même rapidement été liée à sa capacité à inhiber les cyclophilines ([Watashi et al. 2003](#)).

Plusieurs études ont identifié la cyclophiline A comme étant essentielle pour le cycle de vie du VHC. Plus précisément, l'inactivation de l'activité PPIase de la CypA par mutagenèse entraîne une diminution de la réplication du VHC comparable à celle observée en présence de CsA ou de son dérivé non immunosuppressif, l'Alisporivir (Alv). En effet, le remplacement de l'histidine en position 126 par une glutamine (H126Q) ou de l'arginine en position 55 par une alanine (R55A), deux résidus très conservés au sein de la poche catalytique, diminue de plus de 99% l'activité PPIase de la CypA, entraînant une forte diminution de la réplication du VHC ([Chatterji et al. 2009](#); [Yang et al. 2008](#)).



**Figure 25 : Représentation de la protéine NS5A du VHC (Reau and Janardhan 2015)**- 3 domaines entrecoupés de LCS (« Low Complexity Sequences ») ; 2 sites d'interaction avec la protéine non structurale NS5B du VHC dans les domaines 1 et 2 ; Site d'interaction avec la CypA dans le domaine 2

La cyclophiline A interagit avec la protéine non structurale 5A NS5A du VHC, une phosphoprotéine qui possède différents rôles fondamentaux dans la réplication du virus (**Figure 25**). Cette protéine est composée de trois domaines structuraux séparés par des séquences de faibles complexités LCS (« Low-Complexity Sequences »). La CypA interagit au niveau de résidus proline, dans le domaine II de la protéine NS5A, qui sont des substrats pour l'activité PPIase de la CypA. La fixation de la CypA au niveau du domaine II de NS5A induit un changement conformationnel de ce domaine qui favorise la liaison à l'ARN et l'interaction NS5A-NS5B, essentielle pour la modulation de l'activité de la polymérase (Foster et al. 2011; Ngure et al. 2016; Shirota et al. 2002). La cyclophiline A ne semble pas participer à la synthèse de nouveaux brin d'ARN mais semble plutôt impliquée dans la formation et la stabilisation des DMV (« Double Membrane Vesicle ») qui protègent la réplication de facteurs de dégradations cellulaires et concentrent les protéines et acides nucléiques viraux. (**Figure 26**)

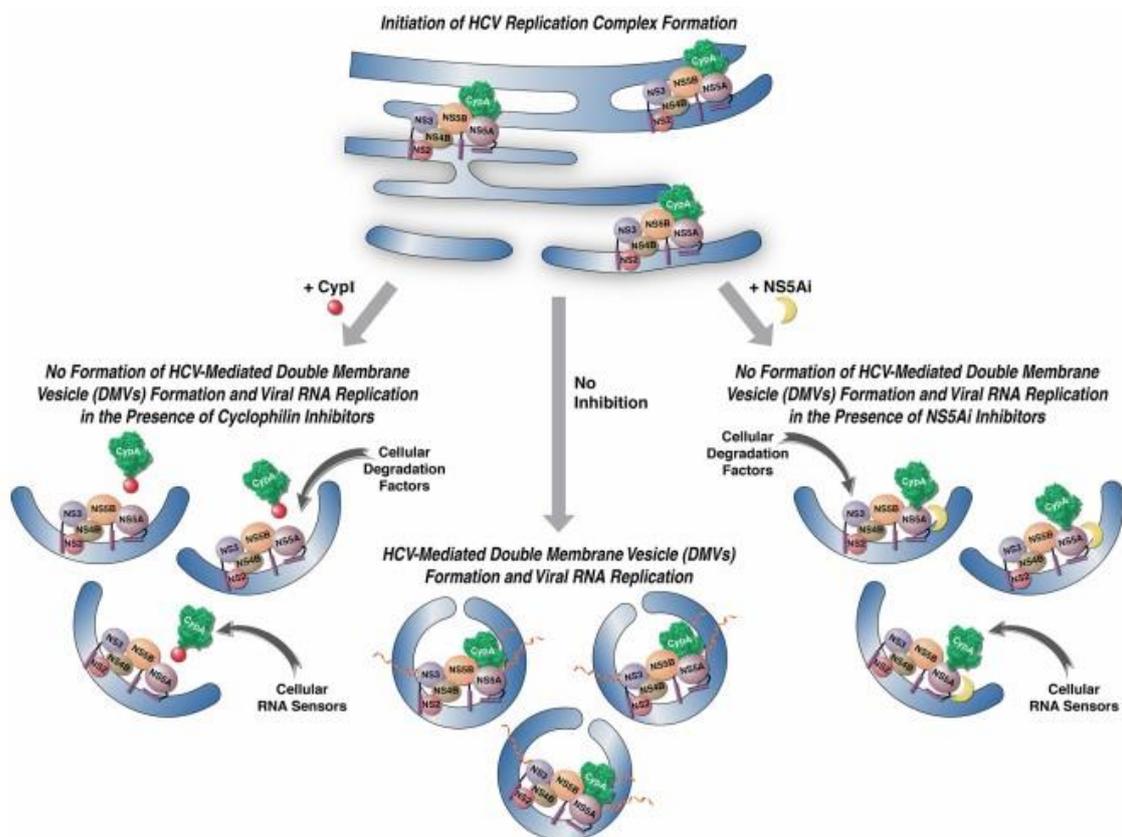


Figure 26 : Schéma représentant la formation des DMV CypA et NS5A-dépendant dans le cycle de vie du VHC (Chatterji et al. 2015)

D'autres membres de la famille des *Flaviviridae* sont sensibles aux inhibiteurs de cyclophilines. En effet, la CsA inhibe la réplication des virus West Nile, de la Dengue, de la fièvre jaune et de l'encéphalite japonaise. Le blocage de l'interaction entre la CypA et la protéine NS5 du virus West Nile par la CsA semble être la cause de la diminution de la réplication du virus. Dans le cas du virus de l'encéphalite japonaise c'est le blocage des interactions entre NS5 et la CypA et entre NS4B et la CypB qui semble responsable de la diminution de la réplication (Kambara et al. 2011; Qing et al. 2009). Une équipe brésilienne a également montré par la technique de GST pull-down une interaction entre la CypA et la protéine NS4B du virus de la fièvre jaune (Vidotto et al. 2017).

Il existe très peu de données dans la littérature quant à l'implication des cyclophilines dans le cycle de vie du virus Zika. Un crible de drogues approuvées par la FDA a montré des résultats contradictoires concernant l'effet de la CsA sur la replication d'une souche mexicaine du virus Zika. En effet, à la concentration de 1µM, l'infection semble être favorisée tandis qu'à la concentration de 10µM il semble y avoir une diminution de la réplication du virus ([Barrows et al. 2016](#)).

## **B) Coronavirus et cyclophilines**

L'étude de l'implication des cyclophilines dans le cycle des coronavirus et l'effet de ses inhibiteurs a commencé après l'épidémie de SARS en 2002-2003. En effet la première étude date de 2004 et suggère, par résonance plasmonique de surface, une interaction forte entre la nucléoprotéine N du SARS-CoV et la CypA. L'affinité entre N et la CypA serait entre 100 et 2700 fois plus importante que celle entre la protéine de capsid du VIH et la CypA ([Luo et al. 2004](#)). Ce résultat a été confirmé un an plus tard dans une autre étude par co-immunoprécipitation entre la CypA purifiée et la protéine N du SARS-CoV. La formation d'un complexe tripartite CypA-N-CD147 a été suggérée pour favoriser l'entrée du SARS-CoV dans la cellule cible. Un peptide dirigé contre CD147 inhibe la réplication virale *in vitro* mais aucune interaction entre les trois n'a été démontrée et il est difficile d'imaginer une interaction physique avec le récepteur CD147 puisque le complexe N-CypA serait protégé par l'enveloppe virale ([Chen et al. 2005](#)). Par ailleurs, une étude de 2008 montre par spectrométrie de masse la présence de CypA dans les virions de SARS-CoV, suggérant un rôle dans les étapes précoces ou tardives du cycle de vie du virus ([Neuman et al. 2008](#)).

L'interactome de la quasi-totalité des protéines virales du SARS-CoV avec des protéines cellulaires a été testé par des techniques de criblage double-hybride et a

permis d'identifier l'interaction de plusieurs cyclophilines (A, B, G et H) avec la protéine nsp1.

De nombreuses études utilisant des KD (« knockdown ») ou KO (« knockout ») de cyclophilines ont permis de montrer leurs implications dans les cycles viraux de plusieurs coronavirus. C'est particulièrement le cas de la cyclophiline A, qui lorsque son expression est atténuée ou éteinte, *in vitro*, entraîne une diminution de la réplication des coronavirus NL63, 229E, MERS et le FCoV (« Feline Coronavirus ») (Brunn et al. 2015; Carbajo-lozoya et al. 2014; Tanaka, Sato, and Sasaki 2017; Wilde et al. 2017).

La cyclophiline D joue également un rôle dans l'infection par les coronavirus OC43 et PEDV où elle semble impliquée dans la mort cellulaire viro-induite caspase-indépendante. Dans le cas de l'infection par HCoV-OC43, l'utilisation de shRNA pour réaliser un KD CypD, protège les cellules différenciées LA-N-5 de la mort cellulaire programmée, suggérant que la cyclophiline D est impliquée dans la mort cellulaire programmée, et plus probablement la nécrose (Favreau et al. 2012; Kim and Lee 2014).

Les inhibiteurs de cyclophilines comme la CsA et l'Alisporivir ont montré des effets sur de nombreux coronavirus humains et animaux *in vitro* faisant de ces molécules des antiviraux à large spectre pan-coronavirus (**Tableau 2**).

Virus	Inhibiteurs	Techniques	EC <sub>50</sub>	Références
PEDV	CsA	Production virale	5µM	(Kim and Lee 2014)
FCoV	CsA	Production virale	2.7 – 4.1 µM	(Pfefferle et al. 2011; Tanaka et al. 2012)
OC43	CsA	Mort viro-induite	2.5 µM	(Favreau et al. 2012)

NL63	CsA, Alv	qPCR, production virale	0.8 – 6.6 $\mu$ M	(Carbajo-lozoya et al. 2014; Pfefferle et al. 2011)
229E	CsA, Alv	Virus GFP ou luciférase, production virale	2.3 – 12.2 $\mu$ M	(Carbajo-Lozoya et al. 2012; Pfefferle et al. 2011; Wilde et al. 2016; de Wilde et al. 2011)
TGEV	CsA	Production virale	10 $\mu$ M	(Pfefferle et al. 2011)
MHV	CsA, Alv	Virus GFP, production virale	6.3 – 12 $\mu$ M	(Wilde et al. 2016; de Wilde et al. 2011)
SARS	CsA, Alv	Virus GFP, production virale	8.3 – 12 $\mu$ M	(Pfefferle et al. 2011; Wilde et al. 2016)
MERS	CsA, Alv	Mort viro-induite, production virale	3.4 – 7.5 $\mu$ M	(Wilde et al. 2016)
IBV	CsA	Production virale	5.5 $\mu$ M	(Pfefferle et al. 2011)

**Tableau 2 : Tableau représentant les données de publications sur l'inhibition de la réplication des coronavirus par les inhibiteurs CsA et Alv**

Malheureusement les données *in vivo* ne sont pas aussi encourageantes. Une étude suggère que l'alisporivir ne protège pas les souris de l'infection par le SARS-CoV (Wilde et al. 2016). Avant d'exclure l'intérêt des inhibiteurs de cyclophilines comme

solution thérapeutique pour lutter contre les coronavirus il faudrait cependant que ces résultats soient corroborés dans plusieurs études en utilisant des modèles, virus et composés différents.

Une très récente étude relate le fait que la CsA inhibe la réplication du MERS-CoV *via* la réponse interféron lambda cyclophiline A-dépendante *in vitro* et *in vivo*. Bien que la diminution de la charge virale soit modeste chez les souris traitées à la CsA, ce résultat laisse supposer un intérêt thérapeutique à l'utilisation des inhibiteurs de cyclophilines pour lutter contre les infections par les coronavirus ([Sauerhering et al. 2020](#)).

Le rôle des cyclophilines dans les cycles viraux reste cependant souvent peu clairs, insuffisamment compris et les résultats *in vitro* sont parfois même contradictoires selon les souches virales et/ou les types cellulaires utilisés.

## V) Objectifs

Encouragé par ces résultats prometteurs confirmant le potentiel des inhibiteurs de cyclophilines comme antiviraux à large spectre, le laboratoire a entrepris de caractériser l'effet antiviral de ces nouvelles molécules sur des virus d'intérêts majeurs et orphelins de traitement : les arbovirus de la famille des *Flaviviridae* et certains virus respiratoires dont les *Coronaviridae*, afin de mieux comprendre l'implication des cyclophilines dans le contexte des cycles réplicatifs de ces virus et de développer des nouvelles molécules à large spectre antivirale à des fins thérapeutiques.

Dans le cadre de ma thèse, mes objectifs ont été de caractériser l'effet antiviral des SMCypl sur les virus Zika et sur un virus modèle des coronavirus, le HCoV-229E, de comprendre les mécanismes d'action anti-Zika et anti-229E des SMCypl, d'utiliser les inhibiteurs pour mieux comprendre le rôle des cyclophilines dans le cycle de vie des virus Zika et HCoV-229E et d'optimiser ces molécules pour une utilisation pan-virale.

- 1) Caractérisation de l'activité anti-VHC du composé C31 et évaluation de son spectre antiviral sur les virus de la famille des *flaviviridae*
- 2) Caractérisation de l'activité anti-Zika des SMCypl
- 3) Caractérisation de l'activité anti-229E des SMCypl
- 4) Repositionnement de drogues pour lutter contre l'infection par le SARS-CoV-2

# Matériels et Méthodes

## I) Modèles d'études

- Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires hépatiques Huh7, pulmonaires MRC5 et rénale VERO E6 ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Carlsbad, Californie) supplémenté (10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 100µg/ml streptomycine, 50 UI/ml péniciline et 0,1µg/ml amphotéricine-β, Thermo Fischer) à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>.

- Amplification de la souche MR766 du virus Zika

L'amplification de la souche MR766 du virus Zika (Souche ATCC VR-1838) a été effectuée dans les cellules de rein de singe, VERO E6. Une flasque T75 à 90% de confluence a été infectée à une MOI de 0,01 avec 2 ml de virus dilué dans du milieu DMEM supplémenté (2% Sérum de Veau Fœtal, 100µg/ml streptomycine, 50 UI/ml péniciline et 0,1µg/ml amphotéricine-β, Thermo Fischer) pendant 4h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sous agitation. Huit ml de milieu ont ensuite été ajoutés pour atteindre un volume final de 10ml. Le virus a été récupéré après 72h, lorsqu'environ 90% des cellules étaient lysées. Après une centrifugation de 5 min à 300g pour clarifier le virus, les 10 ml ont été dilués au 1/5<sup>ème</sup> pour obtenir un volume final de 50ml qui ont été utilisés pour infecter 10 flasques T150 selon le même procédé, afin d'obtenir un stock de virus de 250ml.

- Amplification de la souche HCoV-229E

La souche du virus HCoV-229E a été fournie par le Pr. Astrid Vabret (CHU Caen, France). L'amplification du virus a été effectuée dans les cellules MRC5 (RD-

Biotech, Besancon, France) à 36 doublements. Une flasque T75 (75cm<sup>3</sup>) à 90% de confluence, a été infectée avec 5mL de virus fourni dilué au demi dans du milieu DMEM supplémenté (2% Sérum de Veau Fœtal, 100µg/ml streptomycine, 50 UI/ml pénicilline et 0,1µg/ml amphotéricine-β, Thermo Fischer) pendant 4h à 35°C, 5% CO<sub>2</sub>, sous agitation. Cinq ml de milieu ont ensuite été ajoutés pour atteindre un volume final de 10 ml. Le virus a été récupéré après 72h, lorsqu'environ 90% des cellules étaient lysées. Après clarification du virus (centrifugation 5 min à 300g), les 10ml ont été utilisés pour infecter deux flasques T75 de la même manière. L'opération a été répétée jusqu'à obtenir un stock de virus de 250 ml.

- Amplification de la souche SARS-CoV-2

Les souches des virus SARS-CoV2 ont été amplifiées à partir d'écouvillons nasaux pharyngés de deux patients de l'Hôpital Henri Mondor de Créteil (Patients M70 et M80, Créteil, France). Les échantillons ont été mis en culture dans des plaques 6 puits,ensemencés avec 350000 cellules Vero E6 la veille, pendant 3h à 37°C sous agitation et dilué au demi dans du milieu DMEM supplémenté (2% Sérum de Veau Fœtal, 100µg/ml streptomycine, 50 UI/ml pénicilline et 0,1µg/ml amphotéricine-β, Thermo Fischer). Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec 2 ml de milieu frais pendant 5 jours. Les 2 ml ont ensuite infecté une flasque T75 pendant 3h à 37°C sous agitation. Les cellules ont été lavées au PBS -/- (sans Ca<sup>2+</sup> et sans Mg<sup>2+</sup>) et incubées dans 4ml de milieu frais. L'opération a été répétée jusqu'à obtenir un stock de 250ml.

## II) Techniques utilisées

### A) RT-qPCR

L'ARN intracellulaire de cellules infectées a été extrait avec le kit « SV96 Total RNA Isolation System » (Promega). La rétrotranscription des ARN a été réalisée avec le kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Thermo Fischer Scientific). Les ADNc complémentaires ont été amplifiés grâce à des amorces spécifiques de chacun des virus étudiés (**Tableau 1**).

Les résultats ont été normalisés grâce à la GAPDH en contrôle « GAPDH Human Endogenous Control » (ThermoFischer Scientific).

Virus	Amorces sens	Amorces anti-sens	Sonde
Zika	5'- ATATCGGACATGGCTTCGGA- 3'	5'- GTTCTTTTGCAGACATATTGAGTG -3'	5'-FAM- TGCCCAACACAAGGTGAAGCCTA CCT-3'
HCoV-229E	5'- CGCAAGAATTCAGAACCAGAG -3'	5'- GGGAGTCAGGTTCTTCAACAA-3'	5'-FAM- CCCACTTCAATCAAAGCTCCCA AAT-TAMRA-3'
SARS-CoV-2	5'- ACAGGTACGTTAATAGTTAAT AGCGT -3'	5'- ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3'	5'-FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTT CG-BHQ-1 -3'

Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées en RT-qPCR pour les virus Zika, HCoV-229E et SARS-CoV-2

## **B) Immunofluorescence**

Les immunofluorescences (IF) ont été réalisées en « Labtek Permanox » 8 puits (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) etensemencées avec 40000 cellules Huh7, 20000 cellules MRC5, 30000 cellules Vero E6 par puits. Les cellules infectées ont été lavées avec du PBS +/+ (avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) et fixées pendant 10 minutes dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées à 3 reprises avec du PBS +/+ puis perméabilisées pendant une heure en présence d'un tampon de saturation (BSA fraction V 10mg/ml, Triton X-114 0.3% dans PBS+/+) à 37°C dans une chambre humide. Après 3 lavages au PBS +/+ les cellules ont été incubées 1 heure en présence d'un anticorps primaire de souris anti-ARNdb « J2 » (Scicons, Szirak, Hongrie) dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du « Antibody diluent » (Agilent Technologies, Les Ulis, France), pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages au PBS +/+ ont été réalisés et les cellules incubées pendant 1 heure à 37°C en chambre humide avec un anticorps secondaire anti-souris (« GOAT anti-mouse Alexa Fluor 488nm », ThermoFischer Scientific) dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du « Antibody Diluent ». Après 3 lavages au PBS +/+ les cellules ont été incubées avec du Fluoromount-G (ThermoFischer Scientific) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 3 minutes à température ambiante. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

## **C) Mesure de l'effet cytopathique viro-induit (ECP)**

Le principe du test de mesure de l'effet cytopathique viro-induit repose sur l'action des protéases cellulaires libérées dans le milieu de culture après la lyse cellulaire. Un composé commercial du kit « Cytotox-Glo » (Promega, Madison, Etats-Unis), « AAF –Glo Substate », est ajouté dans le surnageant de culture et est clivé par les protéases cellulaires en luciférase. La présence de luciférine entraîne un signal obtenu au luminomètre, directement lié au niveau de mortalité cellulaire.

Le signal a été calculé selon la formule suivante : Signal spécifique = Signal cellules infectées – signal virus sans cellules – signal cellules non infectées

Les cellules MRC5 ont étéensemencées à la densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits 24h avant d'être infectées avec le virus HCoV-229E pendant 72h à MOI 1 en présence de concentrations croissantes de F836 ou d'Alv.

## **D) Western Blot**

Les différents échantillons ont été analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide « NuPage 4-12% Bis-Tri gel » (Thermo Fischer Scientific). La migration a été effectuée dans du tampon « NuPage SDS MES Running Buffer » (Thermo Fischer Scientific) 1H30 à 90V. Le transfert a ensuite été réalisé dans du tampon de transfert 1X à 4°C, 1h à 100V avec une membrane de nitrocellulose « Nitrocellulose Transfert Membrane 0.45µM » (Thermo Fischer Scientific). La membrane a ensuite été incubée 1h dans une solution de BSA 3% (« Bovine Serum Albumine » standard, Fraction V, Thermo Fischer) pour saturation. Puis la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire pendant toute la nuit à 4°C. Après avoir été rincée 3 fois au TBS (« Tris Buffered-Saline ») 1X-Tween 0,1%, la membrane a été incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (**Tableaux 2 et 3**). La membrane a ensuite été lavée 3 fois au TBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubée avec l'« Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent » (GE Healthcare) et révélée avec le logiciel ImageQuant Las4000 (GE Healthcare).

### **III) Caractérisation de l'activité antivirale des SMCypl**

#### **A) Crible d'une librairie de « Small Molecule Cyclophilin Inhibitors » (SMCypl)**

- Zika

Des cellules Huh7 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, 24h avant d'être infectées pendant 1h à MOI 0,1 par la souche MR766 du virus Zika, en présence de 25  $\mu$ M de chacun des 25 SMCypl. Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS -/- et incubées avec du milieu frais (2% SVF) et l'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR 48h post-infection.

- HCoV-229E

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Les cellules ont été infectées 24h plus tard pendant 72h à MOI 1 avec HCoV-229E en présence de 50  $\mu$ M de chacun des 29 SMCypl. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR 72h post-infection.

#### **B) Cytotoxicité des meilleurs composés**

Des cellules Huh7 ou des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Le lendemain les cellules ont été incubées avec une gamme de concentrations de chacun des composés à tester (SMCypl, Alv, CsA) pendant 48h à 37°C. La viabilité cellulaire a été déterminée grâce à un MTS (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Promega).

### **C) Gammes de concentrations par RT-qPCR**

- Zika

Des cellules Huh7 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, 24h avant d'être infectées pendant 1h à MOI 0,1 par la souche MR766 du virus Zika, en présence de concentrations croissantes de composés. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR et les EC<sub>50</sub> des composés sur l'inhibition de la réplication d'ARN ont été calculées avec le logiciel SigmaPlot.

- HCoV-229E

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées pendant 72h à MOI 1 par HCoV-229E en présence de concentrations croissantes de composés. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR et les EC<sub>50</sub> des composés sur l'inhibition de la réplication d'ARN ont été calculées avec le logiciel SigmaPlot.

### **D) Gamme de concentrations en Immunofluorescence**

- HCoV-229E

20000 cellules MRC5 ont étéensemencées dans des Labtek de 8 puits (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et incubées pendant 24h à 37 °C. Les cellules ont été infectées avec HCoV-229E pendant 24h en présence de concentrations croissantes de F836 (5 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM).

## **E) Titration des virus produits en présence de SMCypl**

- Zika

Des cellules Huh7 ont étéensemencées à une densité de 400000 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées par la souche MR766 du virus Zika en présence de différentes concentrations de composé pendant 3h à 37°C. Après un lavage au PBS -/-, les cellules ont été incubées avec du milieu DMEM supplémenté (2% de Sérum de Veau Fetal (SVF), 50UI/ml péniciline, 100µg/ml streptomycine et 0,1µG/ml amphotericine-β, Thermo Fischer Scientific) en présence de composé. Le titre des virus produit a été mesuré par RT-qPCR 48h post-infection.

- HCoV-229E

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 300000 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées par HCoV-229E en présence de différentes concentrations de composé pendant 3h à 37°C. Après un lavage au PBS -/-, les cellules ont été incubées avec du milieu DMEM supplémenté (2% de Sérum de Veau Fetal (SVF), 50UI/ml péniciline, 100µg/ml streptomycine et 0,1µG/ml amphotericine-β, Thermo Fischer Scientific) en présence de composé. Le titre des virus produits a été mesuré par RT-qPCR 48h post-infection.

## **F) Effet antiviral à large spectre du F836 sur les coronavirus**

- HCoV-229E

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à la densité de 20000 cellules par puits dans une Labtek. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus HCoV-229E à MOI 2 pendant 2h en présence de 50µM de F836 avant d'être lavées au PBS -/- et incubées avec du milieu frais sans composé pendant 7h.

- SARS-CoV-2

Des cellules Vero E6 ont étéensemencées à la densité de 20000 cellules par puits dans une Labtek. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus SARS-CoV-2 à MOI 1 pendant 2h en présence de 50µM de F836 avant d'être lavées au PBS -/- et incubées avec du milieu frais sans composé pendant 7h.

- OC43

Des cellules HRT-18 ont étéensemencées à la densité de 30000 cellules par puits dans une Labtek. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus OC43 à MOI 0.3 pendant 2h en présence de 50µM de F836 avant d'être lavées au PBS -/- et incubées avec du milieu frais sans composé pendant 7h.

- MERS

Les expériences sur le MERS ont été réalisées par Jean K. Millet au sein de l'équipe de Gary Whittaker (Université Cornell, New York, Etats-Unis). La souche EMC/2012 leur a été fournie par Ralph Baric (Université de Chapel Hill, Caroline du Nord, Etats-Unis). Des cellules Huh7 ont été infectées avec le MERS à MOI 10 pendant 2h en présence de 50µM de F836 avant d'être lavées au PBS -/- et incubées avec du milieu frais sans composé pendant 7h.

L'infection a été mesurée par immunofluorescence dirigée contre l'ARN double brin dans le cas de virus HCoV-229E, SARS-CoV-2 et OC43 et dirigée contre la protéine de surface Spike dans le cas de l'infection par le MERS. La quantification des cellules infectées a été réalisée par le logiciel Duolink.

## IV) Mécanisme d'action antiviral des SMCypl

### A) Test de temps d'ajout (TTA)

- Zika

Des cellules Huh7 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, 24h avant d'être infectées avec la souche MR766 du virus Zika à MOI 1. Le composé a été ajouté à une concentration de 20  $\mu$ M à différents temps de l'infection, 3h avant, en même temps ou 3h, 6h, 9h, 12h, 15h ou 18h post infection. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR 48h post infection.

- HCoV-229E

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées par HCoV-229E à MOI 1. Le composé F836 a été ajouté à une concentration de 25 $\mu$ M à différents temps de l'infection, 3h avant, en même temps ou 3h, 6h ou 9h post infection. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR 72h post-infection.

### B) Caractérisation de l'entrée du 229E dans les MRC5

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 10000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus 229E à MOI 1 pendant 1 heure à 37°C en présence de drogues (10  $\mu$ M d'E64d, 10  $\mu$ M de Camostat et 25  $\mu$ M de F836) ou non (DMSO). Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS -/- et les cellules ont été incubées avec du milieu frais 2% SVF en présence de drogue. L'effet antiviral a été mesuré par RT-qPCR 24h post infection.

Les cellules MRC5 et Calu-3 ont été lysées avec du tampon de lyse (« EZ lysis buffer ») et le dosage des protéines a été réalisé par la méthode BCA (« BiCinchoninic

acid Assay »). Pour chacun des puits, 5µg de protéines ont été déposés et la présence de TMPRSS2 a été analysée par western-blot avec un anticorps primaire dirigée contre les 100 premiers acides aminés de la protéine TMPRSS2 (Abcam)

### C) Test d'entrée

- Trypsine

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 100000 cellules par puits dans une plaque 24 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus 229E prétraité pendant 5 min à 37°C en présence de 1000µg/ml de trypsine à MOI 1 (dilution 1/10<sup>ème</sup>) pendant 3 heures en présence de drogues (10µM d'E64d et 50µM de F836). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS -/- et incubées avec du milieu frais 2% SVF en présence de drogues. L'effet antiviral a été mesuré 24h post infection par RT-qPCR.

- Attachement

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 100000 cellules par puits dans une plaque 24 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus 229E à MOI 1 pendant 1 heure à 4°C en présence de drogue. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS -/- et les cellules ont été incubées à 37°C avec du milieu frais 2% SVF en absence de drogue. L'effet antiviral a été mesuré 24h post infection par RT-qPCR.

- Post attachement

Des cellules MRC5 ont étéensemencées à une densité de 100000 cellules par puits dans une plaque 24 puits. Le lendemain les cellules ont été infectées avec le virus 229E à MOI 1 pendant 1 heure à 4°C en absence de drogue. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS -/- et les cellules ont été incubées à 37°C en présence de drogues pendant 3 heures. Les cellules ont été de nouveau lavées au PBS -/- puis

incubées avec du milieu frais 2% SVF en absence de drogues. L'effet antiviral a été mesuré 24h post infection par RT-qPCR.

#### **D) Pseudo-particules HCoV-229E**

Les expériences avec les pseudo particules du coronavirus HCoV-229E ont été réalisées par Sandrine Belouzard (IBL, Lille, France). Des cellules Huh7 ont été inoculées avec des pseudo-particules de virus 229E en présence ou en absence de 50  $\mu$ M de F836. L'entrée des virus a été mesurée par l'expression de la luciférase.

#### **E) Résistance du HCoV-229E au F836**

Des cellules Huh7 ont étéensemencées à la densité de 160000 cellules par puits d'une plaque 12 puits. Quatre puits ont été infectés avec du virus HCoV-229E, dont 1 en présence de DMSO et 3 en présence de 2.5 $\mu$ M de F836 pendant 3h (virus DMSO, Clone 1 C1, Clone 2 C2 et Clone 3 C3). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS -/- puis incubées en présence de DMSO ou de F836. 72h post infection, les virus ont été clarifiés par centrifugation à 300g pendant 5 min avant d'infecter de nouveau des cellules Huh7 fraîches en présence de DMSO ou F836. Le même procédé a été répété sur une période de 120 jours en augmentant progressivement la concentration du composé F836 jusqu'à atteindre 50  $\mu$ M. Les virus ont ensuite été clarifiés par centrifugation à 300g pendant 5 min et amplifiés pour obtenir un stock d'environ 10ml pour chacun d'entre eux.

Le NGS a été réalisé à la plateforme de caractérisation des génomes microbiens par séquençage à haut débit. Les ARN ont été extraits avec le kit « Qiamp Viral RNA mini kit » (Qiagen) et les variants viraux ont été séquencés sur le séquenceur « NextSeq500 » (Illumina).

## F) Identification de la cyclophiline impliquée dans le cycle du HCoV-229E

- Expérience de « cross-linking »

La Cyp A purifiée a été incubée en présence de 0,025% de l'agent pontant Glutaraldéhyde, en présence de la protéine N purifiée du HCoV-229E ou de la protéine N purifiée du SARS-CoV-2 et de F836 à 100 µM. Les complexes formés ont été analysés par western blot.

Protéine détectée	Fournisseur	Dilution	Espèce
CypA	Abcam	1/2000 <sup>ème</sup>	Lapin (polyclonal)
N HCoV-229E	Ingenasa	1/2500 <sup>ème</sup>	Souris (monoclonal)
N SARS-CoV-2	Thermo Fischer	1/2500 <sup>ème</sup>	Souris (monoclonal)

Tableau 2 : anticorps primaires utilisés

Espèce reconnue	Fournisseur	Dilution	Espèce
Lapin	Thermo Fischer	1/10000 <sup>ème</sup>	Chèvre
Souris	Thermo Fischer	1/10000 <sup>ème</sup>	Chèvre

Tableau 3 : anticorps secondaires utilisés

# Résultats

## I) Les Flaviviridae

### A) Caractérisation de l'activité anti-VHC du composé C31 et évaluation de son spectre antiviral sur les virus de la famille des *flaviviridae*

Characterization of the Anti-Hepatitis C Virus Activity of New Nonpeptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with the Potential for Broad Anti-Flaviviridae Activity  
Quentin Nevers, Isaac Ruiz, Nazim Ahnou, Flora Donati, Rozenn Brillet, **Laurent Softic**, Maxime Chazal, Nolwenn Jouvenet, Slim Fourati, Camille Baudesson, Patrice Bruscella, Muriel Gelin, Jean-François Guichou, Jean-Michel Pawlotsky, Abdelhakim Ahmed-Belkacem

Nous avons précédemment, au moyen d'une approche de FBDD (fragment based drugs design) conçu de manière rationnelle une nouvelle famille d'inhibiteurs de cyclophilines non peptidiques (SMCypI) sans lien structural avec la CsA ([Ahmed-Belkacem et al. 2016](#)). Le composé C31 est le composé le plus efficace pour inhiber l'activité enzymatique de la cyclophiline A avec une  $IC_{50}$  de  $0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$  (**Supplementary Table 1**).

La présente étude vise à caractériser l'activité anti-HCV du C31, à élucider son mécanisme moléculaire anti-VHC et à évaluer son potentiel antiviral contre d'autres virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*.

Le composé C31 inhibe la réplication de l'ARN des réplicons sous-génomiques du VHC de génotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4a et 5a avec une  $EC_{50}$  comprise entre  $1,20 \pm 0,83 \mu\text{M}$  et  $7,76 \pm 1,57 \mu\text{M}$  (**Table 1**). Le C31 inhibe également la réplication virale dans les modèles infectieux J6/JFH1 de génotype 2a/2a et DBN-3acc de génotype 3a

**(Table 1 ; Supplementary Figure 1).** Ces résultats démontrent que le composé C31 possède une activité antivirale pan-génotypique contre le VHC.

Les modélisations moléculaires des composés C31 et de la CsA en complexe avec la cyclophiline A révèlent que leurs sites de fixation sont en partie recouvrant. Ce modèle a été confirmé grâce à des expériences de FRET montrant que le C31 était capable de déplacer la CsA de son site de fixation de manière dose-dépendante avec un Kd de 0,105 $\mu$ M (**Figure 1**).

L'inhibition de l'activité enzymatique de la CypA et l'activité antivirale des SMCypl sont fortement corrélées avec un coefficient de Pearson R= 0,96 et un p < 0.0001 (**Figure 1**).

Nous avons ensuite montré que le composé C31 inhibait l'interaction entre la protéine virale NS5A et la cyclophiline A de manière dose dépendante. Le C31 bloquait également l'interaction entre la cyclophiline A et la protéine NS5A portant la substitution amino-acidique D320E précédemment décrite pour conférer une résistance à la CsA et ses dérivés non-immunosuppresseurs (**Figure 2**).

Le C31 était efficace en combinaison avec le ledipasvir (LDV), un inhibiteur de NS5A en développement clinique et demeurait également efficace contre des variants viraux résistants au LDV (**Figure 3**).

Le C31 possédait une forte barrière à l'apparition de la résistance. Parmi les 8 mutations observées dans la région codant NS5A, 5 étaient localisées dans le domaine II de la protéine. Toutes les mutations observées ont été réintroduites dans un réplicon sous-génomique sauvage. Seules deux mutations, D320E et Y321H conféraient une faible résistance au C31 (entre 2 et 5 fois d'augmentation de l'EC<sub>50</sub>). Ces deux mutations ont été précédemment décrites pour conférer la résistance à la CsA et ses dérivés non-immunosuppresseurs (**Table 2 et Figure 4**).

Pour finir l'activité antivirale du composé C31 a été évaluée contre plusieurs virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Le composé C31 inhibait de manière dose dépendante la répllication des virus DENV, YFV et ZIKV avec des EC<sub>50</sub> respectives

de  $7,3 \pm 3,5 \mu\text{M}$ ,  $27,2 \pm 4,7 \mu\text{M}$  et  $48 \pm 5,6 \mu\text{M}$ . Le C31 n'inhibait que faiblement la réplication du WNV (**Figure 5**).

Cette étude a donc permis de montrer que le C31 possède une activité pan-génotypique contre le VHC à l'instar de la cyclosporine A et de l'alisporivir. Il a également été montré que le C31 pouvait potentiellement être administré en combinaison avec des DAA pour limiter l'apparition de résistance associée à ces molécules. De manière intéressante, Le C31 possédait également un potentiel antiviral à large spectre contre les virus de la famille des *Flaviviridae*.



## Characterization of the Anti-Hepatitis C Virus Activity of New Nonpeptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with the Potential for Broad Anti-*Flaviviridae* Activity

Quentin Nevers,<sup>a</sup> Isaac Ruiz,<sup>a</sup> Nazim Ahnou,<sup>a,b</sup> Flora Donati,<sup>a,b</sup> Rozenn Brillet,<sup>a</sup> Laurent Softic,<sup>a</sup> Maxime Chazal,<sup>c</sup> Nolwenn Jouvenet,<sup>c</sup> Slim Fourati,<sup>a,b</sup> Camille Baudesson,<sup>a</sup> Patrice Bruscella,<sup>a</sup> Muriel Gelin,<sup>d</sup> Jean-François Guichou,<sup>d</sup> Jean-Michel Pawlotsky,<sup>a,c</sup> Abdelhakim Ahmed-Belkacem<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955 Team 18, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

<sup>b</sup>National Reference Center for Viral Hepatitis B, C, and D, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

<sup>c</sup>Unité Génomique Virale et Vaccination, CNRS UMR 3569, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>d</sup>Centre de Biochimie Structurale, INSERM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

**ABSTRACT** Although members of the *Flaviviridae* display high incidence, morbidity, and mortality rates, the development of specific antiviral drugs for each virus is unlikely. Cyclophilins, a family of host peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPlases), play a pivotal role in the life cycles of many viruses and therefore represent an attractive target for broad-spectrum antiviral development. We report here the pangenotypic anti-hepatitis C virus (HCV) activity of a small-molecule cyclophilin inhibitor (SMCypI). Mechanistic and modeling studies revealed that the SMCypI bound to cyclophilin A in competition with cyclosporine (CsA), inhibited its PPlase activity, and disrupted the CypA-nonstructural protein 5A (NS5A) interaction. Resistance selection showed that the lead SMCypI hardly selected amino acid substitutions conferring low-level or no resistance *in vitro*. Interestingly, the SMCypI selected D320E and Y321H substitutions, located in domain II of the NS5A protein. These substitutions were previously associated with low-level resistance to cyclophilin inhibitors such as alisporivir. Finally, the SMCypI inhibited the replication of other members of the *Flaviviridae* family with higher 50% effective concentrations (EC<sub>50</sub>s) than for HCV. Thus, because of its chemical plasticity and simplicity of synthesis, our new family of SMCypIs represents a promising new class of drugs with the potential for broad-spectrum anti-*Flaviviridae* activity as well as an invaluable tool to explore the role of cyclophilins in viral life cycles.

**KEYWORDS** cyclophilin inhibitors, *Flaviviridae*, antiviral agents, broad-spectrum antiviral activity, hepatitis C virus, resistance, small molecule

Urbanization, human migrations, and climate changes facilitate the emergence or reemergence of a large number of viruses causing unexpected illnesses and epidemics, while the capacity to identify and control emerging diseases is limited in poorer regions where many of them have their origin (1). Among emerging and reemerging viruses, members of the *Flaviviridae* family represent a global public health issue. The *Flaviviridae* family consists of four genera (*Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus*, and *Pestivirus*), which include viruses responsible for important animal and human diseases, such as yellow fever virus (YFV), Zika virus (ZIKV), Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV), hepatitis C virus (HCV), and dengue virus (DENV). YFV, ZIKV, JEV, WNV, and DENV are leading causes of arthropod-borne human diseases worldwide. According to the World Health Organization (WHO), they globally infect 400 million

Received 24 January 2018 Returned for modification 19 February 2018 Accepted 19 April 2018

Accepted manuscript posted online 14 May 2018

**Citation** Nevers Q, Ruiz I, Ahnou N, Donati F, Brillet R, Softic L, Chazal M, Jouvenet N, Fourati S, Baudesson C, Bruscella P, Gelin M, Guichou J-F, Pawlotsky J-M, Ahmed-Belkacem A. 2018. Characterization of the anti-hepatitis C virus activity of new nonpeptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with the potential for broad anti-*Flaviviridae* activity. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00126-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-18>.

**Copyright** © 2018 Nevers et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Abdelhakim Ahmed-Belkacem, [hakim.ahmed-belkacem@inserm.fr](mailto:hakim.ahmed-belkacem@inserm.fr).

Q.N. and I.R. contributed equally to this work; J.-M.P. and A.A.-B. contributed equally to this work.

individuals each year, causing approximately 80,000 deaths each year. HCV is a blood-borne *Hepacivirus* responsible for chronic liver diseases causing approximately 700,000 deaths annually (2). Approximately 71 million individuals are infected worldwide, representing 1% of the global population (3). The recent approval of a large number of direct-acting antiviral agents (DAAs) that are active against HCV, including generic compounds, has revolutionized the treatment of this infection, with more than 95% rates of infection cure (4). In contrast, no antiviral drugs are available so far to cure infections caused by arthropod-borne members of the *Flaviviridae* family, despite their global public health importance.

During the past 10 years, two different types of antiviral agents, including DAAs and host-targeting antiviral (HTA) agents, have been developed for the treatment of HCV infection. Among the HTAs, nonimmunosuppressive derivatives of cyclosporine (CsA) that target host cyclophilins (Cyps) yielded the most promising results. Alisporivir (ALV) was the first HTA to enter HCV clinical development and reach phase III clinical trials (5, 6). Its development was halted following the report of seven cases of acute pancreatitis, including a lethal one (7). These events were independent from Cyp inhibition, most likely due to ALV-induced hypertriglyceridemia that potentiated the pancreatic toxicity of interferon alpha that was part of the combination regimens. Although the cyclophilin inhibitors (CypIs) failed to reach the market for the indication of hepatitis C treatment, they remain attractive to combat other viral infections (8–11). Indeed, CypIs have been reported to be involved in the life cycles of viruses other than HCV (12) while having a high barrier to resistance, broad antiviral activity, and possibly additive or synergistic effects with other antiviral compounds in various models.

Cyps are peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPlases) that catalyze the interconversion of the two energetically preferred conformers (*cis* and *trans*) of the planar peptide bond preceding an internal proline residue. Seventeen human Cyps have been identified, but more may exist. Cyps have been convincingly shown to play a pivotal role in the life cycles of a large number of viruses from different families (12). However, there are few data available regarding the anti-*Flaviviridae* activity of CypIs, all of which were obtained with CsA and ALV (9, 13–15). The molecular mechanisms of the anti-HCV activity of CypIs are not yet fully understood. It is believed that they exert their antiviral effect by disrupting the CypA-nonstructural protein 5A (NS5A) interaction that regulates multiple phases of HCV replication (16, 17).

We previously reported our rational design of a new family of small-molecule, nonpeptidic CypIs (SMCypIs) unrelated to CsA by means of a complex fragment-based drug discovery approach (18). Our SMCypIs displayed antiviral effectiveness not only against HCV but also against HIV and coronaviruses, suggesting, together with data reported in the literature, that they could act as broad-spectrum antiviral agents, effective against a number of different viruses from different virus families. The present study aims at characterizing the anti-HCV activity of the new family of SMCypIs, unraveling their molecular antiviral mechanism, and evaluating their spectrum of anti-*Flaviviridae* activity.

(This work was presented as an oral communication at HCV2016, the 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, Japan, 11 to 15 October 2016.)

## RESULTS

**C31 has pangenotype anti-HCV activity.** The anti-HCV activity of the new SMCypI compound 31 (C31), our most potent inhibitor of Cyp PPlase activity, was tested in different HCV genotype models containing luciferase reporter genes, including an infectious chimeric J6/JFH1 (genotype 2a/2a) virus; genotype 1a, 1b, 2a, 3a, and 5a HCV subgenomic replicons (HCV-SGRs); and a chimeric 2a/4a HCV-SGR containing a genotype 4a NS5A sequence (see Fig. S1 in the supplemental material). In addition, the anti-HCV activity of C31 was evaluated in the recently developed full-length infectious HCV genotype 3a model (DBN-3acc) (19). ALV and CsA were used as controls in all experiments.

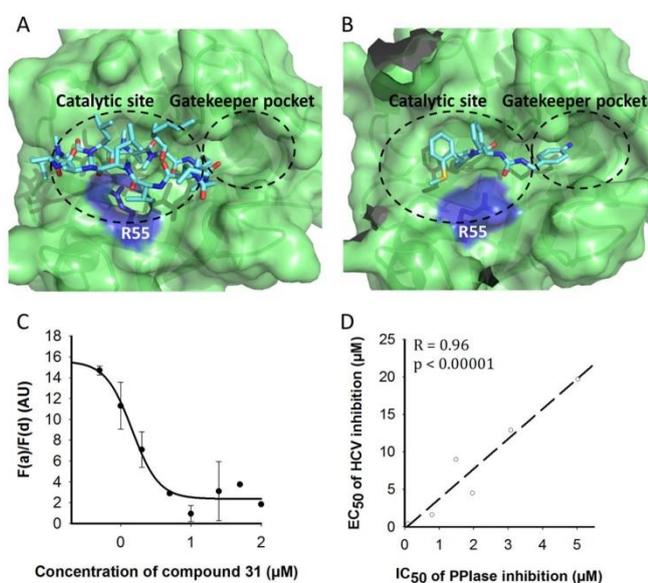
**TABLE 1** Activities of C31, ALV, and CsA against HCV replication

Compound	Mean EC <sub>50</sub> (μM) ± SD <sup>a</sup>						Infectious J6/JFH1 HCV genotype 2a/2a
	HCV-SGR						
	Genotype 1a	Genotype 1b	Genotype 2a	Genotype 3a	Genotype 2a/4a	Genotype 5a	
C31	3.80 ± 1.90	2.95 ± 0.60	2.30 ± 1.20	7.76 ± 1.57	1.40 ± 1.10	1.20 ± 0.83	2.80 ± 0.40
ALV	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.002
CsA	0.60 ± 0.20	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.12	0.04 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.06 ± 0.01

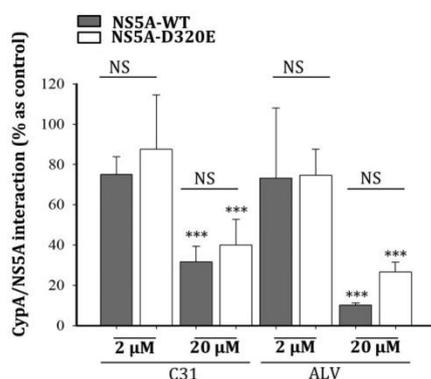
<sup>a</sup>The data are shown as means ± SD of results from three independent experiments.

C31 equally inhibited the replication of genotype 1a, 1b, 2a, 3a, and 5a HCV-SGRs and chimeric genotype 2a/4a HCV-SGRs, with 50% effective concentrations (EC<sub>50</sub>s) ranging from 1.20 ± 0.83 to 7.76 ± 1.57 μM (Table 1). C31 also inhibited the replication of the infectious J6/JFH1 virus, with a comparable EC<sub>50</sub> of 2.80 ± 0.40 μM. Finally, C31 inhibited DBN-3acc RNA replication in a dose-dependent manner, with a maximal 244-fold HCV RNA reduction at 10 μM (Fig. S3). C31 did not affect cell viability at its effective concentration (Fig. S2). Altogether, these results demonstrate the pangeno-type activity of the new SMCypI.

**C31 anti-HCV activity is related to its binding to CypA and inhibition of CypA PPlase activity.** To understand the molecular mechanism of the anti-HCV action of our new SMCypI, the CypA binding modes of C31 and CsA were modeled (Fig. 1A and B,



**FIG 1** Molecular modeling of the interaction of C31 and CsA with CypA, competition between C31 and CsA for CypA binding, and the relationship between the anti-PPlase activity of the SMCypIs in an enzyme assay and their anti-HCV activity against a genotype 1b HCV-SGR. (A and B) Surface representations of CypA in complex with CsA (A) and C31 (B) showing occupation of the catalytic site and the gatekeeper pocket. The side chain of Arg55 is represented in stick format and highlighted in purple. (C) Competition between C31 and CsA for CypA binding, assessed by a TR-FRET assay. The graphs represent the FRET emission ratios measured in the presence of increasing concentrations of C31. Unlabeled CsA and ALV were used as internal controls. The data are shown as means ± SD of results from three independent experiments. AU, arbitrary units. (D) Graph representing the relationship between the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in a CypA PPlase enzyme assay and the EC<sub>50</sub> in a genotype 1b HCV-SGR assay of 6 SMCypIs related to C31 (listed in Table S1 in the supplemental material). The Pearson correlation coefficient (*R*) and *P* value are shown on the graph.



**FIG 2** Disruption of the CypA-NS5A interaction by the cyclophilin inhibitors. The interaction between NS5A-Rluc and CypA-6His was assessed by means of a protein-protein interaction assay with Ni-NTA magnetic beads. After loading of CypA-6His, the beads were incubated with a lysate of Huh7.5 cells expressing WT-NS5A-Rluc (A) or NS5A-D320E-Rluc (B) and two concentrations of C31 and ALV. After washing, CypA-6His-interacting proteins were eluted with imidazole. The NS5A-Rluc activity was measured in the eluate. Huh7.5 cells expressing Rluc were used as a negative interaction control. The data are shown as means  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments. NS, not significant; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

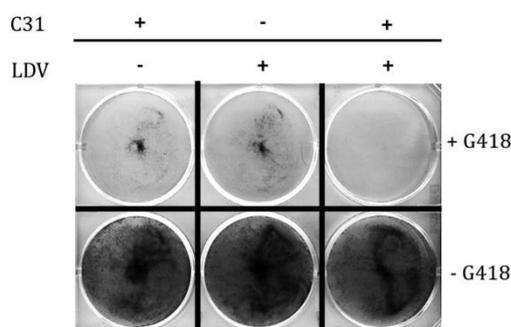
respectively). As shown in Fig. 1B, the structure of CypA in complex with C31 revealed its expected dual binding in the “hydrophobic pocket,” the CypA PPlase active site, on the one hand and the “gatekeeper pocket” on the other hand (18, 20). Interestingly, the methoxy group of compound 31 pushes Arg55 to create a hydrogen bond with the urea moiety of the compound.

The CypA binding sites of C31 and CsA were partially overlapping, suggesting competitive binding to CypA. Thus, time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) was used to assess whether C31 competes with CsA for binding to purified CypA. Both nonlabeled CsA and ALV displaced labeled CsA from its CypA binding site, with  $K_d$  (dissociation constant) values of 8.4 and  $<5$  nM, respectively (data not shown). As shown in Fig. 1C, C31 also displaced labeled CsA, with a  $K_d$  value of 105 nM, confirming competition with CsA binding to CypA.

Finally, we assessed whether the anti-HCV effect of the SMCypls was related to their ability to inhibit CypA PPlase enzyme activity. For this, the anti-HCV activities of 6 different chemically related SMCypls listed in Table S1 in the supplemental material, including C31, were determined with a genotype 1b HCV-SGR and plotted against their respective inhibitory activities in a PPlase enzyme assay. As shown in Fig. 1D, the anti-HCV activity of the SMCypls was strongly correlated with their ability to inhibit PPlase activity, with a Pearson correlation coefficient of 0.96 and a  $P$  value of  $<0.0001$ .

Altogether, these results demonstrate that our new family of SMCypls inhibits HCV replication by binding to both the PPlase catalytic pocket and the gatekeeper pocket of CypA, thus blocking its PPlase catalytic activity.

**C31 disrupts the CypA-NS5A interaction.** Because CypA has been shown to play an important role in the HCV life cycle through its interaction with the NS5A protein, we measured the effect of C31 on the NS5A-CypA interaction. Purified CypA tagged with a polyhistidine sequence (CypA-6His) was bound to Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) magnetic beads. A cell lysate containing wild-type NS5A (WT-NS5A) or the NS5A D320E mutant (NS5A-D320E) fused with the *Renilla* luciferase (NS5A-Rluc) was incubated with CypA-loaded magnetic beads in the presence or absence of C31 and of ALV, used as a control. After washing and elution with imidazole, the luciferase activity corresponding to NS5A-Rluc-CypA-6His interacting complexes was measured. As shown in Fig. 2, the CypA-NS5A interaction was disrupted by both ALV and C31 in a dose-dependent



**FIG 3** Studies of the combination of C31 (2.5  $\mu$ M) and LDV (10 pM) in a genotype 1a HCV-SGR in Huh7.5 cells. Huh7.5 cells stably expressing a genotype 1a HCV-SGR were cultured through 5 passages in the presence of C31 (2.5  $\mu$ M), LDV (10 pM), or both drugs, in the presence (top) or in the absence (bottom) of G418. The cells were stained with crystal violet.

manner. The same result was observed with NS5A-D320E. Together, these results indicate that SMCypIs disrupt the interaction between CypA and the HCV NS5A protein through their binding to CypA.

**C31 exerts at least additive antiviral effects when combined with the NS5A inhibitor ledipasvir and is fully active against ledipasvir-resistant viruses.** A study of the combination of C31 with the NS5A inhibitor ledipasvir (LDV) was performed with Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1a HCV-SGR. As shown in Fig. 3, under G418 selective pressure, the combination of C31 and LDV at their respective  $EC_{50}$ s of 2.5  $\mu$ M and 10 pM was more effective in curing cells of the replicons than each compound alone at the same concentrations, suggesting at least an additive effect of C31 and LDV in combination. In addition, a genotype 1b HCV-SGR, containing the L31V and Y93H substitutions, which confer high-level resistance to ledipasvir (714-fold increase in the LDV  $EC_{50}$  [data not shown]), remained fully sensitive to C31 and ALV (Table 2).

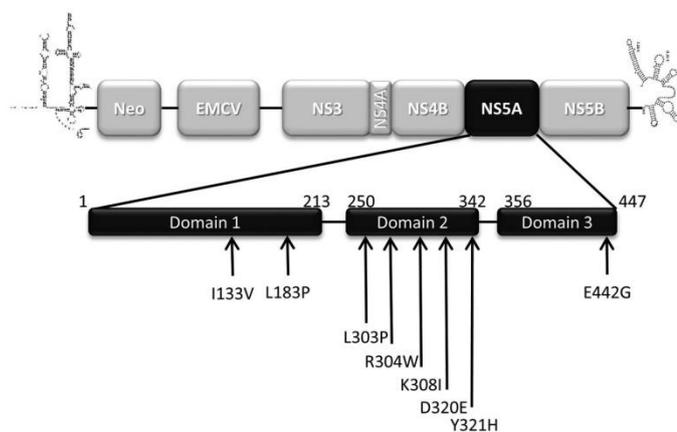
Together, these results suggest that our new SMCypI family has at least additive effects with HCV DAAs targeting domain I of the NS5A protein, without cross-resistance.

**C31 hardly selects amino acid substitutions conferring low-level or no resistance *in vitro*.** Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR containing the neomycin resistance gene were grown under G418 selective pressure in the absence or presence of increasing doses (1  $\mu$ M to 50  $\mu$ M) of C31. Two cellular clones growing in the presence of C31 were selected after 100 days. Because CsA and its nonimmunosuppressive derivatives were shown to select amino acid substitutions in the NS5A

**TABLE 2** C31, ALV, and CsA susceptibility and replication capacity of a wild-type genotype 1b HCV-SGR and effect of introduction of amino acid substitutions selected by serial C31 passages at increasing concentrations<sup>a</sup>

Virus	C31		ALV		CsA		Mean replication capacity (%) $\pm$ SD
	Mean $EC_{50}$ ( $\mu$ M) $\pm$ SD	Fold change	Mean $EC_{50}$ ( $\mu$ M) $\pm$ SD	Fold change	Mean $EC_{50}$ ( $\mu$ M) $\pm$ SD	Fold change	
WT	2.95 $\pm$ 0.60	1.0	0.03 $\pm$ 0.01	1.0	0.17 $\pm$ 0.02	1.0	100
I133V	2.75 $\pm$ 0.20	0.9	0.02 $\pm$ 0.001	0.9	0.21 $\pm$ 0.04	1.2	110 $\pm$ 23
L183P	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2 $\pm$ 1
L303P	3.05 $\pm$ 0.40	1.0	0.04 $\pm$ 0.01	1.3	0.23 $\pm$ 0.04	1.4	57 $\pm$ 7
R304W	2.47 $\pm$ 0.20	0.8	0.03 $\pm$ 0.004	1.1	0.21 $\pm$ 0.004	1.2	91 $\pm$ 4
K308I	2.59 $\pm$ 0.20	0.9	0.04 $\pm$ 0.004	1.3	0.17 $\pm$ 0.03	1.0	103 $\pm$ 3
D320E	8.73 $\pm$ 1.10	3.0	0.12 $\pm$ 0.05	4.4	0.51 $\pm$ 0.04	3.0	82 $\pm$ 16
Y321H	5.41 $\pm$ 0.40	1.8	0.06 $\pm$ 0.02	2.2	0.41 $\pm$ 0.02	2.4	79 $\pm$ 22
E442G	2.99 $\pm$ 0.70	1.0	0.03 $\pm$ 0.004	1.1	0.24 $\pm$ 0.07	1.4	74 $\pm$ 5
L31V/Y93H	1.20 $\pm$ 0.10	0.8	0.01 $\pm$ 0.001	0.5	ND	ND	92 $\pm$ 4

<sup>a</sup>The data are shown as means  $\pm$  SD of results from three independent experiments. NA, not available, due to the lack of replication of the mutated HCV-SGR; ND, not done.



**FIG 4** Amino acid changes selected by serial C31 passages at increasing concentrations in a genotype 1b HCV-SGR. Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR were cultured in medium containing 1.5 mg/ml of G418 in the presence of increasing doses of C31 until resistant clones were selected. Total RNAs of two resistant clones were extracted, and the NS5A-coding region was sequenced. The amino acid changes observed in the sequences of the NS5A regions spanning domains I to III are shown. Neo, neomycin.

region of the HCV genome (21–23), the NS5A-coding region of the two C31-resistant clones was sequenced. Compared to the baseline, 8 amino acid changes were identified, including I133V and L183P in domain I; L303P, R304W, K308I, D320E, and Y321H in domain II; and E442G in domain III of the NS5A protein (Fig. 4). The NS5B-coding region was also sequenced, and only the I585L change was observed (data not shown).

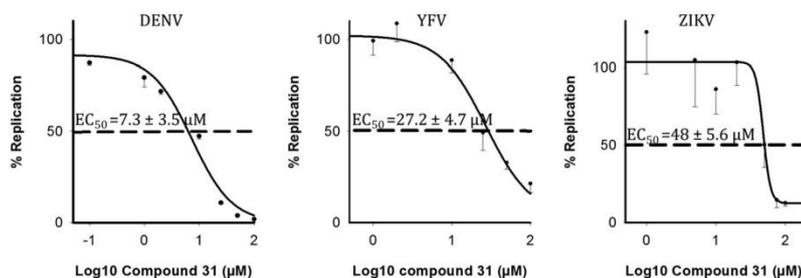
Each of the 8 amino acid substitutions selected was introduced into a WT transient genotype 1b HCV-SGR for phenotypic analysis (compound susceptibility and replication capacity) in the presence of C31, ALV, and CsA (Table 2). Among them, only the D320E and Y321H mutations were associated with a mild increase in the C31  $EC_{50}$  (~2- to 5-fold), without an impairment of the replicon replication capacity. L183P, located in NS5A domain I, drastically reduced the corresponding HCV-SGR replication capacity, so its impact on compound susceptibility could not be evaluated. Thus, only D320E and Y321H in domain II of the NS5A protein, which were selected by serial passages at increasing concentrations of C31, conferred low-level resistance to the SMCypl, as described above for CsA and ALV.

**C31 inhibits the replication of other members of the *Flaviviridae* family.** We assessed whether C31 could exert antiviral activities against other members of the *Flaviviridae* family. Viral replication was assessed by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) at 48 h postinfection. Dose-dependent decreases of viral replication were observed in the presence of C31 for DENV ( $EC_{50}$ ,  $7.3 \pm 3.5 \mu\text{M}$ ), YFV ( $EC_{50}$ ,  $27.2 \pm 4.7 \mu\text{M}$ ), and ZIKV ( $EC_{50}$ ,  $48.0 \pm 5.6 \mu\text{M}$ ), with a 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) of  $\geq 100 \mu\text{M}$  (Fig. 5). C31 was more potent against HCV and DENV than against YFV and ZIKV.

Although C31 is not more potent against all *Flaviviridae* than against HCV, this compound represents a good candidate for further chemical optimizations.

## DISCUSSION

Anti-HCV drug research highlighted the antiviral potential of Cyp inhibition through the clinical development of nonimmunosuppressive derivatives of CsA. Unfortunately, all Cypls in development for HCV were structurally related, and the only compound that reached late-phase clinical development, ALV, was halted due to severe adverse effects unrelated to Cyp inhibition. We recently reported our use of a complex fragment-based



**FIG 5** *In vitro* activity of C31 against three flaviviruses. Shown are dose-dependent curves of antiviral activity against DENV, ZIKV, and YFV. Viral replication was assessed by RT-qPCR at 48 h postinfection. Relative replication was expressed as a percentage of the value for the untreated control and plotted against the log<sub>10</sub> concentration of C31. The EC<sub>50</sub>s are shown on the graph and are represented by a dashed line. Data shown are means ± SD of results from at least two independent experiments performed in triplicate.

drug discovery approach using nucleic magnetic resonance, X-ray crystallography, and structure-based compound optimization to generate a new family of nonpeptidic, small-molecule cyclophilin inhibitors (SMCypls) unrelated to CsA, with broad cyclophilin *in vitro* PPIase-inhibitory activity and antiviral activity against HCV, HIV, and coronaviruses (18).

Although ALV has been shown to potently inhibit HCV replication, its ability to block the replication of other members of the *Flaviviridae* family is unknown. The immunosuppressive agent CsA has been reported to bear antiviral activity against DENV-2, WNV, and YFV (15), with less potency against WNV. Results regarding the susceptibility of ZIKV to CsA are limited and contradictory (24). This sparseness of data prompted us to assess the anti-*Flaviviridae* activity of our new SMCypl. Here, we showed that C31, a SMCypl inhibitor of PPIase activity with anti-HCV activity *in vitro*, also inhibits the replication of several members of the *Flaviviridae* family in cell culture models. C31 was most effective against HCV and DENV replication, with EC<sub>50</sub>s in the low-micromolar range. C31 inhibited YFV and ZIKV replication to a lesser extent, with EC<sub>50</sub>s in the micromolar range. Although the EC<sub>50</sub> was above 50 µM, the highest concentration tested, a trend toward a decrease of viral replication was also observed with WNV (data not shown). In contrast, no effect of C31 against JEV replication has been observed in our experiments (data not shown). To our knowledge, C31 is the first SMCypl with the potential for broad anti-*Flaviviridae* activity. Given the chemical plasticity and simplicity of synthesis of this new family of SMCypls, a large number of new compounds will be synthesized in the future. It is thus likely that C31 derivatives with greater effectiveness against different members of the *Flaviviridae* family will be generated.

The susceptibility of *Flaviviridae* family members to SMCypls suggests that cyclophilins play a pivotal role in their life cycles. However, the different antiviral potencies of C31 across different viruses from the *Flaviviridae* family raise the question of whether there is a similar or a different mechanism of inhibition. Our SMCypls provide a unique, easy-to-use tool to explore this role. In the present study, we used C31 to decipher the role of cyclophilins in the HCV life cycle and understand the mechanisms of its inhibition by the inhibitors. Our results complement previous results generated with CsA or ALV in various models (21–23, 25–27).

We showed here that, like ALV (23, 26, 27), our family of SMCypls has pangentotypic anti-HCV activity (EC<sub>50</sub>s in the low-micromolar range for genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 4a, and 5a), a high barrier to the selection of resistant viruses, and at least additive effects in combination with HCV DAAs. It was demonstrated previously that CypA PPIase activity is required for HCV replication (28, 29). Our library of SMCypls (see Table S1 in the supplemental material) provides us with a unique, thus-far-missing pharmacological tool to dissect the molecular mechanisms of Cyp-virus interactions and of the antiviral effects of Cyp inhibition. The library of SMCypls proved to be particularly useful

to discriminate PPlase-dependent antiviral activity from effects related to other functional roles of the Cyps. Using several SMCypl derivatives with different potencies of inhibition of PPlase catalytic activity, we showed that the antiviral activity of the SMCypls strongly correlates with their PPlase-inhibitory potency, confirming that Cyp PPlase activity is required for HCV replication.

It was shown previously that CypA interacts directly with the HCV NS5A protein to regulate key processes of the HCV life cycle (17, 28, 30). Disruption of this key interaction by CsA or ALV impairs HCV replication, possibly explaining the anti-HCV effect of these compounds (27, 31). Whether similar mechanisms could be involved with other families of Cyp inhibitors remained unknown. We showed that the NS5A-CypA interaction was disrupted by C31. We also modeled the CypA binding modes of C31 and CsA. As expected, their superimposition suggested that both compounds shared a partially overlapping binding site. This result was confirmed by means of a TR-FRET assay, which showed that C31 displaces CsA from the CypA catalytic site. Interestingly, we also observed that the aniline moiety of C31 was deeply buried in a pocket contiguous to the canonical catalytic site, the gatekeeper pocket, which is out of reach for CsA, suggesting that the modes of inhibition of CsA and SMCypls may partially differ. This could explain why CsA and ALV did not inhibit ZIKV replication in this study, whereas C31 did, possibly through a PPlase-independent mechanism different from that involved in HCV inhibition (data not shown).

Resistance experiments performed with ALV and CsA selected amino acid substitutions essentially clustering in domain II of the HCV NS5A protein, also suggesting that NS5A is the main viral partner of CypA (27). The D320E and Y321H mutations, both of which are located in NS5A domain II, have been reported to confer low-level resistance to CsA and its nonimmunosuppressive derivatives (22, 27, 32).

However, NS5A mutant proteins harboring the D320E substitution keep their capacity to interact with CypA *in vitro*, and this interaction remains fully sensitive to ALV disruption (27). In our experiments, 100 days have been necessary to select two cellular clones growing in the presence of 50  $\mu$ M C31 under the selective pressure of G418. The maximum selective pressure obtained with C31 (17-fold) was in keeping with data reported previously for ALV and CsA (65-fold and 10-fold, respectively) (27). These results confirmed the high barrier of resistance of SMCypls.

Among the 8 amino acid changes identified in these clones, only D320E and Y321H in domain II of the NS5A protein were associated with a modest increase in the C31 EC<sub>50</sub> (~2- to 5-fold), without an impairment of the replicon replication capacity. The interaction of NS5A-D320E with CypA remained fully sensitive to C31 disruption. Altogether, these findings confirm that the mode of antiviral action of our SMCypls is identical to that of CsA and its derivatives.

The fact that SMCypls do not target a viral function but instead target a host protein involved in a key step of the virus life cycle suggested that they could bear additive or synergistic properties in combination with DAAs. We confirmed this hypothesis by combining C31 with the potent HCV NS5A inhibitor ledipasvir. Both drugs together were more efficient in curing cells of HCV-SGR than each drug alone, suggesting at least an additive effect. In addition, C31 remained efficient against an HCV-SGR harboring amino acid substitutions known to confer high-level resistance to LDV.

In conclusion, our new family of SMCypls presumably exhibits broad-spectrum antiviral properties against several members of the *Flaviviridae* family that represent important public health problems worldwide and remain without any therapeutic option. Their mechanism of antiviral action against one of these viruses, HCV, is related to Cyp binding, the inhibition of PPlase catalytic activity, and a disruption of the CypA-NS5A interaction, a mechanism common to other cyclophilin inhibitors derived from CsA. Nonimmunosuppressive analogues of CsA suffer from serious caveats, including their large size, resulting in poor cell permeability; their side effects unrelated to cyclophilin inhibition; their drug-drug interactions; and manufacturing issues. Thus, because of their chemical plasticity, low cellular toxicity, and simplicity of synthesis, our new family of SMCypls represents a promising new class of drugs with broad-spectrum

anti-*Flaviviridae* properties as well as an invaluable tool to explore the role of cyclophilins in virus life cycles and the mechanisms to block them.

## MATERIALS AND METHODS

**Drugs.** Alisporivir (ALV) and ledipasvir (LDV) were purchased from AGV Discovery (Clapiers, France), while cyclosporine (CsA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**Compound synthesis.** SMCypl compound synthesis is described in Text S1 supplemental material. Chemical reagents were obtained from Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA), Acros Organics (Geel, Belgium), abcr GmbH (Karlsruhe, Germany), acbblocks (Toronto, Canada), and Chembridge (San Diego, CA) and used without further purification.

**HCV-SGR plasmids.** Plasmids H77/SG-Feo, S52/SG-Feo, and SA1/SG-Feo, which contain a firefly luciferase reporter gene and a genotype 1a, 3a, or 5a HCV subgenome, respectively, were kindly provided by Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, NY) (33, 34). Plasmid p1071-N5SA(Ni)-S22041 contains a firefly luciferase reporter gene and a genotype 1b HCV subgenome (Con1 strain) with an N5SA cassette from the genotype 1b HCV-N strain (35). Plasmids APP76-Con1-SG-Neo(-)-hRluc2aUb and APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo, which contain a *Renilla* luciferase reporter gene and genotype 1b and 2a HCV subgenomes, respectively, were purchased from Apath LLC (New York, NY, USA). Plasmid I389-Neo/NS3-3'/5.1, which contains the neomycin resistance gene and an HCV genotype 1b subgenome, was used for resistance selection experiments and was kindly provided by Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) (36). Plasmid DBN3acc, which contains a full-length HCV genotype 3a genome, was kindly provided by Jens Bukh (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark) (19). Finally, chimeric plasmid fdRocco-chimeric2a/4aN5SA, consisting of a genotype 4a N5SA sequence inserted into a genotype 2a HCV subgenome from APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo, was developed in our laboratory.

**Cell cultures.** Human hepatoma Huh7 cells (kindly provided by Eliane Meurs) and Huh7.5 cells (Apath LLC) were cultured in complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.1 µg/ml amphotericin B (Thermo Fisher Scientific).

**Assessment of antiviral activity in HCV-SGR models.** For transient HCV-SGR models, plasmids p1071-N5SA(Ni)-S22041, APP40-J6/JFH1EMCVIRES-aRlucNeo, and fdRocco-chimeric2a/4aN5SA were linearized with XhoI, XbaI, and XbaI, respectively (FastDigest; Thermo Fisher Scientific) and *in vitro* transcribed by using a MEGAScript T7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Next, approximately  $1.5 \times 10^4$  Huh7.5 cells were transfected with 250 ng of HCV-SGR RNA using the trans-IT mRNA transfection kit (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA). Four hours after transfection, compounds were added to the culture medium. Luciferase activity was monitored at 96, 48, and 72 h posttransfection for genotype 1b, genotype 2a, and chimeric genotype 2a/4a HCV-SGRs, respectively.

Huh7.5 cells stably harboring genotype 1a, 3a, and 5a HCV-SGRs were cultured in the presence of the compounds for 48 h before luciferase activity measurement. Plots were fitted with a four-parameter logistic curve with SigmaPlot v11 software (Systat Software, Inc.), and the  $EC_{50}$ s were determined from the curves.

**Assessment of antiviral activity in the infectious HCV model.** Huh7.5 cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells and incubated 24 h before infection with 250 µl of cell-culture-derived infectious HCV (HCVcc) (J6/JFH1 strain, genotype 2a/2a) in the presence of increasing concentrations of the compounds. Eight hours after infection, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with fresh medium containing the inhibitors for 72 h. The luciferase activity was then measured and plotted against compound concentrations. The  $EC_{50}$ s were determined from curves fitted with a four-parameter logistic equation.

**Assessment of the combination of compound 31 and ledipasvir.** Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1a HCV-SGR were cultured in the presence of 10 pM LDV, 2.5 µM C31, or both drugs at the same concentrations, in the absence or presence of 500 µg/ml of G418. After 5 passages, the remaining living cells were stained with crystal violet.

**Selection of clones resistant to compound 31.** Huh7.5 cells stably harboring a genotype 1b HCV-SGR replicon that confers cell resistance to G418 were used for selection experiments. The cells were cultured in the presence of escalating doses of C31 (1 to 50 µM) and of 1.5 mg/ml of G418 until colonies growing in the presence of C31 appeared. Two resistant colonies were isolated after several passages, and total RNA was extracted with the RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific). The N5SA-coding region was amplified at baseline and in the resistant colonies by PCR using forward oligonucleotides 5'-GTG CAG TGG ATG AAY CGG CTG ATA GC-3', 5'-TTC CAR GAC TCT ARC ART G-3', 5'-ACT ATG TGC CTG AGA GCG ACG-3', and 5'-GGR TTG TAR TCC GGS CGY GCC CAT A-3' and reverse oligonucleotides 5'-TCC CRT GYG AGC CYG AAC CG-3', 5'-GTG GTG ACG CAG CAA AGA GT-3', 5'-CCC ACA TTA CAG CAG AGA CGG C-3', and 5'-TTG ATG GGC AGC TTG GT-3'.

**Phenotypic characterization of amino acid substitutions selected by compound 31.** Candidate resistance-associated substitutions (RASs) were introduced into a wild-type genotype 1b HCV-SGR containing the luciferase reporter gene by means of site-directed mutagenesis (QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ninety-six hours after RNA transfection, the susceptibility of the RAS-containing HCV-SGR to compound 31 was determined by measurement of luciferase activity and comparison to wild-type HCV-SGR susceptibility. The replication capacity of the RAS-containing HCV-SGR was assessed by comparing luciferase activities at 4 h and 96 h posttransfection and expressed as a percentage of the wild-type replication capacity.

**Phenotypic characterization of amino acid substitutions selected by ledipasvir.** The L31V and Y93H RASs, which confer high-level resistance to LDV (37), were introduced into the NS5A-coding region of the APP76-Con1-SG-Neo-(I)-hRluc2aUb plasmid by means of site-directed mutagenesis. After linearization with Scal and *in vitro* transcription, the genotype 1b HCV-SGR was transfected into Huh7.5 cells. The cells were cultured in the presence of the compounds for 84 h, and luciferase activity was measured. The susceptibility of HCV-SGR(L31V/Y93H) to C31, ALV, and LDV was then compared to that of the wild-type HCV-SGR.

**Competitive binding assay.** A 96-well-plate-based TR-FRET (time-resolved fluorescence energy transfer) assay (Selcia, Ongar, UK) was used to determine competitive CypA binding of C31 and CsA. Briefly, CypA was tagged with a polyhistidine sequence (6His) and formed a complex with an anti-6His antibody labeled with a fluorescent donor, F(d), while CsA was tagged with a fluorescent acceptor, F(a). C31 was added to the master mix containing the CypA-antibody-CsA complex, with a final concentration of detergent of 0.01%. After 30 min of incubation at room temperature, the plate was read on a SpectraMax M5 instrument (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 2 wavelengths to detect F(d) and F(a) emissions. The F(a)/F(d) ratio was calculated, and the values were plotted against the inhibitor concentration in log<sub>10</sub> molar and fitted by using one-site K<sub>i</sub> nonlinear regression to determine the K<sub>i</sub>. Nonlabeled CsA and ALV were used as controls.

**Protein-protein interaction assay.** An NS5A-Rluc-CypA-6His *in vitro* interaction assay was developed to measure the efficiency of CypI disruption of the NS5A-CypA interaction by luminescence measurement.

After PCR amplification with primers 5'-AAA AAC TGC AGA TGT CCG GCT CGT GGC T-3' and 5'-AAA AAC CGC GGG CAG CAG ACG ACG TCC-3' and digestion with PstI and SacII (FastDigest; Thermo Fischer Scientific), the genotype 1b NS5A-coding sequence was cloned in fusion with the *Renilla* luciferase into a pRluc-N3(h) plasmid (catalogue number 6310009; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). NS5A-D320E was generated by site-directed mutagenesis with oligonucleotides 5'-ATG GGC ACG CCC GGA ATA CAA CCC TCC ACT G-3' and 5'-CAG TGG AGG GTT GTA TTC CGG GCG TGC CCA T-3' and cloned similarly to WT-NS5A. Huh7.5 cells were then transfected with the pRluc-N-NS5A plasmid. Forty-eight hours later, cells were lysed with 4 thaw-freeze cycles and incubated for 30 min at room temperature with 500 µg of Ni-NTA magnetic beads preloaded with 30 µg of purified CypA in equilibration buffer (10 mM imidazole and 0.05% Tween 20 in PBS). Increasing concentrations of CypI were added during incubation. The beads were then washed 3 times with washing buffer (20 mM imidazole and 0.05% Tween 20 in PBS), and elution was performed with 400 mM imidazole for 15 min at room temperature. *Renilla* luciferase activity in eluates was measured with a *Renilla* luciferase assay system (Promega). Results are presented as means ± standard deviations (SD) of data from at least three independent experiments. All analyses were two sided and considered significant when the *P* value was <0.05.

**Molecular modeling and docking of C31 into CypA.** Molecular modeling and docking experiments were performed by using the @TOME-2 server (38), which integrates an original interface for comparative docking of small molecules detected in the Protein Data Bank (PDB) file of each template. The search for homologous sequences and alignments was performed by using the @TOME-2 server and the CypD sequence (NCBI accession number P30405), with a 75% identity. In each structural model, the active-site boundaries were deduced from the vicinity of the cocrystallized ligands (compound 32 [C32], C34, C35, and C36 were selected as the templates, with the PDB accession numbers 4J59, 4J5C, 4J5B, and 4J5E, respectively) by using the @TOME-2 comparative option. In addition, the same chemical entities were used to define a shape restraint to guide docking in the automatically computed models. The files for the ligands were generated with MarvinSketch 6.2.2 for SMILES and with the Frog2 server for mol2 (39). Figure 1A and B were generated by using PyMOL.

**Assessment of the anti-Flaviviridae activity of compound 31.** Huh7 cells were infected for 48 h with YFV strain Dakar HD 1279 (obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses [WRCEVA], TX, USA) at a multiplicity of infection (MOI) of 7, for 48 h with DENV-4 strain Dominica 814669 (obtained from the Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) at an MOI of 10, or for 1 h with ZIKV strain MR766 (obtained from the ATCC) at an MOI of 1. Infections were performed in the presence of different concentrations of C31.

For DENV and YFV experiments, total RNA was extracted from cell cultures with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNA synthesis was performed with RevertAid H Minus Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase. Quantitative real-time PCR was performed on a real-time PCR system (QuantStudio 6 Flex; Applied Biosystems) with SYBR green PCR master mix (Life Technologies). The data were analyzed with the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, with values for all samples normalized to the value for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). All experiments were performed in triplicate. Genome-equivalent concentrations were determined by extrapolation from a standard curve generated from serial dilutions of the plasmid encoding a subgenomic YFV replicon. The sequences of the 17D-NS3 primers used for RT-qPCR are as follows: 5'-AGGTCCAGTTGATCGCGGC (sense) and 5'-GAGCGACAGCCCCGATTCT (antisense). The sequences of the pan-DENV primers are as follows: 5'-TTGAGTAAACRYTGCTGCTGTAGCTC (sense) and 5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC (antisense).

For ZIKV experiments, total RNA was extracted from cell cultures with the SV96 total RNA isolation system (Promega). Reverse transcription was performed with the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed on a real-time PCR system (Applied Biosystems 7300 system) with TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems), and the data were normalized to the value for GAPDH. The sequences of the primers used are as follows: 5'-ATATCGGACATGGCTTCGGA (sense) and 5'-GTCTTTTGACAGACATATTGAGTG (antisense).

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed by using SigmaPlot software. Statistics were calculated by using the *t* test analysis of variance. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-18>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.4 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Q.N. received a predoctoral fellowship grant from the French Ministry for Research. I.R. received predoctoral fellowship grants from the National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) and the Mexican National Council on Science and Technology (CONACYT). This work was partly supported by French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) grant ANR-10-INBS-05.

We are grateful to Nathalie Pardigon (Institut Pasteur, France), Cécile Khou (Institut Pasteur, France), and Justine Basset (Institut Pasteur, France) for their help with WNV and JEV experiments. We are grateful to Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, NY, USA), Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany), Jens Bukh (University of Copenhagen, Denmark), and Takaji Wakita (National Institute for Infectious Diseases, Tokyo, Japan) for kindly providing plasmids.

Q.N. and I.R. participated in the design of the study, performed part of the experiments, and wrote the article; N.A., F.D., R.B., L.S., M.C., N.J., M.G., C.B., P.B., J.-F.G., and S.F. performed part of the experiments; and A.A.-B. and J.-M.P. designed the study, wrote the article, and led the project. All authors approved the manuscript.

INSERM Transfert is the owner of patent EP 09306294.1 covering the family of cyclophilin inhibitors described, for which J.-F.G., A.A.-B., and J.-M.P. are inventors. All other authors declare no competing financial interests.

#### REFERENCES

- De Clercq E, Li G. 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev* 29:695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Assadi R, Bhala N, Cowie B, Forouzanfar MH, Groeger J, Hanafiah KM, Jacobsen KH, James SL, Maclachlan J, Malekzadeh R, Martin NK, Mokdad AA, Mokdad AH, Murray CJL, Plass D, Rana S, Rein DB, Richardus JH, Sanabria J, Saylan M, Shahrzaz S, So S, Vlassov VV, Weiderpass E, Wiersma ST, Younis M, Yu C, El Sayed Zaki M, Cooke GS. 2016. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 388:1081–1088. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30579-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30579-7).
- World Health Organization. 2017. Global hepatitis report, 2017. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Pawlotsky JM. 2016. Hepatitis C drugs: is next generation the last generation? *Gastroenterology* 151:587–590. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.043>.
- Flisiak R, Horban A, Gallay P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska-Drapalo A, Siwak E, Cielniak I, Higersberger J, Kierkus J, Aeschlimann C, Grosgrun P, Nicolas-Metral V, Dumont JM, Porchet H, Crabbe R, Scalfaro P. 2008. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47:817–826. <https://doi.org/10.1002/hep.22131>.
- Pawlotsky JM. 2015. Viral entry inhibition: too late for hepatitis C, but promising for other viral infections. *Gut* 64:362–364. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307452>.
- Zeuzem S, Flisiak R, Vierling JM, Mazur W, Mazzella G, Thongsawat S, Abdurakhmanov D, Van Kinh N, Calistru P, Heo J, Stanciu C, Gould M, Makara M, Hsu SJ, Buggisch P, Samuel D, Mutimer D, Nault B, Merz M, Bao W, Griffel LH, Brass C, Naoumov NV. 2015. Randomised clinical trial: alisporivir combined with peginterferon and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype 1 infection (ESSENTIAL II). *Aliment Pharmacol Ther* 42:829–844. <https://doi.org/10.1111/apt.13342>.
- de Wilde AH, Li Y, van der Meer Y, Vuagniaux G, Lysek R, Fang Y, Snijder EJ, van Hemert MJ. 2013. Cyclophilin inhibitors block arterivirus replication by interfering with viral RNA synthesis. *J Virol* 87:1454–1464. <https://doi.org/10.1128/JVI.02078-12>.
- Chiramel AI, Banadyga L, Dougherty JD, Falzarano D, Martellaro C, Brees D, Taylor RT, Ebihara H, Best SM. 2016. Alisporivir has limited antiviral effects against Ebola virus strains Makona and Mayinga. *J Infect Dis* 214:S355–S359. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw241>.
- de Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, Posthuma CC, Feldmann H, Perlman S, Snijder EJ. 2017. Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model. *Virus Res* 228:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.011>.
- Burse M, Shi J, Aiken C. 2017. Cyclophilin A potentiates TRIM5alpha inhibition of HIV-1 nuclear import without promoting TRIM5alpha binding to the viral capsid. *PLoS One* 12:e0182298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182298>.
- Hopkins S, Gallay PA. 2015. The role of immunophilins in viral infection. *Biochim Biophys Acta* 1850:2103–2110. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.011>.
- Vidotto A, Morais AT, Ribeiro MR, Pacca CC, Terzian AC, Gil LH, Mohana-Borges R, Gallay P, Nogueira ML. 2017. Systems biology reveals NS4B-cyclophilin A interaction: a new target to inhibit YFV replication. *J Proteome Res* 16:1542–1555. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00933>.
- Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. 2011. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology* 412:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.011>.
- Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY. 2009. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3226–3235. <https://doi.org/10.1128/AAC.00189-09>.
- Lin K, Gallay P. 2013. Curing a viral infection by targeting the host: the

- example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res* 99:68–77. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.020>.
17. Chatterji U, Bobardt M, Tai A, Wood M, Galloway PA. 2015. Cyclophilin and NS5A inhibitors, but not other anti-hepatitis C virus (HCV) agents, preclude HCV-mediated formation of double-membrane-vesicle viral factories. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2496–2507. <https://doi.org/10.1128/AAC.04958-14>.
  18. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Cala O, Douguet D, Bourguet W, Krimm I, Pawlotsky JM, Guichou JF. 2016. Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat Commun* 7:12777. <https://doi.org/10.1038/ncomms12777>.
  19. Ramirez S, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J. 2016. Robust HCV genotype 3a infectious cell culture system permits identification of escape variants with resistance to sofosbuvir. *Gastroenterology* 151:973.e2–985.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.013>.
  20. Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Uuyang H, Lee WH, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S. 2010. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8:e1000439. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000439>.
  21. Fernandes F, Poole DS, Hoover S, Middleton R, Andrei AC, Gerstner J, Striker R. 2007. Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology* 46:1026–1033. <https://doi.org/10.1002/hep.21809>.
  22. Yang F, Robotham JM, Grise H, Frausto S, Madan V, Zayas M, Bartenschlager R, Robinson M, Greenstein AE, Nag A, Logan TM, Bienkiewicz E, Tang H. 2010. A major determinant of cyclophilin dependence and cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus identified by a genetic approach. *PLoS Pathog* 6:e1001118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001118>.
  23. Coelmont L, Kaptein S, Paeshuyse J, Vliegen I, Dumont JM, Vuagniaux G, Neyts J. 2009. Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 53:967–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.00939-08>.
  24. Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, Prasanth KR, Schott-Lerner G, Soto-Acosta R, Galarza-Munoz G, McGrath EL, Urrabaz-Garza R, Gao J, Wu P, Menon R, Saade G, Fernandez-Salas I, Rossi SL, Vasilakis N, Routh A, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. 2016. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 20:259–270. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.004>.
  25. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38:1282–1288. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50449>.
  26. Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43:761–770. <https://doi.org/10.1002/hep.21102>.
  27. Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, Vandamme AM, Bartenschlager R, Galloway P, Lippens G, Neyts J. 2010. DEB025 (aliposporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 5:e13687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013687>.
  28. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, Vuagniaux G, Parkinson T, Galloway P. 2009. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 284:16998–17005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007625>.
  29. Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R. 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5:e1000546. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000546>.
  30. Azhar El, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 370:2499–2505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401505>.
  31. Fernandes F, Ansari IU, Striker R. 2010. Cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A. *PLoS One* 5:e9815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009815>.
  32. Chatterji U, Bobardt MD, Lim P, Galloway PA. 2010. Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *J Gen Virol* 91:1189–1193. <https://doi.org/10.1099/vir.0.018531-0>.
  33. Saeed M, Scheel TK, Gottwein JM, Marukian S, Dustin LB, Bukh J, Rice CM. 2012. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5365–5373. <https://doi.org/10.1128/AAC.01256-12>.
  34. Wose Kinge CN, Espiritu C, Prabdial-Sing N, Sithebe NP, Saeed M, Rice CM. 2014. Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5386–5394. <https://doi.org/10.1128/AAC.03534-14>.
  35. Maqbool MA, Imache MR, Higgs MR, Carmouse S, Pawlotsky JM, Lerat H. 2013. Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes. *J Virol* 87:5523–5539. <https://doi.org/10.1128/JVI.00585-12>.
  36. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110–113. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110>.
  37. Kwon HJ, Xing W, Chan K, Niedziela-Majka A, Brendza KM, Kirschberg T, Kato D, Link JO, Cheng G, Liu X, Sakowicz R. 2015. Direct binding of ledipasvir to HCV NS5A: mechanism of resistance to an HCV antiviral agent. *PLoS One* 10:e0122844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122844>.
  38. Pons JL, Labesse G. 2009. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res* 37:W485–W491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp368>.
  39. Miteva MA, Guyon F, Tuffery P. 2010. Frog2: efficient 3D conformation ensemble generator for small compounds. *Nucleic Acids Res* 38:W622–W627. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq325>.

## B) Caractérisation de l'activité anti-Zika des SMCypl

Les résultats obtenus lors de notre précédente étude suggéraient que le C31 possède une activité antivirale contre le virus Zika. Néanmoins, son efficacité semblait plus limitée. L'objectif de cette seconde étude était donc d'améliorer l'efficacité antivirale des SMCypl contre le virus Zika.

### 1) Crible des SMCypl et Relation de Structure Activité

Les SMCypl sont des petites molécules non peptidiques constituées de 3 domaines fonctionnels comme illustré ci-dessous avec le C31 : la partie R1 qui se fixe dans la poche catalytique (en bleu), la partie R2 qui se fixe dans la poche gardienne (en rouge) et la partie R3 située à l'interface entre ces deux poches (en jaune) (**Figure 1**).

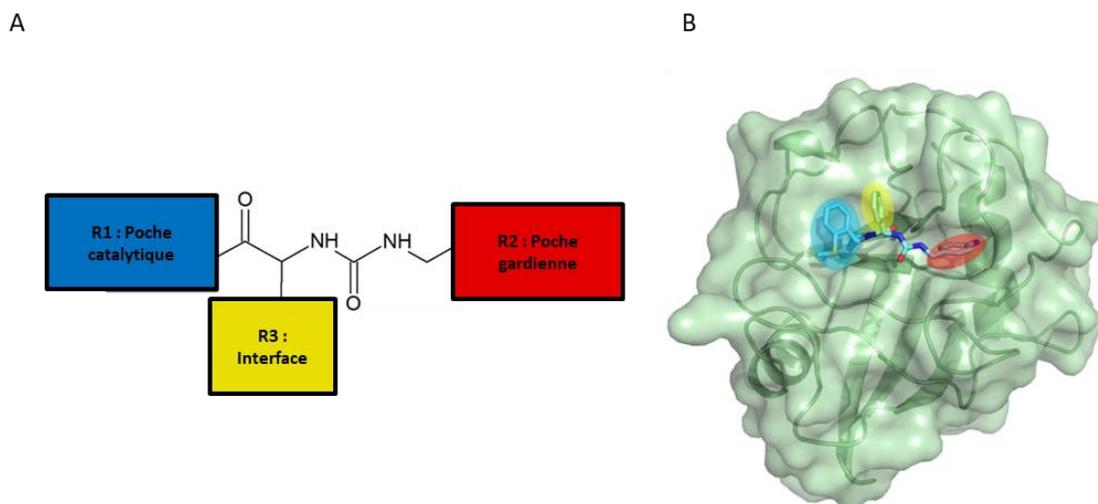


Figure 1 : A) Représentation de la structure des SMCypl et B) Structure cristallographique de la CypA en complexe avec le composé C31.

Chacune de ces trois parties du composé peut être modifiée individuellement. Cette grande plasticité nous a permis de synthétiser 25 SMCypl analogues au C31 qui diffèrent sur les parties R1, R2 et R3 afin de déterminer quel(s) groupement(s) chimique(s) est/sont important(s) pour l'activité anti-Zika (**Tableau 1**).

Des cellules Huh7 ont été infectées par la souche MR766 du virus Zika pendant 1h en présence de 25µM de chacun des composés puis lavées et incubées avec la même concentration de composés. La production d'ARN viral intracellulaire a été mesurée par RT-qPCR 48h post infection (**Figure 2**)

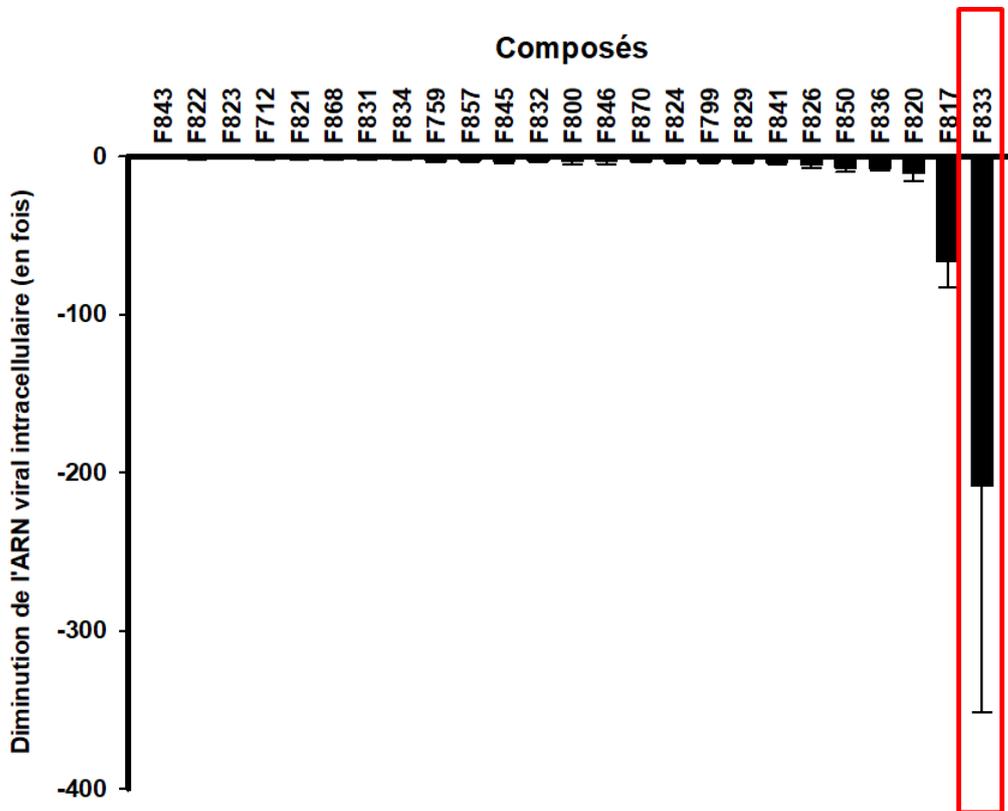
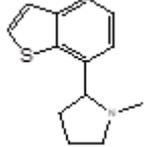
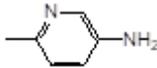
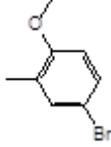
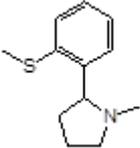
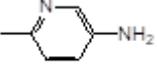
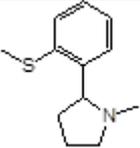
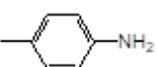
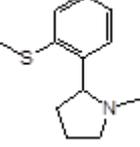
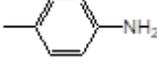
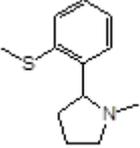
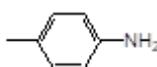
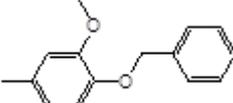
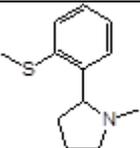
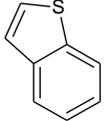
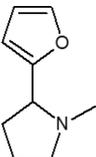
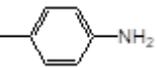
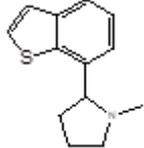
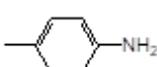
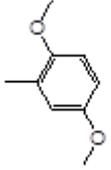
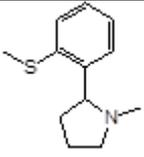
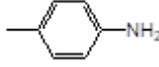
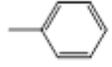
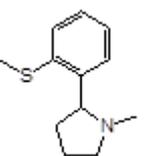
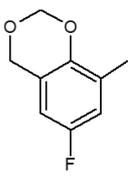
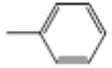
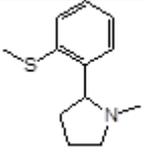
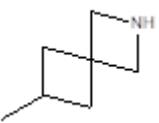
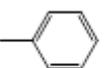
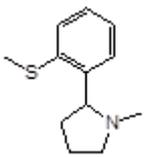
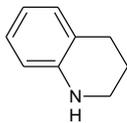
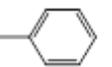
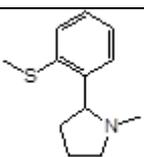
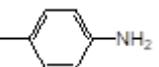
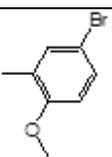
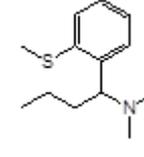
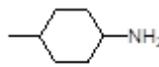
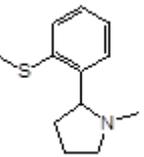
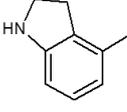
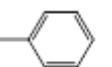
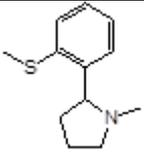
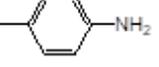
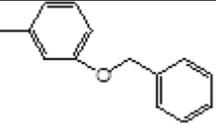
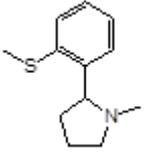
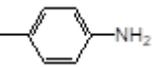
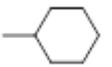


Figure 2 : Crible de 25 SMCypl à 25µM sur des cellules Huh7 après infection par la souche MR766 du virus Zika à MOI 0,1 pendant 48h

Composés	Diminution en fois de l'ARN viral intracellulaire	Inhibition de l'activité anti-PPIase de la cypA à 10 $\mu$ M (%)	R1	R2	R3
F843	1,1 $\pm$ 0,1	37 $\pm$ 3,5			
F822	1,2 $\pm$ 0,4	64 $\pm$ 3,5			
F823	1,3 $\pm$ 0,1	62 $\pm$ 2,4			
F712	1,4 $\pm$ 0,2	71 $\pm$ 1,2			
F821	1.4 $\pm$ 0,4	76 $\pm$ 2,1			
F868	1.5 $\pm$ 0,3	32 $\pm$ 4,1			
F831	1.5 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 10			
F834	1.6 $\pm$ 0,4	97 $\pm$ 1,7			

<b>F759=C31</b>	<b>2.4 ± 1,4</b>	<b>99 ± 1,5</b>			
<b>F857</b>	<b>2.5 ± 0,7</b>	<b>45 ± 14</b>			
<b>F845</b>	<b>2.6 ± 1,7</b>	<b>7 ± 1,5</b>			
<b>F832</b>	<b>2,8 ± 0,5</b>	<b>93 ± 2,0</b>			
<b>F800</b>	<b>3,1 ± 1,6</b>	<b>99 ± 3,0</b>			
<b>F846</b>	<b>3,1 ± 1,7</b>	<b>41 ± 6,6</b>			
<b>F870</b>	<b>3,1 ± 0,7</b>	<b>32 ± 15</b>			
<b>F824</b>	<b>3,2 ± 0,9</b>	<b>ND</b>			
<b>F799</b>	<b>3,3 ± 0,9</b>	<b>89 ± 1,1</b>			

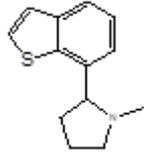
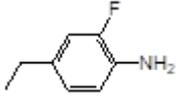
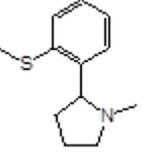
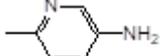
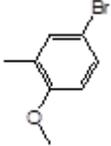
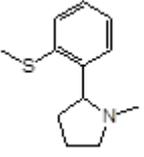
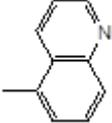
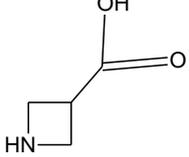
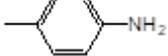
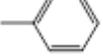
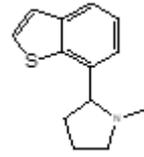
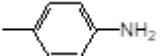
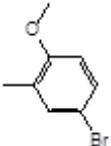
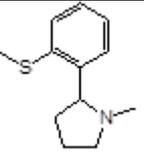
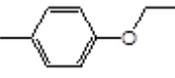
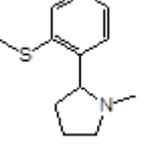
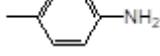
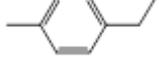
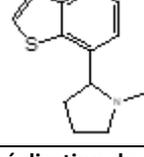
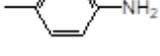
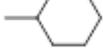
<b>F829</b>	<b>3,4 ± 1,1</b>	<b>80 ± 0,9</b>			
<b>F841</b>	<b>3,8 ± 1,1</b>	<b>69 ± 3,1</b>			
<b>F826</b>	<b>4,8 ± 2,3</b>	<b>35 ± 6,4</b>			
<b>F850</b>	<b>7,0 ± 2,8</b>	<b>ND</b>			
<b>F836</b>	<b>7,4 ± 1,4</b>	<b>99 ± 4,0</b>			
<b>F820</b>	<b>10,6 ± 4,7</b>	<b>70 ± 0,1</b>			
<b>F817</b>	<b>66,5 ± 16,2</b>	<b>79 ± 7,1</b>			
<b>F833</b>	<b>208,1 ± 143,4</b>	<b>93 ± 2,3</b>			

Tableau 1 : Tableau représentatif des composés criblés sur la réplication de la souche MR766 du virus Zika – noms des composés, activité antivirale, Inhibition de l'activité anti-PPiase de la CypA, structures des régions R1, R2 et R3. En rouge le meilleur composé

Le composé F817 et le composé F833 inhibent la réplication du virus Zika de 66,5 et 208,1 fois, respectivement.

Bien que les composés F833 et F799 ne diffèrent que par le radical R1, le composé F833 est 63 fois plus actif que le composé F799 ce qui suggère un rôle positif et montre l'importance du groupement benzothiophène par rapport au groupement thioanisole greffé sur le pyrrolidine en R1. Les composés F833, F834 et F836 possèdent les mêmes groupements chimiques en R1 et R2 mais diffèrent par leur groupement R3. Le F833 est 130 fois plus actif que le F834 et 28 fois plus actif que le F836, montrant l'importance de la présence d'un groupement cyclohexyl en R3. Cette différence d'activité entre les composés portant un cyclohexyl vs un phényl en R3 pourrait être due aux conformations différentes adoptées par ces deux cycles. En effet, les cycles aromatiques ont une structure plane alors que le cyclohexyl adopte une structure dite chaise-bateau (**Figure 3**).

La présence du phenyl pyrrolidine en R1 et d'un cyclohexyl en R3 semble être déterminante pour l'activité antivirale du composé.

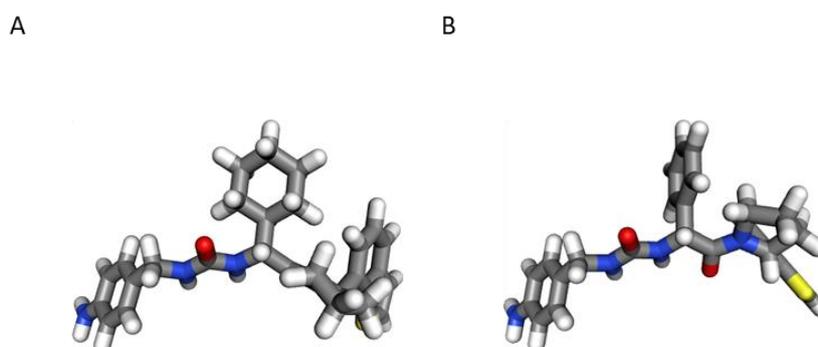


Figure 3 : A) Structure de la molécule avec le cyclohexyl en conformation chaise B) Structure de la molécule avec le phényl en conformation plan (à droite)

De façon surprenante, plusieurs composés capables d'inhiber puissamment l'activité PPIase de la cyclophiline A *in vitro* ne possèdent pas d'activité antivirale contre le virus Zika. En effet, les composés F800, F832 et F834 inhibent 99%, 93% et 97% de l'activité enzymatique de la CypA à 10 $\mu$ M mais n'entraînent qu'une diminution de 3,1, 2,8 et 1,6 fois de la production d'ARN intracellulaire du virus Zika à 25  $\mu$ M.

Cette observation montre que, à la différence du VHC, l'inhibition de l'activité enzymatique de la cyclophiline A par les SMCypl n'est pas directement corrélée à leur effet antiviral contre le virus Zika.

Pour confirmer ce résultat l'effet antiviral de la CsA et de l'Alv, deux puissants inhibiteurs de l'activité enzymatique de la cyclophiline A, a été mesuré. Ni la CsA ni l'Alv n'ont montré d'activité antivirale contre le virus Zika (**Figure 4**). L'activité antivirale des inhibiteurs de cyclophilines ne semble donc pas directement reliée à l'inhibition de l'activité enzymatique de la cyclophiline A.

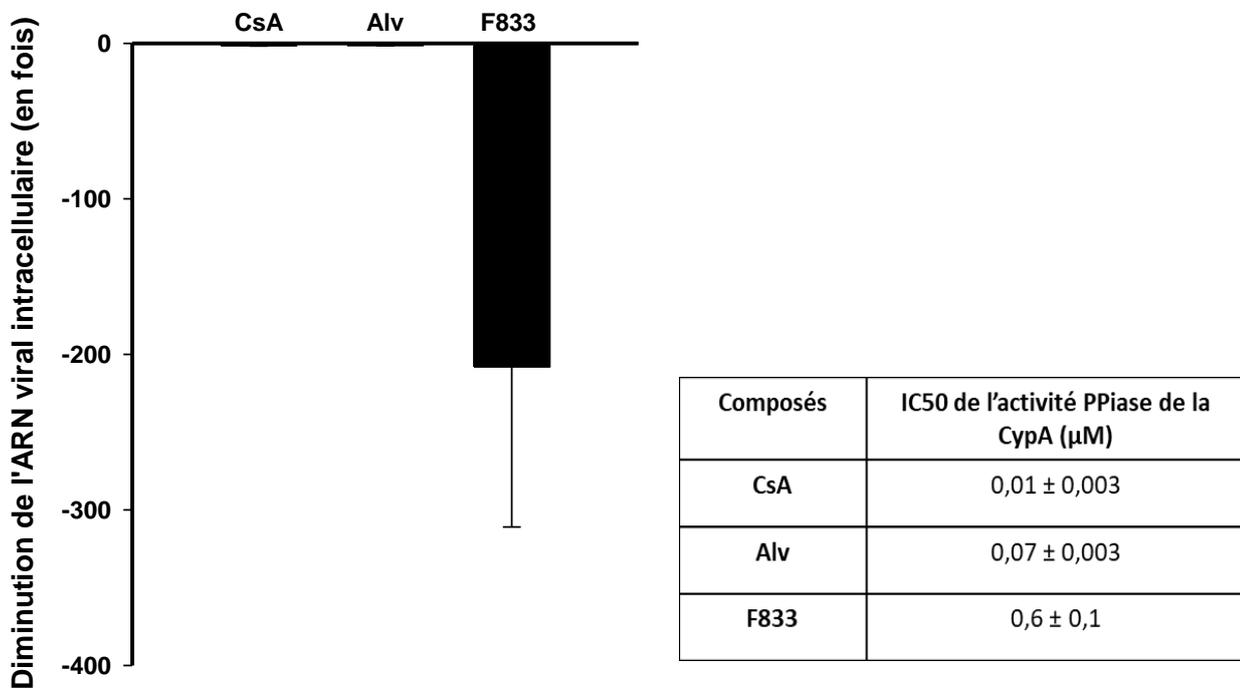


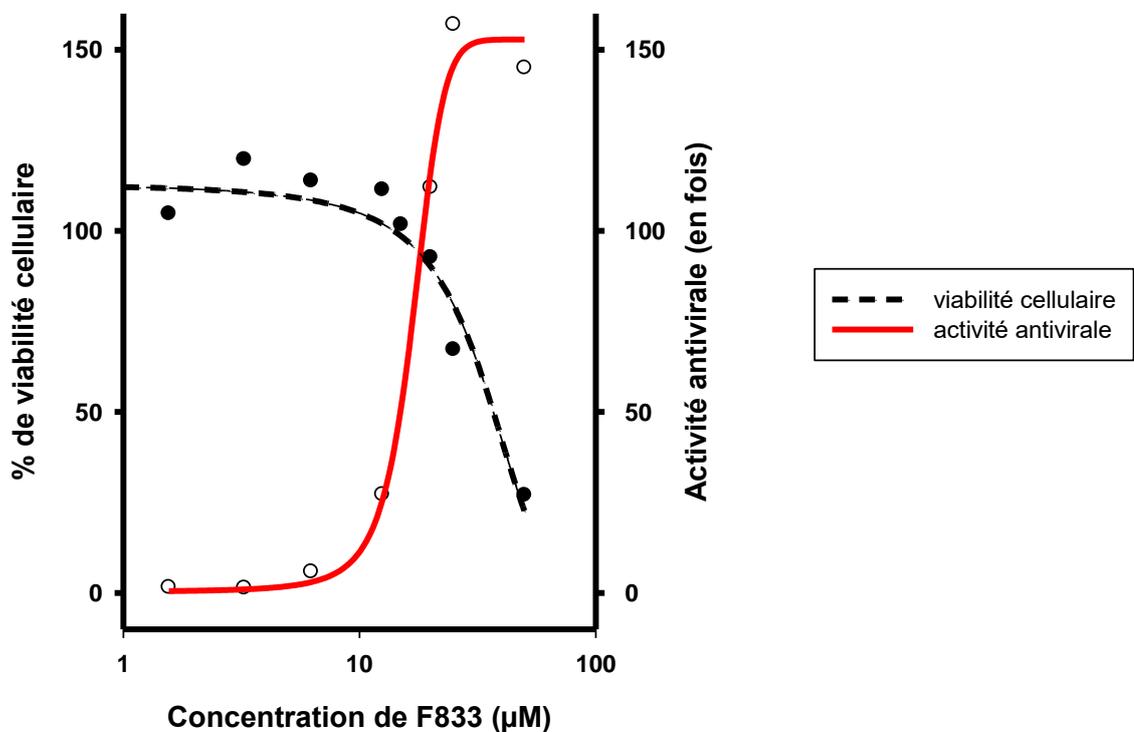
Figure 4 : Comparaison de l'activité antivirale et anti-PPIase de la CsA, l'Alv et le F833

## 2) Caractérisation de l'activité antivirale du meilleur composé, le F833

- $\text{EC}_{50}$  et cytotoxicité du composé F833

L'EC<sub>50</sub> du F833 contre la souche MR766 du virus Zika a été déterminée. Les cellules Huh7 ont été infectées en présence de concentrations croissantes du composé à tester et l'ARN viral intracellulaire du virus Zika a été quantifié par RT-qPCR 48h post-infection.

Le composé F833 inhibe la réplication du virus de manière dose-dépendante (**Figure 5**) avec une EC<sub>50</sub> (concentration qui diminue de moitié l'effet maximum) de  $14,6 \pm 2,5\mu\text{M}$ . En parallèle de cette étude un test de cytotoxicité a été effectué (**Figure 5**). La CC<sub>50</sub> du composé est évalué à  $26,1 \pm 1,2\mu\text{M}$ .

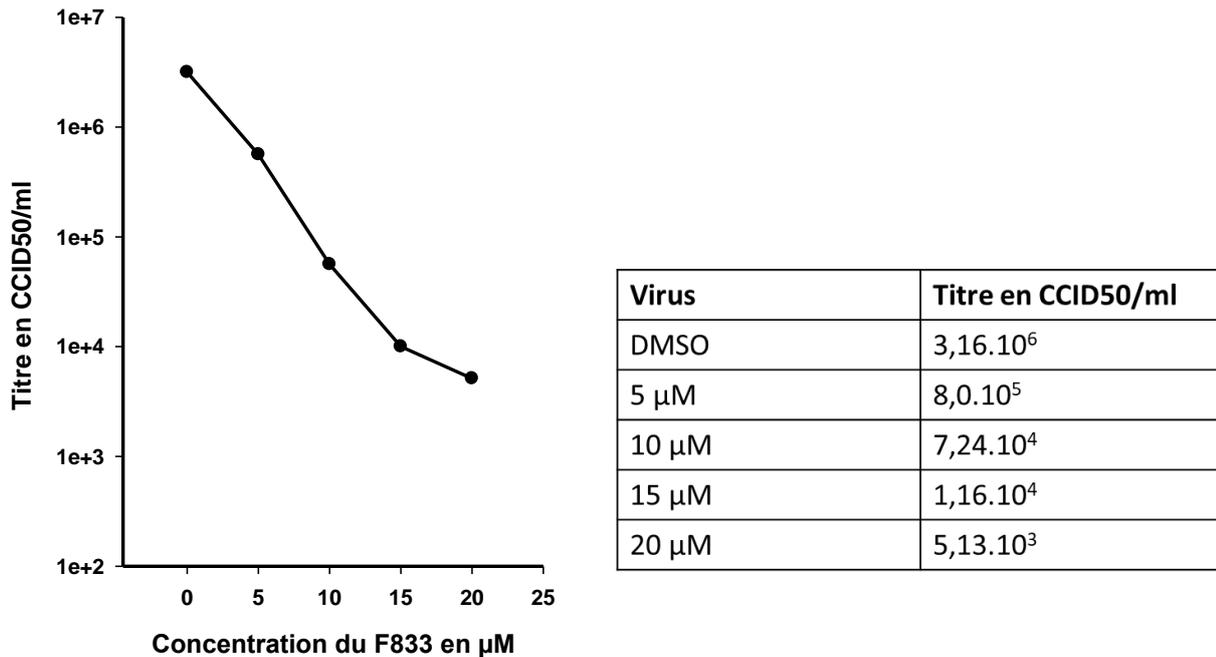


**Figure 5 : Caractérisation de l'effet antiviral du F833 et de sa toxicité** – courbe représentative de l'inhibition de la réplication (trait plein) ; courbe représentative de la viabilité cellulaire (tirets)

- Titre des virus produits en présence de composé

L'effet du composé F833 sur le titre viral a également été mesuré. Des cellules Huh7 ont été infectées par le virus Zika en présence de concentrations croissantes de composé. Les virus produits 48 heures post-infection ont été titrés par

RT-qPCR. Le composé F833 diminue de plus de 3 log le titre du virus Zika produit en présence de 20 $\mu$ M du composé en comparaison au virus produit en présence de DMSO (5,13.10<sup>3</sup> CCID<sub>50</sub>/ml pour le virus produit en présence de 20 $\mu$ M de F833 vs 3,16.10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>/ml pour le virus produit en absence de F833) (**Figure 6**)

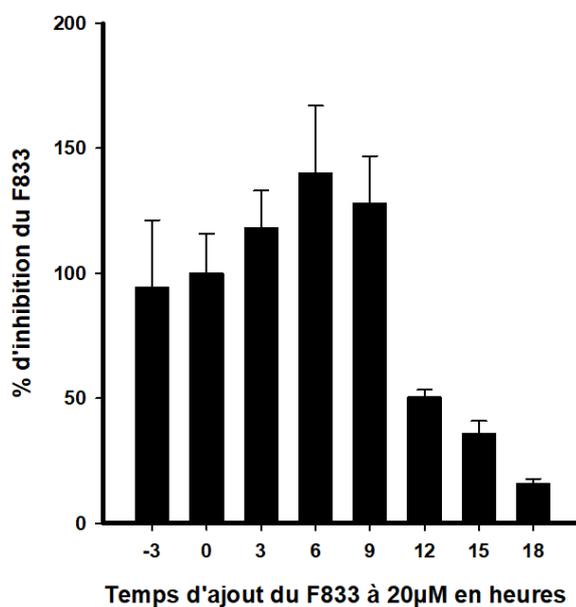
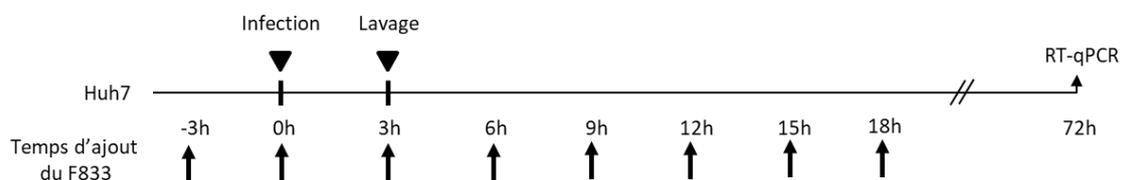


**Figure 6 : Caractérisation de l'effet du F833 sur la production virale** A) Courbe représentative du titre en CCID<sub>50</sub>/ml des virus produit en présence de concentrations croissantes de F833 B) Titre en CCID<sub>50</sub>/ml pour chacun des virus produit en absence ou présence de F833

### 3) Détermination de l'étape du cycle viral ciblée par le F833

Afin de déterminer l'étape du cycle viral ciblée par le composé F833, un test de temps d'ajout (TTA) a été réalisé. Cette expérience consiste à infecter des cellules et à ajouter le composé à différents temps pré ou post-infection (3 heures avant ou 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 heures après l'infection). Nous avons fixé à 100% l'effet du composé ajouté au temps 0. Le pourcentage d'effet de la drogue à chacun des temps a été calculé par rapport au temps 0.

La **figure 7** montre que le composé F833 perd la plus grande partie de son activité antivirale lorsqu'il est ajouté 12h après l'infection. Le F833 semble donc cibler une étape plutôt tardive du cycle viral.



**Figure 7:** « Time of addition assay » du F833 à 20µM sur cellules Huh7 après infection par la souche MR766 du virus Zika à MOI 1 pendant 48h

## II) Les Coronaviridae

### A) Crible des SMCypl à 50 $\mu$ M et Relation de Structure Activité

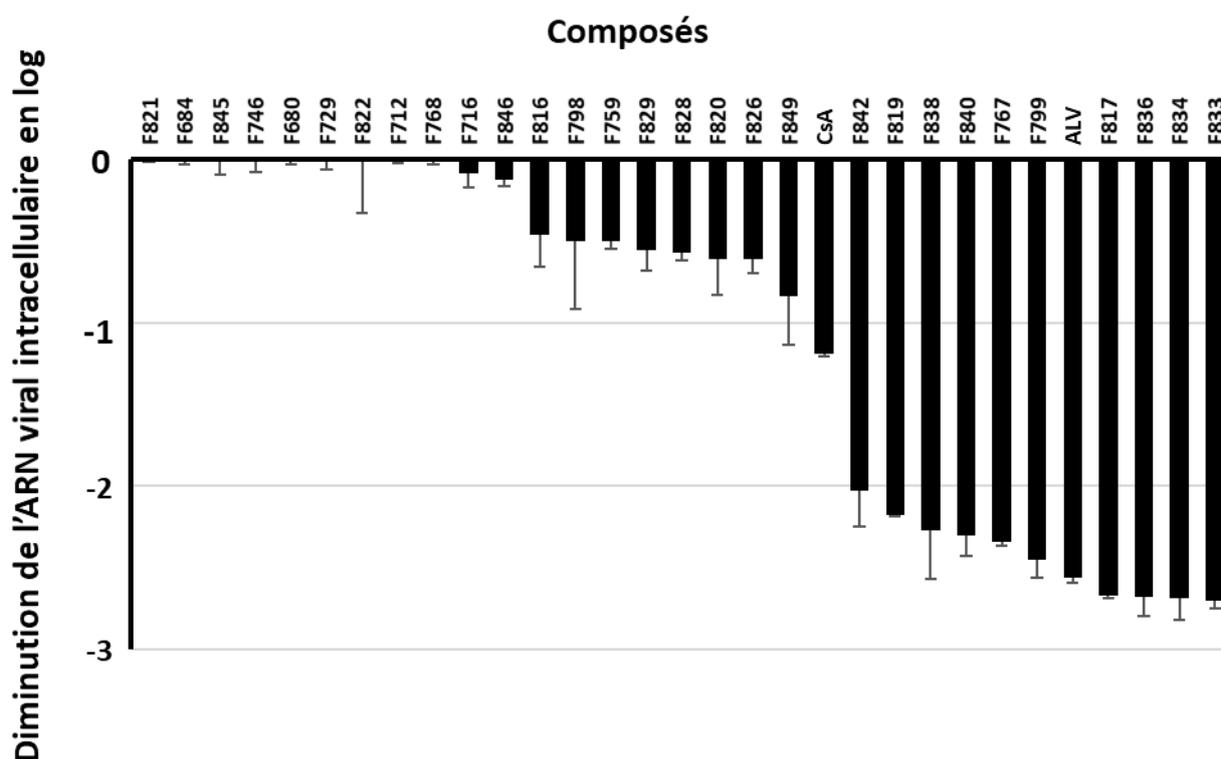


Figure 8 : Crible de 29 SMCypl, de la CsA et de l'Alv sur des cellules MRC5 après infection par le coronavirus HCoV-229E à MOI 1 pendant 72h

Nous avons effectué un crible de 29 SMCypl à la concentration de 50 $\mu$ M sur l'infection par le coronavirus HCoV-229E dans des cellules MRC5. L'ARN viral intracellulaire a été mesuré par RT-qPCR 72h post infection. Les résultats sont présentés sur la **figure 8** ci-dessus. Onze composés ne présentaient aucun effet antiviral, huit composés diminuaient la production d'ARN viral de moins de 1-log et dix composés entraînaient une décroissance de l'ARN supérieur à 2-log.

L'IC<sub>50</sub> de l'activité enzymatique de la cyclophiline A *in vitro* a également été mesurée pour 23 des SMCypl utilisés (**Tableau 2**). Parmi les 23 SMCypl testés, 14

présentaient une forte activité inhibitrice avec des  $IC_{50}$  submicromolaire et 9 SMCypl exhibaient une faible activité avec une  $IC_{50}$  supérieure à  $2\mu M$ .

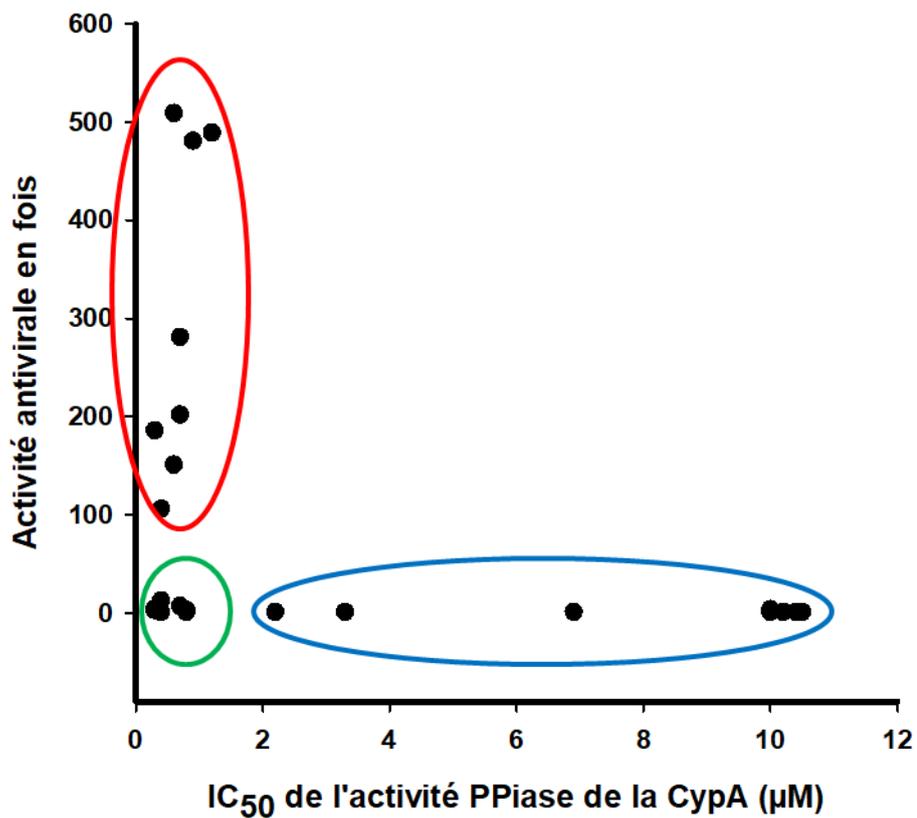


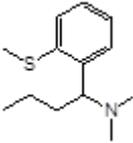
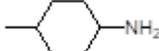
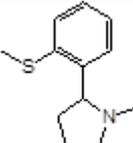
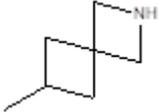
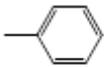
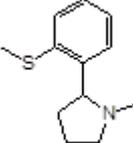
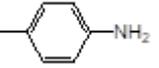
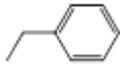
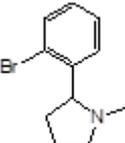
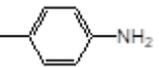
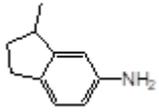
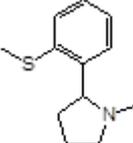
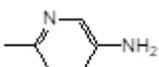
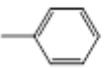
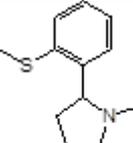
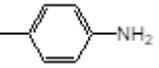
Figure 9 : Corrélation entre l'IC<sub>50</sub> de l'activité de la PPIase de la CypA et l'activité antivirale contre le virus HCoV-229E des petites molécules inhibitrices des cyclophilines

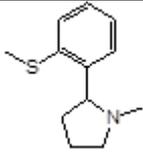
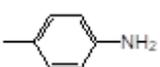
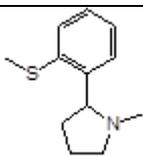
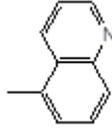
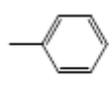
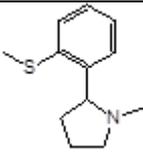
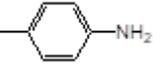
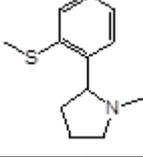
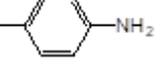
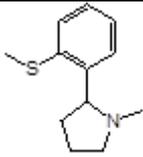
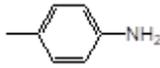
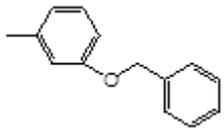
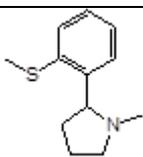
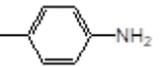
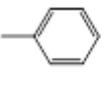
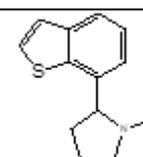
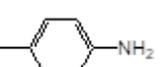
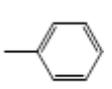
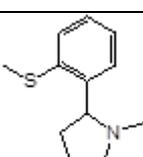
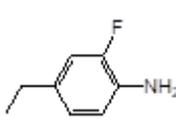
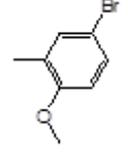
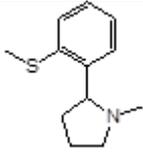
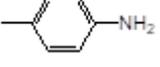
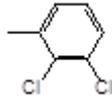
L'analyse de la corrélation entre ces deux résultats, nous a permis de classer les SMCypl en trois groupes en fonction de leur effet antiviral et de leur potentiel d'inhibition de l'activité enzymatique de la cyclophiline A *in vitro* (**Figure 9**)

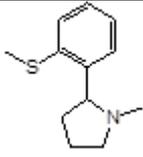
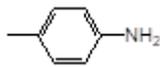
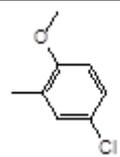
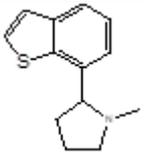
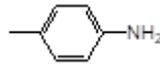
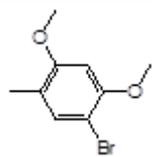
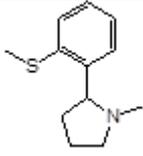
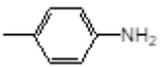
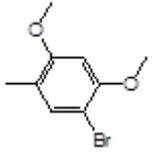
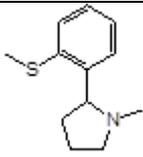
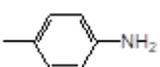
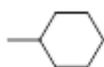
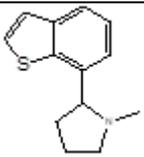
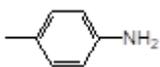
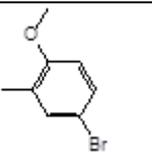
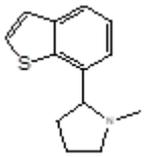
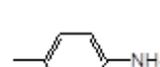
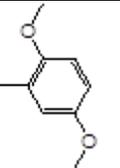
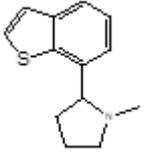
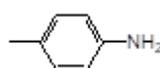
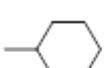
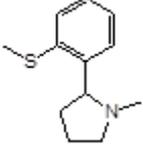
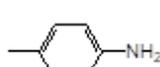
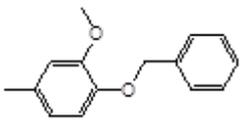
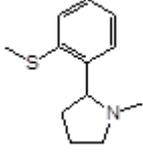
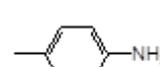
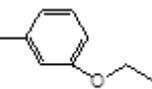
- le groupe 1 en **bleu** contient les molécules présentant une faible activité anti-PPIase et peu ou pas d'activité antivirale.
- le groupe 2 en **vert** rassemble des molécules ayant une forte activité anti-PPIase et peu ou pas d'activité antivirale.

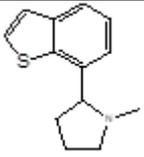
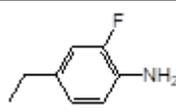
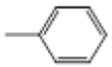
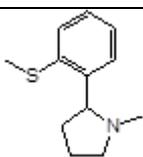
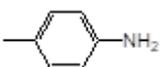
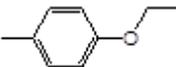
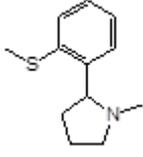
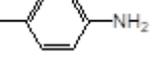
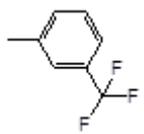
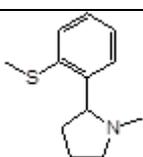
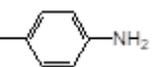
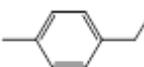
- le groupe 3 en rouge englobe les molécules possédant une forte activité anti-PPiase et une forte activité antivirale.

(Figure 9 et Tableau 2).

Composés	Diminution de l'ARN viral intracellulaire (en fois)	IC50 de l'activité PPiase de la CypA (μM)	R1	R2	R3
F846	1 ± 0.1	>10			
F845	1 ± 0.2	>10			
F746	1 ± 0.2	>10			
F680	1 ± 0.1	2.2 ± 0.4			
F729	1 ± 0.1	>10			
F822	1 ± 1.1	6.9 ± 2.7			
F712	1 ± 0.4	3.3 ± 1.4			

F768	$1 \pm 0.1$	$>10$			
F826	$4 \pm 0.9$	$>10$			
F684	$1 \pm 0.1$	$0.4 \pm 0.07$			
F716	$1 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.1$			
F798	$3 \pm 5.1$	$0.3 \pm 0.1$			
F759	$3 \pm 0.3$	$0.1 \pm 0.01$			
F828	$4 \pm 0.5$	$0.3 \pm 0.02$			
F849	$7 \pm 6.7$	$0.7 \pm 0.07$			
F842	$106 \pm 71$	$0.4 \pm 0.5$			

<b>F819</b>	<b>151 ± 3.7</b>	<b>0.6 ± 0.2</b>			
<b>F838</b>	<b>186 ± 85</b>	<b>0.3 ± 0.04</b>			
<b>F840</b>	<b>202 ± 66</b>	<b>0.7 ± 0.05</b>			
<b>F799</b>	<b>281 ± 87</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>			
<b>F836</b>	<b>481 ± 147</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>			
<b>F834</b>	<b>489 ± 174</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>			
<b>F833</b>	<b>509 ± 50</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>			
<b>F821</b>	<b>1 ± 0.1</b>	<b>ND</b>			
<b>F816</b>	<b>3 ± 1.6</b>	<b>ND</b>			

<b>F829</b>	<b>4 ± 1.2</b>	<b>ND</b>			
<b>F820</b>	<b>4 ± 2.7</b>	<b>ND</b>			
<b>F767</b>	<b>220 ± 11</b>	<b>ND</b>			
<b>F817</b>	<b>473 ± 18</b>	<b>ND</b>			

**Tableau 2 : Tableau représentatif des SMCypl criblés sur la réplication du virus HCoV-229E – Noms des composés, activité antivirale, inhibition de l'activité anti-PPIase, structures des régions R1, R2 et R3**

L'analyse des relations de structure-activité révèle que :

- Tous les composés du groupe 3 possèdent un groupement phenyl-pyrrolidine en R1, un groupement aniline en R2 et un cycle à 6 carbones en R3. Le cycle à 6 carbones en R3 peut être un cyclohexyl ou un phenyl substitué par des halogènes ou des groupements O-methyl .
- Tous les composés du groupe 2 possèdent également un groupement phenyl-pyrrolidine en R1 et un groupement aniline en R2 (à l'exception du F849). En revanche, au contraire du groupe 3, aucun composé appartenant à ce groupe ne possède de cyclohexyl ou de phenyl substitué en R3.

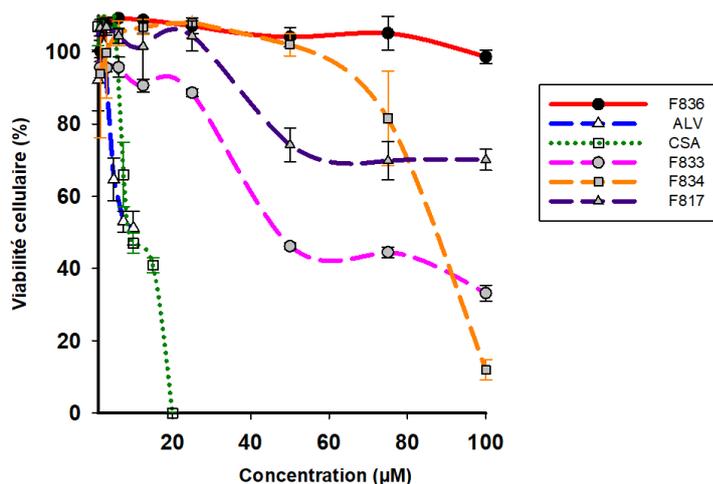
La présence d'un cyclohexyl ou d'un phenyl substitué en R3 semble donc être un prérequis pour un effet antiviral contre le HCoV-229E. Cependant toute substitution sur le phényl ne permet pas l'activité antivirale. La comparaison des composés F819, F842 avec le F798 nous permet de le constater.

La comparaison du composé F759 avec les composés F826 et F845 montre l'importance de l'aniline en R2 pour observer une activité anti-PPiase. Lorsque l'on regarde l'ensemble des molécules des groupes 2 et 3, ayant une forte activité anti-PPiase, on remarque également qu'elles possèdent toutes un phenyl-pyrrolidine en R1.

A l'instar du virus Zika et au contraire du VHC, l'activité antivirale n'est pas directement reliée à l'activité anti-PPiase.

### ▪ Sélection du meilleur composé

La cytotoxicité des 4 SMCypl les plus actifs (F833, F834, F836 et F817) a été mesurée dans des cellules MRC5 après 72h d'exposition (**Figure 10**). Le F836 et le F817 ont une CC50 > à 100  $\mu$ M, la plus forte concentration testée. Le F836 ne présente aucune cytotoxicité à 100  $\mu$ M et a donc été sélectionné pour les futures études.



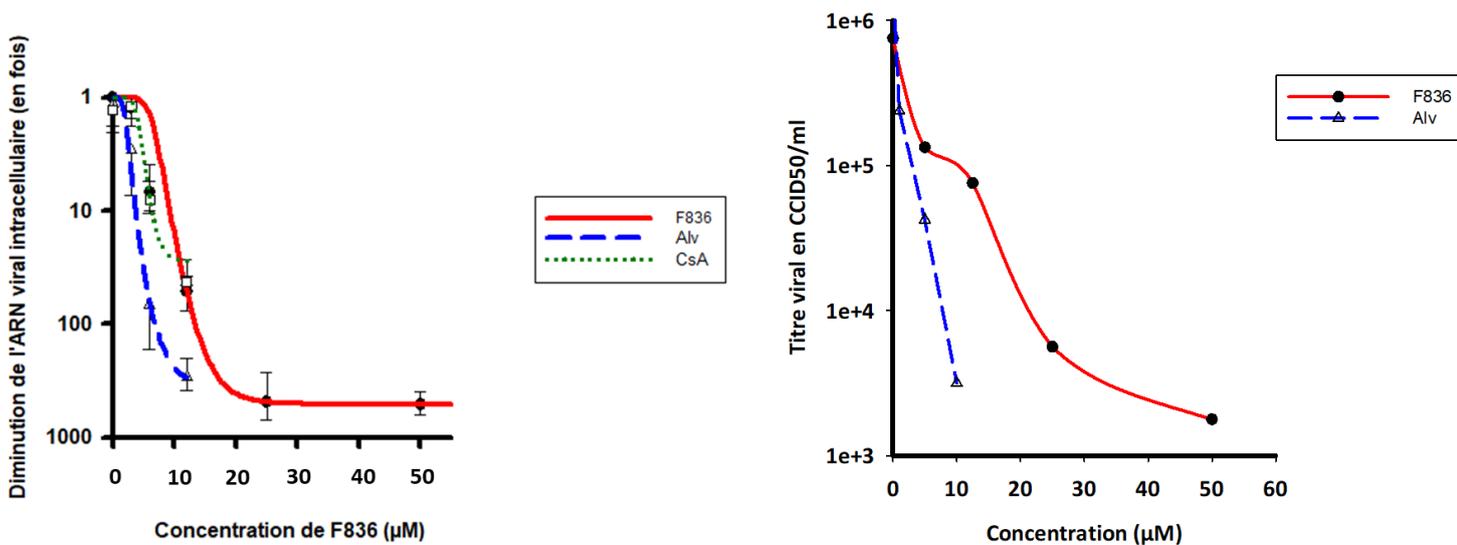
composés	CC50 ( $\mu$ M)
ALV	15.3 $\pm$ 11.5
CsA	8.9 $\pm$ 5.9
F833	36.6 $\pm$ 3.7
F834	84.2 $\pm$ 2.4
F836	> 100
F817	> 100

**Figure 10 :** Courbes de toxicité d'inhibiteurs de cyclophilines A) courbe représentative de la cytotoxicité des composés F836, F833, F834, F817, CsA et de l'Alv en cellules MRC5 B) tableau des CC50 en  $\mu$ M de chacun des composés

## B) Caractérisation de l'activité antivirale du F836

Des cellules MRC5 ont été infectées par le virus HCoV-229E en présence de concentration croissante de F836 et d'Alv. L'ARN viral intracellulaire a été quantifié par RT-qPCR. L'EC<sub>50</sub> (50% de l'effet maximum) du F836 et de l'Alv sont de  $16.4 \pm 0.26 \mu\text{M}$  et  $8.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , respectivement (**Figure 11A**).

L'effet du F836 et de l'Alv sur le titre viral a également été quantifié. Une inhibition dose dépendante de la production de virus infectieux est observée pour les deux composés. Le titre du virus produit en présence de  $50 \mu\text{M}$  de F836 est plus de 100 fois inférieur à celui produit en absence de F836 (**Figure 11B**).

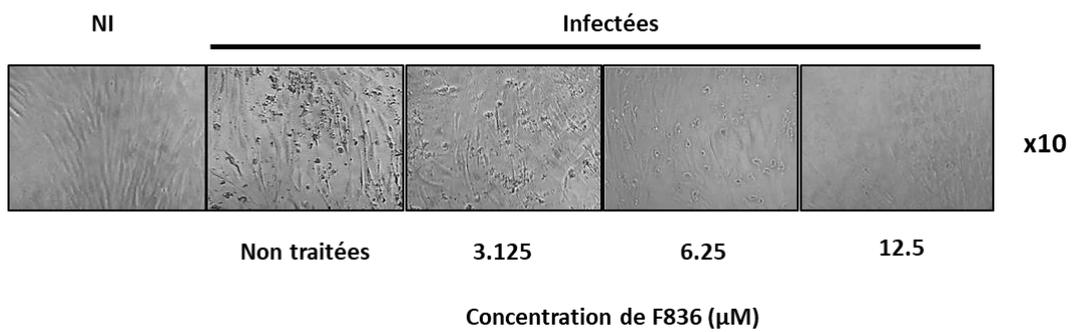


**Figure 11 : Diminution de l'ARN viral intracellulaire et du titre du virus HCoV-229E, en présence de F836** A) Diminution de l'ARN viral intracellulaire de manière dose dépendante B) Diminution de la production virale de manière dose dépendante

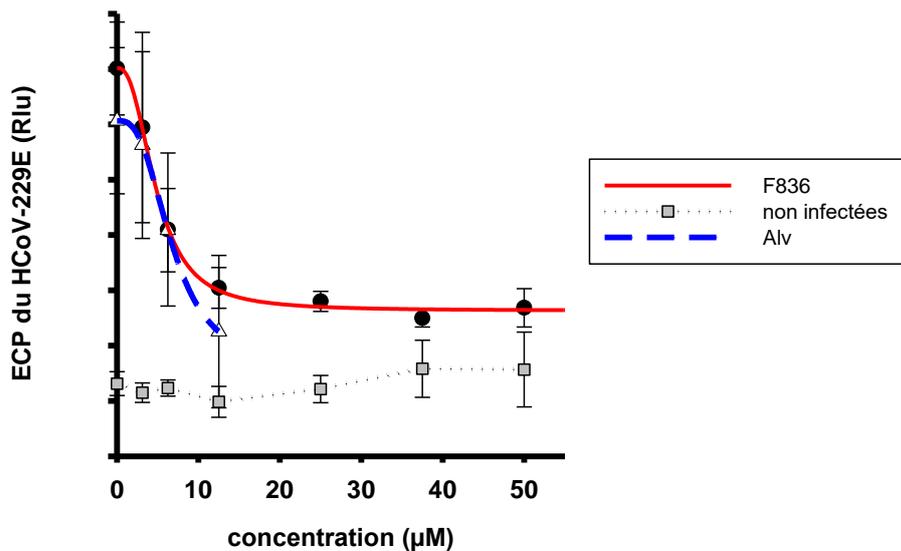
L'infection par le virus HCoV-229E en cellules MRC5 induit un effet cytopathique (ECP) observable à partir de 48h. Nous avons mesuré l'inhibition de l'ECP viro induit en présence de concentrations croissantes de composé 72h post

infection. Comme on peut le voir sur la **figure 12A**, le F836 protège de l'effet cytopathique, avec une protection complète obtenue à la concentration de 12.5  $\mu\text{M}$ . La quantification de l'inhibition par le F836 et l'Alv est représentée dans la **figure 12B** et **12C**. L' $\text{EC}_{50}$  du F836 et de l'Alv sont de  $4.8 \pm 0.23 \mu\text{M}$  et de  $6.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , respectivement. Nous avons donc pu calculer l'index thérapeutique qui correspond à la valeur de la  $\text{CC}_{50}$  divisée par la valeur de L' $\text{EC}_{50}$ . L'index thérapeutique du F836 est supérieur à 21 et celui de l'Alv est de  $8.9 \pm 5.9$  (**Figure 12C**).

A



B

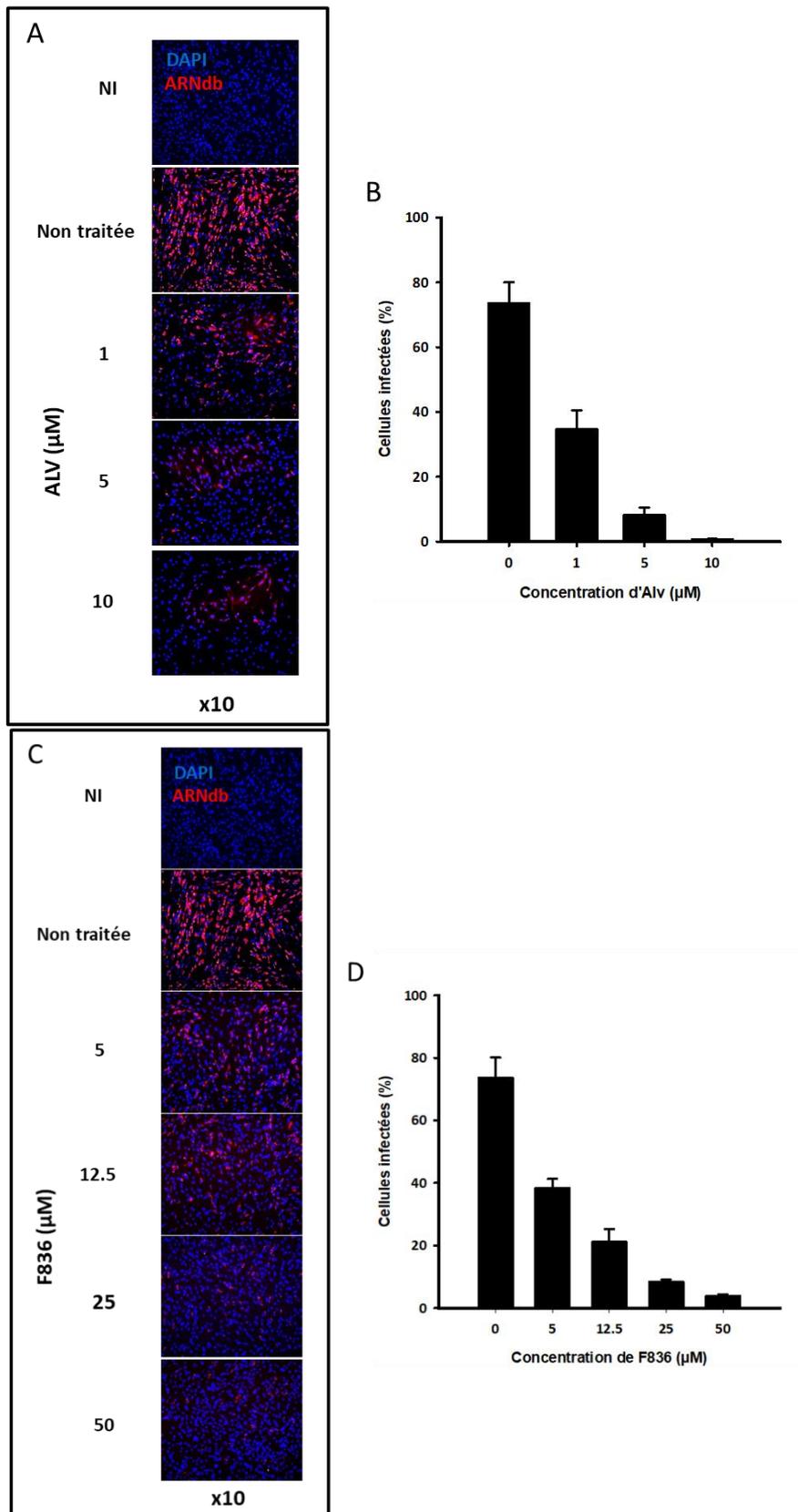


C

Composés	F836	Alv
$\text{EC}_{50}$ ARN ( $\mu\text{M}$ )	$16.4 \pm 0.26$	$8.6 \pm 1.2$
Maximum de diminution de l'ARN (en fois)	$481 \pm 147$	$291 \pm 93$
$\text{EC}_{50}$ ECP ( $\mu\text{M}$ )	$4.8 \pm 0.23$	$6.7 \pm 0.2$
$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	> 100	$15.3 \pm 11.5$
Index thérapeutique	> 21	$8.9 \pm 5.9$

**Figure 12 :**Caratérisation de la diminution de l'effet cytopathique viro-induit (ECP) par le F836 A) Images de microscopie (x10) de cellules MRC5 infectées en présence de concentrations croissantes de F836 B) Courbe de la diminution de l'effet cytopathique viro induit en fonction de la concentration de composés C) Tableau récapitulatif de la caractérisation du F836 en comparaison à l'Alv

L'effet antiviral du F836 a été analysé à l'aide du marquage par immunofluorescence de l'ARN double brin, étape transitoire au cours de la réplication. Des cellules MRC5 ont été infectées pendant 24h en présence de concentrations croissantes d'Alv (**Figure 13A**) ou de F836 (**Figure 13C**). Les cellules marquées ont été quantifiées (**Figure 13B et 13D**). Dans le cas du traitement par l'Alv on observe une diminution dose dépendante du nombre de cellules infectées et un effet maximum à 10 $\mu$ M. On remarque cependant une réduction de la confluence cellulaire, dû à la cytotoxicité de la molécule. De la même manière le traitement au F836 entraîne une diminution dose dépendante de l'infection avec un effet maximal à 50 $\mu$ M.

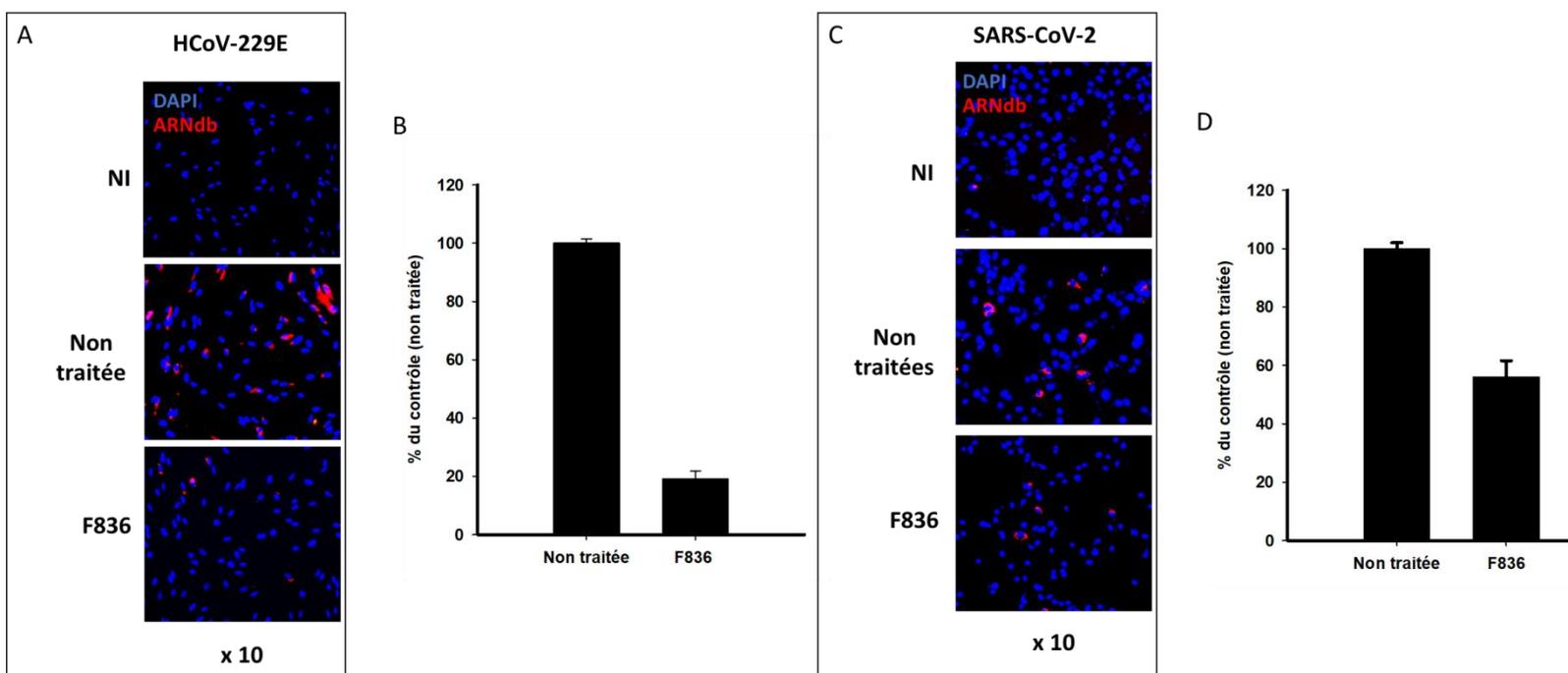


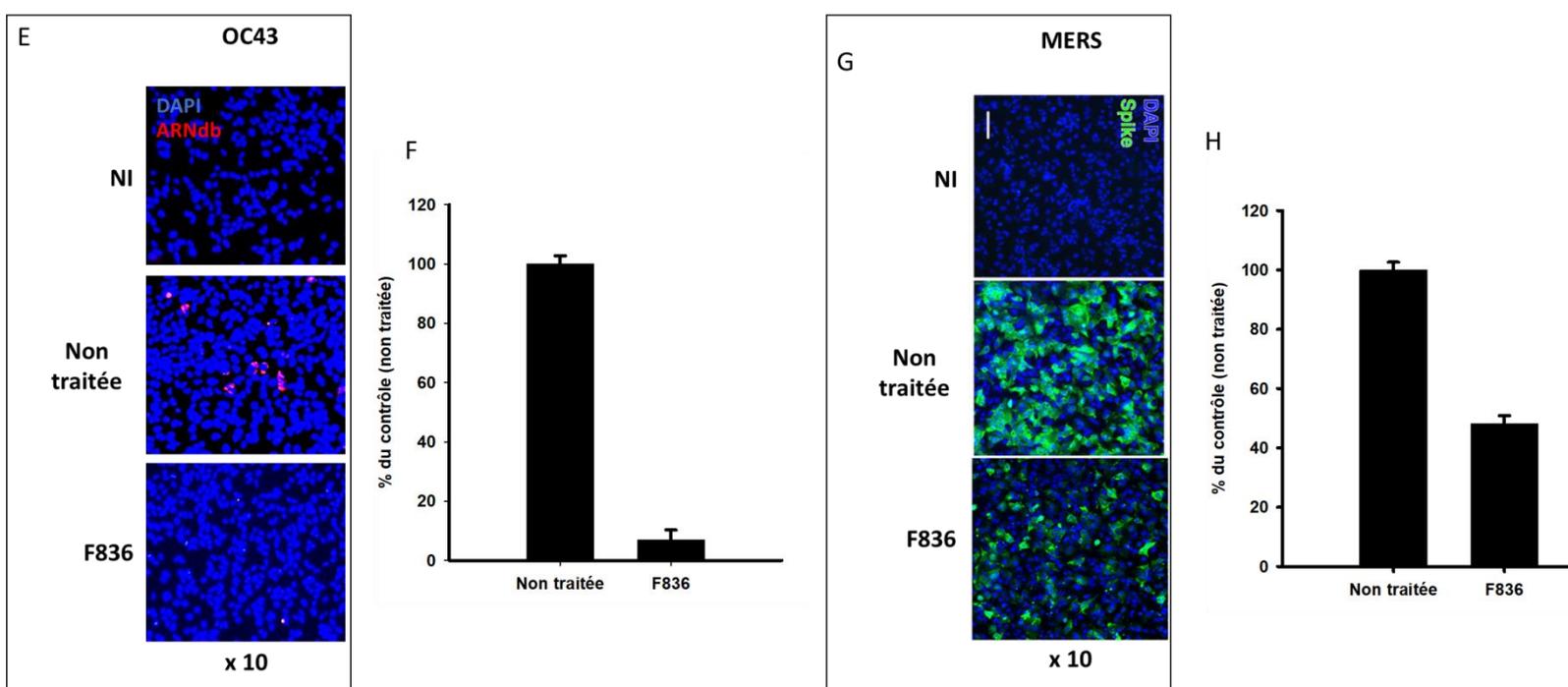
**Figure 13 : Caractérisation du F836 par Immunofluorescence avec marquage de l'ARN double brin lors d'infection par le virus 229E – A) Cellules infectées par le HCoV-229E en présence de concentrations croissantes d'Alv B) Quantification par le logiciel duolink des cellules marquées en présence d'Alv C) Cellules infectées par le 229E en présence de concentrations croissantes de F836 D) Quantification par le logiciel duolink des cellules marquées en présence de F836**

- Effet antiviral à large spectre du F836

L'activité antivirale du F836 a également été testée sur des beta-coronavirus: OC43, MERS (en collaboration avec Gary Whittaker et Jean K. Millet de l'Université de Cornell, New York, Etats-Unis) et SARS-CoV-2. Des cellules MRC5, HRT-18, Huh7 et Vero E6 ont été infectées pendant 2 heures par les coronavirus HCoV-229E, OC43, MERS et SARS-CoV-2, respectivement, en présence ou en absence de 50µM de F836. L'infection a été mesurée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'ARN double brin pour les virus HCoV-229E, OC43 et SARS-CoV-2 et un autre anticorps dirigé contre la protéine Spike du virus pour le MERS, 9 heures post-infection. (Figure 14)

Les résultats montrent que le F836 est efficace sur les beta-coronavirus SARS-CoV-2, OC43 et MERS-CoV. Bien que la puissance du composé ne soit pas la même en fonction des virus, ces résultats suggèrent un effet antiviral à large spectre pan-coronavirus du F836 avec une diminution respective de 94%, 50 % et 46%, des cellules infectées pour le OC43, MERS-CoV et le SARS-CoV-2.





**Figure 14 : Activité pan-coronavirus du F836** A) Infection par le SARS-CoV-2 à MOI 0.2 de cellules VERO E6 avec marquage de l'ARNdb en rouge B) quantification des cellules infectées par le SARS-CoV-2 C) Infection par le virus OC43 à MOI 0.1 de cellules HRT-18 avec marquage de l'ARNdb en rouge D) quantification des cellules infectées par OC43 E) Infection par le MERS à MOI 10 de cellules Huh7 avec marquage de la protéine Spike en vert F) quantification des cellules infectées par le MERS

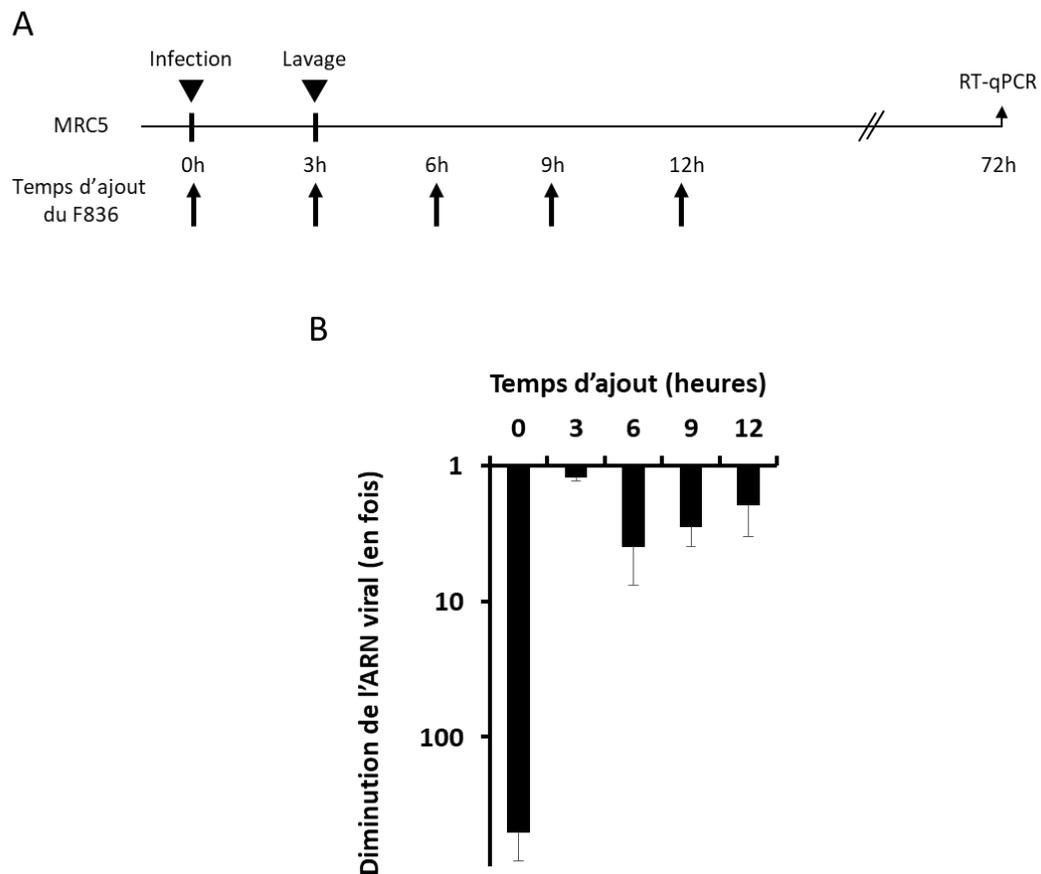
## C) Mécanisme d'action anti-229E du F836

### 1) Détermination de l'étape du cycle viral ciblée par le F836

a) Le F836 bloque une étape précoce du cycle viral du HCoV-229E

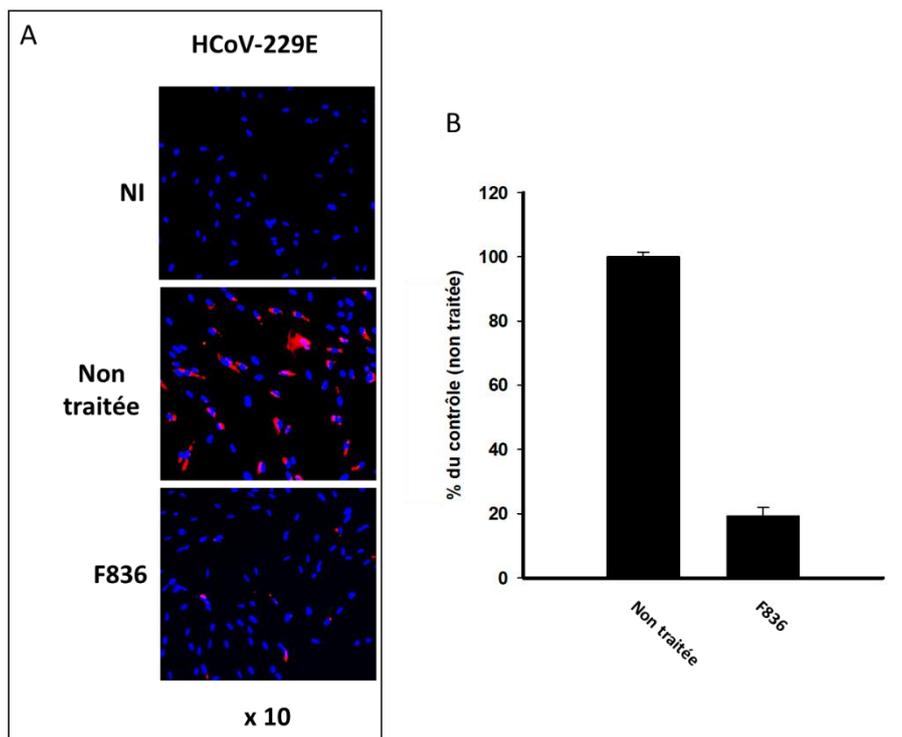
Afin de déterminer l'étape du cycle viral ciblée par le F836. Nous avons réalisé un test de temps d'ajout. Des cellules MRC5 ont été infectées par le HCoV-229E et le F836 a été ajouté à différents temps au cours de l'infection (0h, 3h, 6h, 9h,

12h). L'ARN viral intracellulaire a été quantifié par RT-qPCR 72h post infection (**Figure 15A**). Les résultats montrent que le composé F836 perd son activité antivirale lorsqu'il est ajouté 3h post infection. Ce résultat nous indique que le F836 cible une étape précoce du cycle viral comprise entre 0 et 3h post infection dans les cellules MRC5 (**Figure 15B**).



**Figure 15 : Test de temps d'ajout** A) Les cellules MRC5 ont été infectées pendant 3h et la drogue a été ajoutée à différents temps. L'ARN viral intracellulaire a été mesuré 72h post infection. B) Test de temps d'ajout du F836

Nous avons infecté des cellules MRC5 avec HCoV-229E pendant 2h à MOI 1 en présence de 50 $\mu$ M de F836. Après lavage, les cellules ont été incubées sans composé. L'infection a été mesurée par une IF dirigée contre l'ARN double brin 9h post infection (**Figure 16**). Le F836 réduit de 82% le nombre de cellules infectées et confirme le résultat du TTA. Le F836 bloque une étape précoce du cycle viral.



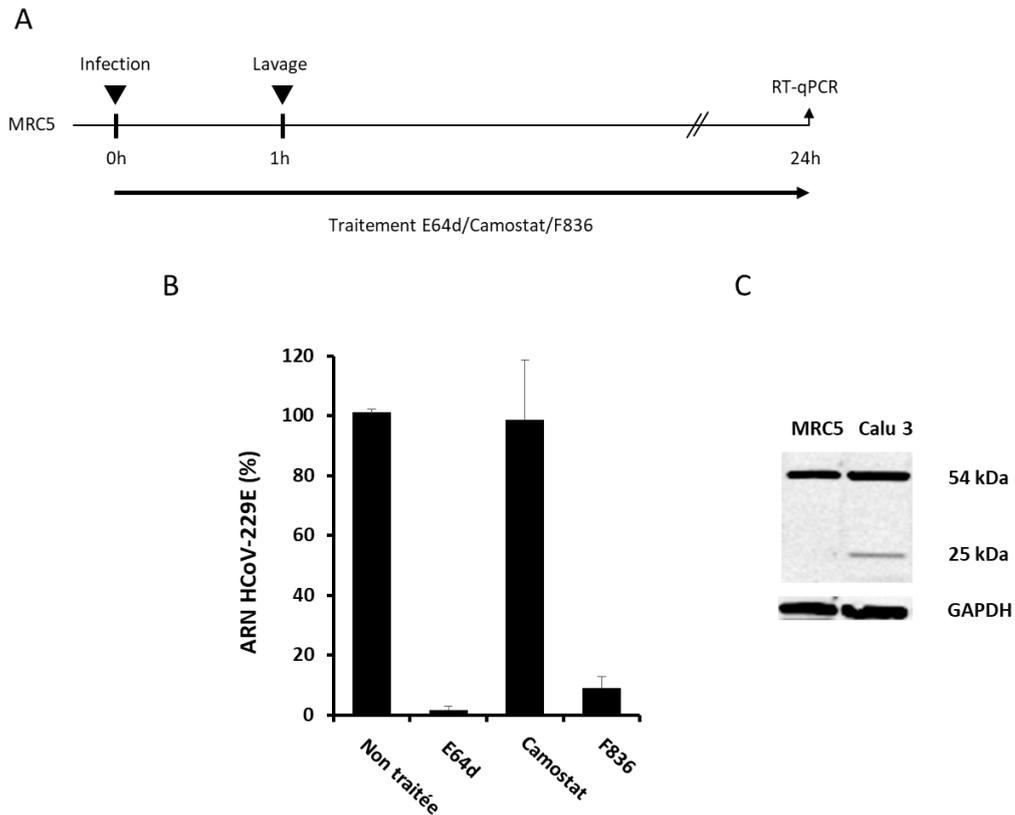
**Figure 16 : Le F836 bloque une étape précoce du cycle de vie du HCoV-229E** – A) Infection par le virus HCoV-229E à MOI 1 de cellules MRC5 avec marquage de l'ARNdb en rouge et le DAPI en bleu B) Le graphe représente le pourcentage d'infection en présence de drogue par rapport à la condition infectée non traitée

#### b) Caractérisation de l'entrée du virus HCoV-229E dans les cellules MRC5

Afin de caractériser l'entrée du HCoV-229E dans les cellules MRC5, nous avons utilisé l'E64d, un inhibiteur de l'entrée par voie endosomale via l'inhibition des cathepsines B et L et le camostat, un inhibiteur de protéases à sérine comme notamment TMPRSS2, qui inhibe l'entrée par fusion à la membrane plasmique. Les cathepsines et TMPRSS2 sont les protéases connues pour le clivage de Spike permettant la fusion et l'entrée par une ou l'autre voie dans le cas de l'infection par le virus HCoV-229E.

Des cellules MRC5 ont été infectées pendant 24h en présence ou non de drogues et les ARN viraux intracellulaires ont été mesurés par RT-qPCR (**Figure 17A**). La **figure 17B** nous montre que l'E64d inhibe la réplication du virus HCoV-229E tout comme le F836. En revanche, le camostat n'a aucun effet ce qui suggère que l'entrée dans les cellules MRC5 serait peu ou pas dépendante de TMPRSS2. La présence de

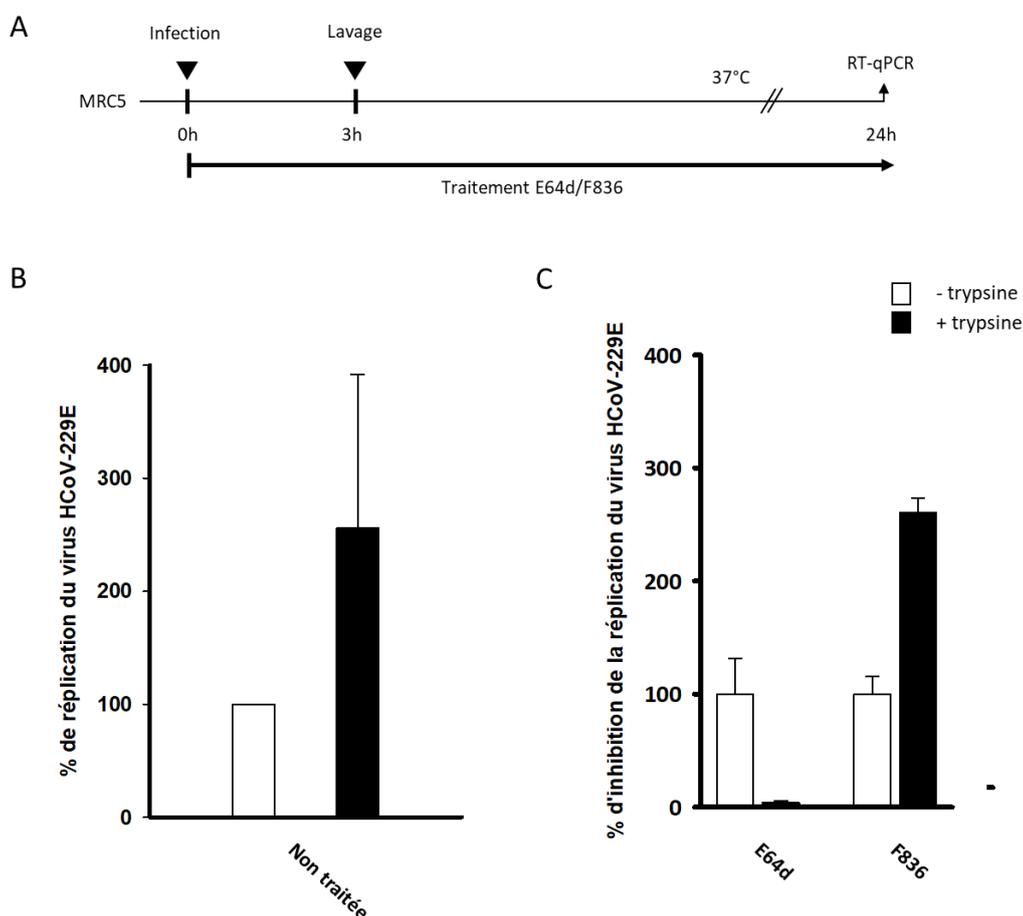
TMPRSS2 dans les cellules MRC5 a été analysé par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminal de TMPRSS2. Les résultats montrent la présence d'une bande à 54 kDa correspondant à TMPRSS2 dans les cellules MRC5 et Calu-3. En revanche, seules les cellules Calu-3 possèdent une bande à 25 kDa correspondant à la forme clivée de TMPRSS2. (Figure 17C).



**Figure 17 : Caractérisation de l'entrée du HCoV-229E en cellules MRC5** - A) Les cellules ont été infectées pendant 1h en présence de drogues, lavées puis incubées en présence de drogues pendant 24h B) Le graphe représente le pourcentage d'infection en présence de drogue par rapport à la condition infectée non traitée C) Western Blot anti-TMPRSS2

c) Le F836 cible une étape commune aux deux voies d'entrée

Afin de favoriser l'entrée par fusion à la membrane plasmique, le virus a été préalablement traité par la trypsine pendant 5 min avant l'infection des cellules MRC5. Les résultats montrent une augmentation de l'infection des virus traités par la trypsine comparé aux virus non traités (**Figure 18A**). Comme attendu, les virus traités par la trypsine deviennent insensibles à l'action de l'E64d. En revanche le F836 bloque l'infection des virus traités par la trypsine. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le F836 est actif quel que soit le mode d'entrée du virus HCoV-229E. Le F836 ciblerait donc une étape commune aux deux types d'entrée (attachement, fusion, décapsidation)(**Figure 18**).

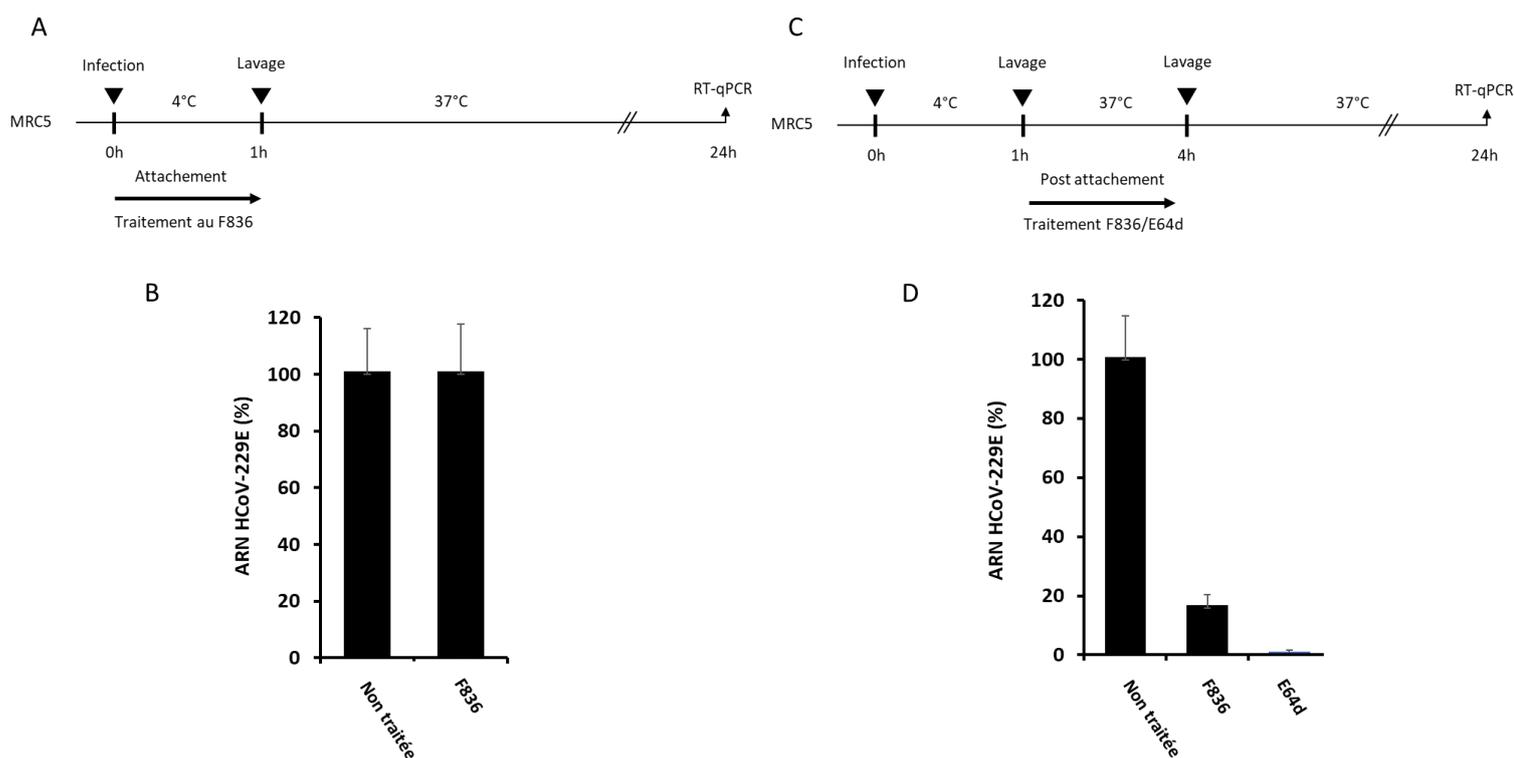


**Figure 18 : Trypsine** – A) Le virus HCoV-229E a été incubé en présence de trypsine avant d'infecter, pendant 3h, des cellules MRC5 en présence de drogues. Les cellules ont été lavées puis incubées en présence de drogues jusqu'à 24h B) Le graphe représente le pourcentage d'infection dans la condition trypsine par rapport à la condition sans trypsine C) Le graphe représente le pourcentage d'inhibition de la répllication de HCoV-229E en présence de trypsine et avec drogues par rapport à la condition sans trypsine avec drogues

d) Le F836 bloque une étape post-attachement du cycle viral du HCoV-229E

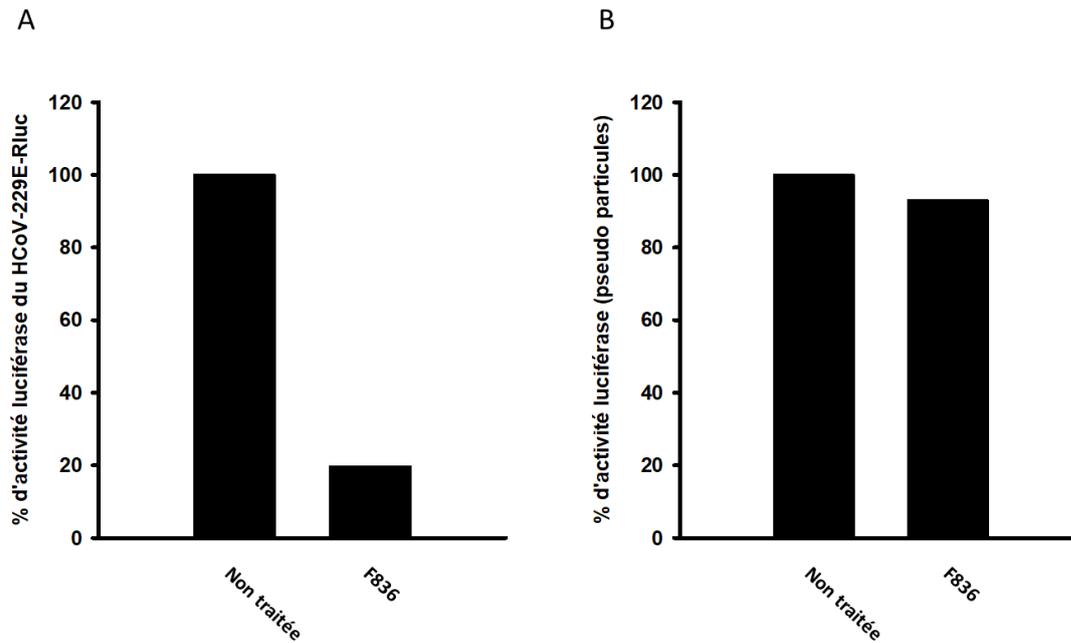
L'effet du F836 sur l'attachement du HCoV-229 a été quantifié selon la procédure expérimentale décrite dans la **figure 19A**. Des cellules MRC5 ont été mises en présence de virus et de 50  $\mu$ M de F836 ou de DMSO pendant une heure à 4°C afin de permettre l'attachement du virus mais de bloquer son internalisation. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h en absence de F836 avant que l'ARN intracellulaire soit mesuré par RT-qPCR. Comme montré dans la **figure 19B**, le F836 n'a pas d'effet sur l'attachement du virus.

En revanche comme indiqué dans la **figure 19D**, le F836 conserve son effet antiviral lorsqu'il est ajouté au moment du passage à 37°C, soit post attachement (**Figure 19C**).



**Figure 19 : Test d'entrée** – A) Les cellules ont été infectées par le 229E à 4°C pendant 1h en présence de F836 avant d'être lavées et incubées à 37°C jusqu'à 24h. B) Le graphe représente le pourcentage d'infection en présence de drogue par rapport à la condition infectée non traitée. C) Les cellules ont été infectées à 4°C pendant 1h puis lavées et infectées pendant 3h à 37°C en présence de drogues. Les ARN viraux intracellulaires ont été mesurés par RT-qPCR 24h post infection D) Le graphe représente le pourcentage d'infection en présence de drogue par rapport à la condition infectée non traitée.

En collaboration avec le Dr. Sandrine Bélouard (IBL, Lille, France), nous avons utilisé des pseudo particules qui miment l'entrée des coronavirus mais ne sont pas capable de se répliquer. Bien que le F836 inhibe la replication du HCoV-229E-Rluc de 80% à 50  $\mu$ M (**Figure 20A**), l'entrée des pseudo particules, quantifiée par la mesure de l'expression de la luciférase, n'est pas affectée par l'addition de F836 (**Figure 20B**). Ces résultats suggèrent que le F836 cible une étape post fusion.



**Figure 20 : Le composé F836 bloque la réplication du virus HCoV-229E-Rluc mais n'a aucun effet sur l'entrée des pseudo particules du virus HCoV-229E** – A) Graphe représentant le pourcentage d'activité luciférase du virus HCoV-229E-Rluc en présence de F836 par rapport à la condition non traitée B) Graphe représentant le pourcentage d'activité luciférase des pseudo particules du virus HCoV-229E en présence de F836 par rapport à la condition non traitée

## 2) Résistance du virus HCoV-229E au composé F836

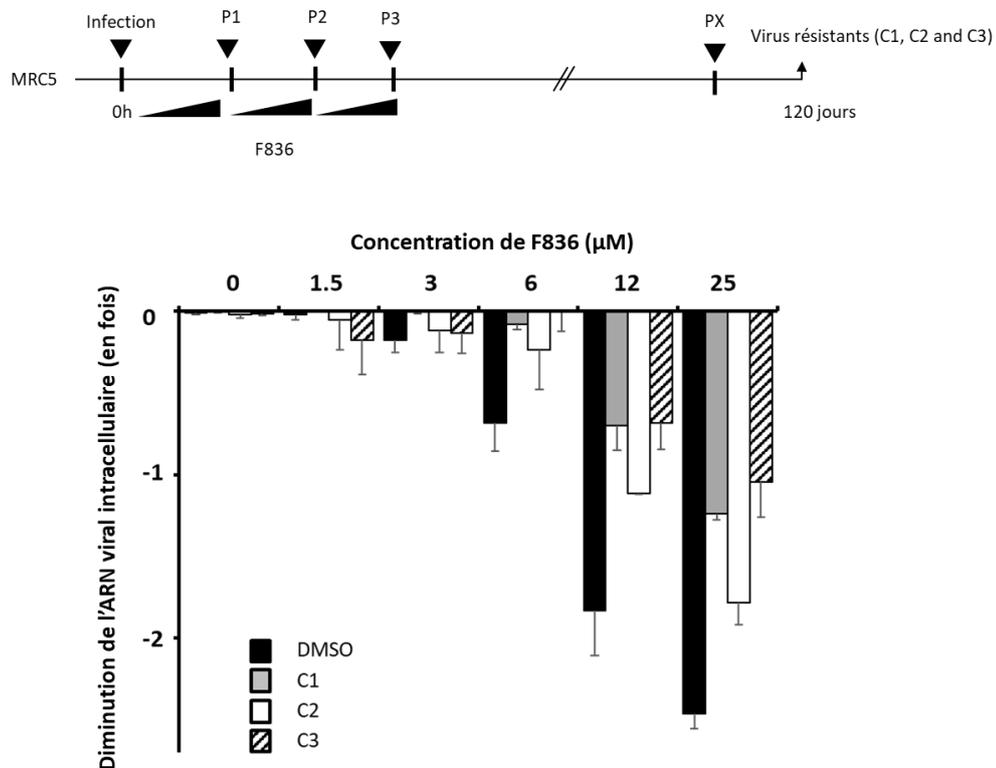


Figure 21: Les variants du virus HCoV-229E C1, C2 et C3 sont résistants au composé F836

Comme indiqué dans la **figure 21**, des virus ont été sélectionnés en présence de concentration croissante de F836. L'expérience réalisée trois fois de manière indépendante a permis de sélectionner trois variants viraux (C1, C2 et C3). La susceptibilité au F836 des variants C1, C2 et C3 a été mesurée dans des cellules Huh7 par RT-qPCR. La susceptibilité au F836 des variants C1, C2 et C3 est réduite de respectivement 13, 4 et 20 fois comparé au virus sauvage.

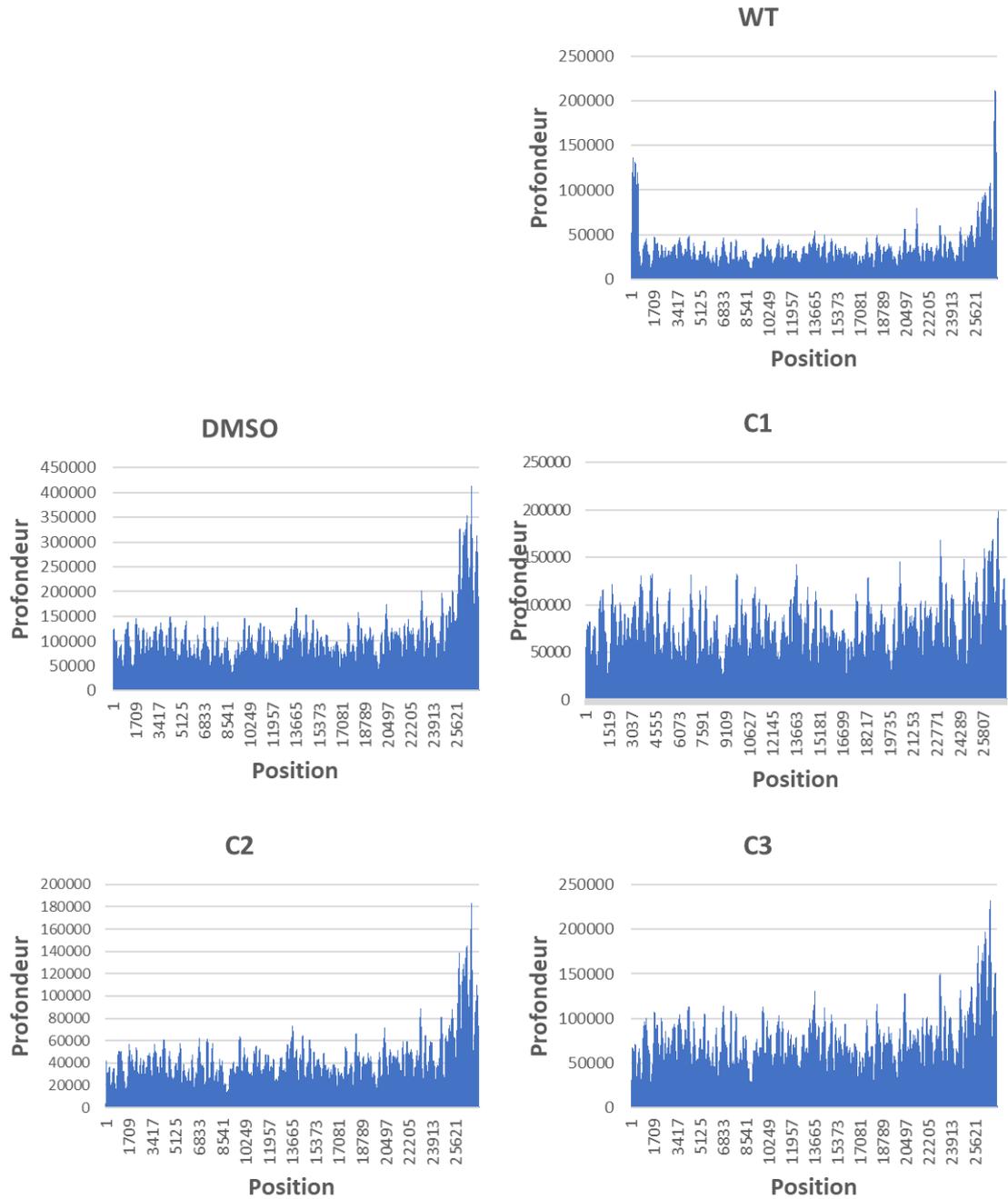
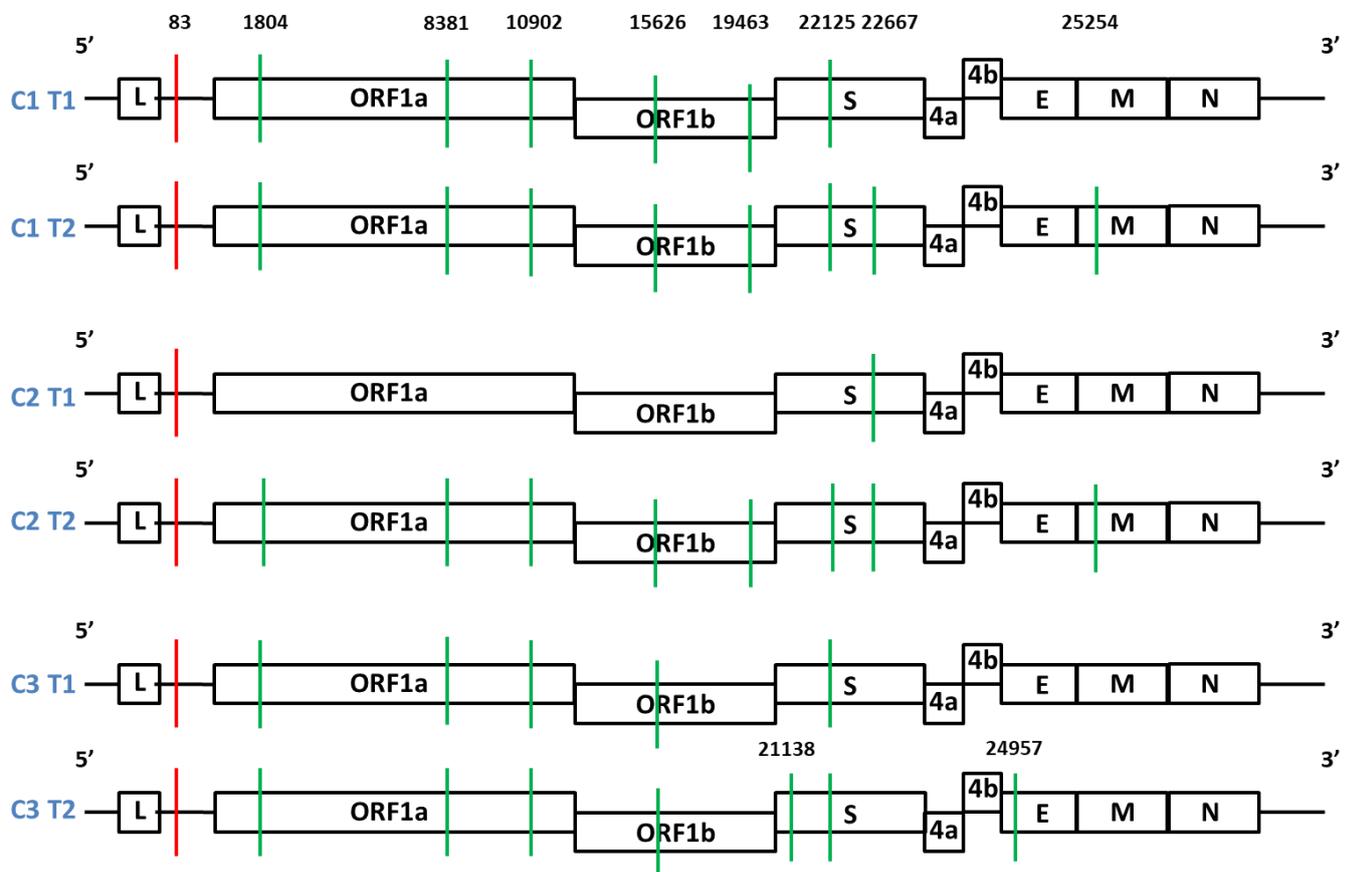


Figure 22 : Couverture du génome à 100% du virus HCoV-229E WT et des variants DMSO, C1, C2 et C3

Les génomes complets des différents variants ont été séquencés par « Next Generation Sequencing » (NGS). La couverture du génome pour le coronavirus HCoV-229E est de 100% (Figure 22) et la technique de « shotgun metagenomic » permet l'identification et la quantification des variants minoritaires au sein de la quasi-espèce virale: mutations minoritaires de 1 à 15%, mutations intermédiaires de 15 à 50% et les mutations majoritaires >50%.

	5'	ORF 1a	ORF 1b	S	4a	4b	E	M	N	3'
Minoritaire (<15%)			19463	21138			24957	25254		
Intermédiaire (15-50%)		1804 8381 10902	15626	22125 22667						
Majoritaire (>50%)	83									

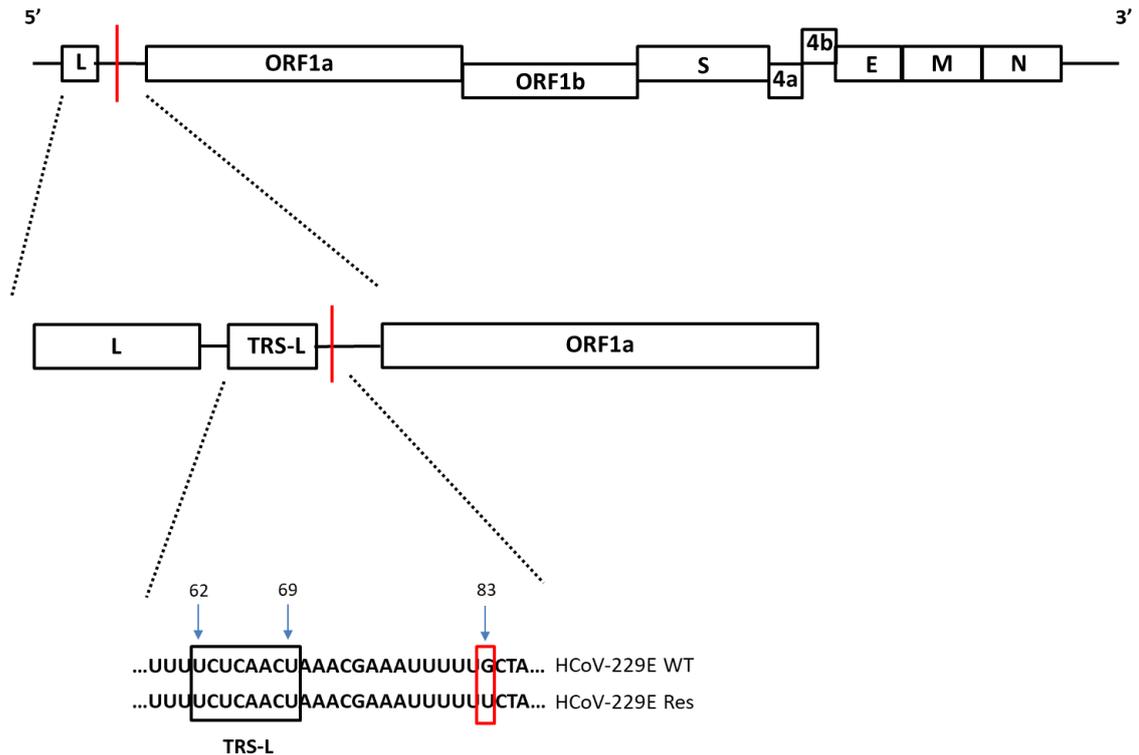
**Tableau 3 : Positions sur le génome de l'ensemble des mutations apparues dans au moins un des 3 variants C1, C2 et C3 selon leur représentation au sein de la quasi-espèce virale : mutation minoritaire (<15%), mutation intermédiaire (15-50%), mutation majoritaire (>50%)**



**Figure 23 : Représentation des mutations présentes sur l'ensemble des 3 variants viraux C1, C2 et C3 – T1 et T2 : Temps 1 et Temps 2 ; L : Leader ; ORF1a et ORF1b : Cadres ouverts de lecture 1a et 1b ; S : Spike ; 4a et 4b : protéines accessoires ; E : Enveloppe ; M : Membrane ; N : Nucléoprotéine ; en rouge la seule mutation présente sur l'ensemble des trois variants à T1 et T2**

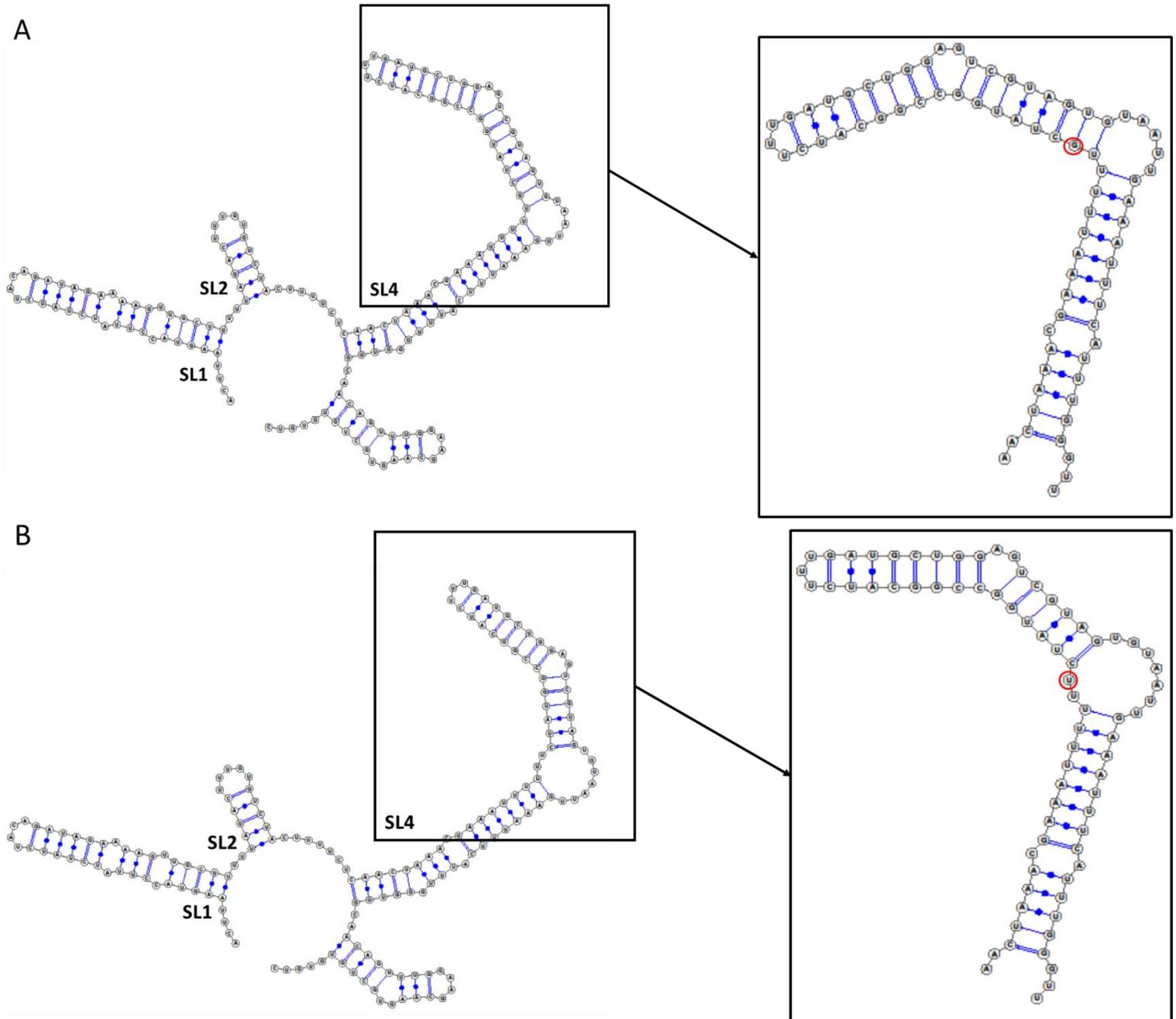
Chacun des variants viraux a été séquencé à deux temps, T1 (90 jours) et T2 (120 jours). Le **tableau 3** représente l'ensemble des mutations apparues dans au moins un des trois variants viraux C1, C2 et C3 et leur représentation au sein de la quasi-espèce virale. D'après la **figure 23** on compte au total 11 mutations sur l'ensemble du génome avec deux mutations que l'on retrouve dans un seul variant, C3, à T2 (position 21138 dans la protéine Spike ; position 24957 dans la protéine d'Enveloppe), 3 mutations que l'on retrouve sur deux variants C1 et C2, à T2 (position 19463 dans la protéine non structurale nsp15 ; position 22667 dans la protéine Spike ; position 25254 dans la protéine de Membrane) et 6 mutations que l'on retrouve dans les 3 variants (position 83 dans la région 5'UTR ; position 1804 dans nsp2 ; position 8381 dans nsp4, position 10902 dans nsp6 ; position 15626 dans nsp13 ; position 22125 dans la protéine Spike).

La **figure 23** et le **tableau 3** nous montrent que la mutation en position 83 est la seule présente sur les trois variants C1, C2 et C3 dès T1 et que c'est également la seule mutation majoritaire au sein de la quasi espèce virale. Elle se situe dans la région non codante 5' UTR, en aval de la séquence de régulation de la transcription de la séquence leader (**Figure 24**).



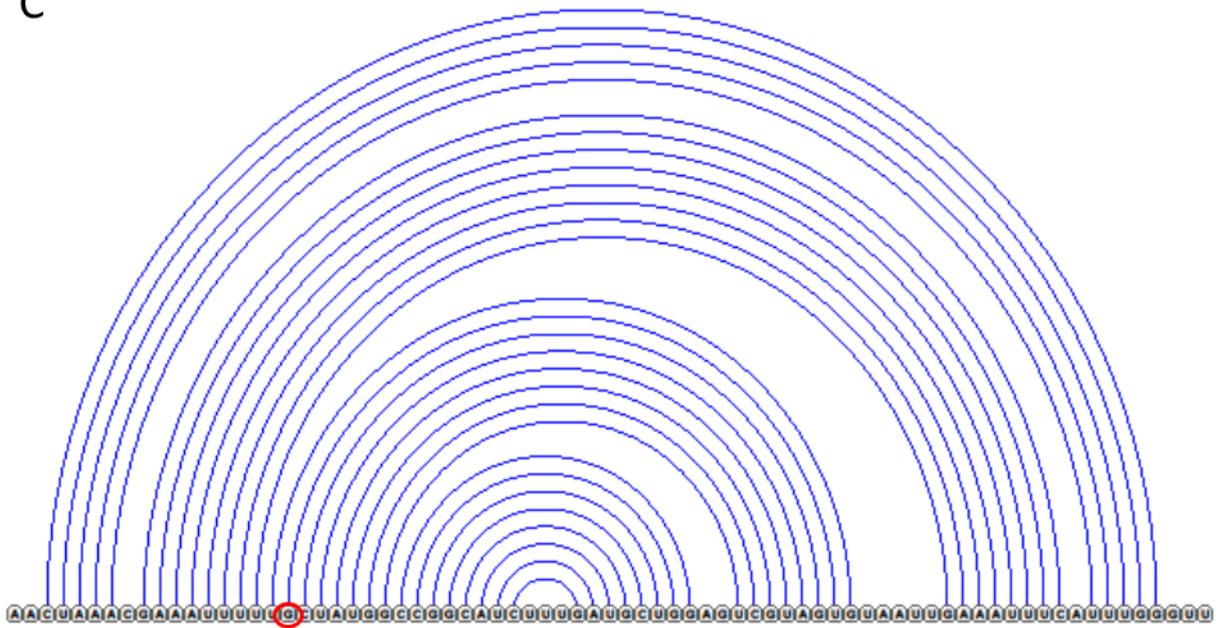
**Figure 24 : Mutation en position 83 dans la région 5' UTR**– L = Leader, nsp = « non structural protein », TRS = « Transcription Regulating Sequence, WT = « Wild Type », Res = « Résistants » ; apparition d'une mutation présente chez les 3 variants C1, C2 et C3 aux temps T1 et T2 en position 83 (rouge) avec une transition G en U

La région 5' UTR des coronavirus est une région qui abrite des éléments structuraux, importants pour la réplication et la transcription. Cette région contient des structures en tige boucle, appelées SL1, SL2 et SL4 (« Stem-Loop 1/2/4 ») très conservées chez l'ensemble des coronavirus. La mutation que l'on retrouve sur les trois variants C1, C2 et C3 se situe au niveau de la structure en tige boucle SL4. Afin de savoir si cette mutation en position 83 pourrait modifier la structure de l'ARN, nous avons réalisé une prédiction de la structure secondaire en comparant la séquence de C1, C2 et C3 avec la séquence du variant DMSO (**Figure 22**). On remarque que la structure secondaire de l'ARN viral pourrait être modifiée par la mutation G en U en position 83, *via* une augmentation de la zone de non appariement dans la boucle interne où se situe la mutation. Ce changement nucléotidique entraînerait un changement structural de la tige SL4.

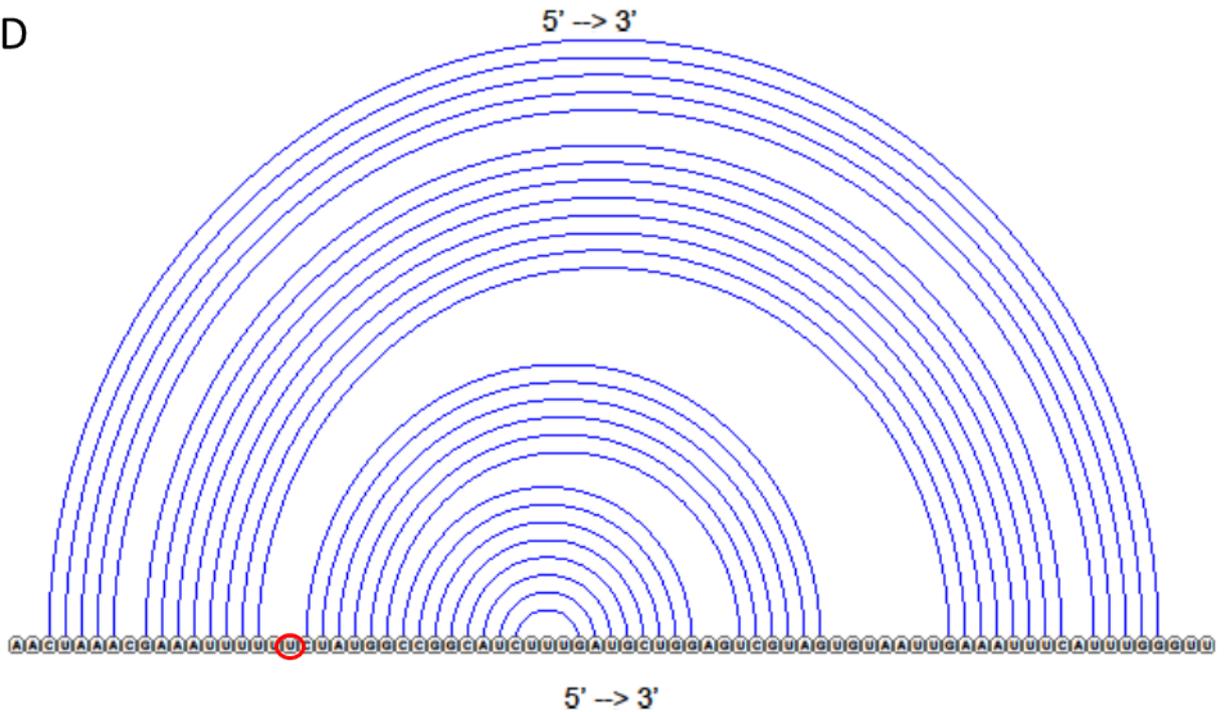


**Figure 22 : Prédiction de la structure secondaire de l'ARN – A) séquence du virus DMSO B) séquence des variants C1, C2 et C3 ; la position 83 est entourée en rouge sur les deux figures ; encadré noir = zoom sur la structure SL4**

C



D

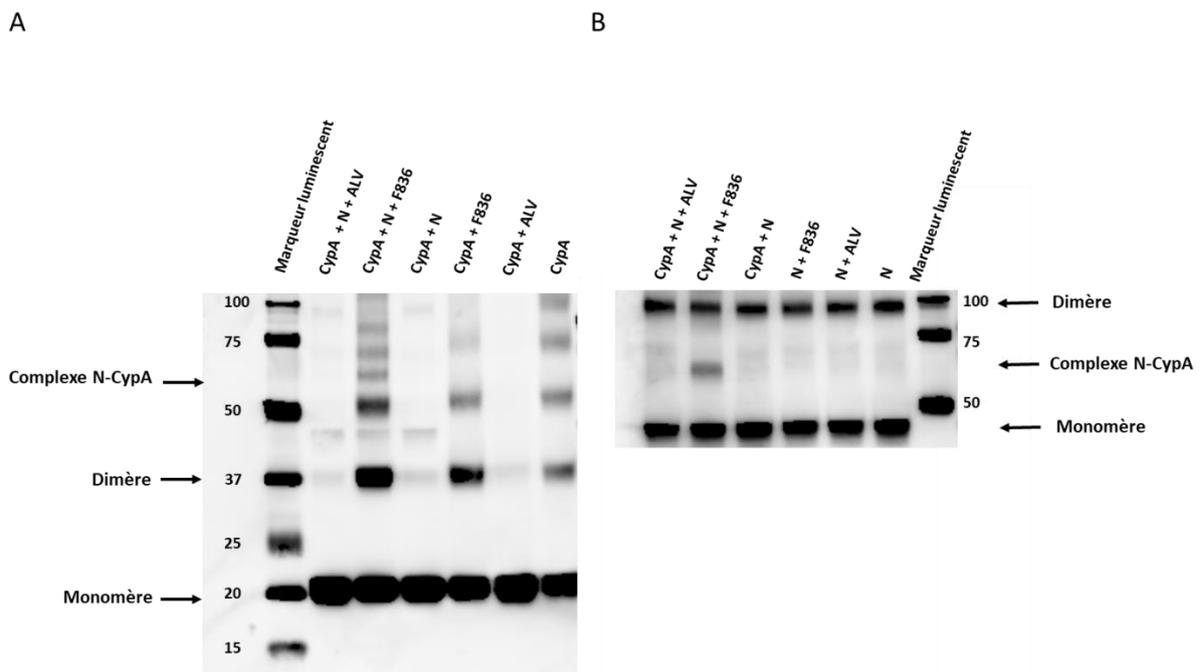


**Figure 22 (suite) : Prédiction de la structure secondaire de l'ARN** – Diagramme en arc de la probabilité d'appariement de bases C) séquence de SL4 du virus DMSO D) séquence de SL4 des variants C1, C2 et C3 ; la position 83 est entourée en rouge sur les deux figures

### 3) Identification de la cyclophiline impliquée dans le cycle du HCoV-229E

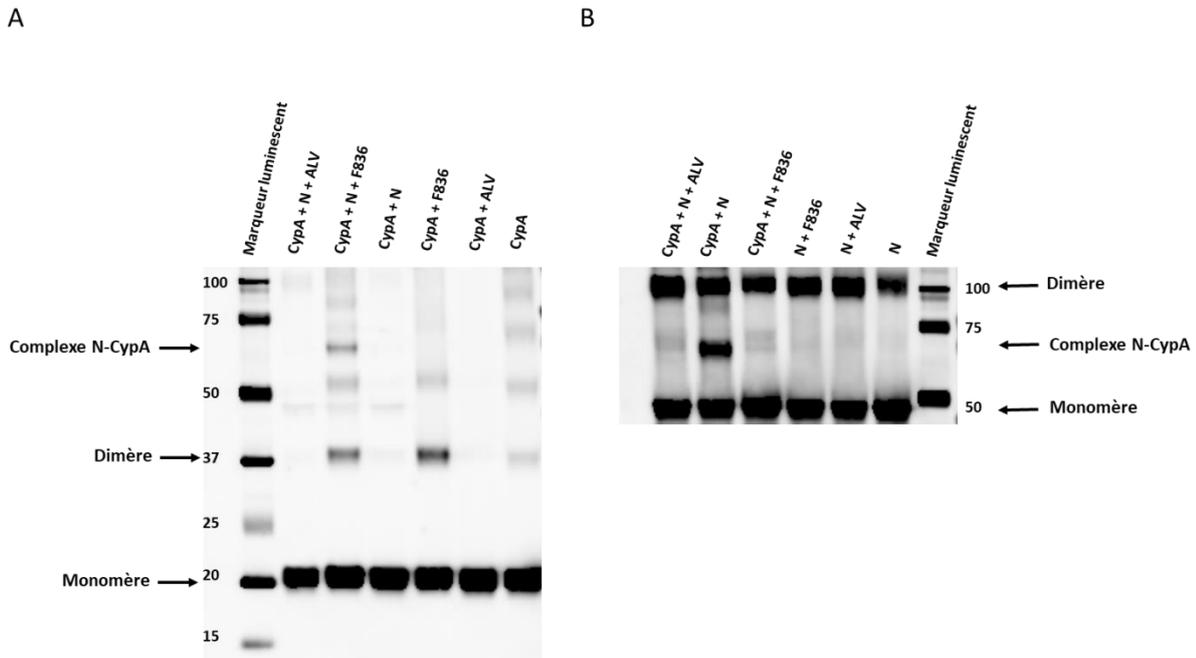
Afin de caractériser l'interaction entre la protéine N et la cyclophiline A ainsi que l'effet du F836 sur cette interaction des expériences de « crosslinking » ont été réalisées. La CypA purifiée a été incubée 5 minutes en présence de la protéine N du HCoV-229E purifiée et du F836 ou de l'Alv et de glutaraldehyde (0,025%). Les interactions entre la CypA et la protéine N ont été analysées par Western Blot (**Figure 25**). La CypA a un poids moléculaire de 18 kDa et la protéine N du HCoV-229E, 44 kDa.

Les résultats montrent que la CypA interagit avec elle-même et s'oligomérisise. L'Alv semble diminuer l'interaction entre les monomères de CypA tandis que le F836 semble favoriser la dimérisation de celle-ci. Enfin, il semblerait que le F836 favorise l'interaction entre la protéine N du virus HCoV-229E et la CypA.



**Figure 25 :** Le composé F836 favorise l'interaction de la CypA avec la protéine N du virus HCoV-229E– La cyclophiline A et la protéine N ont été incubées en présence de F836 ou d'Alv. A) Révélation avec l'anticorps anti-CypA B) Révélation avec l'anticorps anti-N

La même expérience a été réalisée avec la protéine N du SARS-CoV-2 et les mêmes résultats que pour HCoV-229E ont été observés. Le composé F836 favorise l'interaction entre la protéine N du virus SARS-CoV-2 et la cyclophiline A (**Figure 26**).



**Figure 26 : Interaction de la CypA avec la protéine N du virus SARS-CoV-2 rompue par le F836 – La cyclophiline A et la protéine N ont été incubées en présence de F836 ou d'Alv. A) Révélation avec l'anticorps anti-CypA B) Révélation avec l'anticorps anti-N**

### III) Repositionnement de drogues pour la lutte contre l'infection par le SARS-CoV-2

A la fin de l'année 2019, le coronavirus SARS-CoV-2 a émergé en Chine. Très rapidement le virus s'est répandue sur toute la planète et la recherche d'un traitement efficace est devenu une priorité internationale. Au début de l'année 2020 nous avons entamé une stratégie de repositionnement de drogues afin de lutter contre l'infection par le SARS-CoV-2.

#### A) Alisporivir

Inhibition of SARS-CoV-2 Infection by the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir (Debio 025)

**Laurent Softic**, Rozenn Brillet, François Berry, Nazim Ahnou, Quentin Nevers, Margot Morin-Dewaele, Sabah Hamadat, Patrice Bruscella, Slim Fourati, Jean-Michel Pawlotsky, Abdelhakim Ahmed-Belkacem

Nous avons commencé par étudier l'effet de l'alisporivir sur l'infection par le SARS-CoV-2. En effet l'alisporivir était connu pour avoir un effet antiviral *in vitro* sur les coronavirus. Celui-ci a également été jusqu'en phase 3 d'essai clinique dans le traitement contre le virus de l'hépatite C mais a été arrêté car, administré en association avec du peginterféron- $\alpha$ 2a et de la ribavirine, le traitement a engendré cinq pancréatites dont une mortelle. Il n'était cependant pas responsable de toxicité lorsqu'administré seul, ce qui en faisait un candidat crédible pour lutter contre la Covid-19 face à la pénurie de solutions thérapeutiques.

Nous avons tout d'abord montré, par RT-qPCR, l'activité antivirale dose-dépendante de l'alisporivir *in vitro* en comparaison à la chloroquine (contrôle positif de l'inhibition de la réplication du SARS-CoV-2) ce qui nous a permis de calculer une  $EC_{50} = 0,46 \pm 0,04\mu\text{M}$  pour l'alisporivir et de  $0,35 \pm 0,02\mu\text{M}$  pour la chloroquine.

Grâce à un test de cytotoxicité nous avons pu calculer la  $CC_{50}$  des composés et aucune des deux drogues ne montre de toxicité avant la concentration de  $20\mu\text{M}$ . Ces résultats nous ont permis de calculer l'index thérapeutique de l'alisporivir  $>43$  et de la chloroquine  $>57$ .

Nous avons confirmé les résultats obtenus par mesure de l'ARN par RT-qPCR, précédemment décrit, grâce à la technique d'immunofluorescence et à un anticorps primaire anti-ARNdb. L'alisporivir inhibe de manière dose dépendante le nombre de cellules infectées par le SARS-CoV-2 avec une inhibition complète à  $10\mu\text{M}$ .

Par la suite nous avons déterminé l'étape du cycle viral du SARS-CoV-2 ciblée par l'alisporivir toujours en comparaison à la chloroquine qui est connue pour inhiber l'entrée par la voie endosomale. Nous avons tout d'abord infecté des cellules VERO E6 pendant 2h en présence d'alisporivir ou de chloroquine. Après lavage, les cellules ont été incubées 7 heures supplémentaires en présence de milieux frais sans composés. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées grâce à un anticorps anti-ARNdb. Aucune cellule n'était infectée dans la condition traitée à la chloroquine comme prévu, contrairement à l'alisporivir qui n'inhibe visiblement pas une étape d'entrée.

Ces résultats ont été confirmés par un test de temps d'ajout montrant que la chloroquine perdait son effet lorsqu'elle était ajoutée 3h post infection alors que l'alisporivir perdait son effet 6h post infection, suggérant que l'alisporivir inhibe une étape post entrée du cycle de vie du SARS-CoV-2.

Notre étude a montré que l'alisporivir avait un effet anti-SARS-CoV-2 similaire à la chloroquine in vitro avec une  $EC_{50}$  de  $0,46 \pm 0,04\mu\text{M}$  et de  $0,35 \pm 0,02\mu\text{M}$ , respectivement. L'étape ciblée par l'alisporivir est plus tardive que pour la chloroquine (post-entrée).

En plus d'avoir une activité antivirale l'alisporivir pourrait avoir un effet protecteur sur les lésions causées par le virus par son inhibition de la CypD, impliquée dans l'ouverture du mPTP et donc de la mort cellulaire par apoptose. L'inhibition de la cyclophiline D a été bénéfique dans de nombreuses pathologies différentes :

cardiaques, rénales et hépatiques. Les inhibiteurs de cyclophilines apparaissent donc comme une voie thérapeutique potentielle pour lutter contre l'infection par le SARS-Cov2 par une activité antivirale et/ou par une activité protectrice des lésions pulmonaires.



## Inhibition of SARS-CoV-2 Infection by the Cyclophilin Inhibitor Alisporivir (Debio 025)

Laurent Softic,<sup>a</sup> Rozenn Brillet,<sup>a</sup> François Berry,<sup>a</sup> Nazim Ahnou,<sup>a</sup> Quentin Nevers,<sup>a</sup> Margot Morin-Dewaele,<sup>a</sup> Sabah Hamadat,<sup>a</sup> Patrice Bruscella,<sup>a</sup>  Slim Fourati,<sup>a,b</sup>  Jean-Michel Pawlotsky,<sup>a,b</sup>  Abdelhakim Ahmed-Belkacem<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Team "Viruses, Hepatology, Cancer," Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, Créteil, France

<sup>b</sup>Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

**ABSTRACT** Cyclophilins play a key role in the life cycle of coronaviruses. Alisporivir (Debio 025) is a nonimmunosuppressive analogue of cyclosporine with potent cyclophilin inhibition properties. Alisporivir reduced SARS-CoV-2 RNA production in a dose-dependent manner in Vero E6 cells, with a 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) of 0.46 ± 0.04 μM. Alisporivir inhibited a postentry step of the SARS-CoV-2 life cycle. These results justify rapidly conducting a proof-of-concept phase 2 trial with alisporivir in patients with SARS-CoV-2 infection.

**KEYWORDS** SARS-CoV-2, alisporivir, antiviral, cyclophilin

In December 2019, an outbreak of pneumonia emerged in the Chinese city of Wuhan. A novel coronavirus was identified as the pathogen causing the disease, named COVID-19 (for coronavirus disease 2019). This new virus was called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) because of its genetic proximity to SARS-CoV. At the time of writing, over 3.5 million people have been diagnosed with COVID-19 worldwide, while over 250,000 of them have died from complications of the disease.

Currently, there are no vaccines or effective antiviral drugs targeting SARS-CoV-2. A pragmatic approach is to assess whether drugs that are approved for other indications or have reached late clinical developmental stages are effective against SARS-CoV-2 and could be rapidly repurposed for this indication. For instance, chloroquine has been shown to bear potent antiviral properties against SARS-CoV-2 *in vitro*, and several clinical trials are under way to assess its efficacy in patients with COVID-19. The nucleotide analogues remdesivir and favipiravir, as well as the antiretroviral drug lopinavir in combination with ritonavir, are also under clinical investigation.

Cyclophilins are cellular peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases that catalyze the interconversion of the two energetically preferred conformers of the planar peptide bond preceding an internal proline residue. Cyclophilins play a key role in the life cycle of many coronaviruses, including human coronaviruses 229E (HCoV-229E) and NL-63 (HCoV-NL63), feline infectious peritonitis coronavirus (FIPV), SARS-CoV, and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) (1–7). Cyclosporine A (CsA), a potent cyclophilin inhibitor, blocks the replication of various coronaviruses *in vitro*, including HCoV-229E, HCoV-NL63, FIPV, mouse hepatitis virus (MHV), avian infectious bronchitis virus, and SARS-CoV (5, 8–10). However, CsA cannot be used in patients with COVID-19 because of its strong immunosuppressive properties.

Alisporivir (Debio 025) is a nonimmunosuppressive analogue of CsA that potently inhibits cyclophilins. Alisporivir has been administered to more than 1,800 patients with chronic hepatitis C virus infection in phase 2 and 3 clinical trials, alone or in combination with pegylated interferon alpha and/or ribavirin. *In vitro*, alisporivir inhibits the

**Citation** Softic L, Brillet R, Berry F, Ahnou N, Nevers Q, Morin-Dewaele M, Hamadat S, Bruscella P, Fourati S, Pawlotsky J-M, Ahmed-Belkacem A. 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 infection by the cyclophilin inhibitor alisporivir (Debio 025). *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00876-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00876-20>.

**Copyright** © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

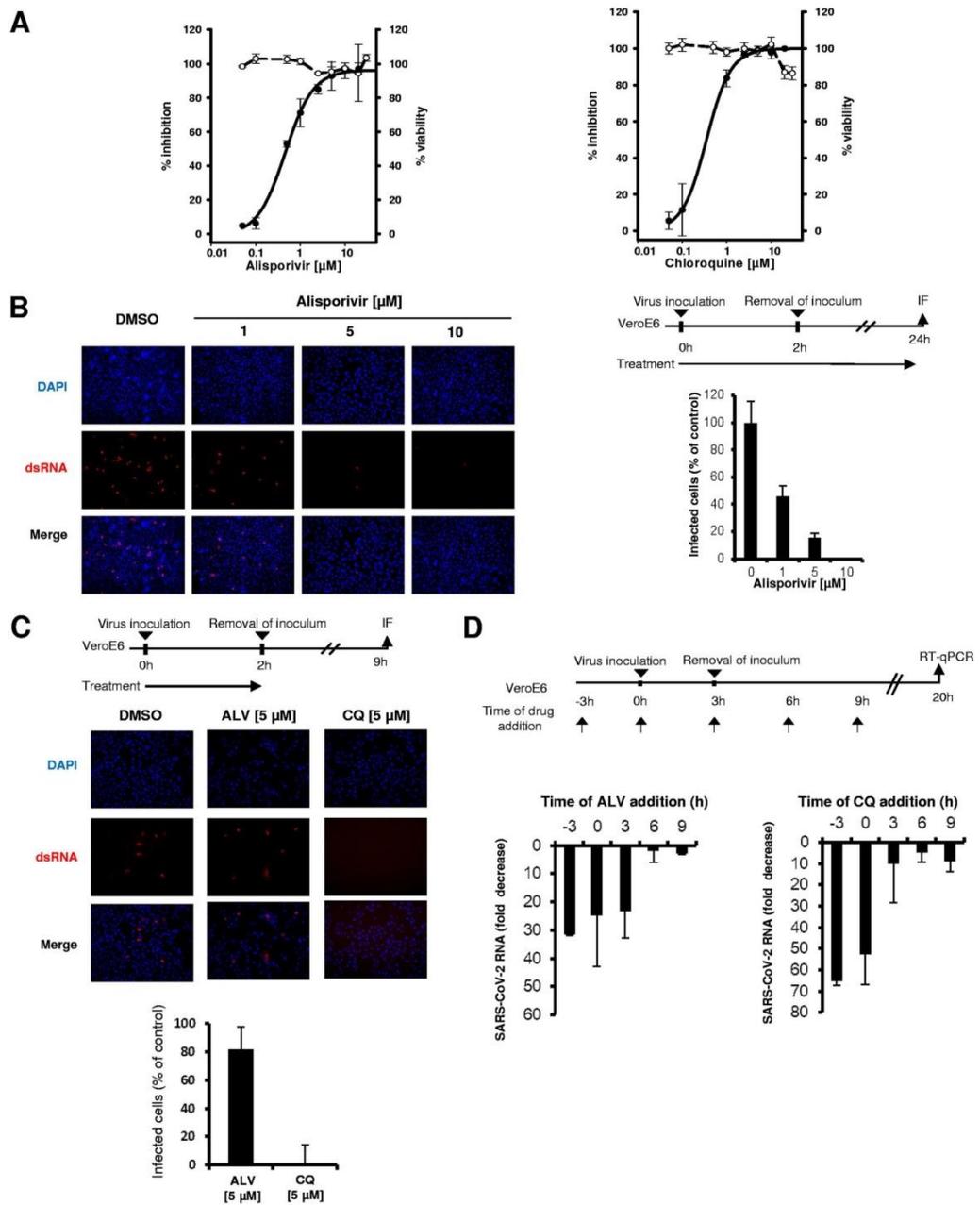
Address correspondence to Jean-Michel Pawlotsky, [jean-michel.pawlotsky@aphp.fr](mailto:jean-michel.pawlotsky@aphp.fr).

**Received** 3 May 2020

**Accepted** 4 May 2020

**Accepted manuscript posted online** 6 May 2020

**Published** 23 June 2020



**FIG 1** Antiviral activity of alisporivir against SARS-CoV-2. The means  $\pm$  standard deviations from 2 experiments performed in triplicate are shown. (A) Vero E6 cells were infected for 2 h with a SARS-CoV-2 clinical isolate at an MOI of 0.02 in the presence of increasing concentrations of alisporivir (left) or chloroquine (right). Cells were incubated for 48 h in the presence of the compounds, and SARS-CoV-2 RNA was quantified in cell supernatants by RT-qPCR (solid lines). Cell viability is shown with dashed lines. (B) SARS-CoV-2 infection of Vero E6 cells at an MOI of 0.4 assessed by immunofluorescence using anti-dsRNA

(Continued on next page)

philin D, a key regulator of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, a mechanism involved in triggering cell death. Therefore, besides its antiviral properties, alisporivir may also be effective in preventing lung tissue damage. A phase 2, proof-of-concept trial with alisporivir in patients with COVID-19 is planned to start very soon.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale and the Agence Nationale de la Recherche, Call ANR FLASH COVID-19.

Alisporivir was kindly provided by Debiopharm, Lausanne, Switzerland.

S.F. has served as an advisor and/or speaker for Abbvie; J.-M.P. has served as an advisor and/or speaker for Abbvie, Gilead, Merck, and Siemens Healthcare; A.A.-B. has served as a speaker for Abbvie.

#### REFERENCES

- Carbajo-Lozoya J, Ma-Lauer Y, Malešević M, Theuerkorn M, Kahlert V, Prell E, von Brunn B, Muth D, Baumert TF, Drosten C, Fischer G, von Brunn A. 2014. Human coronavirus NL63 replication is cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine A-derivatives including alisporivir. *Virus Res* 184:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.010>.
- Chen Z, Mi L, Xu J, Yu J, Wang X, Jiang J, Xing J, Shang P, Qian A, Li Y, Shaw PX, Wang J, Duan S, Ding J, Fan C, Zhang Y, Yang Y, Yu X, Feng Q, Li B, Yao X, Zhang Z, Li L, Xue X, Zhu P. 2005. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis* 191:755–760. <https://doi.org/10.1086/427811>.
- de Wilde AH, Pham U, Posthuma CC, Snijder EJ. 2018. Cyclophilins and cyclophilin inhibitors in nidovirus replication. *Virology* 522:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.011>.
- Luo C, Luo H, Zheng S, Gui C, Yue L, Yu C, Sun T, He P, Chen J, Shen J, Luo X, Li Y, Liu H, Bai D, Shen J, Yang Y, Li F, Zuo J, Hilgenfeld R, Pei G, Chen K, Shen X, Jiang H. 2004. Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun* 321:557–565. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.003>.
- Pfefferle S, Schöpf J, Kögl M, Friedel CC, Müller MA, Carbajo-Lozoya J, Stellberger T, von Dall'Armí E, Herzog P, Kallies S, Niemeyer D, Ditt V, Kuri T, Züst R, Pumpor K, Hilgenfeld R, Schwarz F, Zimmer R, Steffen I, Weber F, Thiel V, Herrler G, Thiel H-J, Schwegmann-Wessels C, Pöhlmann S, Haas J, Drosten C, von Brunn A. 2011. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog* 7:e1002331. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002331>.
- Tanaka Y, Sato Y, Sasaki T. 2017. Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. *J Gen Virol* 98:190–200. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000663>.
- von Brunn A, Ciesek S, von Brunn B, Carbajo-Lozoya J. 2015. Genetic deficiency and polymorphisms of cyclophilin A reveal its essential role for human coronavirus 229E replication. *Curr Opin Virol* 14: 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.004>.
- de Wilde AH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Thiel V, Narayanan K, Makino S, Snijder EJ, van Hemert MJ. 2011. Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses. *J Gen Virol* 92:2542–2548. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034983-0>.
- Tanaka Y, Sato Y, Osawa S, Inoue M, Tanaka S, Sasaki T. 2012. Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A. *Vet Res* 43:41. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-41>.
- Ma-Lauer Y, Zheng Y, Malešević M, von Brunn B, Fischer G, von Brunn A. 2020. Influences of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives on cellular cyclophilins and viral nucleocapsid protein during human coronavirus 229E replication. *Antiviral Res* 173:104620. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104620>.
- de Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, Posthuma CC, Feldmann H, Perlman S, Snijder EJ. 2017. Alisporivir inhibits MERS- and SARS-coronavirus replication in cell culture, but not SARS-coronavirus infection in a mouse model. *Virus Res* 228:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.011>.
- Pawlotsky J-M, Flisiak R, Sarin SK, Rasenack J, Piratvisuth T, Chuang W-L, Peng C-Y, Foster GR, Shah S, Wedemeyer H, Hézode C, Zhang W, Wong KA, Li B, Avila C, Naoumov NV, VITAL-1 Study Team. 2015. Alisporivir plus ribavirin, interferon free or in combination with pegylated interferon, for hepatitis C virus genotype 2 or 3 infection. *Hepatology* 62:1013–1023. <https://doi.org/10.1002/hep.27960>.

## B) Ivermectine

Oral ivermectin for a scabies outbreak in a long-term-care facility: Potential value in preventing COVID-19 and associated mortality?

C. Bernigaud, D. Guillemot,\* A. Ahmed-Belkacem,\* L. Grimaldi-Bensouda, A. Lespine, F. Berry, **L. Softic**, C. Chenost, G. Do-Pham, B. Giraudeau, S. Fourati, and O. Chosidow

L'ivermectine est un anti-parasitaire très utilisée dans le traitement contre la gale. L'équipe de dermatologues du Pr. Chosidow de l'Hôpital Henri Mondor a observé un effet positif de l'ivermectine orale, utilisée dans le cas d'une épidémie de gale dans un centre de soin pour personnes âgées, sur le taux, la sévérité et le décès lié au SARS-CoV-2.

Dans le cas de cette étude, le travail qui a été confié à notre équipe a été de confirmer les résultats de l'ivermectine in vitro et de tester la moxidectine qui est également un anti-parasitaire qui possède une demi-vie plasmatique plus longue.

Nous avons commencé par déterminer les EC50 des deux composés. Pour cela nous avons infecté des cellules Vero E6 à MOI 0.05 pendant 48h en présence de concentrations croissantes de drogues. La production virale a été mesurée par RT-qPCR et a permis de déterminer une EC50 de  $0.14 \pm 0.2 \mu\text{M}$  avec un maximum de réduction de l'ARN viral de 54846 fois à  $5 \mu\text{M}$  pour l'ivermectine et une EC50 de  $0.48 \pm 0.08 \mu\text{M}$  avec un maximum de réduction de 19074 fois à  $5 \mu\text{M}$  pour la moxidectine.

Nous avons confirmé ces résultats par immunofluorescence en infectant des cellules VERO E6 à MOI 0.3 pendant 24h en présence de concentrations croissantes de drogues. L'ARN double brin a été marqué pour pouvoir observer et quantifier l'infection. L'ivermectine et la moxidectine diminuent de manière dose dépendante

l'infection par le SARS-CoV-2 avec une inhibition complète à 2.5  $\mu$ M pour chacune des molécules.

Un test de temps d'ajout a également été réalisé pour identifier l'étape du cycle viral ciblé par les deux molécules. Les drogues ont été ajoutées 0h, 3h, 6h ou 9h post-infection. Les résultats ont montré que l'ivermectine et la moxidectine perdent une grande partie de leur activité lorsqu'elles sont ajoutées 3h post infection ce qui suggère que les deux molécules ciblent une étape précoce du cycle viral du SARS-CoV-2.

Cette étude confirme et caractérise l'effet antiviral de l'ivermectine sur le SARS-CoV-2 in vitro. Elle permet également de caractériser l'effet antiviral de la moxidectine, un autre anti-parasitaire dont les résultats in vitro sont semblables à ceux de l'ivermectine. Bien que la preuve formelle que les patients du centre de soins pour personnes âgées soient infectés par le SARS-CoV-2 ne soit pas totalement établis, elle permet de soulever l'intérêt à la fois de l'ivermectine comme traitement potentiel à la covid-19, mais aussi du concept d'un traitement en prophylaxie.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Disclosure Statement**

CUST\_CONFLICTS\_OF\_INTEREST\_TO\_DECLARE :No data available.

For Peer Review

## ORIGINAL ARTICLE - BJD

**Oral ivermectin for a scabies outbreak in a long-term-care facility: Potential value in preventing COVID-19 and associated mortality?**

C. Bernigaud,<sup>1,2</sup> D. Guillemot,<sup>3,4,5,\*</sup> A. Ahmed-Belkacem,<sup>6,\*</sup> L. Grimaldi-Bensouda,<sup>3,4,†</sup> A. Lespine,<sup>7,†</sup> F. Berry,<sup>6</sup> L. Softic,<sup>6</sup> C. Chenost,<sup>8</sup> G. Do-Pham,<sup>9</sup> B. Giraudeau,<sup>10,§</sup> S. Fourati,<sup>6,11,§</sup> and O. Chosidow<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Santé de Créteil et Service de Dermatologie, APHP, Hôpital Henri-Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

<sup>2</sup>Research Group Dynamic, EA7380, Faculté de Santé de Créteil, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, USC ANSES, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, CESP, Anti-Infective Evasion and Pharmacoepidemiology Team, Montigny-Le-Bretonneux, France

<sup>4</sup>APHP, Paris-Saclay, Public Health, Medical Information, Clinical Research, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>5</sup>Institut Pasteur, Epidemiology and Modelling of Antibiotic Evasion (EMAE), Paris, France

<sup>6</sup>INSERM U955, Université de Santé, Paris-Est, Créteil, France

<sup>7</sup>INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

<sup>8</sup>Long-Term-Care Facility Chief Medical Officer, Seine-et-Marne, France

<sup>9</sup>Service de Médecine Interne, Centre Intercommunal de Créteil, Créteil, France

<sup>10</sup>UMR SPHERE Inserm U1246, Université de Tours, Université de Nantes, & INSERM CIC1415, CHRU de Tours, Tours, France

<sup>11</sup>Faculté de Santé de Créteil et Laboratoire de Virologie, APHP, Hôpital Henri-Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

\*,†, § Equal contribution

**Correspondence:** Charlotte Bernigaud and Olivier Chosidow.

E-mails: [charlotte.bernigaud@aphp.fr](mailto:charlotte.bernigaud@aphp.fr); [olivier.chosidow@aphp.fr](mailto:olivier.chosidow@aphp.fr)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

***Running head:* Positive effect of ivermectin used for a scabies outbreak in COVID-19**

**Manuscript words: 1581/3000**

**Abstract count: 239/250**

**Number of references: 17**

**Number of Figures: 3**

**Number of Table: 2**

***Key words:* ivermectin; moxidectin; COVID-19; SARS-CoV-2; long-term-care facility**

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Bulleled statements

#### What's already known about this topic?

- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), leading to COVID-19, emerged in December 2019.
- Age is the major risk factor for severe disease and death, and residents in long-term-care facilities with chronic underlying comorbidities are particularly vulnerable.
- Ivermectin, was identified by an Australian research team to be an interesting candidate *in vitro*, inhibiting SARS-CoV-2 replication.
- Moxidectin, another macrocyclic lactone, with a longer plasma half-life, could be promising.

#### What does this study add?

- We report a positive outcome of oral ivermectin used during a scabies outbreak in a LTCF on COVID-19 rate, severity and associated death.
- We also confirmed that both ivermectin and moxidectin had strong *in-vitro* activities against SARS-CoV-2, at concentrations suitable for their use *in-vivo*.
- Both drugs are appropriate candidates for the prevention of COVID-19. Further studies are needed.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUMMARY

*Background* Residents living in long-term-care facilities (LTCFs) are at high-risk of severe COVID-19.

*Objectives* To report the effect of oral ivermectin used for a LTCF scabies-outbreak on COVID-19 rate, severity and associated death.

*Methods* A patient with profuse scabies was hospitalized and randomized in a RCT (NCT02841215) to receive ivermectin 400 or 200 µg/kg blinded (Days 0-7-14). The resident came back and ivermectin was dispensed to the whole LTCF-A (n=121). During the outbreak, confirmed/suspected COVID-19 cases were identified; risk factors for mortality recorded. COVID-19 rates and deaths in LTCF-A were compared with control LTCFs in the same county (i.e. Seine-et-Marne-County; comparable in residents age partition, fees and LTCF-size). Anti-SARS-CoV-2 *in-vitro* activity of ivermectin (concentrations 0.05-10µM) was also assessed by RNA quantification and immunofluorescence.

*Results* 69 residents (median age 90, 78.3% women, 98.6% with at least one risk factor for severe COVID-19) and 52 staffs received ivermectin. Eleven persons presented confirmed and/or suspected COVID-19 (7/69 residents and 4/52 staff, frequency 10.1%). 90.9% (10/11) had minor COVID-19, no hospitalization and no death was recorded. Among the 177 LTCFs in Seine-et-Marne County, 45 were included as controls with 3,062 residents (median age 86.2, 77.3% women): 22.6% had COVID-19 (*v.s.* 1.4% in LTCF-A) with attributable mortality of 4.9% [95% CI 3.2-6.5]. The virological study confirmed a major *in vitro* antiviral activity with ivermectin EC<sub>50</sub> at 0.14 ± 0.02 µM.

*Conclusions* Plausible role of ivermectin against COVID-19 should be confirmed by further studies.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUCTION

Severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the cause of COVID-19, emerged in December 2019,<sup>1</sup> triggering a global pandemic. Among >52 million COVID-19 cases reported worldwide,<sup>2</sup> 14% are severe and 5% critical, with a general population case-fatality rate of 1%.<sup>3</sup> Risk factors for severe disease and death including age >65 years, obesity, common chronic underlying comorbidities<sup>4</sup> make the elderly particularly vulnerable. Their mortality risk is high, especially in long-term-care facilities (LTCFs), where resident-staff contacts may facilitate transmission.<sup>5</sup> Specific therapeutic agents for COVID-19 remain sparse<sup>6</sup> and ivermectin, an antiparasitic inhibiting SARS-CoV-2 replication *in vitro*,<sup>7</sup> could be a potential candidate. Moxidectin, another macrocyclic lactone, with a longer plasma half-life, could be considered too.<sup>8</sup>

Here, we treated a scabies outbreak in LTCF-A residents and staff with oral ivermectin, concomitant with COVID-19 arrival. “Ivermectin-exposed” LTCF-A’s COVID-19 and mortality rates were compared to those of other county-wide LTCFs. *In vitro* ivermectin and moxidectin activities against SARS-CoV-2, were also studied in parallel.

## CASE REPORT

On 6 March 2020, a 66-year-old woman (Resident-1), with numerous comorbidities from LTCF-A (Seine-and-Marne County, in suburban Paris) was referred to our Dermatology Department for an extensive pruritic rash with sleep-disrupting itch. High-powered dermoscopy confirmed the profuse scabies diagnosis (Supplemental Figure S1). Taking advantage of an ongoing, double-blind, randomised-controlled trial (RCT; NCT02841215), comparing ivermectin (400 vs. 200 µg/kg, on days 0, 7 and 14) for crusted and profuse scabies, she was included and received per-protocol: the three oral ivermectin doses (exact dose blinded, weight 48 kilograms), 5% permethrin cream head-to-toe application (days 0 and

1  
2  
3 7) and emollient cream. LTCF-A identified three more residents (2 profuse scabies and 1  
4 classic scabies), residing on different floors, declaring an outbreak. They were treated  
5 accordingly; all remaining LTCF-A residents and staff (n= 117), were also treated  
6 simultaneously with ivermectin (200 µg/kg, given 7 days apart, starting March 10).<sup>9</sup> Resident-  
7  
8 I returned to LTCF-A on March 17, 2020, due to COVID-19 hospital reorganisation.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 MATERIALS AND METHODS

### 18 *Study oversight*

19 Signed informed consent was obtained from participants or their legal guardians for RCT-  
20 participating patients. In accordance with French law, other participants were informed of the  
21 use of their medical data with no change of standard care, and that their participation was  
22 voluntary; they could refuse but none did, and oral consent was noted in their medical charts.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 *COVID-19 epidemiology: ivermectin-exposed LTCF-A vs. county-wide LTCFs*

34 All LTCF-A residents' and staff's confirmed or suspected COVID-19 cases (March 5–May  
35 15, 2020) were identified, as follows, respectively: real-time, reverse-transcriptase–  
36 polymerase-chain-reaction (RT-PCR, BPR AS, Pannes, France) detected SARS-CoV-2 RNA  
37 on nasopharyngeal swabs, or based on the European Center for Disease Prevention and  
38 Control guidance ([https://www.ecdc.europa.eu/en/case-definition-and-european-surveillance-  
39 human-infection-novel-coronavirus-2019-ncov](https://www.ecdc.europa.eu/en/case-definition-and-european-surveillance-human-infection-novel-coronavirus-2019-ncov)). For some suspected cases with a negative  
40 first RT-PCR, another nasopharyngeal sample was collected. LTCF-A residents'  
41 demographics, potential severe COVID-19 risk factors<sup>4</sup> and initial manifestations,  
42 concomitant medication(s), COVID-19 severity (mild, moderate, severe or critical) at peak of  
43 disease activity<sup>4,10</sup> were recorded in electronic charts. All COVID-19 treatments, including  
44 oxygen supplementation, time to clinical improvement and clinical outcomes (i.e., recovery  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 with resumption of normal activities, hospitalization, or death) were recorded.  
4

5 All suspected and confirmed COVID-19 cases and deaths in all other LTCFs in Seine-and-  
6  
7 Marne-County were systematically declared in a national online database by law  
8  
9  
10 (<https://signalement.social-sante.gouv.fr>) from April 5–May 15, 2020 (no prior data  
11  
12 available). The Agence Régionale de Santé–Ile-de-France  
13  
14 (<https://www.iledefrance.ars.sante.fr/>) provided compiled county-wide data. We first  
15  
16 identified all other county-wide LTCFs, retaining only LTCFs with comparable fees, i.e., only  
17  
18 partial French National Health Insurance reimbursements, to avoid economic level  
19  
20 discrimination; those that completed the national declaration; and facilities accommodating  
21  
22 50–90 residents, like LTCF-A, to account for density-associated COVID-19 dissemination.  
23  
24 All remaining LTCFs provided aggregated demographic data (age and sex) to account for  
25  
26 their demographic pattern. Each retained LTCF—except LTCF-A—was considered a cluster.  
27  
28 R, v6.1.2, software with function (svyquantile) of library (survey) was used to estimate  
29  
30 COVID-19 and mortality rates, and their distributions.  
31  
32 The main assessments were LTCF-A residents' COVID-19 rate, defined as the number of  
33  
34 suspected and confirmed cases divided by the number of residents; and their COVID-19  
35  
36 mortality rate vs. that of other LTCFs.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

#### 46 ***In-vitro antiviral activities against SARS-CoV-2***

47 In parallel, *in vitro* ivermectin and moxidectin activities against SARS-CoV-2 were evaluated  
48  
49 (see details in Supplementary Appendix). Briefly, VeroE6-monkey-kidney cells were infected  
50  
51 with SARS-CoV-2/Mondor/M80, a clinical strain isolated at our hospital. To determine *in*  
52  
53 *vitro* antiviral activities, ivermectin and moxidectin concentrations (range, 0.05–10  $\mu$ M) were  
54  
55 incubated with VeroE6, with cell viability controlled at each step, and immunofluorescence  
56  
57 and time-of-drug-addition assays.  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### *COVID-19 epidemiology: ivermectin-exposed LTCF-A vs. county-wide LTCFs*

Between 5 March and 15 May, 2020, 69 LTCF-A residents, including Resident-1, and 52 staff received ivermectin (Figure 1). Residents' characteristics, demographics and risk factors for severe COVID-19 are reported in Table 1. Their median age was 90 (IQR 84–94) years and 78.3% were female. On March 19, 2020 Resident-1 developed a cough, fever, headache, diarrhoea, fatigue and shortness of breath not requiring oxygen. Six days later, her nasopharyngeal swab tested positive for SARS-CoV-2; retesting on April 7, 2020 was negative. She recovered with symptoms disappearing by April 14, 2020. Following notification of that case, 6/69 residents and 4/52 staff developed manifestations suggestive of COVID-19 (Table 2). Only Resident-1 had a SARS-CoV-2–positive nasopharyngeal RT-PCR. The median COVID-19 onset-to-RT-PCR intervals were 4.5 (IQR 3–6) and 2.5 (IQR 1.8–3.3) days for residents and staff, respectively. Notably, 90.9% (n= 10/11) of suspected/confirmed COVID-19 cases were classified as mild (only Resident-1 was considered moderate): no oxygen supplementation, no hospitalisations and no deaths. All resident and staff cases recovered, with respective median symptom-onset-to-outcome intervals of 15 (IQR, 9.5–25.5) and 18.5 (IQR, 14.3–22.3) days. LTCF-A residents' COVID-19 rate was 10.1% (7/69); none died.

Among the 177 LTCFs identified in the Seine-and-Marne County, 45 county-wide LTCFs, housing 3,062 residents (median age, 86.2 (IQR, 87.4–88.8) years; 77.3% female), met study criteria (Supplemental Figure S2). From 5 April to 15 May, 2020, a mean of 22.6% (95% confidence interval [CI], 16.3%– 28.9%) of them acquired COVID-19, with attributed mortality at 4.9% (95% CI, 3.2%–6.5%) vs. LTCF-A's mean COVID-19 rate of 1.4%. Figure 2 shows the COVID-19 –rate distribution for all LTCFs.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### ***In vitro antiviral activities***

As shown in Figure 3 (Panels A–F, respectively), ivermectin and moxidectin lowered SARS-CoV-2–RNA, with  $EC_{50}$ s of  $0.14 \pm 0.02 \mu\text{M}$  and  $0.48 \pm 0.08 \mu\text{M}$ , respectively and maximum inhibition at  $5 \mu\text{M}$ : 54,846- and 19,074-fold, respectively, without affecting cell viability; dose-dependently limited numbers of SARS-CoV-2–infected cells; obtained complete SARS-CoV-2–infection inhibition at  $2.5 \mu\text{M}$ ; and, when added 3-hours post-infection (i.e., early during SARS-CoV-2 infection), no antiviral effect was seen.

### **DISCUSSION**

To control scabies, the entire LTCF-A population was given ivermectin while at the same time a COVID-19 outbreak was declared with 11 confirmed/suspected cases. During the study period, no ivermectin-exposed LTCF-A person developed severe COVID-19, was hospitalised or died, compared to 4.9% in county-wide LTCFs. The LTCF-A had one of the lowest mean COVID-19 rates (1.4%), three none *vs.* the 42 others county-wide (22.6%). Usually, once COVID-19 enters an LTCF—in any healthcare system—its rapid dissemination<sup>11</sup> is associated with a high risk of death, mainly because old age is the main risk factor for COVID-19 mortality.<sup>12</sup> An outbreak in 30 LTCFs (King and Snohomish Counties, Washington) showed high COVID-19 prevalence in residents, with 54.5% requiring hospitalization, and 33.7% mortality.<sup>5</sup> In England and Wales, 20,000 excess deaths were recorded in LTCF population in March and April 2020 (<https://www.ons.gov.uk>) and, in France, 36% of COVID-19–attributable deaths occurred in LTCFs at the time of the study (May, 2020; <https://www.santepubliquefrance.fr>).

Ivermectin is an antiparasitic drug that is used to treat neglected tropical diseases (i.e. onchocerciasis, helminthiasis, scabies), and is being evaluated for malaria control. We were aware of ivermectin’s potential anti-SARS-CoV-2 effect<sup>7</sup> and confirmed it on VeroE6-cells,

1  
2  
3 as well as moxidectin. The ivermectin  $EC_{50}$  that we found ( $0.14\mu M$  equivalent to  $0.12\mu g/mL$ )  
4  
5 was much lower than what was found by Caly *et al.* ( $IC_{50} \sim 2\mu M^7$ ). Considering maximum  
6  
7 plasma-ivermectin concentrations ( $0.26\pm 0.17\mu g/mL$ ) in healthy fed volunteers after a 400-  
8  
9  $\mu g/kilogram$  oral dose (30mg)<sup>13</sup> and the expected drug concentration in the lung ( $\sim 3$  times  
10  
11  $\mu g/mL$ )<sup>14</sup>, our findings would be within the therapeutic margin.<sup>15,16</sup> In our  
12  
13 observation, over 12 PCRs, some of those repeated, only one was positive. We acknowledge  
14  
15 that typical COVID-19 symptoms occurring among 10 during the COVID-19 epidemic may  
16  
17 lack of specificity. However, it would be surprising that symptoms could be due to another  
18  
19 infection, especially at that time of the year, knowing that LTCF-A was in part locked-down.  
20  
21 Indeed, it could suggest an action of ivermectin on an early phase of viral replication which  
22  
23 could have negated PCRs. Other populations might have benefited from ivermectin, as its  
24  
25 use was associated with lower in-hospital mortality in a multihospital retrospective cohort  
26  
27 study on 280 North American patients (ivermectin,  $n= 173$  (15%) *vs.* no ivermectin,  $n= 107$   
28  
29 (25.2%), OR 0.52, CI 0.29-0.96;  $p=0.03$ ).<sup>17</sup> Our study has both epidemiologic and virologic  
30  
31 limitations. It was limited to one ivermectin-exposed LTCF. Systematic PCR screening of all  
32  
33 residents and staff during and after drug exposure, and serologic testing are missing. Potential  
34  
35 confounders, habits and comorbidities, were not available and, thus, not controlled. Moreover,  
36  
37 LTCF-mortality data for such a short time in one county limits generalizability; and finally,  
38  
39 extrapolating *in vitro* antiviral effects against different coronaviruses to clinical efficacy  
40  
41 remains to be demonstrated.

42  
43 Although ivermectin's role in preventing LTCF-A residents' COVID-19 and mortality  
44  
45 rates is plausible, it remains an hypothesis and, further studies are needed to elucidate if  
46  
47 ivermectin is an appropriate candidate for the prevention of COVID-19.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Acknowledgments

The double-blind randomized-controlled trial (RCT GALECRUSTED; <https://clinicaltrials.gov>, NCT02841215) is funded by the French Ministry of Health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique, 2014 AOM14612) and supported by a grant from the French Society of Dermatology (March, 2019).

We would like to gratefully acknowledge all residents, healthcare workers, administrative staff of the long-term-care facility A and their directors for agreeing to participate in this report, and providing their technical support; Margaut Petignier, Agence Régionale de Santé Ile-de-France, for assistance in generating COVID-19 and mortality rates data in Seine-and-Marne County; all certified nurse assistants and administrative staff of the 45 long-term-care facilities that agreed to share their demographic information. We thank Saskia Ingen-Housz-Oro, Françoise Foulet, Audrey Colin, and nursing staff of the Dermatology Department, Henri-Mondor Hospital, Créteil, France, for their devoted patient care; Hayat Medjenah, Elie Guichard, Laetitia Grégoire, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé (AGEPS) pharmacists, administrative staff of the Unité de Recherche Clinique, Henri-Mondor Hospital, Créteil, for NCT02841215 RCT support; Françoise Botterel and Jacques Guillot for their assistance supervising preliminary laboratory work; Selim Aractingi, Jean-Philippe Derenne, Anaïs Farcet, Bruno Housset, Pascal del Giudice, Fatimata Ly, and Solène Makdessi for discussions and thoughtful advice; Anne-Claude Crémieux for the specific COVID-19 literature weekly review of APHP hospitals; and Janet Jacobson for editorial assistance.

### Conflicts of interest:

Drs. Charlotte Bernigaud and Olivier Chosidow act as unpaid scientific advisors for Medicines Development for Global Health. Olivier Chosidow is the principal investigator of the RCT

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

“Dose-finding Study of Moxidectin for Treatment of Scabies” (NCT03905265). Dr Giao Do-Pham is the principal investigator of the “Efficacy Study Between Two Different Dosages of an Antiparasitic in Patients With Crusted Scabies “GALECRUSTED” RCT (NCT02841215), Bruno Giraudeau the main statistician and Olivier Chosidow the scientific head. No other potential conflicts of interest were declared.

## REFERENCES

1. Zhu N, Zhang D, Wang W et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; **382**: 727–733.
2. Johns Hopkins University of Medicine. Coronavirus Resource Center - COVID-19 Dashboard - World Map, November 12, 2020. Available at : <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (last accessed 12 November 2020).
3. Jordan RE, Adab P, Cheng KK. COVID-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ* 2020; **368**: m1198.
4. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or Moderate COVID-19. *N Engl J Med* 2020; 10.1056/NEJMcp2009249.
5. McMichael TM, Currie DW, Clark S et al. Epidemiology of COVID-19 in a long-term care facility in King County, Washington. *N Engl J Med* 2020; **382**: 2005–2011.
6. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA* 2020; 10.1001/jama.2020.6019.
7. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. *Antiviral Res* 2020; **178**: 104787.
8. Mounsey KE, Bernigaud C, Chosidow O, McCarthy JS. Prospects for moxidectin as a new oral treatment for human scabies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; **10**: e0004389.
9. Chosidow O. Clinical practices. Scabies. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1718–1727.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020; 10.1001/jama.2020.2648.
11. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC *et al.* Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020; **382**: 2081–2090.
12. Williamson E, Walker AJ, Bhaskaran KJ *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 2020; **584**: 430–436.
13. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG *et al.* Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* 2002; **42**: 1122–1133.
14. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M, Lanusse C. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet Parasitol* 2000; **87**: 327–338.
15. Bray M, Rayner C, Noël F, Jans D, Wagstaff K. Ivermectin and COVID-19: A report in Antiviral Research, widespread interest, an FDA warning, two letters to the editor and the authors' responses. *Antiviral Res* 2020; **178**: 104805.
16. Navarro M, Camprubí D, Requena-Méndez A *et al.* Safety of high-dose ivermectin: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 827–834.
17. Cepelowicz Rajter J, Sherman M, Fatteh N *et al.* Use of Ivermectin is Associated with Lower Mortality in Hospitalized Patients with COVID-19 (ICON study). *Chest* 2020; S0012-3692(20)34898-4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.10.009>. Epub ahead of print.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### FIGURE LEGENDS

#### **Figure 1. Concomitant COVID-19 and ivermectin-treated scabies outbreak in a long-term-care facility.**

LTCF denotes long-term-care facility, IVM ivermectin, RT-PCR real-time reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction. The navy-blue timeline represents COVID-19-dictated closure coinciding with the scabies-outbreak onset in LTCF-A, located in Seine-and-Marne County, and the oral IVM treatments for the scabies-infested patients (n= 4) and their contacts (n= 117), for a total of 121 IVM-treated individuals, according to NCT 02841215 and current therapeutic recommendations on scabies. The bars below the timeline represent the different subjects with confirmed or suspected COVID-19 (LTCF-A residents and staff) and their lengths represent the durations of COVID-19 manifestations. RT-PCR (*RdRp*-gene, CT 36 and *N*-gene, CT 34) detected Resident-1's COVID-19 (yellow bar). As of 17 March, 2020, patients were isolated and staff was provided with appropriate personal protective equipment (<https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/guide-covid-19-phase-epidemiologique-v15-16032020.pdf>).

#### **Figure 2. Distribution of SARS-CoV-2-infection rates in 46 county-wide long-term-care facilities (LTCFs) in Seine-and-Marne County.**

The figure shows the infection-rate distributions in the 46 LTCFs included in the study, based on data from the Île-de-France Regional Health Agency. Ivermectin-exposed LTCF-A (dashed vertical line; 1.4%) had one of the lowest COVID-19 rates, with only five other LTCFs having lower ones; three had no COVID-19 cases. The green-filled area represents the infection density.

**Figure 3. *In Vitro* ivermectin and moxidectin antiviral activities against SARS-CoV-2.**

EC<sub>50/90</sub> denotes 50%/90% maximal effective concentration, DMSO dimethylsulfoxide, DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole, dsRNA, double-stranded ribonucleic acid; h, hour; RT-qPCR quantitative, real-time reverse-transcriptase–polymerase-chain reaction. VeroE6 cells were infected with an in-hospital SARS-CoV-2 clinical strain (SARS-CoV-2/Mondor/M80) at a multiplicity of infection (MOI)=0.05 in increasing ivermectin concentrations and moxidectin, and controls with DMSO. RT-qPCR detected SARS-CoV-2 RNA in cell supernatants and data were analyzed with the 2- $\Delta\Delta$ CT method. SARS-CoV-2–RNA relative quantities were plotted against drug concentrations and fitted to a four-parameter logistic curve with SigmaPlot v11 software. Panels A and B report the EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> determined from the curves and cell-viability percentages. Panel C shows immunofluorescence microscopy of SARS-CoV-2 infection after culturing cells for 24 hours post-plating, infected 2 hours with SARS-CoV-2/Mondor/M80 (MOI=0.4), incubated with indicated ivermectin or moxidectin concentrations or DMSO-control for 24 hours, then washing. Cells were exposed to primary Mouse Anti-dsRNA antibody “J2” and visualized with anti-mouse Goat anti-mouse Alexa Fluor 594 nm. Nuclei were stained with DAPI. Panel D shows infected cells quantified with ImageJ software. Panel E reports the percentages of virus-replication inhibition in the time-of-drug-addition experiment: ivermectin and moxidectin at 2.5  $\mu$ M were added 3 hours before (–3), or 0, 3, 6 or 9 hours after SARS-CoV-2 inoculation (MOI=1). Ivermectin and moxidectin lowered SARS-CoV-2–RNA, with EC<sub>50s</sub> of  $0.14 \pm 0.02 \mu$ M and  $0.48 \pm 0.08 \mu$ M, respectively and maximum inhibition at 5  $\mu$ M: 54,846- and 19,074-fold, respectively, without affecting cell viability; dose-dependently limited numbers of SARS-CoV-2–infected cells; obtained complete SARS-CoV-2–infection inhibition at 2.5  $\mu$ M; and, when added 3-hours post-infection (i.e., early during SARS-CoV-2 infection), no antiviral effect was seen.

**Table 1. Characteristics of all long-term-care facility-A's residents and their risk factors for severe COVID-19.**

Characteristic	All residents (N=69)	Suspected/confirmed COVID-19 (N=7)
Female sex — no. (%)	54 (78.3)	5 (71.4)
Age — yr		
Median age (IQR)	90 (84–94)	92 (86–93.5)
Distribution — no. (%)		
<60	0	0
61–70	2 (2.9)	1 (14.3)
71–80	4 (5.8)	0
81–90	30 (43.5)	2 (28.6)
91–100	32 (46.4)	4 (57.1)
>100	1 (1.4)	0
Mobility — no. (%)		
Mobile	23 (33.3)	1 (14.3)
Transfer with help	29 (42.0)	5 (71.4)
Bedbound	17 (24.6)	1 (14.3)
Dementia-associated wanderers	11 (15.9)	0
Continence — no. (%)		
Continent	25 (36.2)	2 (28.6)
Urinary incontinence	13 (18.8)	3 (42.9)
Fecal incontinence	0	0
Urinary and fecal incontinence	31 (44.9)	2 (28.6)
Dementia — no. (%)	46 (66.7)	5 (71.4)
Coexisting comorbidity risk factor for COVID-19 — no. (%)		
Any	1 (1.4)	0
Chronic respiratory disease	21 (30.4)	3 (42.9)
Diabetes	12 (17.4)	1 (14.3)
Hypertension	49 (71.0)	5 (71.4)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Chronic heart disease	40 (58)	7 (100)
Chronic kidney disease	24 (34.8)	4 (57.1)
Cerebrovascular disease	10 (14.5)	1 (14.3)
Immunodeficiency	2 (2.9)	0
Malignancy	16 (23.2)	0
Chronic gastrointestinal disease	3 (4.3)	1 (14.3)
Body mass index >30	10 (14.5)	0 (0)
Body mass index <18.5	14 (20.3)	1 (14.3)
Taking antihypertensive(s) (ACEI or ARB)	28 (40.6)	5 (71.4)
Active smokers — no. (%)	4 (5.8)	0
Scabies cases — no. (%)		
Suspected	1 (1.4)	1 (14.3)
Confirmed	3 (4.3)	1 (14.3)
COVID-19 cases — no. (%)		
Suspected	6 (8.7)	6 (85.7)
Confirmed	1 (1.4)	1 (14.3)

ACEIs denotes, angiotensin I-converting-enzyme inhibitor, ARBs, angiotensin II receptor blocker.

Long-term-care facility-A housed 69 residents and employed 52 staff. COVID-19 was diagnosed based on the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) guidance. Real-time, reverse-transcriptase-polymerase chain reaction detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs confirmed COVID-19. Suspected COVID-19 had to satisfy the ECDC case definition (<https://www.ecdc.europa.eu/en/case-definition-and-european-surveillance-human-infection-novel-coronavirus-2019-ncov>).

**Table 2. Characteristics of long-term-care facility-A residents and staff with suspected/confirmed COVID-19.**

Characteristic	Suspected/Confirmed COVID-19	
	Residents (N = 7)	Healthcare workers (N = 4)
Manifestation — no. (%)		
Fever	3 (42.9)	1 (25)
Conjunctival congestion	1 (14.3)	0
Nasal congestion	0	1 (25)
Headache	3 (42.9)	0
Anosmia	0	0
Cough	6 (85.7)	3 (75)
Sore throat	0	1 (25)
Sputum production	3 (42.9)	0
Fatigue	6 (85.7)	2 (50)
Hemoptysis	0	0
Shortness of breath	2 (28.6)	2 (50)
Nausea or vomiting	2 (28.6)	0
Diarrhea	5 (71.4)	3 (75)
Myalgias or arthralgias	0	0
Chills	1 (14.3)	2 (50)
Agitation/confusion	5 (71.4)	0
Positive RT-PCRs — no./total run	1/8	0/4
Median (IQR) illness-onset-to-RT-PCR — days	4.5 (3–6)	2.5 (1.75–3.25)
Range	0–26	1–4
Median (IQR) symptom-onset-to-outcome interval — days	15 (9.5–25.5)	18.5 (14.3–22.3)
Range	2–26	12–23
COVID-19 severity — no. (%)		
Mild	6 (85.7)	4 (100)

1

1			
2			
3	Moderate	1 (14.3)	0
4			
5	Severe	0	0
6			
7	Critical	0	0
8			
9	Treatment — no. (%)		
10	Oral antibiotics	2 (28.6)	0
11			
12	Intravenous antibiotics	1 (14.3)	0
13			
14	Systemic glucocorticoids	0	0
15			
16	Oxygen therapy	0	0
17			
18	Clinical outcomes — no. (%)		
19	Recovered/Healthy	7 (100)	4 (100)
20			
21	Hospitalized	0	0
22			
23	Admitted to ICU	0	0
24			
25	Died	0	0

RT-PCR denotes real-time reverse-transcriptase–polymerase-chain reaction, IQR interquartile range, ICU intensive care unit.

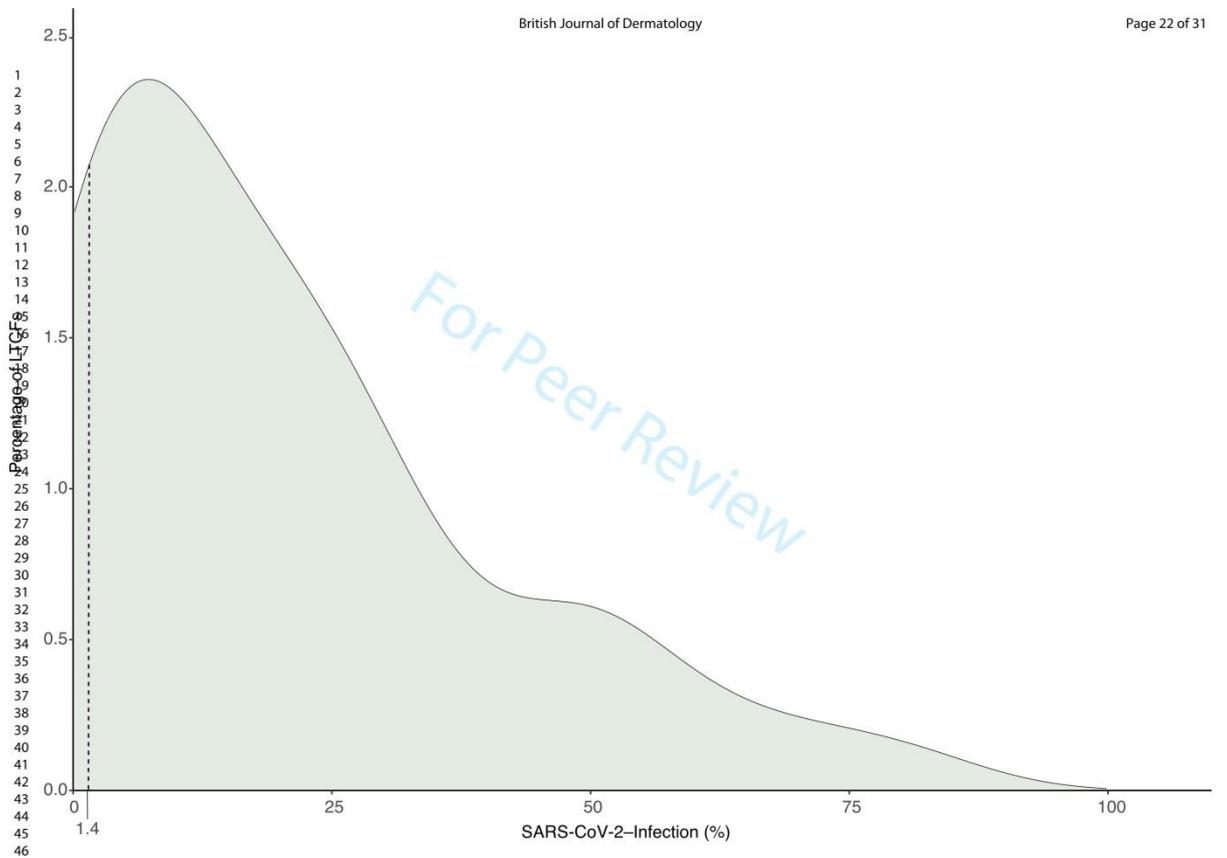
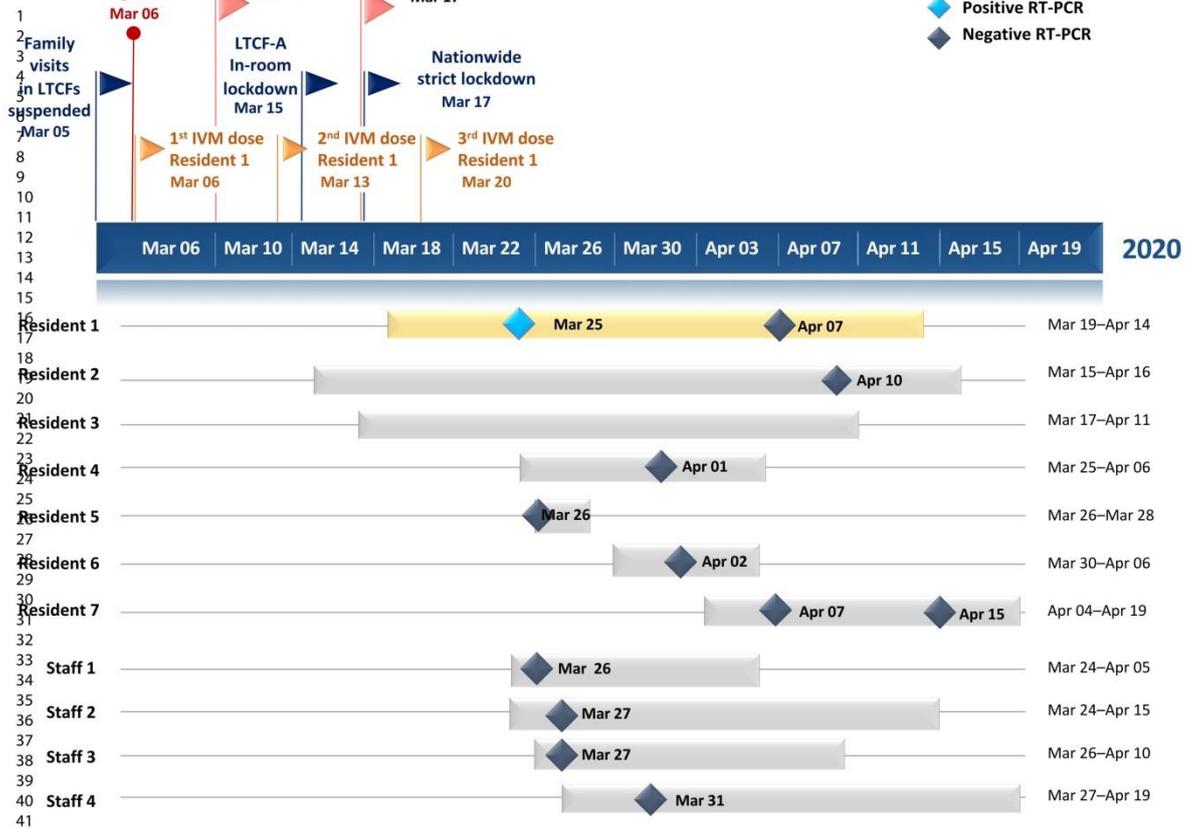
COVID-19 severity at its peak activity was defined as follows: mild: disease manifestations without pneumonia; moderate: symptoms with pneumonia; severe: pneumonia with dyspnea, tachypnea (respiratory rate frequency >30 breaths/minute), hypoxemia (blood oxygen saturation, <93%) and/or lung infiltrates (>50% of the lung field involved within 24–48 hours); and critical: respiratory failure, septic shock and/or multiple organ dysfunction or failure.

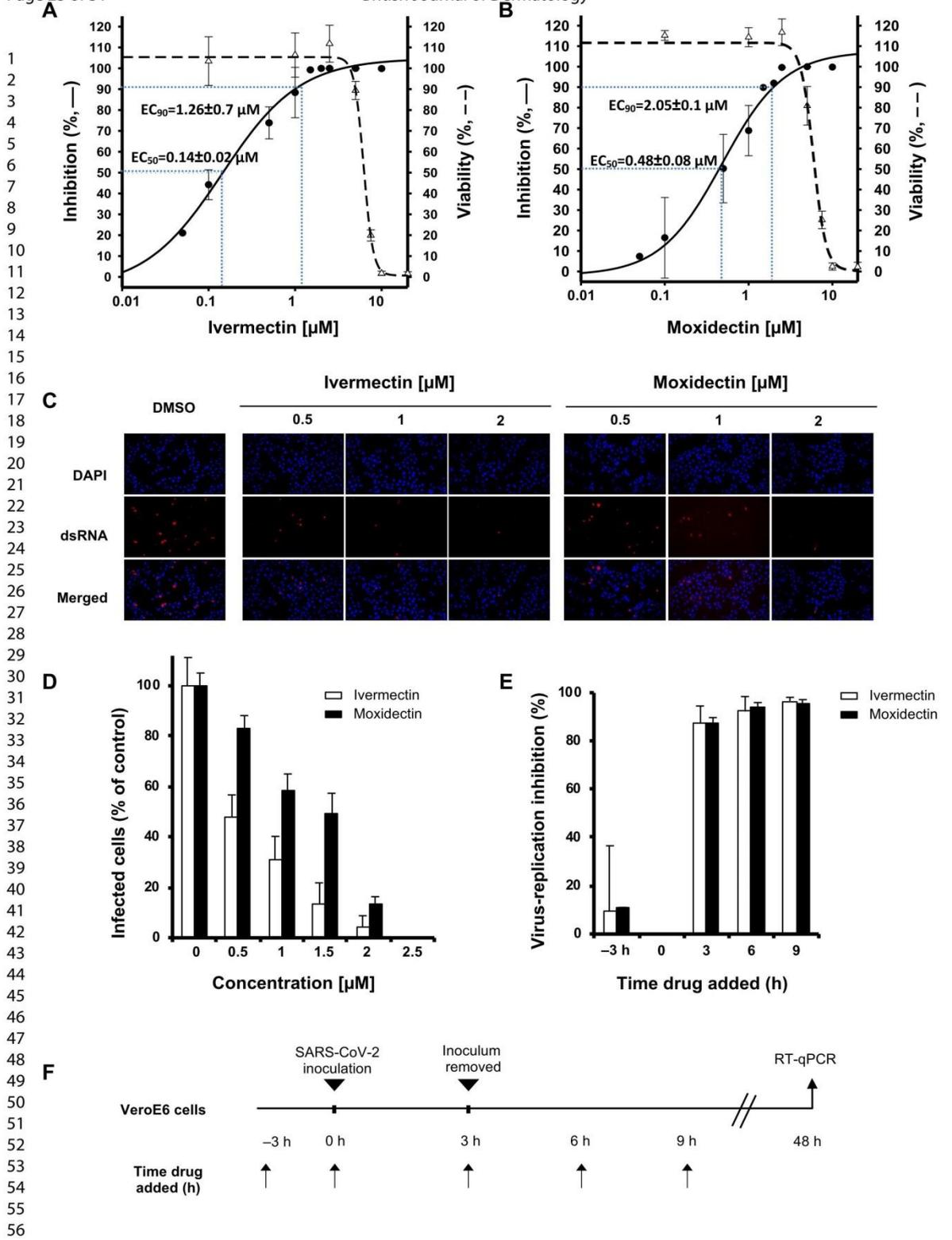
60

1

Scabies outbreak diagnosed Mar 06  
 1<sup>st</sup> IVM dose All LTCF-A Mar 10  
 2<sup>nd</sup> IVM dose All LTCF-A Mar 17

◆ Positive RT-PCR  
 ◆ Negative RT-PCR





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ORIGINAL ARTICLE - BJD

### Oral ivermectin for a scabies outbreak in a long-term-care facility: Potential value in preventing COVID-19 and associated mortality?

C. Bernigaud,<sup>1,2</sup> D. Guillemot,<sup>3,4,5,\*</sup> A. Ahmed-Belkacem,<sup>6,\*</sup> L. Grimaldi-Bensouda,<sup>3,4,†</sup> A. Lespine,<sup>7,†</sup> F. Berry,<sup>6</sup> L. Softic,<sup>6</sup> C. Chenost,<sup>8</sup> G. Do-Pham,<sup>9</sup> B. Giraudeau,<sup>10,§</sup> S. Fourati,<sup>6,11,§</sup> and O. Chosidow<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Santé de Créteil et Service de Dermatologie, APHP, Hôpital Henri-Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

<sup>2</sup>Research Group Dynamic, EA7380, Faculté de Santé de Créteil, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, USC ANSES, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, CESP, Anti-Infective Evasion and Pharmacoepidemiology Team, Montigny-Le-Bretonneux, France

<sup>4</sup>APHP, Paris-Saclay, Public Health, Medical Information, Clinical Research, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>5</sup>Institut Pasteur, Epidemiology and Modelling of Antibiotic Evasion (EMAE), Paris, France

<sup>6</sup>INSERM U955, Université de Santé, Paris-Est, Créteil, France

<sup>7</sup>INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

<sup>8</sup>Long-Term-Care Facility Chief Medical Officer, Seine-et-Marne, France

<sup>9</sup>Service de Médecine Interne, Centre Intercommunal de Créteil, Créteil, France

<sup>10</sup>UMR SPHERE Inserm U1246, Université de Tours, Université de Nantes, & INSERM CIC1415, CHRU de Tours, Tours, France

<sup>11</sup>Faculté de Santé de Créteil et Laboratoire de Virologie, APHP, Hôpital Henri-Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

\*,†, § Equal contribution

**Correspondence:** Charlotte Bernigaud and Olivier Chosidow.

E-mails: [charlotte.bernigaud@aphp.fr](mailto:charlotte.bernigaud@aphp.fr); [olivier.chosidow@aphp.fr](mailto:olivier.chosidow@aphp.fr)

**SUPPLEMENTARY APPENDIX**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**CONTENTS**

**CASE REPORT** ..... 3

**Figure S1. Scabies clinical and parasitologic presentations** ..... 3

**METHODS** ..... 4

***In Vitro* ivermectin and moxidectin antiviral activities against SARS-CoV-2** ..... 4

    Cell culture, virus strain..... 4

    VeroE6-cell infection and drug treatment ..... 4

    RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 ..... 4

    Immunofluorescence ..... 5

    Cytotoxicity assays ..... 5

    Time-of-drug-addition assay ..... 6

**RESULTS** ..... 7

**Figure S2. Flow chart of the Long-Term-Care Facilities (LTCFs) identified in Seine-and-Marne County meeting study criteria** .....7

**Supplementary appendix reference** ..... 7

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### CASE REPORT

Resident-1, a 66-year-old woman with numerous comorbidities, was hospitalized in our Dermatology Department for an extensive rash with sleep-disrupting itch (Supplementary Appendix Figure S1a). One month ago, “eczema” had been diagnosed and clobetasol propionate, a super-potent topical steroid, was applied. Lesions worsened, leading the LTCF-A to refer her to us (6 March, 2020). High-powered dermoscopy confirmed the profuse scabies diagnosis (Supplementary Appendix Figure S1b).<sup>1</sup>

She had been institutionalized 7 months earlier in long-term-care facility-A (LTCF-A), located in Seine-and-Marne County, in suburban Paris, because of severely impaired mobility and malnutrition, making it impossible for her to remain at home with her husband. Ten years prior to admission, bipolar disorder with psychotic features had been diagnosed and, more recently, dementia. Her other medical history includes chronic pulmonary disease due to numerous episodes of aspiration pneumonia, Takotsubo cardiomyopathy, stroke and a right hip, bone-and-joint infection necessitating several surgeries.

#### Figure S1. Scabies Clinical and Parasitologic Presentations.

The erythematous rash began with lesions on the arms and trunk, extending to the hands, legs, and feet. Dermatologic examination revealed a widespread erythematous eruption with inflammatory papules, visible on the trunk (Figure S1a). Figure S1b is a high-powered dermoscopy image of a mite’s burrow (magnification  $\times 80$ ) showing a “delta-wing jet” pattern. A female scabies mite is seen at the distal end of the burrow (black circle), confirming the scabies diagnosis (International Alliance for the Control of Scabies 2020 criteria A2).<sup>1</sup>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## METHODS

### *IN-VITRO* ANTIVIRAL ACTIVITY OF IVERMECTIN AND MOXIDECTIN AGAINST SARS-CoV-2

#### *Cell culture, virus strain*

Monkey kidney cells (VeroE6) were cultured in growth medium consisting of complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.1 µg/ml amphotericin B (ThermoFischer Scientific), and maintained in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C. The SARS-CoV-2 strain used to infect the cells was isolated from the nasopharyngeal sample of a patient hospitalized at Henri-Mondor Hospital, Créteil, France (SARS-CoV-2/Mondor/M80).

#### *VeroE6-cell infection and drug treatment*

Ivermectin and moxidectin (Sigma) were dissolved in a 10 mM dimethylsulfoxide (DMSO) stock solution (all from Sigma-Aldrich Chimie, St-Quentin-Fallavier, France). VeroE6 cells were seeded at a density of 75,000 cells/well in a 48-well plate and incubated for 24 h prior to inoculation with SARS-CoV-2/Mondor/M80 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 for 2 hours. After removing the supernatant and washing the cells in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), growth medium containing the drug (concentration range, 0.05–10 µM) or DMSO–growth medium (controls) was added, and incubation continued for 48 hours.

#### *Quantitative, real-time, reverse-transcriptase–polymerase chain reaction (RT-qPCR)*

##### *detection of SARS-CoV-2*

SARS-CoV-2 double-stranded RNA was extracted from infected cells and their supernatants using the SV96 Total RNA Isolation System Kit (Promega, Madison, WI, USA) and QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively. After retro-transcription using

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFischer Scientific) and GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega), in a Lightcycler 480 PCR device (Roche, Basel, Switzerland), SARS-CoV-2 RNA levels were measured using the TaqMan technology with SARS-CoV-2-specific primers (forward 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' and reverse 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3') and qPCR probe (5'-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG [5'] Fam [3'] BHQ-1 -3').

Data were analyzed with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, with all samples normalized to 18S mRNA from cell samples. Two experiments were run in triplicate. SARS-CoV-2 RNA relative quantities were plotted against drug concentrations and fitted to a four-parameter logistic curve with SigmaPlot v11 software.  $EC_{50s}$  and  $EC_{90s}$  were determined from those curves.

#### *Immunofluorescence*

VeroE6 cells were seeded at a density of 25,000 cells/well in eight-well plates (Labtek Permanox, Sigma-Aldrich, USA) and incubated for 24 hours. Cells were infected with SARS-CoV-2/Mondor/M80 (MOI=0.4) for 2 hours. After removing the virus-containing supernatant, cells were incubated for 24 hours in growth medium containing the drugs (0.5, 1, 1.5, 2 or 2.5  $\mu$ M) or DMSO. After washing in PBS, cells were fixed in 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, US), permeabilized with saturation buffer (Triton X-114 0.3%, BSA fraction V 10 mg/ml in PBS+/+) and incubated for 1 hour at 37°C in humid chamber with Mouse Anti-dsRNA primary antibody "J2" (Scicons, Szirak, Hungary; diluted, 1/400). After washing, cells were incubated with the anti-mouse secondary antibody, Goat anti-mouse Alexa Fluor 594 nm (ThermoFischer Scientific). Nuclei were stained with DAPI. Infected cells were quantified with ImageJ software.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### *Cytotoxicity assays*

VeroE6 cells in growth medium were allowed to proliferate for 2 days at 37°C in presence of increasing concentrations of ivermectin and moxidectin (range, 0.05–10 µM); then the numbers of viable cells were determined with the MTS (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Promega).

#### *Time-of-drug-addition assay*

VeroE6 cells were seeded on 48-well plates (75,000 cells/well) 24 hours prior to infection. Ivermectin (2.5 µM) or moxidectin (2.5 µM) was added 3 hours before inoculation, or 0, 3, 6 or 9 hours after adding SARS-CoV-2 (MOI=1). Cells from each well were collected 48 hours post-inoculation, washed with PBS and lysed with lysis buffer (RLA, Promega). Total cell RNA was then extracted according to the manufacturer's instructions and subjected to RT-qPCR to detect viral RNA. The percent virus-replication inhibition was calculated.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**RESULTS**

**Figure S2. Flow chart of the long-term-care facilities (LTCFs) identified in Seine-and-Marne County meeting study criteria.**

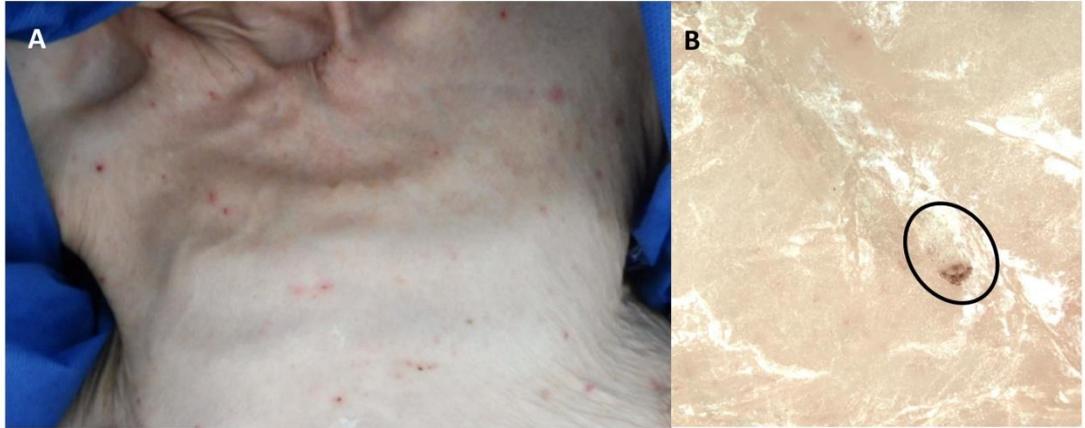
LTCF-A denotes the index facility.

**SUPPLEMENTARY APPENDIX REFERENCE**

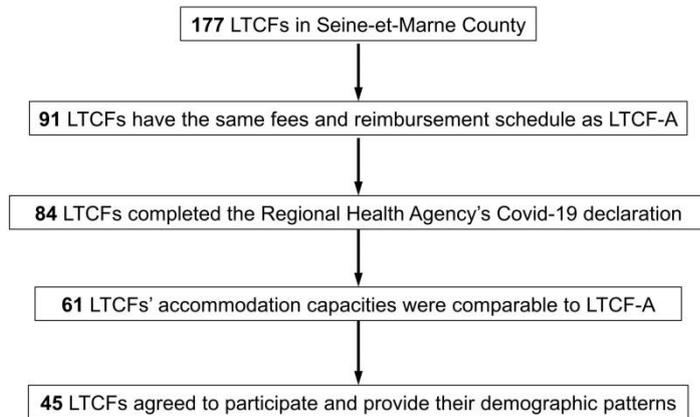
1. Engelman D, Yoshizumi J, Hay RJ, et al. The 2020 International Alliance for the Control of Scabies Consensus Criteria for the Diagnosis of Scabies. *Br J Dermatol* 2020; 183:808-820.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41



## Discussion

Les dernières décennies ont vu l'émergence ou la réémergence de nombreux virus. Le VIH et le VHC ont concentré une grande partie de la recherche notamment sur le développement d'antiviraux spécifiques. Aujourd'hui, malgré un traitement lourd et quotidien, l'infection par le VIH est contrôlée par l'utilisation de DAA et permet aux patients traités une nette amélioration de l'espérance et de la qualité de vie. L'utilisation de DAA pour lutter contre le VHC permet une guérison complète pour la quasi-totalité des patients soignés. Néanmoins, le développement de ces antiviraux a pris de nombreuses années. Face à plus de 200 virus, infectant l'Homme, orphelins de traitement et face à l'augmentation de l'émergence ou réémergence virale des dernières années, la stratégie de développement d'antiviraux spécifiques pour chacun d'entre eux ne semble pas toujours être la plus adéquate.

A l'instar des antibiotiques pour les bactéries, la stratégie de développement d'antiviraux à large spectre semble la plus adaptée pour pallier l'absence de traitement antiviraux, comme nous le rappelle la crise sanitaire en cours. Les HTA ciblent des protéines ou des voies de signalisations de l'hôte, utilisées par les virus au cours de leurs cycles de vie. Les cyclophilines font partie de ces protéines et sont donc une cible très intéressante pour le développement d'HTA. Il existe déjà des inhibiteurs de cyclophilines, comme la cyclosporine A qui a montré une activité antivirale sur de nombreux virus. Néanmoins, ses propriétés immunosuppressives l'empêchent d'être un candidat crédible pour le traitement d'infections virales. Pour pallier ce problème l'alisporivir, un dérivé non immunosuppressif de la CsA, a été conçu. Cette molécule a atteint la phase 3 d'essai clinique dans le cadre du traitement de patients atteints par le VHC, diminuant de 3 à 4 log la charge virale. Le développement de l'Alv a été arrêté à cause d'effets secondaires graves, non liés à l'inhibition des cyclophilines, lorsqu'il était administré avec de la ribavirine et de l'interféron.

Le laboratoire a conçu une famille de petites molécules non peptidiques inhibitrices des cyclophilines (SMCypI), qui se fixent dans les deux poches du site actif des cyclophilines : la poche catalytique et la poche gardienne. Les SMCypI inhibent puissamment l'activité PPIase des cyclophilines, bien que plus faiblement que l'Alv et la CsA, et sont moins toxiques que ces dernières ([Ahmed-Belkacem et al. 2016](#)).

Les SMCypI possèdent une activité antivirale *in vitro* sur plusieurs virus de familles différentes (VHC, DNV, ZIKV, Fièvre Jaune HCoV-229E, OC43, MERS et SARS-CoV2) confirmant le potentiel des inhibiteurs de cyclophilines pour le développement d'antiviraux à large spectre.

Les inhibiteurs de cyclophilines n'ont pas seulement un intérêt thérapeutique, ils sont aussi d'excellents outils pour comprendre l'implication des cyclophilines dans les cycles viraux. La première étude des SMCypI a été réalisée sur le VHC, virus modèle du laboratoire, dont les interactions avec les cyclophilines sont maintenant bien connues. Nous avons pu montrer, qu'à l'instar de la CsA et l'Alv, le composé C31 a une activité antivirale pan-génotypique sur les réplicons sous génomiques du VHC (génotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4a et 5a). L'utilisation de 6 SMCypI a permis de démontrer que l'activité antivirale et l'activité anti-PPIase sont finement corrélées. La modélisation moléculaire de la cyclophiline A en complexe avec le composé C31 et la CsA montre que leurs sites de fixations sont partiellement recouvrant. Ce résultat a été confirmé par les expériences de FRET qui montrent que le C31 déplace la CsA du site actif de la CypA.

Nous avons également montré que le composé C31 rompt l'interaction entre la cyclophiline A et NS5A comme la CsA et l'Alv. Ce résultat indique que le C31, l'Alv et la CsA possèderaient un mécanisme d'action commun, responsable de l'activité anti-VHC. L'étude de la résistance du VHC au composé C31 nous a permis de conforter cette hypothèse. En effet, les deux mutations de résistance identifiées au sein du domaine II de la protéine virale NS5A, D320E et Y321H, ont également été décrites pour conférer la résistance à la CsA et l'Alv.

Bien que les effets soient parfois très modestes, le C31 inhibe, *in vitro*, la réplication de la Dengue, de la fièvre jaune, de Zika et du virus West Nile. Un seul des virus testés n'a montré aucune sensibilité au composé, le virus de l'encéphalite japonaise. Il n'existe encore aucune étude montrant l'implication des cyclophilines dans le cycle de vie du virus Zika. Seule une étude montre des résultats peu clairs quant à l'activité antivirale de la CsA sur la réplication du virus. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé un crible de 25 SMCypl contre la souche MR766 du virus Zika. Ce crible a permis d'identifier le composé F833 qui inhibe la réplication du virus Zika de plus de 2 logs. Cependant la plupart des composés n'ont montré aucune véritable activité antivirale. La relation de structure activité montre l'importance de la présence du benzothiophène greffé sur un groupement pyrrolidine en R1 et la présence d'un cyclohexyl ou phenyl substitué en R3.

L'activité antivirale ne semble pas directement corrélée à l'inhibition de l'activité enzymatique des cyclophilines. Ce résultat est corroboré par l'absence d'activité anti-Zika de la CsA et de l'Alv. L'ensemble de ces observations permettent de conclure que les mécanismes d'action anti-HCV et anti-Zika des SMCypl sont différents.

Les SMCypl ont la particularité de cibler les deux poches du site actif des cyclophilines contrairement à la CsA et ses analogues. Le fait que le F833 se fixe dans la poche catalytique et dans la poche gardienne pourrait expliquer cette différence d'activité antivirale. Le rôle des cyclophilines dans le cycle de vie du virus pourrait alors dépendre d'une interaction entre la cyclophiline et une protéine virale ou cellulaire nécessaire au virus. Le groupement en R3 du F833 empêcherait l'interaction protéine-protéine. Bien que l'effet antiviral du F833 puisse être dû à la fixation du composé sur une autre cible, la nécessité d'inhiber l'activité enzymatique des cyclophilines pour observer une activité antivirale des SMCypl laisse penser que les cyclophilines sont impliquées dans le cycle de vie du virus Zika.

L'activité antivirale du F833 a été caractérisée *via* l'effet du composé sur la production d'ARN viral intracellulaire. L'EC<sub>50</sub> du composé a été calculée et est de 14.6

$\pm 2.5 \mu\text{M}$ . L'activité antivirale du F833 a également été caractérisée sur la production de particules virales infectieuses. Le virus produit en présence de  $20\mu\text{M}$  de F833 diminue le titre du virus d'environ 2 logs.

Enfin, nous avons déterminé l'étape du cycle viral ciblée par le F833. Bien que les résultats ne permettent pas de conclure précisément, le F833 ne cible pas une étape précoce puisque le composé perd la plus grande partie de son activité lorsqu'il est ajouté 9/12h post infection. Pour confirmer ce résultat nous envisageons de tester l'effet du composé sur un réplicon de la souche MR766 créé par l'équipe du Pr. Ralf Bartenschlager à Heidelberg ([Münster et al. 2018](#)).

Par suite d'un échec de production de la souche PRVABC59, nous n'avons pu tester nos composés sur cette souche de lignée asiatique, provenant de l'épidémie de Porto Rico en 2015. Les souches de lignée asiatique sont très proches les unes des autres mais diffèrent des souches de la lignée africaine, notamment au niveau de la protéine d'enveloppe, provoquant des différences d'infectivité et de pathogénicité notables ([Carbaugh, Baric, and Lazear 2019](#); [Giraldo et al. 2020](#)). En collaboration avec l'équipe du Dr Muriel Culpier, un crible des 25 SMCypl sera réalisé sur les infections par les souches MR766 et PF-25013-18 (lignée asiatique) de progéniteurs neuronaux, cellules cibles du virus. Bien que très permissives, les cellules Huh7 ne représentent pas un modèle très relevant pour valider totalement le concept *in vitro* d'un nouvel antiviral anti-Zika ou pour faire une étude complète de mécanisme d'action des cyclophilines au sein du cycle viral.

L'étude sur la souche MR766 du virus Zika n'apporte pour l'instant pas de réponse précise sur l'implication des cyclophilines dans le cycle de vie du virus. Une étude de résistance est en cours afin d'identifier un partenaire viral potentiel impliqué par une interaction direct ou indirect avec une ou plusieurs cyclophilines. Cette étude a permis d'identifier une nouvelle molécule qui inhibe fortement la réplication du virus Zika *in vitro*. Cette molécule est également le premier inhibiteur de cyclophilines qui montre un effet antiviral conséquent sur le virus Zika.

Le rôle des cyclophilines dans le cycle de vie des coronavirus demeure peu clair et nécessite des recherches plus approfondies. Nous avons réalisé un crible de 29 SMCypl pour tester leur capacité à inhiber la réplication de l'alpha coronavirus HCoV-229E en cellules MRC5. Les résultats ont montré une grande hétérogénéité d'efficacité des composés que nous avons pu classer en trois groupes distincts en fonction de leur activité antivirale et de leur activité anti-PPiase. La relation de structure activité, réalisée grâce à l'analyse de ces trois groupes montre la dépendance du groupement benzothiophène ou thioanisole greffé sur un pyrrolidine en R1 et du groupement aniline en R2 pour observer une forte inhibition de l'activité enzymatique. L'activité antivirale dépend elle de la présence d'un cyclohexyl ou d'un phényl substitué par des atomes halogènes ou par un O-méthyl en position R3, c'est-à-dire à l'interface des deux poches du site actif des cyclophilines. Au contraire du VHC et de manière semblable au virus Zika, l'activité antivirale n'est pas directement corrélée à l'activité anti-PPiase.

A ce jour nous avons identifié deux profils de mécanisme d'action antiviral : celui du VHC où l'activité antivirale est finement corrélée à l'activité anti-PPiase et celui des virus Zika et HCoV-229E, plus complexe, où l'activité anti-PPiase ne semble pas directement corrélée. Une différence notable est quand même à noter puisque dans le cas de l'infection par le virus Zika, la CsA et l'Alv n'ont aucun effet antiviral, contrairement à l'infection par le HCoV-229E.

Plusieurs SMCypl ont montré une inhibition de la réplication supérieure à 2 logs et un des composés, le F836, n'a montré aucune toxicité jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  et a donc été choisi pour caractériser son activité antivirale et pour tenter de déterminer son mécanisme d'action. Le F836 diminue fortement la quantité d'ARN viral intracellulaire de façon comparable à l'alisporivir et protège de l'ECP viro-induit avec une protection cellulaire complète à 12,5 $\mu\text{M}$ .

Le composé possède une activité pan-coronavirus puisqu'il est également efficace contre 3 trois beta-coronavirus dont deux sont responsables d'infections

respiratoires sévères : OC43, SARS-CoV-2 et MERS-CoV. Ce résultat illustre l'intérêt des inhibiteurs de cyclophilines dans la lutte contre les infections par les coronavirus.

Nous avons utilisé les cellules MRC5 comme modèle d'infection par le virus HCoV-229E. Les coronavirus ont la particularité d'utiliser deux voies d'entrée dans la cellule, la voie endosomale et la fusion à la membrane plasmique. Dans notre modèle cellulaire MRC5, le HCoV-229E utilise préférentiellement la voie endosomale. Il est donc sensible à l'E64d, un inhibiteur de l'entrée par voie endosomale *via* l'inhibition des cathepsines, et non sensible au camostat qui inhibe la fusion à la membrane plasmique *via* l'inhibition des protéases à sérine comme TMPRSS2.

Le test de temps d'ajout du F836 a montré un profil tout à fait similaire à celui réalisé avec l'inhibiteur de l'entrée par voie endosomale, l'E64d, puisqu'il perdait toute son activité entre 0 et 3h post infection (résultats non montrés). De manière très intéressante, le composé F836 semble efficace sur une étape précoce du cycle pour l'ensemble des coronavirus testés, puisqu'il est efficace lorsqu'il est ajouté uniquement pendant les deux premières heures d'infection. Ce résultat indiquerait que le mécanisme d'action antivirale du F836 pourrait être commun pour le HCoV-229E, OC43, SARS-CoV-2 et MERS-CoV.

Nous avons par la suite montré que le F836 bloquait une étape post-attachement. Le traitement de l'infection par le HCoV-229E avec la trypsine a favorisé l'entrée par fusion à la membrane plasmique. Dans ce contexte, le F836 bloque également la réplication du virus. Il semblerait donc qu'il bloque une étape commune aux deux voies d'entrée. L'utilisation des pseudo-particules par le Dr Sandrine Belouzard, nous montre que le F836 n'est pas actif sur l'étape d'entrée en elle-même et que l'étape ciblée par le F836 est donc post-fusion.

L'étude de la résistance au F836 illustre la haute barrière à la résistance au composé. Après 120 jours de pression de sélection, nous avons identifié seulement 11 mutations, présentes sur au moins un des trois variants C1, C2 et C3 et un faible niveau de résistance pour l'ensemble des variants (entre 4 et 20 fois). La mutation

dans la partie 5' UTR a particulièrement retenu notre attention puisque c'est la seule présente sur l'ensemble des variants dès le premier temps de séquençage (T1) et la seule mutation présente de façon majoritaire (>50%) au sein de la quasi-espèce virale.

Cette région est composée d'éléments structuraux en tige boucle très conservés chez les coronavirus. La mutation 83 est située au niveau de la structure en tige boucle appelée SL4 et la prédiction de la structure secondaire de l'ARN montre un changement structurel de la tige *via* l'augmentation de la zone de non-appariement dans la boucle interne où se situe la mutation.

Deux mutations dans la protéine Spike en position 22125 (F519S) et 22667 (L700I) ont également été observées sur C1, C2 et C3 et sur C1 et C2, respectivement. La F519S est présente dans la région S1 au niveau du RBD du HCoV-229E décrit par Breslin en 2003 ([Breslin et al. 2003](#)). La mutation L700I se situe au niveau du peptide de fusion et a déjà été publiée dans une étude qui porte sur l'identification de la voie d'entrée préférentielle des souches cliniques de HCoV-229E ([Shirato, Kanou, et al. 2017](#)). Il semblerait que ces dernières soient moins sensibles aux cathepsines que les souches de laboratoire. Après 20 passages consécutifs sur cellules HeLa, la souche clinique devient plus sensible aux cathepsines et entre donc plus facilement par voie endosomale. La mutation L700I compterait parmi les 6 mutations observées dans la région très conservée aux abords du peptide de fusion qui pourrait affecter l'usage des cathepsines. D'après les résultats de cette étude et nos résultats sur les pseudo particules, la mutation L700I ne semble pas due à la pression de sélection imposée par le F836 mais plus à l'adaptation du virus à la culture cellulaire, au fitness. La mutation F519S, serait également une mutation qui favoriserait l'infection et donc le fitness des variants C1, C2 et C3 par rapport au virus WT.

Les interactions de la cyclophiline A avec des protéines de capsid ont déjà été démontrées. La Cyp A, par l'intermédiaire de son interaction avec deux hexamères de la protéine de capsid du VIH (CA), participe à sa stabilisation. Celle-ci est cependant dépendante du niveau d'expression de cyclophiline A dans la cellule et

du type cellulaire infecté, témoignant de la complexité de son mécanisme d'action ([Fricke et al. 2013](#); [Liu et al. 2016](#)). Dans le cas de l'infection par l'Enterovirus 71, la cyclophiline A interagit avec la protéine de capsid VP1 et régule la décapsidation de manière pH dépendante ([Qing et al. 2014](#)).

Dans une étude très récente, l'équipe de Von Brunn a montré une interaction entre la protéine N du HCoV-229E avec la cyclophiline A, rompue par la CsA et l'Alv ([Ma-Lauer et al. 2020](#)). De manière surprenante, mais très intéressante, nous avons montré que le composé F836 favorise l'interaction de la protéine N du HCoV-229E avec la cyclophiline A. Dans nos conditions d'expérimentation nous n'avons pu montrer la rupture de l'interaction en présence d'Alv car en absence de F836, celle-ci n'était pas observable en western blot. Nous pouvons simplement conclure que l'Alv ne favorise pas l'interaction entre la protéine N du HCoV-229E et la cyclophiline A et possède donc un mécanisme d'action anti-HCoV-229E différent du F836.

L'efficacité antivirale du F836 pourrait donc s'expliquer par la stabilisation de la nucléocapside qui empêcherait la décapsidation de l'ARN viral. Le cas inverse se produirait avec l'Alv qui favoriserait la rupture de l'interaction et déstabiliserait la nucléocapside aboutissant également à l'effet antiviral. Cette hypothèse illustrerait parfaitement le paradoxe de l'interaction de la protéine N avec l'ARN viral. En effet cette interaction doit être forte pour que la nucléocapside puisse protéger le matériel génétique du virus, et elle doit à la fois être rompue sans trop de difficulté pour permettre la décapsidation et la libération du génome viral dans le cytoplasme.

Une récente étude d'interactome de l'ARN du virus SARS-CoV-2 avec des protéines virales et cellulaires a montré une interaction de l'ARN viral avec la CypA et avec la protéine N ([Schmidt et al. 2020](#)). Un test de décapsidation en présence de la protéine N, de la CypA, des inhibiteurs de cyclophilines et de la séquence de la région non codante de l'ARN génomique avec ou sans la mutation est en cours de préparation.

Les interactions de la protéine N avec l'ARN viral ne servent pas uniquement à la formation de la nucléocapside. Elle interagit avec les régions 5' UTR et 3' UTR et permet de circulariser le génome des coronavirus. Cette étape serait essentielle pour la première étape de la réplication et donc la synthèse du brin négatif d'ARN (Lo et al. 2019). Il n'est donc pas exclu que la cyclophiline A ait une importance à une étape post-décapsidation comme le suggère également une étude très originale réalisée par une équipe d'Oxford. La protéine N du SARS-CoV-2 subirait une autoprotéolyse qui donnerait cinq protéoformes de tailles variables ayant des fonctions différentes. La cyclophiline A interagirait avec le domaine d'interaction à l'ARN (NTD) présent sur deux des protéoformes et cette interaction serait rompue en présence de CsA (Lutomski et al. 2020)(non publiée).

Les différentes études menées et décrites dans ce manuscrit montrent la complexité de l'étude des interactions des virus avec les cyclophilines. L'identification des groupements chimiques déterminants pour l'activité antivirale des virus étudiés au laboratoire a engendré la création d'un nouveau composé, le F83233, dont l'EC<sub>50</sub> (50% de l'effet maximum) a été calculé et comparé à l'EC<sub>50</sub> des meilleurs composés sélectionnés pour chacun des virus (**Tableau 4**).

<b>Virus</b>	<b>EC<sub>50</sub> RNA fold decrease of the lead compound (μM)</b>	<b>EC<sub>50</sub> RNA fold decrease (μM) of F83233</b>
<b>Zika</b>	14.6 ± 2.5	0.68 ± 0.8
<b>HCoV-229E</b>	16.4 ± 0.26	0.21 ± 0.015

**Tableau 4** : EC<sub>50</sub> des meilleurs composés identifiés lors des différents cribles en comparaison à l'EC<sub>50</sub> du F83233, sur les infections par chacun des virus

Le composé F83233 s'est avéré bien plus efficace sur les deux virus d'intérêt. Il améliore d'un facteur 78 la puissance d'inhibition de la réplication du virus HCoV-

229E. La forte inhibition de la réplication de virus à ARN de familles très différentes, témoigne de l'intérêt des SMCypl, et particulièrement des composés optimisés comme le F83233, dans le cadre du développement d'antiviraux à large spectre pour une utilisation thérapeutique.

Il n'existe aujourd'hui aucun antiviral contre les coronavirus. La recherche d'antiviraux est donc plus que jamais d'actualité. Au début de l'année 2020, pour lutter face à l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons établi une stratégie de repositionnement de médicament. Les inhibiteurs de cyclophilines ont montré une activité antivirale *in-vitro* sur l'ensemble des coronavirus humains et la CsA un effet antiviral *in vivo* sur un modèle murin infecté par le MERS-CoV. L'alisporivir a atteint la phase 3 d'essai clinique dans le cadre de l'infection par le VHC sans provoquer d'effets secondaires grave lorsqu'il était administré seul ou en combinaison avec la ribavirine. L'alisporivir semblait donc un candidat crédible pour lutter contre l'infection par le SARS-CoV-2. Le but de l'étude était donc d'évaluer les propriétés antivirales de l'alisporivir dans le but de générer la preuve de concept préclinique d'efficacité antivirale requise pour commencer un essai clinique chez les patients atteints de la covid19.

Nous avons évalué l'effet de l'alisporivir sur l'infection par le SARS-CoV-2 en cellules VERO-E6 en comparaison à la chloroquine. La production d'ARN viral diminue de façon dose dépendante en présence d'Alv et l' $EC_{50}$  (concentration à laquelle il y a 50% d'inhibition de la réplication du SARS-CoV-2) du composé est de  $0.46 \pm 0.04 \mu\text{M}$  contre  $0.35 \pm 0.02 \mu\text{M}$  pour la chloroquine. L'étape ciblée par l'Alv serait plus tardive que celle ciblée par la chloroquine qui cible l'entrée par voie endosomale du virus. Des données pharmacologiques préliminaires indiquent qu'après administration orale, l'alisporivir est largement distribué dans l'ensemble du corps et dans les poumons et que l' $EC_{90}$  obtenu en cellules VERO-E6 est cliniquement réalisable sur le patient. De plus l'Alv pourrait également avoir un effet protecteur sur les lésions pulmonaires causées par l'infection par l'intermédiaire de son inhibition de la cyclophiline D, un régulateur clé de l'ouverture du mPTP impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire.

En collaboration avec une équipe de dermatologues de l'Hôpital Henri Mondor (Pr. Chosidow) nous avons étudié l'effet potentiel de l'ivermectine sur l'infection par le SARS-CoV-2. Tout d'abord nous avons confirmé l'activité antivirale *in vitro* de l'ivermectine et démontré l'activité antivirale *in vitro* de la moxidectine avec des EC<sub>50</sub> de  $0.14 \pm 0.02 \mu\text{M}$  et  $0.48 \pm 0.08 \mu\text{M}$ , respectivement. Nous avons également démontré que les deux molécules agissent sur une étape précoce du cycle viral, puisqu'elles perdent 90% de leur efficacité lorsqu'elles sont ajoutées 3h post infection.

En mars 2020, des cas de gale ont été reportés dans un centre de soins pour personnes âgées, entraînant un traitement à l'ivermectine pour l'ensemble des patients (69 personnes) et du staff médical (52 personnes). Parmi les 121 personnes traitées à l'ivermectine, 10 cas ont été suspectés et 1 cas confirmé pour l'infection par le SARS-CoV-2, dont 7 patients atteints de facteurs de comorbidité d'un âge médian de 90 ans. Aucun cas sévère n'a été déclaré. Ces observations cliniques ont été comparées à celles de 45 centres de soins pour personnes âgées de la Seine et Marne. Le nombre de cas est un des plus faibles des 45 centres avec 1,4% de cas confirmés contre 22,6% dans les 42 centres ayant comptabilisés des cas. Ces résultats soulèvent l'intérêt potentiel d'un traitement prophylactique à l'ivermectine mais nécessite cependant des études plus approfondies et plus robustes pour déterminer si l'ivermectine est efficace contre le SARS-CoV-2. Aucune confirmation par RT-qPCR ou sérologique n'a été apportée pour savoir si les cas suspectés ont été infectés par le SARS-CoV-2.

Des essais cliniques ont été menés en utilisant l'ivermectine avec des résultats encourageants puisque le traitement diminue la longévité des symptômes, les effets secondaires et la mortalité chez les patients traités avec la molécule ([Pandey 2020](#)). Ces résultats ont été obtenus en traitant les patients une fois les symptômes déclarés.

Face à une infection aigue, le laps de temps dans lequel les antiviraux peuvent avoir un effet est plutôt court (excepté s'ils ciblent l'immunité). En effet une fois les symptômes déclarés, les cas sévères ont montré que l'aggravement de la condition du patient était dû au dérèglement immunitaire important du patient (« cytokines storms ») pouvant aboutir à la mort de ce dernier. Le traitement antiviral post-symptomes peut donc arriver trop tard. Il semble donc que traitement prophylactique soit la meilleure solution pour optimiser les effets d'une molécule sur le patient comme c'est le cas pour le tamiflu, utilisé en prophylaxie pour prévenir des gripes de type A et B. Il est néanmoins difficile d'observer des effets bénéfiques d'un médicament administré de façon préventive puisqu'il souffre d'aucun élément de comparaison et il est impossible de prouver que le patient ait été en « contact » avec le virus. Une étude in vivo sur un modèle animal semble alors primordiale.

## Références bibliographiques

- Ahmed-Belkacem, Abdelhakim, Lionel Colliandre, Nazim Ahnou, Quentin Nevers, Muriel Gelin, Yannick Bessin, Rozenn Brillet, Olivier Cala, Dominique Douguet, William Bourguet, Isabelle Krimm, Jean Michel Pawlotsky, and Jean Francois Guichou. 2016. "Fragment-Based Discovery of a New Family of Non-Peptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with Potent Antiviral Activities." *Nature Communications* 7.
- Alam, Aftab, Nikhat Imam, Anam farooqui, Shahnawaz Ali, Md Zubair Malik, and Romana Ishrat. 2017. "Recent Trends in ZikV Research: A Step Away from Cure." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 91:1152–59.
- Araujo, Abelardo Q. C., Marcus Tullius T. Silva, and Alexandra P. Q. C. Araujo. 2016. "Zika Virus-Associated Neurological Disorders: A Review." *Brain* 139(8):2122–30.
- Arribas, Jose R., and Ignacio Pe. 2011. "Protease Inhibitor Monotherapy." 114.
- Baric, R. S., G. W. Nelson, J. O. Fleming, R. J. Deans, J. G. Keck, N. Casteel, and S. A. Stohlman. 1988. "Interactions between Coronavirus Nucleocapsid Protein and Viral RNAs: Implications for Viral Transcription." *Journal of Virology* 62(11):4280–87.
- Barnard, Trisha R., Quinn H. Abram, Qi Feng Lin, Alex B. Wang, and Selena M. Sagan. 2021. "Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly." *Trends in Biochemical Sciences* xx(xx):1–13.
- Barrows, Nicholas J., Rafael K. Campos, Steven T. Powell, K. Reddisiva Prasanth, Geraldine Schott-Lerner, Ruben Soto-Acosta, Gaddiel Galarza-Muñoz, Erica L. McGrath, Rheanna Urrabaz-Garza, Junling Gao, Ping Wu, Ramkumar Menon, George Saade, Ildefonso Fernandez-Salas, Shannan L. Rossi, Nikos Vasilakis, Andrew Routh, Shelton S. Bradrick, and Mariano A. Garcia-Blanco. 2016. "A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection." *Cell Host and Microbe* 20(2):259–70.
- Belouzard, Sandrine, Victor C. Chu, and Gary R. Whittaker. 2009. "Activation of the SARS Coronavirus Spike Protein via Sequential Proteolytic Cleavage at Two Distinct Sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14):5871–76.
- Belouzard, Sandrine, Jean K. Millet, Beth N. Licitra, and Gary R. Whittaker. 2012. "Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein." *Viruses* 4(6):1011–33.
- Bertram, S., R. Dijkman, M. Habjan, A. Heurich, S. Gierer, I. Glowacka, K. Welsch, M. Winkler, H. Schneider, H. Hofmann-Winkler, V. Thiel, and S. Pohlmann. 2013. "TMPRSS2 Activates the Human Coronavirus 229E for Cathepsin-Independent Host Cell Entry and Is Expressed in Viral Target Cells in the Respiratory Epithelium." *Journal of Virology* 87(11):6150–60.
- Blaising, Julie, Pierre L. Lévy, Stephen J. Polyak, Megan Stanifer, Steeve Boulant, and Eve Isabelle Pécheur. 2013. "Arbidol Inhibits Viral Entry by Interfering with Clathrin-Dependent Trafficking." *Antiviral Research* 100(1):215–19.
- Bleibtreu. 2020. "Focus on Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)." (January).

- Bogoch, Isaac I., Oliver J. Brady, Moritz U. G. Kraemer, Matthew German, Marisa I. Creatore, Manisha A. Kulkarni, John S. Brownstein, Sumiko R. Mekaru, Simon I. Hay, Emily Groot, Alexander Watts, and Kamran Khan. 2016. "Anticipating the International Spread of Zika Virus from Brazil." *The Lancet* 387(10016):335–36.
- Bonavia, Aurelio, Bruce D. Zelus, David E. Wentworth, Pierre J. Talbot, and Kathryn V. Holmes. 2003. "Identification of a Receptor-Binding Domain of the Spike Glycoprotein of Human Coronavirus HCoV-229E." *Journal of Virology* 77(4):2530–38.
- Bonnin, Ariane, Adeline Danneels, Jean Dubuisson, Anne Goffard, and Sandrine Belouzard. 2018. "HCoV-229E Spike Protein Fusion Activation by Trypsin-like Serine Proteases Is Mediated by Proteolytic Processing in the S2' Region." *Journal of General Virology* 99(7):908–12.
- Bos, Sandra, Wildriss Viranaicken, Etienne Frumence, Ge Li, Philippe Desprès, Richard Y. Zhao, and Gilles Gadea. 2019. "The Envelope Residues E152/156/158 of Zika Virus Influence the Early Stages of Virus Infection in Human Cells." *Cells* 8(11):1–15.
- Bos, Sandra, Wildriss Viranaicken, Jonathan Turpin, Chaker El-Kalamouni, Marjolaine Roche, Pascale Krejbich-Trotot, Philippe Desprès, and Gilles Gadea. 2018. "The Structural Proteins of Epidemic and Historical Strains of Zika Virus Differ in Their Ability to Initiate Viral Infection in Human Host Cells." *Virology* 516(December 2017):265–73.
- Breslin, Jamie J., Irene Mørk, M. K. Smith, Lotte K. Vogel, Erin M. Hemmila, Aurelio Bonavia, Pierre J. Talbot, Hans Sjöström, Ove Norén, and Kathryn V. Holmes. 2003. "Human Coronavirus 229E: Receptor Binding Domain and Neutralization by Soluble Receptor at 37°C." *Journal of Virology* 77(7):4435–38.
- Brunn, Albrecht Von, Sandra Ciesek, Brigitte Von Brunn, and Javier Carbajo-lozoya. 2015. "ScienceDirect Genetic Deficiency and Polymorphisms of Cyclophilin A Reveal Its Essential Role for Human Coronavirus 229E Replication." *Current Opinion in Virology* 14:56–61.
- Carbajo-lozoya, Javier, Yue Ma-lauer, Miroslav Malešević, Martin Theuerkorn, Viktoria Kahlert, Erik Prell, Brigitte von Brunn, Doreen Muth, Thomas Baumert, Christian Drosten, Gunter Fischer, and Albrecht von Brunn. 2014. "Human Coronavirus NL63 Replication Is Cyclophilin A-Dependent and Inhibited by Non-Immunosuppressive Cyclosporine A-Derivatives Including Alisporivir." (January).
- Carbajo-Lozoya, Javier, Marcel A. Müller, Stephan Kallies, Volker Thiel, Christian Drosten, and Albrecht Von Brunn. 2012. "Replication of Human Coronaviruses SARS-CoV, HCoV-NL63 and HCoV-229E Is Inhibited by the Drug FK506." *Virus Research* 165(1):112–17.
- Carbaugh, Derek L., Ralph S. Baric, and Helen M. Lazear. 2019. "Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis." *Journal of Virology* 93(12):1–16.
- Chakraborty, C., A. R. Sharma, G. Sharma, M. Bhattacharya, and S. S. Lee. 2020. "SARS-CoV-2 Causing Pneumonia-Associated Respiratory Disorder (COVID-19): Diagnostic and Proposed Therapeutic Options." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24(7):4016–26.
- Chang, Chung-ke, Ming-hon Hou, Chi-fon Chang, Chwan-deng Hsiao, and Tai-huang Huang. 2014. "The SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein – Forms and Functions." (January).
- Chatterji, Udayan, Michael Bobardt, Suganya Selvarajah, Feng Yang, Hengli Tang, Noayo

- Sakamoto, Gregoire Vuagniaux, Tanya Parkinson, and Philippe Gallay. 2009. "The Isomerase Active Site of Cyclophilin A Is Critical for Hepatitis C Virus Replication." *Journal of Biological Chemistry* 284(25):16998–5.
- Chatterji, Udayan, Michael Bobardt, Andrew Tai, Malcolm Wood, and Philippe A. Gallay. 2015. "Cyclophilin and NS5A Inhibitors, but Not Other Anti-Hepatitis C Virus (HCV) Agents, Preclude HCV-Mediated Formation of Double-Membrane-Vesicle Viral Factories." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(5):2496–2507.
- Chen, Shih Cheng, and René C. L. Olsthoorn. 2010. "Group-Specific Structural Features of the 5'-Proximal Sequences of Coronavirus Genomic RNAs." *Virology* 401(1):29–41.
- Chen, Zhinan, Li Mi, Jing Xu, Jiyun Yu, Xianhui Wang, Jianli Jiang, Jinliang Xing, Peng Shang, Airong Qian, Yu Li, Peter X. Shaw, Jianwei Wang, Shumin Duan, Jin Ding, Chunmei Fan, Yang Zhang, Yong Yang, Xiaoling Yu, Qiang Feng, Biehu Li, Xiyang Yao, Zheng Zhang, Ling Li, Xiaoping Xue, and Ping Zhu. 2005. "Function of HAb18G/CD147 in Invasion of Host Cells by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus." *Journal of Infectious Diseases* 191(5):755–60.
- Choo, Qui Lim, George Kuo, Amy J. Weiner, Lacy R. Overby, Daniel W. Bradley, and Michael Houghton. 1989. "Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome." *Science* 244(4902):359–62.
- De Clercq, Erik, and Guangdi Li. 2016. "Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years." *Clinical Microbiology Reviews* 29(3):695–747.
- Collisson, Ellen W., Minglong Zhou, Paul Gershon, and Jyothi Jayaram. 2001. "Infectious Bronchitis Virus Nucleocapsid Protein Interactions with the 3' Untranslated Region of Genomic RNA Depend on Uridylate Bases." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 494:669–75.
- Cologna, Raymond, Jeannie F. Spagnolo, and Brenda G. Hogue. 2000. "Identification of Nucleocapsid Binding Sites within Coronavirus-Defective Genomes." *Virology* 277(2):235–49.
- Crouse, Josh, Ulrich Kalinke, and Annette Oxenius. 2015. "Regulation of Antiviral T Cell Responses by Type I Interferons." *Nature Reviews Immunology* 15(4):231–42.
- Davis, Tara L., John R. Walker, Valérie Campagna-Slater, Patrick J. Finerty, Patrick J. Finerty, Ragika Paramanathan, Galina Bernstein, Farrell Mackenzie, Wolfram Tempel, Hui Ouyang, Wen Hwa Lee, Elan Z. Eisenmesser, and Sirano Dhe-Paganon. 2010. "Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases." *PLoS Biology* 8(7).
- DiMasi, Joseph A., Henry G. Grabowski, and Ronald W. Hansen. 2016. "Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs." *Journal of Health Economics* 47:20–33.
- Elrod, John W., and Jeffery D. Molkentin. 2013. "Physiologic Functions of Cyclophilin D and the Mitochondrial Permeability Transition Pore." *Circulation Journal* 77(5):1111–22.
- Elrod, John W., Renee Wong, Shikha Mishra, Ronald J. Vagnozzi, Bhuvana Sakthivel, Sanjeewa A. Goonasekera, Jason Karch, Scott Gabel, John Farber, Thomas Force, Joan Heller Brown, Elizabeth Murphy, and Jeffery D. Molkentin. 2010. "Cyclophilin D Controls Mitochondrial Pore - Dependent Ca<sup>2+</sup> Exchange, Metabolic Flexibility, and Propensity

- for Heart Failure in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 120(10):3680–87.
- Fang Li. 2017. "Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins." *Annual Review of Virology* 3(1):237–61.
- Favreau, D. J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges, and P. J. Talbot. 2012. "Human Coronavirus-Induced Neuronal Programmed Cell Death Is Cyclophilin D Dependent and Potentially Caspase Dispensable." *Journal of Virology* 86(1):81–93.
- Fehr, Anthony, and Stanley Perlman. 2015. "Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis." *Coronaviruses: Methods and Protocols* 1282(1):1–282.
- Foster, T. L., P. Gallay, N. J. Stonehouse, and M. Harris. 2011. "Cyclophilin A Interacts with Domain II of Hepatitis C Virus NS5A and Stimulates RNA Binding in an Isomerase-Dependent Manner." *Journal of Virology* 85(14):7460–64.
- Fricke, T., A. Brandariz-Nunez, X. Wang, A. B. Smith, and F. Diaz-Griffero. 2013. "Human Cytosolic Extracts Stabilize the HIV-1 Core." *Journal of Virology* 87(19):10587–97.
- Furuta, Yousuke, Kazumi Takahashi, Kimiyasu Shiraki, Kenichi Sakamoto, Donald F. Smee, Dale L. Barnard, Brian B. Gowen, Justin G. Julander, and John D. Morrey. 2009. "T-705 (Favipiravir) and Related Compounds: Novel Broad-Spectrum Inhibitors of RNA Viral Infections." *Antiviral Research* 82(3):95–102.
- Galat, Andrzej. 1993. "Peptidylproline Cis-Trans-Isomerases : Immunophilins." 707:689–707.
- Gao, Yan, Liming Yan, Yucen Huang, Fengjiang Liu, Yao Zhao, Lin Cao, Tao Wang, Qianqian Sun, Zhenhua Ming, Lianqi Zhang, Ji Ge, Litao Zheng, Ying Zhang, Haofeng Wang, Yan Zhu, Chen Zhu, Tianyu Hu, Tian Hua, Bing Zhang, Xiuna Yang, Jun Li, Haitao Yang, Zhijie Liu, Wenqing Xu, Luke W. Guddat, Quan Wang, Zhiyong Lou, and Zihao Rao. 2020. "Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from COVID-19 Virus." *Science* 368(6492):779–82.
- Ge, Xing Yi, Jia Lu Li, Xing Lou Yang, Aleksei A. Chmura, Guangjian Zhu, Jonathan H. Epstein, Jonna K. Mazet, Ben Hu, Wei Zhang, Cheng Peng, Yu Ji Zhang, Chu Ming Luo, Bing Tan, Ning Wang, Yan Zhu, Gary Cramer, Shu Yi Zhang, Lin Fa Wang, Peter Daszak, and Zheng Li Shi. 2013. "Isolation and Characterization of a Bat SARS-like Coronavirus That Uses the ACE2 Receptor." *Nature* 503(7477):535–38.
- Giraldo, Maria I., Hongjie Xia, Leopoldo Aguilera-Aguirre, Adam Hage, Sarah van Tol, Chao Shan, Xuping Xie, Gail L. Sturdevant, Shelly J. Robertson, Kristin L. McNally, Kimberly Meade-White, Sasha R. Azar, Shannan L. Rossi, Wendy Maury, Michael Woodson, Holly Ramage, Jeffrey R. Johnson, Nevan J. Krogan, Marc C. Morais, Sonja M. Best, Pei Yong Shi, and Ricardo Rajsbaum. 2020. "Envelope Protein Ubiquitination Drives Entry and Pathogenesis of Zika Virus." *Nature* 585(7825):414–19.
- Göertz, Giel P., Sandra R. Abbo, Jelke J. Fros, and Gorben P. Pijlman. 2018. "Functional RNA during Zika Virus Infection." *Virus Research* 254(July 2017):41–53.
- Hamel, Rodolphe, Ophélie Dejarnac, Sineewanlaya Wichit, Peeraya Ekchariyawat, Aymeric Neyret, Natthanej Luplertlop, Manuel Perera-lecoin, Pornapat Surasombatpattana, Loïc Talignani, Frédéric Thomas, Van-mai Cao-lormeau, Valérie Choumet, Laurence Briant, Philippe Desprès, Ali Amara, and Hans Yssel. 2015. "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." 89(17):8880–96.
- Hasel, K. W., J. R. Glass, M. Godbout, and J. G. Sutcliffe. 1991. "An Endoplasmic Reticulum-

- Specific Cyclophilin." *Molecular and Cellular Biology* 11(7):3484–91.
- Haviernik, Jan, Michal Štefánik, Martina Fojtíková, Sabrina Kali, Noël Tordo, Ivo Rudolf, Zdeněk Hubálek, Luděk Eyer, and Daniel Ruzek. 2018. "Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses." *Viruses* 10(4):1–8.
- Heukelbach, Jorg, Carlos Henrique Alencar, Alyson Ann Kelvin, Wanderson Kleber de Oliveira, and Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti. 2016. "Zika Virus Outbreak in Brazil." *Journal of Infection in Developing Countries* 10(2):116–20.
- Hoffmann, Hans Heinrich, William M. Schneider, and Charles M. Rice. 2015. "Interferons and Viruses: An Evolutionary Arms Race of Molecular Interactions." *Trends in Immunology* 36(3):124–38.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, Georg Herrler, Nai Huei Wu, Andreas Nitsche, Marcel A. Müller, Christian Drosten, and Stefan Pöhlmann. 2020. "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." *Cell* 181(2):271-280.e8.
- Iyidogan, Pinar, and Karen S. Anderson. 2014. "Current Perspectives on HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance." *Viruses* 6(10):4095–4139.
- Jaimes, Javier A., Jean K. Millet, and Gary R. Whittaker. 2020. "Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site." *IScience* 23(6):101212.
- Javed, Farakh, Khanzadi N. Manzoor, Mubashar Ali, Irshad U. Haq, Abid A. Khan, Assad Zaib, and Sobia Manzoor. 2018. "Zika Virus: What We Need to Know?" *Journal of Basic Microbiology* 58(1):3–16.
- Kambara, Hiroto, Hideki Tani, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Hiroshi Katoh, Takasuke Fukuhara, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. 2011. "Involvement of Cyclophilin B in the Replication of Japanese Encephalitis Virus." *Virology* 412(1):211–19.
- Kawase, Miyuki, Kazuya Shirato, Shutoku Matsuyama, and Fumihiro Taguchi. 2009. "Protease-Mediated Entry via the Endosome of Human Coronavirus 229E." *Journal of Virology* 83(2):712–21.
- Kim, Dongwan, Joo-yeon Lee, Jeong-sun Yang, Jun Won Kim, V. Narry Kim, Hyesik Chang, Dongwan Kim, Joo-yeon Lee, Jeong-sun Yang, Jun Won Kim, V. Narry Kim, and Hyesik Chang. 2020. "Resource The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome LI LI Resource The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome." *Cell* 181(4):914-921.e10.
- Kim, Youngnam, and Changhee Lee. 2014. "Porcine Epidemic Diarrhea Virus Induces Caspase-Independent Apoptosis through Activation of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor." (January).
- Kirchdoerfer, Robert N., and Andrew B. Ward. 2019. "Structure of the SARS-CoV Nsp12 Polymerase Bound to Nsp7 and Nsp8 Co-Factors." *Nature Communications* 10(1):1–9.
- Lam, Tommy Tsan Yuk, Na Jia, Ya Wei Zhang, Marcus Ho Hin Shum, Jia Fu Jiang, Hua Chen Zhu, Yi Gang Tong, Yong Xia Shi, Xue Bing Ni, Yun Shi Liao, Wen Juan Li, Bao Gui Jiang, Wei Wei, Ting Ting Yuan, Kui Zheng, Xiao Ming Cui, Jie Li, Guang Qian Pei, Xin Qiang, William Yiu Man Cheung, Lian Feng Li, Fang Fang Sun, Si Qin, Ji Cheng Huang, Gabriel M. Leung, Edward C. Holmes, Yan Ling Hu, Yi Guan, and Wu Chun Cao. 2020. "Identifying

- SARS-CoV-2-Related Coronaviruses in Malayan Pangolins." *Nature* 583(7815):282–85.
- Lim, Yvonne, Yan Ng, James Tam, and Ding Liu. 2016. "Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions." *Diseases* 4(4):26.
- Liu, Chuang, Juan R. Perilla, Jiyong Ning, Manman Lu, Guangjin Hou, Ruben Ramalho, Benjamin A. Himes, Gongpu Zhao, Gregory J. Bedwell, In Ja Byeon, Jinwoo Ahn, Angela M. Gronenborn, Peter E. Prevelige, Itay Rousso, Christopher Aiken, Tatyana Polenova, Klaus Schulten, and Peijun Zhang. 2016. "Cyclophilin A Stabilizes the HIV-1 Capsid through a Novel Non-Canonical Binding Site." *Nature Communications* 7:1–10.
- Liu, Jun, Jesse D. Farmer, Willam S. Lane, Jeff Friedman, Irving Weissman, and Stuart L. Schreiber. 1991. "Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes." *Cell* 66(4):807–15.
- Lo, Chen Yu, Tsung Lin Tsai, Chao Nan Lin, Ching Hung Lin, and Hung Yi Wu. 2019. "Interaction of Coronavirus Nucleocapsid Protein with the 5'- and 3'-Ends of the Coronavirus Genome Is Involved in Genome Circularization and Negative-Strand RNA Synthesis." *FEBS Journal* 286(16):3222–39.
- Luo, Cheng, Haibin Luo, Suxin Zheng, Chunshan Gui, Liduo Yue, Changying Yu, Tao Sun, Peilan He, Jing Chen, Jianhua Shen, Xiaomin Luo, Yixue Li, Hong Liu, Donglu Bai, Jingkang Shen, Yiming Yang, Fangqiu Li, Jianping Zuo, Rolf Hilgenfeld, Gang Pei, Kaixian Chen, Xu Shen, and Hualiang Jiang. 2004. "Nucleocapsid Protein of SARS Coronavirus Tightly Binds to Human Cyclophilin A." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321(3):557–65.
- Lutomski, Corinne A., Tarick J. El-Baba, Jani R. Bolla, and Carol V. Robinson. 2020. "Autoproteolytic Products of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Are Primed for Antibody Evasion and Virus Proliferation." *BioRxiv* 1–24.
- Ma-Lauer, Yue, Yu Zheng, Miroslav Malešević, Brigitte von Brunn, Gunter Fischer, and Albrecht von Brunn. 2020. "Influences of Cyclosporin A and Non-Immunosuppressive Derivatives on Cellular Cyclophilins and Viral Nucleocapsid Protein during Human Coronavirus 229E Replication." *Antiviral Research* 173(July 2019):104620.
- Malik, Yasmin A. 2020. "Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2." *Malaysian Journal of Pathology* 42(1):3–11.
- McBride, Ruth, Marjorie van Zyl, and Burtram C. Fielding. 2014. "The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein." *Viruses* 6(8):2991–3018.
- Medin, Carey L., and Alan L. Rothman. 2017. "Zika Virus: The Agent and Its Biology, with Relevance to Pathology." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 141(1):33–42.
- Molenkamp, Richard, and Willy Spaan. 1997. "Identification of a Specific Interaction between the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus A59 Nucleocapsid Protein and Packaging Signal." (august).
- Münster, Maximilian, Anna Płaszczycza, Mirko Cortese, Christopher John Neufeldt, Sarah Goellner, Gang Long, and Ralf Bartenschlager. 2018. "A Reverse Genetics System for Zika Virus Based on a Simple Molecular Cloning Strategy." *Viruses* 10(7):1–17.
- Nabel, Gary J. 1999. "A Transformed View of Cyclosporine." *Nature* 397(6719):471–72.
- Nascimento, Osvaldo J. M., and Ivan R. F. Da Silva. 2017. "Guillain-Barré Syndrome and Zika Virus Outbreaks." *Current Opinion in Neurology* 30(5):500–507.

- Nelson, Gary W., Stephen A. Stohlman, and Stanley M. Tahara. 2000. "High Affinity Interaction between Nucleocapsid Protein and Leader/Intergenic Sequence of Mouse Hepatitis Virus RNA." *Journal of General Virology* 81(1):181–88.
- Neuman, Benjamin W., Jeremiah S. Joseph, Kumar S. Saikatendu, Pedro Serrano, Amarnath Chatterjee, Margaret A. Johnson, Lujian Liao, Joseph P. Klaus, John R. Yates, Kurt Wüthrich, Raymond C. Stevens, Michael J. Buchmeier, and Peter Kuhn. 2008. "Proteomics Analysis Unravels the Functional Repertoire of Coronavirus Nonstructural Protein 3." *Journal of Virology* 82(11):5279–94.
- Neuman, Benjamin W., Gabriella Kiss, Andreas H. Kunding, David Bhella, M. Fazil Baksh, Stephen Connelly, Ben Droese, Joseph P. Klaus, Shinji Makino, Stanley G. Sawicki, Stuart G. Siddell, Dimitrios G. Stamou, Ian A. Wilson, Peter Kuhn, and Michael J. Buchmeier. 2011. "A Structural Analysis of M Protein in Coronavirus Assembly and Morphology." *Journal of Structural Biology* 174(1):11–22.
- Ngure, Marianne, Moheshwarnath Issur, Nikoloz Shkriabai, Hsiao-Wei Liu, Gonzalo Cosa, Mamuka Kvaratskhelia, and Matthias Götze. 2016. "Interactions of the Disordered Domain II of Hepatitis C Virus NS5A with Cyclophilin A, NS5B, and Viral RNA Show Extensive Overlap." *ACS Infectious Diseases* 2(11).
- Nosengo, Nicola. 2016. "Can You Teach Old Drugs New Tricks?" *Nature* 534(7607):314–16.
- Pandey, Sanjay. 2020. "Ivermectin in COVID 19: What Do We Know?" (January).
- Perales, Celia, Josep Quer, Josep Gregori, Juan Ignacio Esteban, and Esteban Domingo. 2015. "Resistance of Hepatitis C Virus to Inhibitors: Complexity and Clinical Implications." *Viruses* 7(11):5746–66.
- Perera, Rushika, Mansoor Khaliq, and Richard J. Kuhn. 2008. "Closing the Door on Flaviviruses: Entry as a Target for Antiviral Drug Design." *Antiviral Research* 80(1):11–22.
- Perlman, Stanley, and Jason Netland. 2009. "Coronaviruses Post-SARS: Update on Replication and Pathogenesis." *Nature Reviews Microbiology* 7(6):439–50.
- Perrucci, Gianluca Lorenzo, Aoife Gowran, Marco Zanobini, Maurizio Colognesi Capogrossi, Giulio Pompilio, and Patrizia Nigro. 2015. "Peptidyl-Prolyl Isomerases: A Full Cast of Critical Actors in Cardiovascular Diseases." *Cardiovascular Research* 106(3):353–64.
- Pfefferle, Susanne, Julia Schöpf, Manfred Kögl, Caroline C. Friedel, Marcel A. Müller, Javier Carbajo-Lozoya, Thorsten Stellberger, Ekatarina von Dall'Armi, Petra Herzog, Stefan Kallies, Daniela Niemeyer, Vanessa Ditt, Thomas Kuri, Roland Züst, Ksenia Pumpor, Rolf Hilgenfeld, Frank Schwarz, Ralf Zimmer, Imke Steffen, Friedemann Weber, Volker Thiel, Georg Herrler, Heinz Jürgen Thiel, Christel Schwegmann-Weßels, Stefan Pöhlmann, Jürgen Haas, Christian Drosten, and Albrecht von Brunn. 2011. "The SARS-Coronavirus-Host Interactome: Identification of Cyclophilins as Target for Pan-Coronavirus Inhibitors." *PLoS Pathogens* 7(10).
- Pires de Mello, Camilly P., Xun Tao, Tae Hwan Kim, Michael Vicchiarelli, Jürgen B. Bulitta, Ajeet Kaushik, and Ashley N. Brown. 2018. "Clinical Regimens of Favipiravir Inhibit Zika Virus Replication in the Hollow-Fiber Infection Model." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(9):1–11.
- Potena, Luciano, Giada Frascaroli, Francesco Grigioni, Tiziana Lazzarotto, Gaia Magnani, Luciana Tomasi, Fabio Coccolo, Liliana Gabrielli, Carlo Magelli, Maria P. Landini, and

- Angelo Branzi. 2004. "Hydroxymethyl-Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition Limits Cytomegalovirus Infection in Human Endothelial Cells." *Circulation* 109(4):532–36.
- Pradat, Pierre, Victor Virlogeux, Marie-Claude Gagnieu, Fabien Zoulim, and François Bailly. 2014. "Ribavirin at the Era of Novel Direct Antiviral Agents for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection: Relevance of Pharmacological Monitoring." *Advances in Hepatology* 2014:1–13.
- Pushkarsky, Tatiana, Vyacheslav Yurchenko, Christophe Vanpouille, Beda Brichacek, Iosif Vaisman, Shigetsugu Hatakeyama, Keiichi I. Nakayama, Barbara Sherry, and Michael I. Bukrinsky. 2005. "Cell Surface Expression of CD147/EMMPRIN Is Regulated by Cyclophilin 60." *Journal of Biological Chemistry* 280(30):27866–71.
- Qing, Jie, Yaxin Wang, Yuna Sun, Jiaoyan Huang, Wenzhong Yan, Jinglan Wang, Dan Su, Cheng Ni, Jian Li, Zihe Rao, Lei Liu, and Zhiyong Lou. 2014. "Cyclophilin A Associates with Enterovirus-71 Virus Capsid and Plays an Essential Role in Viral Infection as an Uncoating Regulator." *PLoS Pathogens* 10(10).
- Qing, Min, Feng Yang, Bo Zhang, Gang Zou, John M. Robida, Zhiming Yuan, Hengli Tang, and Pei Yong Shi. 2009. "Cyclosporine Inhibits Flavivirus Replication through Blocking the Interaction between Host Cyclophilins and Viral NS5 Protein." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8):3226–35.
- Del Real, Gustavo, Sonia Jiménez-Baranda, Emilia Mira, Rosa Ana Lacalle, Pilar Lucas, Concepción Gómez-Moutón, Marta Alegret, Jose María Peña, Manuel Rodríguez-Zapata, Melchor Alvarez-Mon, Carlos Martínez-A, and Santos Mañes. 2004. "Statins Inhibit HIV-1 Infection by down-Regulating Rho Activity." *Journal of Experimental Medicine* 200(4):541–47.
- Reau, Nancy, and Sujit Janardhan. 2015. "Should NS5A Inhibitors Serve as the Scaffold for All-Oral Anti-HCV Combination Therapies?" *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 11.
- Reiner, Željko, Mahdi Hatamipour, Maciej Banach, Matteo Pirro, Khalid Al-Rasadi, Tannaz Jamialahmadi, Dina Radenkovic, Fabrizio Montecucco, and Amirhossein Sahebkar. 2020. "Statins and the Covid-19 Main Protease: In Silico Evidence on Direct Interaction." *Archives of Medical Science* 16(2):490–96.
- Richman, Douglas D., and Luis Menendez-Arias. 2014. "Editorial Overview: Antivirals and Resistance: Advances and Challenges Ahead." (January).
- Salinas, Franco Maximiliano, Antonela Díaz Nebreda, Luciana Vázquez, María Virginia Gentilini, Victoria Marini, Martina Benedetti, Mercedes Soledad Nabaes Jodar, Mariana Viegas, Carina Shayo, and Carlos Alberto Bueno. 2020. "Imiquimod Suppresses Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication via PKA Pathway and Reduces RSV Induced-Inflammation and Viral Load in Mice Lungs." *Antiviral Research* 179(May):104817.
- Salinas, Sara, Yannick Simonin, Gregory L'Ambert, and Sébastien Nisole. 2019. "Autochthonous Cases of Zika Virus in Metropolitan France: A New Paradigm for This Arbovirus?" *Virologie* 23(6):329–32.
- Samara, Emad M., and Khalid A. Abdoun. 2014. "Concerns about Misinterpretation of Recent Scientific Data Implicating Dromedary Camels in Epidemiology of Middle East Respiratory Syndrome (MERS)." *MBio* 5(4):4–6.

- Sauerhering, Lucie, Alexandra Kupke, Lars Meier, Erik Dietzel, Judith Hoppe, Achim D. Gruber, Stefan Gattenloehner, Biruta Witte, Ludger Fink, Nina Hofmann, Tobias Zimmermann, Alexander Goesmann, Andrea Nist, Thorsten Stiewe, Stephan Becker, Susanne Herold, and Christin Peteranderl. 2020. "Cyclophilin Inhibitors Restrict Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus via Interferon- $\lambda$  in Vitro and in Mice." *European Respiratory Journal* 56(5).
- Sawicki, Stanley G., Dorothea L. Sawicki, and Stuart G. Siddell. 2007. "A Contemporary View of Coronavirus Transcription." *Journal of Virology* 81(1):20–29.
- Schmidt, Nora, Caleb A. Lareau, Hasmik Keshishian, Sabina Ganskih, Cornelius Schneider, Thomas Hennig, Randy Melanson, Simone Werner, Yuanjie Wei, Matthias Zimmer, Jens Ade, Luisa Kirschner, Sebastian Zielinski, Lars Dölken, Eric S. Lander, Neva Caliskan, Utz Fischer, Jörg Vogel, Steven A. Carr, Jochen Bodem, and Mathias Munschauer. 2020. "The SARS-CoV-2 RNA–Protein Interactome in Infected Human Cells." *Nature Microbiology*.
- Shannon, Ashleigh, Barbara Selisko, Nhung Thi Tuyet Le, Johanna Huchting, Franck Touret, Géraldine Piorkowski, Véronique Fattorini, François Ferron, Etienne Decroly, Chris Meier, Bruno Coutard, Olve Peersen, and Bruno Canard. 2020. "Rapid Incorporation of Favipiravir by the Fast and Permissive Viral RNA Polymerase Complex Results in SARS-CoV-2 Lethal Mutagenesis." *Nature Communications* 11(1):1–9.
- Sharp, Paul M., and Beatrice H. Hahn. 2011. "Origins of HIV and the AIDS Pandemic." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1):1–22.
- Shirato, Kazuya, Kazuhiko Kanou, Miyuki Kawase, and Shutoku Matsuyama. 2017. "Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry." *Journal of Virology* 91(1):1–12.
- Shirato, Kazuya, Miyuki Kawase, and Shutoku Matsuyama. 2017. "Wild-Type Human Coronaviruses Prefer Cell-Surface TMPRSS2 to Endosomal Cathepsins for Cell Entry." (January).
- Shirota, Yukihiro, Hong Luo, Weiping Qin, Shuichi Kaneko, Tatsuya Yamashita, Kenichi Kobayashi, and Seishi Murakami. 2002. "Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-Dependent RNA Polymerase Activity." *Journal of Biological Chemistry* 277(13):11149–55.
- Shrivastava-Ranjan, Punya, Mike Flint, Éric Bergeron, Anita K. McElroy, Payel Chatterjee, César G. Albariño, Stuart T. Nichol, and Christina F. Spiropoulou. 2018. "Statins Suppress Ebola Virus Infectivity by Interfering with Glycoprotein Processing." *MBio* 9(3):1–14.
- Sissoko, Daouda, Cedric Laouenan, Elin Folkesson, Abdoul Bing M'Lebing, Abdoul Habib Beavogui, Sylvain Baize, Alseny Modet Camara, Piet Maes, Susan Shepherd, Christine Danel, Sara Carazo, Mamoudou N. Conde, Jean Luc Gala, Géraldine Colin, Héléne Savini, Joseph Akoi Bore, Frederic Le Marcis, Fara Raymond Koundouno, Frédéric Petitjean, Marie Claire Lamah, Sandra Diederich, Alexis Tounkara, Geertrui Poelart, Emmanuel Berbain, Jean Michel Dindart, Sophie Duraffour, Annabelle Lefevre, Tamba Leno, Olivier Peyrouset, Léonid Irengé, N'Famara Bangoura, Romain Palich, Julia Hinzmann, Annette Kraus, Thierno Sadou Barry, Sakoba Berette, André Bongono, Mohamed Seto Camara, Valérie Chanfreau Munoz, Lanciné Doumbouya, Souley Harouna, Patient Mumbere Kighoma, Fara Roger Koundouno, René Lolamou, Cécé Moriba Loua, Vincent Massala,

- Kinda Moumouni, Célia Provost, Nenefing Samake, Conde Sekou, Abdoulaye Soumah, Isabelle Arnould, Michel Saa Komano, Lina Gustin, Carlotta Berutto, Diarra Camara, Fodé Saydou Camara, Joliene Colpaert, Léontine Delamou, Lena Jansson, Etienne Kourouma, Maurice Loua, Kristian Malme, Emma Manfrin, André Maomou, Adele Milinouno, Sien Ombet, Aboubacar Youla Sidiboun, Isabelle Verreckt, Pauline Yombouno, Anne Bocquin, Caroline Carbonnelle, Thierry Carmoi, Pierre Frange, Stéphane Mely, Vinh Kim Nguyen, Delphine Pannetier, Anne Marie Taburet, Jean Marc Treluyer, Jacques Kolie, Raoul Moh, Minerva Cervantes Gonzalez, Eeva Kuisma, Britta Liedigk, Didier Ngabo, Martin Rudolf, Ruth Thom, Romy Kerber, Martin Gabriel, Antonino Di Caro, Roman Wölfel, Jamal Badir, Mostafa Bentahir, Yann Deccache, Catherine Dumont, Jean François Durant, Karim El Bakkouri, Marie Gasasira Uwamahoro, Benjamin Smits, Nora Toufik, Stéphane Van Cauwenberghe, Khaled Ezzedine, Eric Dortenzio, Louis Pizarro, Aurélie Etienne, Jérémie Guedj, Alexandra Fizet, Eric Barte de Sainte Fare, Bernadette Murgue, Tuan Tran-Minh, Christophe Rapp, Pascal Piguet, Marc Poncin, Bertrand Draguez, Thierry Allaford Duverger, Solenne Barbe, Guillaume Baret, Isabelle Defourny, Miles Carroll, Hervé Raoul, Augustin Augier, Serge P. Eholie, Yazdan Yazdanpanah, Claire Levy-Marchal, Annick Antierrens, Michel Van Herp, Stephan Günther, Xavier de Lamballerie, Sakoba Keita, France Mentre, Xavier Anglaret, and Denis Malvy. 2016. "Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea." *PLoS Medicine* 13(3):1–36.
- Smither, Sophie J., Lin S. Eastaugh, Jackie A. Steward, Michelle Nelson, Robert P. Lenk, and Mark S. Lever. 2014. "Post-Exposure Efficacy of Oral T-705 (Favipiravir) against Inhalational Ebola Virus Infection in a Mouse Model." *Antiviral Research* 104(1):153–55.
- Starzl, Thomas E., Göran B. G. Klintmalm, Kendrick A. Porter, Shunzaburo Iwatsuki, and Gerhard P. J. Schröter. 1981. "Liver Transplantation with Use of Cyclosporin a and Prednisone." *New England Journal of Medicine* 305(5):266–69.
- Stohman, S. A., R. S. Baric, G. N. Nelson, L. H. Soe, L. M. Welter, and R. J. Deans. 1988. "Specific Interaction between Coronavirus Leader RNA and Nucleocapsid Protein." *Journal of Virology* 62(11):4288–95.
- Su, Shuo, Gary Wong, Weifeng Shi, Jun Liu, Alexander C. K. Lai, Jiyong Zhou, Wenjun Liu, Yuhai Bi, and George F. Gao. 2016. "Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses." *Trends in Microbiology* 24(6):490–502.
- Taler-Verčič, Ajda, Samra Hasanbašić, Selma Berbić, Veronika Stoka, Dušan Turk, and Eva Žerovnik. 2017. "Proline Residues as Switches in Conformational Changes Leading to Amyloid Fibril Formation." *International Journal of Molecular Sciences* 18(3).
- Tanaka, Yoshikazu, Yuka Sato, Shuichi Osawa, Mai Inoue, Satoka Tanaka, and Takashi Sasaki. 2012. "Suppression of Feline Coronavirus Replication in Vitro by Cyclosporin A." *Veterinary Research* 43(1):41.
- Tanaka, Yoshikazu, Yuka Sato, and Takashi Sasaki. 2017. "Feline Coronavirus Replication Is Affected by Both Cyclophilin A and Cyclophilin B." *Journal of General Virology* 98(2):190–200.
- Valente, Ana Paula, and Adolfo Henrique Moraes. 2019. "Zika Virus Proteins at an Atomic Scale: How Does Structural Biology Help Us to Understand and Develop Vaccines and Drugs against Zika Virus Infection?" *Journal of Venomous Animals and Toxins Including*

*Tropical Diseases* 25(February 2019):1–14.

- Vennema, Harry, Gert Jan Godeke, John W. A. Rossen, Wim F. Voorhout, Marian C. Horzinek, Dirk Jan E. Opstelten, and Peter J. M. Rottier. 1996. "Nucleocapsid-Independent Assembly of Coronavirus-like Particles by Co-Expression of Viral Envelope Protein Genes." *EMBO Journal* 15(8):2020–28.
- Ventura, Camila V., Mauricio Maia, Vasco Bravo-Filho, Adriana L. Góis, and Rubens Belfort. 2016. "Zika Virus in Brazil and Macular Atrophy in a Child with Microcephaly." *The Lancet* 387(10015):228.
- Vidotto, Alessandra, Ana T. S. Morais, Milene R. Ribeiro, Carolina C. Pacca, Ana C. B. Terzian, Laura H. V. G. Gil, Ronaldo Mohana-Borges, Philippe Gallay, and Mauricio L. Nogueira. 2017. "Systems Biology Reveals NS4B-Cyclophilin A Interaction: A New Target to Inhibit YFV Replication." *Journal of Proteome Research* 16(4).
- Wang, Huihui, Xuemei Li, Tao Li, Shubing Zhang, Lianzi Wang, Xian Wu, and Jiaqing Liu. 2020. "The Genetic Sequence, Origin, and Diagnosis of SARS-CoV-2." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 39(9):1629–35.
- Wang, Ping, and Joseph Heitman. 2005. "Protein Family Review The Cyclophilins."
- Wang, Qihui, Jianxun Qi, Yuan Yuan, Yifang Xuan, Pengcheng Han, Yuhua Wan, Wei Ji, Yan Li, Ying Wu, Jianwei Wang, Aikichi Iwamoto, Patrick C. Y. Woo, Kwok Yung Yuen, Jinghua Yan, Guangwen Lu, and George F. Gao. 2014. "Bat Origins of MERS-CoV Supported by Bat Coronavirus HKU4 Usage of Human Receptor CD26." *Cell Host and Microbe* 16(3):328–37.
- Wang, Zijun, Qi Zhou, Chenglin Wang, Qianling Shi, Shuya Lu, Yanfang Ma, Xufei Luo, Yangqin Xun, Weiguo Li, Muna Baskota, Yinmei Yang, Hui Zhai, Toshio Fukuoka, Hyeong Sik Ahn, Myeong Soo Lee, Zhengxiu Luo, Enmei Liu, and Yaolong Chen. 2020. "Clinical Characteristics of Children with COVID-19: A Rapid Review and Meta-Analysis." *Annals of Translational Medicine* 8(10):620–620.
- Watashi, Koichi, Makoto Hijikata, Masahiro Hosaka, Masashi Yamaji, and Kunitada Shimotohno. 2003. "Cyclosporin A Suppresses Replication of Hepatitis C Virus Genome in Cultured Hepatocytes." *Hepatology* 38(5):1282–88.
- White, D. J. G., B. D. Pentlow, and J. Harold. n.d. "Cyclosporin Receiving Given."
- White, Martyn K., Hassen S. Wollebo, J. David Beckham, Kenneth L. Tyler, Kamel Khalili, and Ann Neurol Author manuscript. 2016. "Zika Virus: An Emergent Neuropathological Agent HHS Public Access Author Manuscript." *Ann Neurol* 80(4):479–89.
- Wilde, Adriaan H. De, Darryl Falzarano, Jessika C. Zevenhoven-dobbe, Heinz Feldmann, Stanley Perlman, and Eric J. Snijder. 2016. "Alisporivir Inhibits MERS- and SARS-Coronavirus Replication in Cell Culture , but Not SARS-Coronavirus Infection in a Mouse Model." (January).
- Wilde, Adriaan H. De, Uyen Pham, Clara C. Posthuma, and Eric J. Snijder. 2018. "Cyclophilins and Cyclophilin Inhibitors in Nidovirus Replication." (January).
- Wilde, Adriaan H. De, Jessika C. Zevenhoven-dobbe, Corrine Beugeling, Udayan Chatterji, Danielle De Jong, Philippe Gallay, Karoly Szuhai, Clara C. Posthuma, and Eric J. Snijder. 2017. "Coronaviruses and Arteriviruses Display Striking Differences in Their Cyclophilin A-Dependence during Replication in Cell Culture." (January).

- de Wilde, Adriaan H., Jessika C. Zevenhoven-Dobbe, Yvonne van der Meer, Volker Thiel, Krishna Narayanan, Shinji Makino, Eric J. Snijder, and Martijn J. van Hemert. 2011. "Cyclosporin A Inhibits the Replication of Diverse Coronaviruses." *Journal of General Virology* 92(11):2542–48.
- Wiley, D. J., John Douglas, Karl Beutner, Tom Cox, Kenneth Fife, Anna Barbara Moscicki, and Lynne Fukumoto. 2002. "External Genital Warts: Diagnosis, Treatment, and Prevention." *Clinical Infectious Diseases* 35(Suppl 2):S210–24.
- Wilson, Lauren, Carolyn Mckinlay, Peter Gage, and Gary Ewart. 2004. "SARS Coronavirus E Protein Forms Cation-Selective Ion Channels." *Virology* 330(1):322–31.
- Wu, Zhiqiang, Li Yang, Xianwen Ren, Junpeng Zhang, Fan Yang, Shuyi Zhang, and Qi Jin. 2016. "ORF8-Related Genetic Evidence for Chinese Horseshoe Bats as the Source of Human Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus." *Journal of Infectious Diseases* 213(4):579–83.
- Xia, Shuai, Wei Xu, Qian Wang, Cong Wang, Chen Hua, Weihua Li, Lu Lu, and Shibo Jiang. 2018. "Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors Targeting HCoV-229E Spike Protein HR1 and HR2 Domains." *International Journal of Molecular Sciences* 19(2):8–11.
- Yang, Chunpeng, Rui Gong, and Natalia de Val. 2019. "Development of Neutralizing Antibodies against Zika Virus Based on Its Envelope Protein Structure." *Virologica Sinica* 34(2):168–74.
- Yang, Feng, Jason M. Robotham, Heather B. Nelson, Andre Irsigler, Rachael Kenworthy, and Hengli Tang. 2008. "Cyclophilin A Is an Essential Cofactor for Hepatitis C Virus Infection and the Principal Mediator of Cyclosporine Resistance In Vitro." *Journal of Virology* 82(11):5269–78.
- Zeuzem, S., R. Flisiak, J. M. Vierling, W. Mazur, G. Mazzella, S. Thongsawat, D. Abdurakhmanov, N. Van K inh, P. Calistru, J. Heo, C. Stanciu, M. Gould, M. Makara, S. J. Hsu, P. Buggisch, D. Samuel, D. Mutimer, B. Nault, M. Merz, W. Bao, L. H. Griffel, C. Brass, and N. V. Naoumov. 2015. "Randomised Clinical Trial: Alisporivir Combined with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-Na ive Patients with Chronic HCV Genotype 1 Infection (ESSENTIAL II)." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 42(7):829–44.