



**HAL**  
open science

# Stratégies de repositionnement et combinaisons de médicaments pour le développement de thérapies antivirales contre les virus respiratoires

Blandine Padey

► **To cite this version:**

Blandine Padey. Stratégies de repositionnement et combinaisons de médicaments pour le développement de thérapies antivirales contre les virus respiratoires. Virologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1064 . tel-04100302

**HAL Id: tel-04100302**

**<https://theses.hal.science/tel-04100302>**

Submitted on 17 May 2023

**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.



N° d'ordre NNT : 2022LYSE1064

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 341**

**Evolution Ecosystèmes Modélisation Microbiologie (E2M2)**

**Spécialité de doctorat** : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
**Discipline** : Virologie

Soutenue publiquement le 3 mai 2022 par :  
**Blandine PADEY**

---

**Stratégies de repositionnement et  
combinaisons de médicaments pour le  
développement de thérapies antivirales  
contre les virus respiratoires**

---

Devant le jury composé de :

<b>Dr Moreau, Karen</b>	Professeure des Universités Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
<b>Dr Ducatez, Mariette</b>	Directrice de recherche INRAE Unité Interactions hôtes-agents pathogènes Ecole nationale vétérinaire de Toulouse	Rapporteure
<b>Dr Belouzard, Sandrine</b>	Chercheuse CNRS Centre d'infection et d'immunité de Lille	Rapporteure
<b>Dr De Chasse, Benoît</b>	Co-fondateur d'ENYO Pharma Responsable de la plateforme de <i>drug discovery</i>	Examineur
<b>Dr Rosa-Calatrava, Manuel</b>	Directeur de recherche INSERM Co-directeur du Laboratoire VirPath (CIRI) Co-fondateur de Signia Therapeutics	Directeur de thèse
<b>Dr Pizzorno, Andrés</b>	Chercheur postdoctoral Laboratoire VirPath (CIRI) Co-fondateur de Signia Therapeutics	Co-directeur de thèse



# **Université Claude Bernard – LYON 1**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

## RESUME

Les infections aiguës respiratoires d'origine virale demeurent une préoccupation majeure de santé publique, impactant significativement nos sociétés d'un point de vue sanitaire, économique et sociétal. La pandémie actuelle de COVID-19 ne peut que renforcer ce constat et souligner l'importance de disposer d'un arsenal prophylactique et thérapeutique efficace pour lutter contre ces pathogènes respiratoires émergents et ré-émergents. L'apparition récurrente de mutations de résistance virale constitue la limite majeure des médicaments antiviraux classiques, et particulièrement de l'arsenal très limité à ce jour contre les virus respiratoires, légitimant ainsi le développement de nouvelles approches thérapeutiques, telles que le repositionnement de médicaments, les stratégies ciblant l'hôte ou encore les associations de molécules à activité antivirale et/ou immunomodulatrice.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est inscrit dans un programme de recherche visant à développer une stratégie innovante permettant l'identification de molécules à fort potentiel pour leur repositionnement comme antiviraux contre les virus respiratoires, par un criblage *in silico* basé sur la comparaison de signatures virogénomiques et chemogénomiques. L'analyse transcriptomique d'échantillons biologiques issus de patients infectés par les virus influenza nous a ainsi permis d'identifier le diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques indiqué dans le traitement de l'hypertension pulmonaire, comme candidat à un repositionnement contre les virus de la grippe. L'analyse de sa signature chemogénomique a permis de formuler une hypothèse pertinente quant à son mode d'action antiviral, basé sur la modulation de la réponse interféron dans le tissu épithélial respiratoire. En parallèle, nos travaux sur les combinaisons de molécules ont souligné la capacité de certaines molécules ciblant la cellule-hôte à potentialiser l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des antiviraux classiques ciblant les déterminants viraux. Ces stratégies combinatoires antivirales ont également fait leurs preuves contre le virus SARS-CoV-2 dans plusieurs modèles précliniques, contribuant ainsi à enrichir nos connaissances sur la physiopathologie associée à ce nouveau virus et à la mise en place de modèles physiologiques prédictifs *in vitro* pour l'évaluation pertinente de molécules candidates antivirales.

En résumé, mes travaux de thèse ont notamment contribué à (i) la mise en place de modèles précliniques d'infection basés sur des cultures en interface air-liquide d'épithélium respiratoire humain reconstitué, pour l'évaluation de molécules antivirales en mono- et bithérapies, (ii) l'identification du diltiazem comme antiviral à large spectre via son mécanisme d'action stimulant l'expression des interférons lambda (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186 ; WO2021/FR50406 20210310), (iii) la démonstration *in vitro* du bénéfice du diltiazem à potentialiser en combinaison l'efficacité d'antiviraux approuvés, comme les inhibiteurs de neuraminidase (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186) et de polymérase (WO2021FR50049 20210112), (iv) la mise en œuvre d'un essai clinique de phase IIb (FLUNEXT) évaluant la combinaison du diltiazem avec l'oseltamivir chez des patients hospitalisés pour une grippe sévère (NCT03212716), et (v) la préparation d'une nouvelle étude multicentrique de phase IIb (DICOV) visant à évaluer le bénéfice apporté par un traitement avec du diltiazem en complément du standard de soins pour une pneumopathie hypoxémiante à COVID-19.

Dans cette dynamique, ces travaux se poursuivent au sein de la start up Signia Therapeutics en collaboration avec le laboratoire VirPath dans le but de contribuer au développement (i) de la plateforme de *drug discovery* « SIGNATURA » intégrant l'analyse transcriptomique, des outils d'intelligence artificielle et des modèles physiologiques prédictifs permettant un criblage *in silico* optimisé et une évaluation préclinique accélérée de candidats-médicaments, ainsi que (ii) d'une nouvelle formulation du diltiazem permettant son administration intranasale sous forme d'aérosol, à visée thérapeutique et/ou prophylactique.

Mots clés : virus respiratoires, influenza, SARS-CoV-2, antiviraux, repositionnement de médicaments, combinaisons de molécules, synergie, diltiazem, épithélium respiratoire humain, interférons lambda, signatures virogénomiques et chemogénomiques, aérosolthérapie.

## ABSTRACT

Acute respiratory infections of viral origin remain a major public health concern, significantly impacting our societies from a health, economic and societal point of view. The current COVID-19 pandemic can only support this observation and underline the importance of having an effective prophylactic and therapeutic arsenal to fight against these emerging and re-emerging respiratory pathogens. The recurrent appearance of viral resistance mutations constitutes the major limitation of conventional antiviral drugs, and particularly of the very limited arsenal, to date, against respiratory viruses, thus legitimizing the development of new therapeutic approaches, such as drug repurposing, strategies targeting the host or drug combinations with antiviral and/or immunomodulatory activity.

In this context, my thesis work is part of a research program aimed at developing an innovative strategy allowing the identification of molecules with high potential for their repositioning as antivirals against respiratory viruses, by *in silico* screening based on the comparison of virogenomic and chemogenomic signatures. Transcriptomic analysis of biological samples from patients infected by influenza viruses thus enabled us to identify diltiazem, a calcium channel blocker indicated in the treatment of pulmonary hypertension, as a candidate for repositioning against influenza viruses. The analysis of its chemogenomic signature enabled us to formulate a relevant hypothesis as to its antiviral mode of action, based on the interferon response modulation in the respiratory epithelial tissue. In parallel, our work on drug combinations highlighted the ability of molecules targeting the host cell to potentiate the *in vitro* and *in vivo* efficacy of conventional antivirals targeting viral determinants. These combinatorial antiviral strategies have also been proven against the SARS-CoV-2 virus in several preclinical models, thus contributing to enriching our knowledge of the physiopathology associated with this new virus and to the establishment of predictive physiological *in vitro* models for the relevant evaluation of antiviral drug candidates.

In summary, my thesis work has notably contributed to (i) the establishment of preclinical models of infection based on air/liquid interface cultures of reconstituted human respiratory epithelium, for the evaluation of antiviral drugs in mono- and double-therapies, (ii) the identification of diltiazem as a broad-spectrum antiviral via its mechanism of action stimulating the expression of lambda interferons (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186; WO2021/FR50406 20210310), (iii) the *in vitro* demonstration of the benefit of diltiazem in potentiating the efficacy of approved antiviral drugs in combination, such as neuraminidase (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186) and polymerase (WO2021FR50049 20210112) inhibitors, (iv) the implementation of a phase IIb (FLUNEXT) clinical trial evaluating the combination of diltiazem with oseltamivir in patients hospitalized for severe influenza (NCT03212716), and (v) the preparation of a new multicentric phase IIb (DICOV) clinical trial to assess the benefit of treatment with diltiazem in addition to the standard of care for hypoxemic COVID-19 pneumonia.

In this dynamic, this work is continuing within the start-up Signia Therapeutics in collaboration with the VirPath laboratory with the aim of contributing to the development of (i) the "SIGNATURA" drug discovery platform integrating transcriptomic analysis, tools for artificial intelligence and predictive physiological models allowing optimized *in silico* screening and accelerated preclinical evaluation of drug candidates, as well as (ii) a new formulation of diltiazem allowing its intranasal delivery in aerosol form, for therapeutic and/or prophylactic aim.

Key words: respiratory viruses, influenza, SARS-CoV-2, antiviral drugs, drug repurposing, drug combinations, synergy, diltiazem, human respiratory epithelium, interferon lambda, virogenomic and chemogenomic signatures, aerosol therapy.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury, le Dr Mariette Ducatez, le Dr Sandrine Belouzard, le Dr Karen Moreau ainsi que le Dr Benoît De Chassey, pour le temps et l'attention qu'ils ont accordés à mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement mes deux directeurs de thèse,

le Dr Manuel Rosa-Calatrava, pour avoir cru en moi dès mon arrivée au sein de l'équipe. Merci de m'avoir permis d'apprendre mon métier dans la VirTeam, de m'avoir toujours soutenue, et poussée dans mes retranchements à de nombreuses reprises. Merci également pour ces sept années d'échanges qui m'ont fait grandir, professionnellement bien sûr, mais aussi personnellement ;

et le Dr Andrés Pizzorno, pour m'avoir toujours écoutée, soutenue et guidée sur le chemin de la réflexion. Je le remercie pour son calme, son pragmatisme et sa capacité hors du commun à résoudre les problèmes.

Je remercie également Signia Therapeutics, en la personne des Présidents et CEO, Michel Cousineau, Philippe Personne, Andrés Pizzorno et Angelita De Francisco, ainsi que l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour avoir financé mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également au Dr François-Loïc Cosset, Directeur du Centre International de Recherche en Infectiologie, au Pr Bruno Lina, Directeur du laboratoire VirPath, ainsi qu'à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et l'école doctorale E2M2, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au laboratoire VirPath.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de suivi de thèse, le Pr Patricia Doublet, le Dr Sylvie Pillet et le Dr Jean-François Eleouet, pour leurs précieux conseils et leur soutien.

Un merci tout particulier au Dr Olivier Terrier, pour avoir répondu positivement à ma candidature pour un stage de Master en 2014. Je le remercie d'avoir initié mes premiers pas en virologie et contribué à me faire une place dans l'équipe, ainsi que pour son soutien dans les moments difficiles.

Un immense merci à l'ensemble de la VirTeam, ma deuxième famille. Merci à mes précieux collègues pour leur implication et leur contribution à mes travaux de thèse, qui constituent une démonstration de nos travaux d'équipe. Merci de partager et d'illuminer mon quotidien depuis toutes ces années et d'être toujours là, dans les bons comme les mauvais moments.

Merci à ceux qui m'ont tout appris, Thomas J., Aurélien et Anaïs ; et aux autres membres de la VirDreamTeam avec qui je continue d'apprendre chaque jour, Julia, Victoria, Pauline, Caroline, Emilie et Cédrine.

Merci également à mes bio-informaticiens préférés, Claire et Julien, et à mes collègues de Signia Therapeutics, Catalina, Laetitia, Thomas L., Thomas C. et Abdel,

ainsi qu'à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer, sous les casquettes de VirPath, VirNext, VirHealth, VirexpR ou Vaxxel, Fanny, Justine, Fannie, Léa, Dounia, Laurane, Mendy, Camille S., Laurent, Camille M., Clément, Sophie, William, Carla, Clara, Emma, Paul, ...

Enfin, je remercie affectueusement mes proches, ma famille et mes amis, pour leur soutien sans faille, et tout particulièrement mes parents et mon compagnon. J'ai hâte de lever mon verre avec vous, avec une tendre pensée pour ceux avec qui je n'aurai plus le bonheur de le faire.



## AVANT-PROPOS

Pendant mon cursus à l'Institut de Formation de Techniciens de Laboratoire Médical de l'Université Catholique de Lyon, j'ai eu l'opportunité de réaliser plusieurs stages dans des laboratoires de recherche académique et dans l'industrie pharmaceutique qui m'ont permis d'acquérir des connaissances techniques et analytiques essentielles à la mise en œuvre de travaux expérimentaux. Après l'obtention de mon diplôme d'Etat de technicienne, j'ai complété ma formation à l'Université Lyon 1 par une Maîtrise en Sciences du Médicament (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques) et un Master en Génétique et Biologie de la Cellule, spécialité professionnelle Infectiologie.

La thématique du repositionnement des médicaments contre la grippe a fait l'objet de mes deux stages de Master au laboratoire VirPath où j'ai été accueillie à partir de 2014, encadrée par le Dr Olivier Terrier, dans l'équipe codirigée par le Dr Manuel Rosa-Calatrava et le Pr Bruno Lina. A la suite de ces stages, j'ai eu la chance d'intégrer l'équipe, dans laquelle j'ai travaillé comme ingénieure d'études pendant 3 ans, de juin 2015 à octobre 2018.

D'abord en tant que chargée de projets de recherche et développement pour la plateforme de recherche technologique du laboratoire (VirNext), où j'ai réalisé des travaux de recherche en lien avec l'industrie dans les domaines des antiviraux et du vaccin, puis au sein de l'équipe de recherche du laboratoire où j'ai participé à plusieurs programmes de recherche fondamentale focalisés sur les interactions fonctionnelles hôte-virus. En particulier, mon implication dans les projets FLUNEXT et RESPIROMIX a contribué à (i) l'identification du diltiazem comme candidat à un repositionnement contre la grippe par un criblage basé sur la comparaison de signatures virogénomiques et chemogénomiques, (ii) la mise au point des modèles 3D d'études précliniques d'infections (influenza, *Pneumovirus*, *Coronavirus*) : les épithéliums respiratoires humains reconstitués, et (iii) la mise en place au laboratoire de méthodologies d'évaluations de combinaisons de molécules.

Dans une dynamique de valorisation, la start-up Signia Therapeutics a été créée en 2017 dans le cadre d'un partenariat de recherche mis en place avec l'UCBL1, sur la base des différentes preuves de concept validées au laboratoire, de son portefeuille de brevets et du lancement de l'essai clinique FLUNEXT. Avec l'objectif de contribuer à la mise en place et au développement de SIGNATURA, une plateforme de criblage et d'évaluation de médicaments pour leur repositionnement comme antiviraux de nouvelle génération ciblant la cellule-hôte, j'ai saisi l'opportunité de poursuivre ma formation professionnelle dans le cadre d'une thèse doctorale en convention CIFRE, grâce à l'obtention d'un financement de l'ANRT, au sein de Signia Therapeutics et en partenariat avec le laboratoire VirPath.

Ainsi, mon projet de thèse a porté sur les stratégies de repositionnement et combinaisons de médicaments pour le développement de thérapies antivirales contre les virus respiratoires, et plus particulièrement les virus influenza et SARS-CoV-2.

L'aboutissement du projet FLUNEXT a donné lieu à une première publication dans *Frontiers in Immunology* (**Article 1**), rapportant l'identification du diltiazem comme candidat antiviral à un repositionnement contre la grippe, ciblant la cellule-hôte. Son mode d'action antiviral, basé sur la modulation de la réponse interféron dans le tissu épithélial respiratoire a souligné le potentiel antiviral à large spectre de ce médicament repositionné ainsi que sa capacité à potentialiser en combinaison l'effet des antiviraux classiques ciblant les déterminants viraux. Ces travaux ont notamment contribué à un dépôt de brevet international (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186) et au démarrage d'un essai clinique multicentrique de phase IIb en 2018, évaluant l'efficacité antivirale du diltiazem en

complément du traitement de référence à l'oseltamivir contre la grippe sévère dans 25 services de réanimation (FLUNEXT, PHRC #15-0442, NCT03212716).

En parallèle de l'approche ciblée sur la cellule-hôte, j'ai pris part à une seconde étude publiée dans *Viruses* (**Article 2**), visant à la détermination du potentiel synergique des antiviraux classiques approuvés contre les virus influenza, développée en collaboration avec l'équipe du Dr Guy Boivin (CHU Laval, Québec). Ce travail a contribué à la mise en place et à la validation d'outils pertinents *in vitro* pour l'évaluation de combinaisons de médicaments, en mettant en avant le potentiel des combinaisons de médicaments issus de différentes familles avec des mécanismes d'action différents, et particulièrement l'efficacité de la combinaison du baloxavir, un inhibiteur de polymérase, avec les inhibiteurs de neuraminidase.

Ces travaux princeps et la mise en œuvre opérationnelle d'outils, modèles d'infection et logistique (laboratoires BSL-2 et BSL-3), nous ont permis de faire preuve de réactivité face à l'émergence du SARS-CoV-2 et ont abouti à la publication d'une nouvelle étude dans *Cell Report in Medicine* au premier semestre 2020 (**Article 3**) décrivant la physiopathologie de ce nouveau virus en modèle d'épithéliums respiratoires humains et l'évaluation de molécules candidates antivirales en mono- et bithérapies dans ces modèles prédictifs pertinents *in vitro*.

Enfin, la caractérisation du mode d'action du diltiazem sur l'induction de l'expression endogène des interférons lambda dans le tissu épithélial respiratoire et l'application de notre stratégie combinatoire antivirale associant les antiviraux classiques à des molécules ciblant la cellule-hôte a donné lieu à l'étude finale de ma thèse (**Manuscrit 4**), rapportant les capacités antivirales à large spectre du diltiazem, contre les virus influenza (sauvages et porteurs de mutations de résistances aux antiviraux) et plusieurs variants d'intérêt du SARS-CoV-2, ainsi que son potentiel en combinaison avec des inhibiteurs de polymérase (baloxavir et molnupiravir). Ces travaux ont notamment contribué au dépôt de deux demandes de brevets (WO2021FR50406 20210310667 et WO2021FR50049 20210112712) et à la préparation d'un essai clinique de phase IIb (DICOV) visant à évaluer le bénéfice apporté par un traitement avec du diltiazem en complément du standard de soin pour une pneumopathie hypoxémiante à COVID-19.

Du point de vue personnel, cette thèse a représenté un défi important, mettant à profit mon expérience pour piloter et développer des projets de recherche menés par l'équipe. Elle a également fait ressortir l'importance du travail collectif tant sur l'aboutissement des projets expérimentaux que sur l'épanouissement au travail. Vivre la pandémie du côté des chercheurs a été une expérience très enrichissante qui a confirmé mon attrait à travailler sur des projets scientifiques dynamiques. J'aspire maintenant à pouvoir mettre à profit ces apprentissages en contribuant au développement de Signia Therapeutics et en m'impliquant dans des projets stimulants et ambitieux de recherche et développement.

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	4
ABSTRACT .....	6
REMERCIEMENTS .....	7
AVANT-PROPOS.....	8
TABLE DES MATIERES .....	10
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX .....	16
ABREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION GENERALE .....	19
Chapitre 1.    Les infections respiratoires aiguës .....	20
1.    Physiologie des voies respiratoires .....	20
1.1.    Les voies respiratoires hautes .....	20
1.2.    Les voies respiratoires basses.....	21
1.3.    Fonction barrière de l'épithélium respiratoire.....	21
2.    Définition des infections respiratoires aiguës.....	22
3.    Enjeux sanitaires et économiques.....	22
4.    Présentation des virus respiratoires.....	24
4.1.    Les virus influenza .....	24
4.1.1.    Transmission.....	24
4.1.2.    Symptômes.....	25
4.1.3.    Epidémiologie .....	25
4.1.3.1.    Pandémies grippales historiques.....	26
4.1.3.2.    Epidémiologie de la grippe saisonnière .....	27
4.1.4.    Structure et composition des virus influenza.....	29
4.1.4.1.    Organisation du virus .....	29
4.1.4.2.    Génome et protéines virales .....	29
4.1.4.3.    Sauts et glissements antigéniques .....	32
4.1.5.    Cycle de réplication virale des virus influenza.....	32
4.2.    Le virus SARS-CoV-2.....	35
4.2.1.    La famille des Coronavirus.....	35
4.2.2.    Spécificité des Coronavirus pandémiques.....	35
4.2.2.1.    SARS-CoV .....	36
4.2.2.2.    MERS-CoV .....	36
4.2.2.3.    SARS-CoV-2.....	37

4.2.3.	Transmission.....	38
4.2.4.	Symptômes.....	39
4.2.5.	Epidémiologie .....	40
4.2.5.1.	Chronologie de la pandémie de SARS-CoV-2 : faits marquants .....	40
4.2.5.2.	Les variants du SARS-CoV-2.....	45
4.2.6.	Structure et composition du virus SARS-CoV-2 .....	48
4.2.6.1.	Organisation du virus .....	48
4.2.6.2.	Génome et protéines virales .....	48
4.2.7.	Cycle de réplication virale du virus SARS-CoV-2.....	51
5.	Diagnostic des virus respiratoires .....	53
5.1.	Examen clinique.....	53
5.2.	Diagnostic direct.....	53
5.2.1.	Diagnostic moléculaire .....	54
5.2.2.	Diagnostic antigénique.....	54
5.3.	Diagnostic indirect.....	55
6.	Prophylaxie.....	56
6.1.	Les vaccins contre la grippe.....	56
6.2.	Les vaccins contre la COVID-19 .....	58
7.	Traitements .....	60
7.1.	Les antiviraux dirigés contre les virus influenza .....	60
7.1.1.	Les adamantanes.....	61
7.1.2.	Les inhibiteurs de neuraminidase .....	61
7.1.3.	Les inhibiteurs de polymérase.....	62
7.1.4.	Les inhibiteurs de fusion.....	62
7.1.5.	Candidats en développement .....	63
7.1.6.	Les alternatives et nouvelles stratégies antivirales.....	63
7.2.	Les traitements contre le virus SARS-CoV-2.....	64
8.	Les modèles d'études précliniques .....	66
8.1.	Les différents types cellulaires .....	66
8.2.	Les modèles de cultures cellulaires <i>in vitro</i> .....	67
8.2.1.	La culture monocouche en phase liquide.....	68
8.2.2.	Les systèmes complexes tridimensionnels.....	69
8.2.2.1.	La culture d'organoïdes en phase liquide .....	69
8.2.2.2.	La culture en interface air-liquide .....	70
8.2.2.3.	Les systèmes « <i>lung-on-chip</i> ».....	74
Chapitre 2.	Les interférons de type III.....	77

1.	Généralités .....	77
1.1.	Les différents types d'interférons .....	77
1.1.1.	Interférons de type I.....	77
1.1.2.	Interférons de type II.....	78
1.1.3.	Interférons de type III.....	78
1.2.	Les gènes des interférons lambda.....	78
1.2.1.	IFNL1, IFNL2, IFNL3, IFNL4.....	78
1.2.2.	Polymorphismes de l'IFNL4 .....	79
1.3.	Récepteurs.....	80
2.	Du stimulus à la sécrétion des ISG : schéma général .....	80
2.1.	Induction des interférons .....	81
2.2.	Induction des ISG.....	81
3.	Spécificité des cellules épithéliales .....	82
3.1.	RIG-I est un PRR majeur .....	82
3.2.	La localisation de MAVS détermine l'espèce produite.....	82
3.3.	NFKB joue un rôle régulateur .....	83
4.	Les interférons $\lambda$ constituent la première ligne de défense antivirale du tractus respiratoire supérieur .....	83
4.1.	Les interférons $\alpha$ , $\beta$ et $\lambda$ ont des activités non redondantes.....	84
4.2.	Les interférons $\lambda$ n'activent pas d'inflammation.....	85
5.	Activité antivirale des ISG.....	86
5.1.	Mx1.....	87
5.2.	Viperin (RSAD2) .....	87
5.3.	IFITM3.....	87
5.4.	OAS1 .....	88
Chapitre 3.	Le repositionnement de médicaments .....	89
1.	Définition du médicament.....	89
2.	Le marché du médicament.....	89
3.	Processus de développement d'un médicament <i>de novo</i> .....	89
4.	Le repositionnement de médicaments .....	92
4.1.	Définition du repositionnement.....	92
4.2.	Avantages du repositionnement .....	92
4.2.1.	Réduction du temps et des coûts de R&D.....	92
4.2.2.	Valorisation de composés abandonnés.....	93
4.2.3.	Nouvelle activité inventive .....	93
4.2.4.	Enjeux sanitaires.....	94

4.3.	Stratégies et modes de repositionnement des médicaments .....	94
4.3.1.	La sérendipité, « découverte scientifique au hasard » .....	95
4.3.2.	Repositionnement basé sur la cible thérapeutique .....	96
4.3.3.	Criblage à haut-débit .....	97
4.3.4.	Criblage systématiques phénotypiques .....	98
4.3.5.	Outils de criblage <i>in silico</i> .....	99
4.3.5.1.	Docking moléculaire .....	100
4.3.5.2.	Outils Omics.....	101
4.4.	Exemples de repositionnement pour le traitement de la grippe .....	103
4.5.	Exemples de repositionnement pour le traitement de la COVID-19 .....	105
4.5.1.	Inhibiteurs de polymérase.....	107
4.5.2.	Inhibiteurs de protéase .....	110
4.5.3.	Inhibiteurs de fusion ou d'endocytose.....	110
4.5.4.	Interactions avec la nucléocapside et les vRNP.....	112
4.5.5.	Interactions avec le système de l'angiotensine.....	113
4.5.6.	Médiateurs de l'inflammation.....	113
	RESULTATS.....	115
1.	Contexte de la thèse.....	116
1.1.	Stratégie du laboratoire .....	116
1.2.	Présentation des travaux de thèse.....	118
2.	Le repositionnement de médicaments ciblant la cellule-hôte pour leur activité antivirale contre les virus influenza.....	120
2.1.	Article 1: <i>“Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures”</i> .....	121
2.2.	Présentation de l'article .....	139
2.3.	Discussion et perspectives.....	140
3.	Combiner des antiviraux pour potentialiser leur efficacité et potentiellement limiter l'émergence de mutations de résistance .....	143
3.1.	Article 2: <i>“In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses”</i> .....	144
3.2.	Présentation de l'article .....	157
3.3.	Discussion et perspectives.....	159
4.	Les premiers mois de la pandémie de COVID-19 : caractérisation du SARS-CoV-2 et perspectives de traitements.....	161
4.1.	Article 3: <i>“Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia”</i> .....	162
4.2.	Présentation de l'article .....	176

4.3. Discussion et perspectives.....	177
5. Le mode d'action pan-antiviral du diltiazem par la stimulation de l'expression des interférons lambda dans l'épithélium respiratoire permet de potentialiser l'efficacité des antiviraux ciblant des déterminants viraux.....	181
5.1. Manuscrit 4: <i>“Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses”</i> .....	182
5.2. Présentation de l'article .....	210
5.3. Discussion et perspectives.....	212
DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES .....	217
ANNEXES.....	228
1. <i>“Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection : Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy”</i> .....	231
2. <i>“Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia”</i> .....	243
3. <i>“In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2”</i> .....	255
4. <i>“Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs”</i> .....	261
BIBLIOGRAPHIE.....	279

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN .....	20
FIGURE 2 : ORGANISATION DES CELLULES DES EPITHELIUMS DU TRACTUS RESPIRATOIRE .....	21
FIGURE 3 : HISTORIQUE DE LA CIRCULATION DES SOUCHES D'INFLUENZA PANDEMIQUES AU COURS DU SIECLE DERNIER.....	26
FIGURE 4 : EPIDEMIOLOGIE DE LA GRIPPE SAISONNIERE SUR LA SAISON 2019-2020.....	28
FIGURE 5 : NOMBRE HEBDOMADAIRE DE PRELEVEMENTS POSITIFS A INFLUENZA EN FRANCE METROPOLITAINE .....	28
FIGURE 6 : ORGANISATION DU VIRUS INFLUENZA.....	29
FIGURE 7 : SCHEMA DES SEGMENTS NS, PA, PB1 ET M DES VIRUS INFLUENZA A ET DE LA TRANSCRIPTION DES PROTEINES.....	30
FIGURE 8 : SAUTS ET GLISSEMENTS ANTIGENIQUES.....	32
FIGURE 9 : CYCLE DE REPLICATION VIRALE DES VIRUS INFLUENZA .....	34
FIGURE 10 : CHRONOLOGIE DE L'EVOLUTION ET DE LA SEVERITE DE LA MALADIE DE COVID-19.....	39
FIGURE 11 : NOMBRE DE NOUVEAUX CAS JOURNALIERS DE COVID-19 RAPPORTES PAR CONTINENT.....	41
FIGURE 12 : SITUATION PANDEMIQUE PAR CONTINENT DU 30 DECEMBRE 2019 AU 21 DECEMBRE 2020 .....	43
FIGURE 13 : CAS REPORTES ET NOMBRE DE DECES PAR SEMAINE DE LA COVID-19 DANS LE MONDE PAR REGION, D'APRES LE BILAN EPIDEMIOLOGIQUE DE L'OMS DU 7 DECEMBRE 2021. ....	44
FIGURE 14 : FREQUENCE DES SEQUENÇAGES DES VARIANTS DU SARS-COV-2 ENREGISTRES DANS GISAID AU NIVEAU MONDIAL DE DECEMBRE 2020 A DECEMBRE 2021 .....	47
FIGURE 15 : FREQUENCE DES SEQUENÇAGES DES VARIANTS DU SARS-COV-2 ENREGISTRES DANS GISAID D'AVRIL 2020 A DEBUT JANVIER 2022.....	47
FIGURE 16 : ORGANISATION DU VIRUS SARS-COV-2 .....	48
FIGURE 17 : STRUCTURE DU GENOME DU SARS-COV-2 .....	48
FIGURE 18: CYCLE DE REPLICATION VIRALE DU SARS-COV-2.....	52
FIGURE 19 : TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE COMMERCIALISE PAR ALLTEST .....	55
FIGURE 20 : PROCEDE DE FABRICATION ALLANTOÏQUE DU VACCIN INACTIVE INFLUENZA A.....	57
FIGURE 21 : PROCEDE DE GENERATION D'UN TISSU EPITHELIAL DIFFERENCIE A L'INTERFACE AIR-LIQUIDE A PARTIR DE CELLULES PRIMAIRES HUMAINES.....	70
FIGURE 22 : SUIVI DES PARAMETRES INDICATEURS DE LA DIFFERENCIATION DES EPITHELIUMS A L'INTERFACE AIR-LIQUIDE AU COURS DU TEMPS .....	71
FIGURE 23 : MESURE DE LA RESISTANCE TRANSEPITHELIALE (TEER) .....	71
FIGURE 24 : MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS TISSULAIRES TRADUISANT LA DIFFERENCIATION DES EPITHELIUMS .....	72
FIGURE 25 : LE SYSTEME « LUNG-ON-CHIP » .....	75
FIGURE 26 : SCHEMA COMMERCIAL DU « HUMAN-ON-A-CHIP » DEVELOPPE PAR TISSUSE .....	75
FIGURE 27 : SCHEMA DES GENES DES INTERFERONS LAMBDA ET EMBLEMES DES POLYMORPHISMES DES VARIANTS FONCTIONNELS D'IFNL4 .....	79
FIGURE 28 : SCHEMA GENERAL DES VOIES DE SIGNALISATION DES INTERFERONS .....	80
FIGURE 29 : LES INTERFERONS DE TYPE III CONSTITUENT LA PREMIERE LIGNE DE DEFENSE ANTIVIRALE LOCALE .....	84
FIGURE 30 : SCHEMA GENERAL DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES INTERFERONS DE TYPE I CONDUISANT A LA SECRETION DES ISG .....	86
FIGURE 31 : SCHEMA RECAPITULATIF DU PROCESSUS DE DEVELOPPEMENT D'UN MEDICAMENT DE NOVO ....	90
FIGURE 32 : SCHEMA COMPARATIF DU DEVELOPPEMENT CLINIQUE D'UN MEDICAMENT DE NOVO VERSUS UN MEDICAMENT REPOSITIONNE.....	93
FIGURE 33 : SCHEMA DES DIFFERENTES STRATEGIES DE REPOSITIONNEMENT DE MEDICAMENTS.....	95
FIGURE 34 : PERTURBATION DE LA BALANCE DU SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE PAR LE SARS-COV-2 .....	97
FIGURE 35 : ANALYSES QUANTITATIVES ET TRANSCRIPTOME.....	101
FIGURE 36 : SCHEMA GENERAL DE MES OBJECTIFS ET TRAVAUX DE THESE. ....	119



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LISTE DES PROTEINES VIRALES CODEES ET EXPRIMEES PAR LES IAV ET IBV HUMAINS, AINSI QUE LEUR(S) FONCTION(S).....	31
TABLEAU 2 : VARIANTS CLASSES COMME PREOCCUPANTS PAR L'OMS ET LEURS CARACTERISTIQUES.....	45
TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES ET FONCTIONS DES PROTEINES STRUCTURALES DU SARS-COV-2 .....	49
TABLEAU 4 : ROLE DES PROTEINES NON STRUCTURALES DU SARS-COV-2 DANS LA REPLICATION VIRALE ET LA PATHOGENESE.....	50
TABLEAU 5 : VACCINS CONTRE LA GRIPPE APPROUVES PAR L'ANSM EN FRANCE ET PAR LA FDA AUX ETATS-UNIS POUR LA SAISON 2021-2022 DANS L'HEMISPHERE NORD.....	57
TABLEAU 6 : VACCINS CONTRE LA COVID-19 APPROUVES PAR LE FDA ET/OU L'EMA EN DECEMBRE 2021 .....	59
TABLEAU 7 : MEDICAMENTS ANTIVIRAUX DISPONIBLES SUR LE MARCHE COMME TRAITEMENTS CONTRE LA GRIPPE ET MUTATIONS DE RESISTANCES ASSOCIEES. ....	60
TABLEAU 8 : LES MODELES CELLULAIRES D'ORIGINE HUMAINE ADAPTES A L'ETUDE DES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES.....	67
TABLEAU 9 : MEDICAMENTS CANDIDATS A UN REPOSITIONNEMENT COMME ANTIVIRAL CONTRE LES VIRUS INFLUENZA .....	103
TABLEAU 10 : MEDICAMENTS REPOSITIONNES OU CANDIDATS AU REPOSITIONNEMENT CONTRE LA COVID-19 .....	106
TABLEAU 11 - LES INDEX DE COMBINAISONS CALCULES A PARTIR DES VALEURS D'IC50 OBTENUES IN VITRO. ....	157
TABLEAU 12 - LES CONCENTRATIONS DES ANTIVIRAUX ONT ETE CALCULEES SELON LES RATIOS OPTIMUMS DETERMINES SUR LA BASE DU TRAITEMENT DE REFERENCE AU BALOXAVIR (BLX) VALIDE EN HAE.....	158

## ABREVIATIONS

AA	Acides aminés
Ac / AcM	Anticorps / Anticorps monoclonaux
ACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité
ALI	Interface Air Liquide
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APN	Amino-peptidase humaine N
ARN	Acide ribonucléique
ARNc/m/g/v	ARN complémentaire / messenger / génomique / viral
ATII	Angiotensine II
CA	Chiffre d'Affaires
CC50	Concentration médiane cytotoxique
CCP	Certificat complémentaire de protection
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CI	Index de combinaisons
CMap	<i>Connectivity Map</i>
CoV	Coronavirus
COVID-19	<i>Coronavirus disease</i>
cRNP	Ribonucléoprotéine complémentaire
DPP4	Dipeptidyl-peptidase 4
E	Protéine d'enveloppe
EC50	Concentration efficace médiane
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Agence Européenne des Médicaments
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HA	Hémagglutinine
HAE	Epithéliums respiratoires humains
HAS	Haute Autorité de Santé
HCV	Virus de l'hépatite C
hMPV	Métapneumovirus humain
h / hpi	heure(s) / heure(s) post infection
hPIV	Virus parainfluenza humain
hRSV	Virus Respiratoire Syncytial humain
HTS	<i>Hight-throughput screens</i> = Criblage haut débit
IAV / IBV	Virus influenza A / Virus influenza B
IC50	Concentration inhibitrice médiane
IFIT1/3	<i>Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats</i>
IFITM1/3	<i>Interferon Induced Transmembrane Protein</i>
IFN	Interféron(s)
IFNL	Interféron(s) lambda
IL-6/28/29...	Interleukine
INA	Inhibiteurs de la neuraminidase
IRA	Infections Respiratoires Aigües
IRF	<i>Interferon Regulatory Factors</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
M	Protéine de membrane (coronavirus)

M1 / M2	Protéines de matrice 1 et 2 (influenza)
MAVS	<i>Mitochondrial Anti Viral Signaling protein</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
Mx1	<i>Myxovirus resistance protein 1</i>
N	Nucléoprotéine (coronavirus)
NA	Neuraminidase
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NGS	Séquençage à haut débit
NHC	β-d-N4-hydroxycytidine
NP	Nucléoprotéine (influenza)
NS1/2	Protéines non structurales 1 / 2 (influenza)
Nsp	Protéines non structurales (coronavirus)
NTP	Nucléoside triphosphate
OAS1	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	<i>Open Reading Fragment</i> = cadre de lecture ouvert
PA	<i>Polymerase Acidic protein</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PB1 / PB2	<i>Polymerase Basic 1 ou 2</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
R&D	Recherche et développement
RDB	<i>Receptor Domain Binding</i>
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RLR	<i>RIG-I-Like Receptors</i>
RTC	Complexe de réplication et transcription
RTqPCR	<i>Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RTU	Recommandation Temporaire d'Utilisation
S	<i>Spike protein</i>
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SNP	Polymorphismes Nucléotidiques Simples
SRAS	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
SSMD	Différence moyenne strictement normalisée
STAT1 / 2	<i>Signal transducer and activator of transcription 1/2</i>
TEER	<i>Transepithelial/transendothelial electrical resistance</i>
TMPRSS2	Protéase transmembranaire à sérine 2
TLR	<i>Toll-Like Récepteurs</i>
TYK1/2	<i>Tyrosine Kinase 1 / 2</i>
UV	Ultra-Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficiência Humaine (HIV)
Viperin/RSAD2	<i>Virus Inhibitory Protein, Endoplasmic Reticulum [ER]-associated, IFN-inducible</i>
VOC	<i>Variant of Concern</i>
VOI	<i>Variant of Interest</i>
vRNP	Complexes ribonucléoprotéiques viraux
XRD	Cristallographie par rayons X

# **INTRODUCTION GENERALE**

# Chapitre 1. Les infections respiratoires aiguës

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont une cause majeure de consultations, d'hospitalisations et de décès dans le monde, responsables de 2 millions de décès par an. Au-delà des enjeux sanitaires, elles exercent un impact économique très fort sur nos systèmes de santé, estimé à plusieurs dizaines de milliards d'euros. Elles se caractérisent par la pénétration et la réplication d'un agent pathogène dans les voies aériennes respiratoires.

## 1. Physiologie des voies respiratoires

L'épithélium respiratoire a pour fonction de filtrer l'air et d'éliminer les potentiels pathogènes et éléments irritants. Il constitue une véritable barrière qui devient susceptible aux infections et à l'inflammation lorsque son intégrité est dégradée.

L'architecture des voies respiratoires se divise en deux parties (Figure 1) :

- (i) Les voies aériennes supérieures constituées de la cavité nasale, des sinus, du pharynx et du larynx, conduisant l'air entrant
- (ii) Les voies aériennes inférieures composées de la trachée, des bronches, bronchioles et alvéoles qui exercent la fonction respiratoire

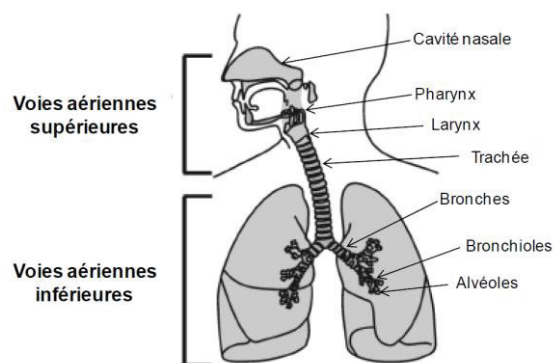


Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire humain, d'après Loret (2017)<sup>1</sup>

### 1.1. Les voies respiratoires hautes

La cavité nasale et les sinus sont tapissés d'une muqueuse épithéliale pseudostratifiée très vascularisée, composée de cellules caliciformes (*goblet cells*) sécrétant du mucus, de cellules ciliées (les plus abondantes de l'épithélium) permettant de faire remonter le mucus vers l'extérieur, et de cellules basales, cellules souches épithéliales, capables de générer tous les autres types cellulaires<sup>2,3</sup> (Figure 2). Ce sont des espaces vides, humides, chauds et ventilés ayant pour fonction de réchauffer, d'humidifier et de filtrer l'air inspiré<sup>4</sup>.

Le pharynx est un carrefour entre les voies aériennes et la voie digestive, permettant à la fois le passage des aliments et de l'air. Il communique également avec la trompe d'Eustache, qui équilibre la pression entre le pharynx et l'oreille interne lors de la déglutition.

Le larynx marque la frontière entre les voies respiratoires supérieures et inférieures. Il contient les cordes vocales et assure la protection des voies respiratoires inférieures grâce à sa muqueuse qui entraîne un réflexe de toux au contact d'un corps étranger.

## 1.2. Les voies respiratoires basses

La trachée marque le début de la ramification de l'arbre bronchique, se séparant en deux bronches souches, droite et gauche (Figure 1)<sup>4</sup>. Les bronches sont constituées de cartilage et de muscles lisses et tapissées de cellules ciliées. Au fur et à mesure de leur subdivision en bronchioles, la quantité de cartilage diminue. Ainsi, la paroi des bronchioles ne contient plus du tout de cartilage. L'épithélium évolue également, d'une forme pseudostratifiée à cylindrique simple, puis cubique simple<sup>5</sup>. Les cellules de Clara (*club cells*), non ciliées, deviennent prédominantes<sup>3</sup> (Figure 2). Elles exercent dans les alvéoles des fonctions sécrétoires et de cellules souches, semblables à celles des cellules basales.

La zone respiratoire, où se situe la barrière entre l'air et le sang, correspond à l'extrémité des bronchioles terminales : les alvéoles, terminaison de l'arbre respiratoire. La paroi alvéolaire richement vascularisée permet une surface d'échange gazeux supérieure à 100 m<sup>2</sup><sup>6</sup>. Elle est constituée d'un épithélium cubique simple, très fin et pavimenteux. Sa surface est recouverte à 90 % de Pneumocytes de Type I, permettant une diffusion de l'oxygène et du dioxyde de carbone vers le compartiment systémique. Les alvéoles abritent également des Pneumocytes de Type II, qui sécrètent un surfactant permettant de réduire la tension de surface au niveau des alvéoles, favorisant les échanges de gaz, ainsi que des macrophages résidents qui s'attaquent aux corps étrangers (Figure 2).

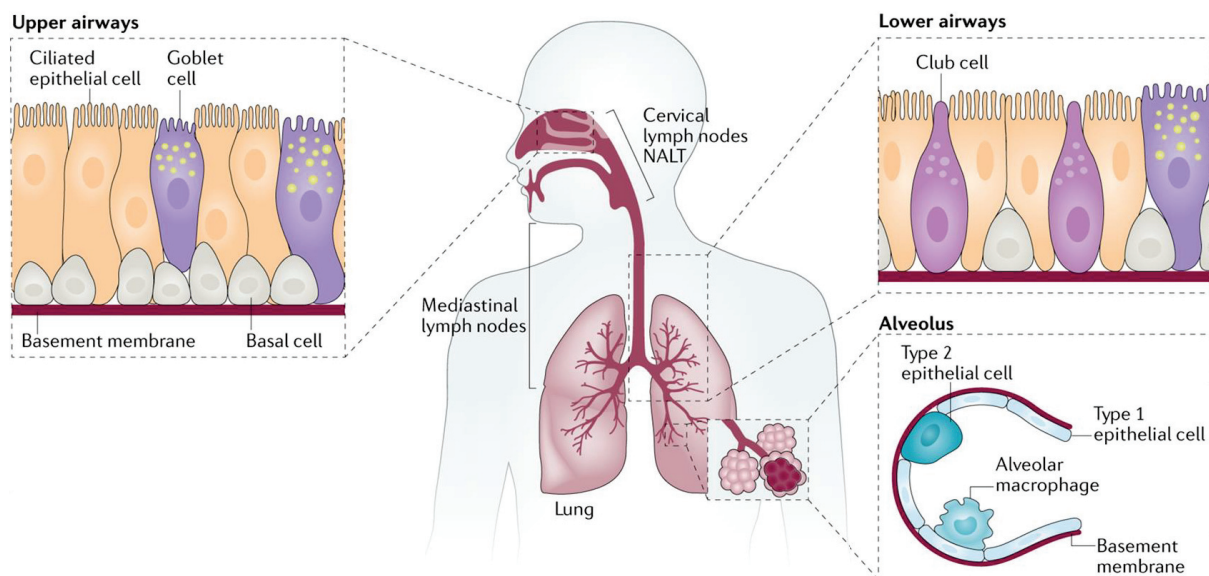


Figure 2 : Organisation des cellules des épithéliums du tractus respiratoire, d'après Alon et al. (2021)<sup>7</sup>. Les voies respiratoires supérieures sont majoritairement tapissées de cellules ciliées, à la différence des voies respiratoires inférieures où l'on retrouve des cellules de Clara non ciliées et des Pneumocytes alvéolaires.

## 1.3. Fonction barrière de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire est constitué d'un ensemble de cellules juxtaposées, solidarisées par des systèmes de jonctions et séparées du tissu conjonctif par une membrane basale (Figure 2). Il constitue l'interface entre l'environnement extérieur et la sphère respiratoire<sup>3</sup>. Il assure une fonction physique, fonctionnelle et un rôle de barrière immunologique pour protéger l'hôte des potentiels effets nocifs des particules inhalées. Tissu différencié et polarisé, il possède au pôle apical un système

de clairance mucociliaire permettant de limiter l'entrée de particules, allergènes, polluants ou pathogènes infectieux.

Plus en détail, les cellules productrices de mucus contiennent des vésicules capables de sécréter des granules de mucine (Muc5AC et Muc5B) ainsi que d'autres protéines surfactantes qui ont pour objectif de capturer les particules environnementales. Les cellules ciliées, majoritaires des voies respiratoires, sont différenciées à partir de cellules basales. Elles possèdent à leur pôle apical un grand nombre de cils (environ 200/cellule) capables de battre à une fréquence élevée (6 mm/min<sup>8</sup>) pour chasser le mucus et les éventuelles particules captives. Cette protection est renforcée par les complexes d'adhésion intracellulaire qui forment une barrière physique, consolidée par les jonctions serrées présentes entre les cellules basales qui restreignent la diffusion paracellulaire. Les cellules basales, retrouvées dans l'ensemble du tractus respiratoire, sont capables de se différencier en n'importe quel autre type de cellule épithéliale et confèrent aux tissus une capacité de régénération rapide en cas de perte d'intégrité, notamment d'infection par des pathogènes.

L'épithélium exerce également une fonction sécrétoire en capacité de produire une variété très diversifiée de médiateurs lipidiques, de facteurs de croissance et de bronchoconstriction, de peptides, ainsi que des chemokines et cytokines capables d'attirer et/ou d'activer des cellules inflammatoires ou d'autres effecteurs cellulaires de l'immunité (macrophages, lymphocytes, etc.).

## 2. Définition des infections respiratoires aiguës

Dans le dictionnaire Larousse, une infection est définie par : « *La pénétration et le développement dans un être vivant de micro-organismes qui peuvent provoquer des lésions en se multipliant, et éventuellement en sécrétant des toxines ou en se propageant par voie sanguine.* »

Une infection est dite respiratoire lorsqu'elle atteint l'une des structures composant le système respiratoire, des voies aériennes supérieures (nez, oreille, gorge, larynx) et/ou inférieures (trachée, bronches, bronchioles et poumons)<sup>9</sup>. Les rhinopharyngites, angines, otites, sinusites, laryngites aiguës affectent le tractus respiratoire haut, tandis que les bronchites, bronchiolites et les pneumonies aiguës affectent les voies basses. Les infections des voies respiratoires basses peuvent s'avérer particulièrement sévères<sup>10</sup>.

Les IRA sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires d'un individu contaminé via des aérosols émis lors d'une discussion, d'une toux ou d'un éternuement. Les symptômes cliniques associés dépendent de la nature des agents étiologiques pathogènes, ainsi que des facteurs environnementaux ou intrinsèques à l'hôte, tels que l'âge et/ou le statut immunitaire par exemple. Même si les bactéries sont fréquemment impliquées dans les IRA, les virus sont les principaux agents étiologiques responsables d'hospitalisations et d'épidémies nosocomiales<sup>10</sup>.

## 3. Enjeux sanitaires et économiques

Les IRA sont une cause majeure de consultations, d'hospitalisations et de décès dans les pays industrialisés et/ou en développement. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les IRA, hautement transmissibles, sont la première cause de mortalité chez les jeunes enfants, responsables de 2 millions de décès par an ; les pneumonies étant les plus meurtrières avec près de 15 % des décès chez les enfants de moins de 5 ans<sup>11</sup>.

Les agents étiologiques des IRA les plus prévalents sont les virus respiratoires, tels que les virus influenza de types A et B (IAV et IBV ; famille des *Orthomyxoviridae*), les virus parainfluenza humains (hPIV-1 à 4 ; famille des *Paramyxoviridae*), les rhinovirus (famille des *Picornaviridae*), les adénovirus (famille des *Adenoviridae*), ainsi que deux membres de la famille des *Pneumoviridae* : le Virus Respiratoire Syncytial humain (hRSV) et le Méta-pneumovirus humain (hMPV).

La prise en charge de ces IRA représente un coût annuel pour les pays de l'Union Européenne estimé à 2.5 milliards d'euros<sup>12</sup>. Ces données prennent en compte les frais d'hospitalisation (examens, prise en charge, soins primaires) et de traitements (symptomatiques et/ou anti-infectieux) ; auxquels s'ajoutent les frais indirects (perte de production ou de jours de travail, handicaps ou encore décès prématurés), estimés à plus de 43 milliards d'euros.

Ces statistiques sont régulièrement perturbées par l'émergence et/ou la réémergence de virus qui constituent une menace sanitaire majeure. En effet, ces 20 dernières années ont été marquées par l'émergence de plusieurs Coronavirus (CoV) à fort potentiel pandémique, tels que le SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) responsable de l'épidémie de SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) en 2003 étendue dans 30 pays<sup>13,14</sup>, le MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) responsable d'une épidémie en 2013 localisée sur la région du Moyen Orient dont la mortalité a atteint 35 %<sup>15-17</sup> et aujourd'hui endémique de la péninsule arabique<sup>18</sup> ; et bien sûr la pandémie actuelle débutée fin 2019 causée par le SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) qui touche aujourd'hui tous les pays du globe et a suspendu l'économie mondiale pendant plusieurs semaines<sup>19</sup>. En France, la pandémie de COVID-19 (*Coronavirus disease*) a causé une surmortalité de 9 % sur l'année 2020<sup>20</sup> et un coût pour la sécurité sociale estimé entre 9 et 10 milliards d'euros<sup>21</sup>.

Les manifestations cliniques et la sévérité des infections virales respiratoires varient selon de nombreux paramètres, notamment des propriétés intrinsèques des souches infectieuses, mais aussi en fonction des facteurs de risque associés à l'âge, les comorbidités et/ou le statut immunitaire des patients. Les IRA peuvent alors se traduire par de simples rhumes jusqu'à être la cause de pneumonies mortelles. Les symptômes les plus fréquents sont la fièvre, la toux, des écoulements nasaux et des difficultés respiratoires. Le tableau clinique peut cependant se compliquer, notamment dans le cas de co-infections ou de surinfections d'origines bactérienne, fongique ou même virale, décrites avec tous les virus respiratoires cités<sup>22-24</sup>. Les plus fréquemment rapportés sont des pneumonies sévères à influenza, associées dans 30 % des cas à une co-infection d'origine bactérienne, en particulier *Streptococcus pneumoniae*, qui constitue un facteur important de co-morbidité<sup>25-28</sup>. Un constat similaire a été récemment rapporté sur une cohorte de 476 patients infectés par le virus SARS-CoV-2 ; 34.5 % des cas sévères étaient associés à une surinfection bactérienne<sup>29</sup>. Pourtant, 92.9 % de ces patients étaient déjà sous traitement antibiotique. En outre, l'usage plus fréquent d'antibiotiques en traitement prophylactique augmente la prévalence de souches bactériennes résistantes, mettant en péril l'efficacité des médicaments. Cette problématique est parfaitement illustrée dans une étude réalisée dans un hôpital de Hong-Kong, rapportant une évolution du pourcentage de souches de *Staphylococcus méticilline-résistant* dans son service de soins intensif de 3.53 à 25.3 % après une épidémie de SRAS en mai 2003<sup>30</sup>.

Malgré ce constat, l'arsenal prophylactique et thérapeutique pour lutter contre ces virus respiratoires est quasi-inexistant, à l'exception des virus influenza et du SARS-CoV-2, contre lesquels des vaccins et médicaments sont aujourd'hui disponibles sur le marché<sup>31</sup>.

Néanmoins, dans le cas des virus influenza, la protection conférée par les vaccins annuels est parfois sous-optimale du fait de la variabilité génétique intrinsèque des virus circulants saisonniers et



l'émergence de mutations de résistance aux antiviraux est une source de préoccupation majeure<sup>32-34</sup>. Concernant le SARS-CoV-2, l'émergence rapide et récurrente de nouveaux variants menace la durabilité de la protection vaccinale, encore mal caractérisée à ce jour, et le manque de recul ne permet pas encore de mesurer l'efficacité des rares traitements approuvés par les autorités de santé (remdesivir, molnupiravir et nirmatrelvir-ritonavir).

Dans ce contexte, la lutte contre les virus respiratoires constitue un enjeu sanitaire, économique et sociétal majeur, faisant du développement de nouvelles solutions thérapeutiques et prophylactiques une priorité de santé publique.

## 4. Présentation des virus respiratoires

Le laboratoire VirPath travaille depuis 2008 sur la caractérisation de la biologie cellulaire des virus respiratoires et la compréhension des interactions avec la cellule-hôte, afin de développer de nouvelles stratégies antivirales. Les virus à acide ribonucléique (ARN), tels que les virus influenza, les *Pneumovirus* et les *Coronavirus*, occupent une place prépondérante parmi les agents étiologiques des IRA et constituent ainsi les sujets de recherche du laboratoire. Mes travaux de thèse, initialement focalisés sur les virus influenza ont été enrichis par des travaux sur le SARS-CoV-2, dans le contexte de la mobilisation du laboratoire VirPath dès janvier 2020 contre ce virus pandémique.

### 4.1. Les virus influenza

Les virus influenza sont les agents étiologiques de la grippe, provoquant des pathologies respiratoires légères, pouvant évoluer vers des formes graves dans les populations à risque. Ils appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont divisés en 4 types antigéniques : A, B, C et D. Seuls les virus influenza de type A et B sont pathogènes pour l'Homme<sup>35,36</sup>.

Les IAV sont responsables de la majorité des épidémies saisonnières humaines. Ils sont classés en sous-types en fonction des propriétés antigéniques des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). A ce jour, il a été dénombré jusqu'à 18 types de HA et 11 de NA<sup>35,36</sup>. Les combinaisons de ces glycoprotéines à la surface des virus conditionnent leur tropisme et leur *fitness* cellulaire pour leurs hôtes naturels, tels que les oiseaux aquatiques migrateurs (réservoir naturel), les porcs, l'Homme (H1, H2, H3 et N1, N2) ou encore les chevaux et les chauves-souris, ainsi que de nombreux autres mammifères. Les IAV font l'objet d'une surveillance particulièrement accrue, du fait de l'émergence et de la réémergence récurrente de souches réassortantes à l'origine d'épisodes pandémiques majeurs dans la population humaine ou d'épizooties dans le monde animal (H5N1, H1N1pdm09, H7N9)<sup>35</sup>.

Il n'existe pas de réservoir similaire pour les IBV mais deux lignages antigéniques distincts circulent chez l'Homme : Victoria et Yamagata (B/Victoria/2/87 et B/Yamagata/16/88), responsables d'épidémies saisonnières dans une moindre mesure<sup>35,36</sup>.

#### 4.1.1. Transmission

Le potentiel épidémique des virus influenza chez l'Homme repose majoritairement sur leur efficacité de transmission entre les individus. Lorsqu'un individu infecté tousse ou éternue, il rejette de microscopiques particules infectieuses (fomites) capables de résister plusieurs heures en

suspension dans l'air et sur les surfaces dans l'environnement. Les microgouttelettes les plus grosses (> 10 µM) sont rapidement déposées sur les surfaces mais peuvent entrer en contact direct avec les muqueuses des voies aériennes supérieures (nez, bouche)<sup>37,38</sup>. La transmission par aérosol (< 5 µM) est la voie majoritaire d'infection, les particules sont inhalées et déposées dans l'ensemble du tractus respiratoire<sup>38</sup>. Bien que le virus reste peu de temps infectieux sur les mains, la transmission par contact fomite-muqueuse est également possible. Sur des surfaces non poreuses, le virus peut rester infectieux jusqu'à 48h<sup>39</sup>.

La propagation du virus est favorisée par les fortes densités de populations (lieux très fréquentés et/ou confinés comme les écoles ou maisons de retraite) et des facteurs environnementaux tels que de faibles taux d'humidité, températures, aération et niveaux d'ultra-violet (UV), argumentant la saisonnalité des épidémies dans les régions tempérées<sup>40,41</sup>. Dans un contexte épidémique, la transmission peut ainsi facilement être ralentie en appliquant des gestes barrières simples, tels que se couvrir la bouche pour tousser et éternuer, se laver les mains régulièrement, éviter de se toucher le visage ou porter un masque.

Les symptômes apparaissent en moyenne entre 1 et 4 jours suivant l'infection. Les individus infectés sont contagieux à partir du jour précédant l'apparition des symptômes et le restent généralement jusqu'à 7 jours après<sup>36</sup>. Les enfants et les personnes immunodéprimées excrètent le virus sur une plus longue durée et sont donc susceptibles de contaminer leur entourage au-delà de cette période.

#### **4.1.2. Symptômes**

Les symptômes de la grippe varient de bénins à sévères en fonction de la population touchée et de la souche virale impliquée<sup>35,37</sup>. Après une période d'incubation d'un à deux jours, les symptômes les plus fréquemment décrits sont : la fièvre, des maux de tête, des courbatures et/ou myalgies, une toux, des maux de gorge, des écoulements nasaux et des malaises, pouvant persister jusqu'à 8 jours<sup>42</sup>.

Chez des individus à risque tels que les nourrissons, personnes âgées ou immunodéprimées, des complications peuvent apparaître. Les plus fréquentes sont liées à la progression de l'infection vers les voies respiratoires basses conduisant à une pneumonie sévère, potentiellement léthales, notamment dans les cas de co-infections ou surinfections virale-bactérienne (*S.Aureus*, *S.pneumoniae*) ou virale-fongique (*Aspergillus*)<sup>23,43</sup>. Des complications non pulmonaires sont également décrites comme des myocardites, encéphalites ou myosites (infections des tissus musculaires) ou encore une défaillance multi-organes (insuffisance respiratoire et/ou rénale)<sup>42,43</sup>. L'apparition de symptômes suggérant une altération des échanges d'oxygène, une insuffisance cardio-pulmonaire, une altération de l'état mental, une fièvre très élevée et persistante ou encore une déshydratation sévère, doivent alerter sur l'évolution vers une forme de grippe sévère.

#### **4.1.3. Epidémiologie**

Il est impossible de connaître la date de la première circulation des virus influenza chez l'Homme. Les historiens s'accordent à dire que les premiers écrits sur les symptômes pouvant évoquer la grippe datent du 16<sup>ème</sup> siècle (début des registres en tous genres)<sup>44</sup>. En 1510, des contemporains réalisent une première description de ce qui semble être une épidémie de grippe évoluant rapidement en Europe. Cependant, aucune littérature médicale n'existe à cette période. Des « fièvres » pouvant être attribuées à la grippe sont régulièrement répertoriées sur des centaines d'années mais il faudra attendre le 19<sup>ème</sup> siècle pour caractériser et reconnaître les épidémies de grippe. L'agent étiologique,

le virus influenza humain est isolé pour la première fois en 1930, après la pandémie de « grippe espagnole » de 1918.

L'état des connaissances actuelles sur les virus influenza nous permet de comprendre que l'émergence d'un nouveau virus grippal à potentiel pandémique résulte généralement d'une modification génétique majeure, due à la grande plasticité du génome ; notamment par l'acquisition chez les IAV d'un ou plusieurs segments provenant d'un autre sous-type (réassortiments, en particulier avec des virus aviaires ou porcins). La diffusion souvent rapide des virus émergents dans des populations à l'immunité naïve peut être à l'origine de plusieurs vagues d'épidémies virulentes, voire de pandémies, avant de devenir des souches épidémiques saisonnières.

#### 4.1.3.1. Pandémies grippales historiques

Le siècle dernier a été marqué par quatre pandémies grippales<sup>35,44,45</sup> (Figure 3). La plus dévastatrice, la « grippe espagnole » de 1918 à virus H1N1, a causé plus de 40 millions de morts dans le monde, en particulier chez les 20-39 ans, avant de devenir une souche circulante saisonnière. Cette souche H1N1 est une adaptation directe d'une souche aviaire à l'Homme. Les IAV émergents et circulants ensuite, pandémiques comme saisonniers, sont tous dérivés de cette souche « mère » par des phénomènes de glissements antigéniques ou de recombinaisons<sup>46</sup>. Les pandémies de « grippe asiatique » (Singapour) de 1957 à virus H2N2, et de 1968 (Hong Kong) à virus H3N2 ont fait suite à des réassortiments génétiques avec des virus aviaires. Ces deux souches ont successivement remplacé les souches saisonnières. En 1977, le virus H1N1 recommence à circuler, en parallèle du virus H3N2, avec des déterminants antigéniques identiques à la souche de 1957, sans créer de pandémie. En 2009, une nouvelle souche de H1N1 (H1N1pdm09) issue d'un quadruple réassortiment entre des souches porcines, aviaires et humaines, avec des déterminants antigéniques très différents, est à l'origine de la première pandémie du 21<sup>ème</sup> siècle<sup>47</sup>. Toutes les souches H1N1 circulantes depuis dérivent de ce virus H1N1pdm09.

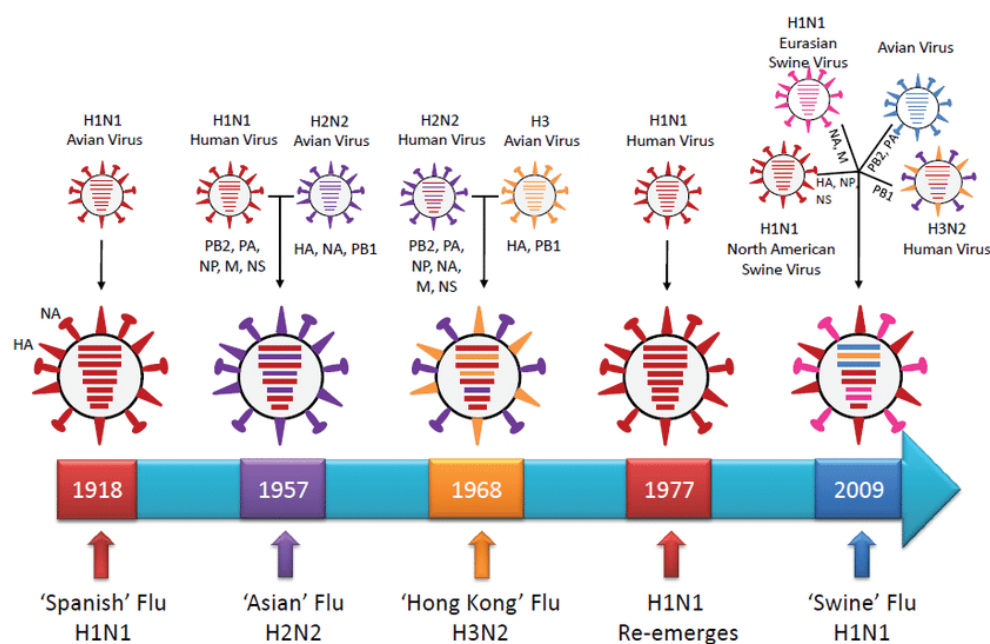


Figure 3 : Historique de la circulation des souches d'influenza pandémiques au cours du siècle dernier, d'après Giles et al. (2011)<sup>48</sup>. Les souches d'influenza aviaires en sont à l'origine, par des phénomènes d'adaptation ou de réassortiments avec des souches humaines et porcines.

#### 4.1.3.2. Épidémiologie de la grippe saisonnière

Au niveau mondial, les épidémies grippales annuelles sont responsables d'environ 5 millions de maladies graves, et de 290 000 à 650 000 décès, majoritairement dans les populations à risque<sup>41</sup>.

Dans les zones tempérées, les épidémies de grippe sont saisonnières et surviennent principalement l'hiver. Le pic épidémique est observé en janvier ou février dans l'hémisphère Nord, et entre juin et août dans l'hémisphère Sud. Dans les régions tropicales, la grippe peut apparaître tout au long de l'année, avec des flambées épidémiques plus irrégulières<sup>49</sup>. Plusieurs souches humaines d'IAV et IBV co-circulent dans la population. Au cours des dernières décennies, les deux sous-types d'IAV majoritaires H1N1 et H3N2 ainsi que les deux lignages B/Yamagata et B/Victoria ont été le plus fréquemment isolés chez les patients testés. Cependant, la situation est rarement identique d'une épidémie à l'autre.

Par exemple, sur la saison hivernale 2017-2018, les réseaux de surveillance ont observé une co-circulation des virus A(H1N1)pdm09 et B/Yamagata en Europe. Les IBV ont représenté 64 % des échantillons testés, un taux supérieur aux années précédentes<sup>50</sup>. La saison épidémique a été qualifiée de sévère par le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) européen, ayant entraîné plus de 2 millions de consultations et près de 10 000 hospitalisations, dont 20 % concernaient des patients de moins de 5 ans et 53 % de plus de 65 ans<sup>50</sup>. Santé publique France a dénombré près de 3 000 hospitalisations en réanimation et estimé à 13 000 décès l'excès de mortalité attribuable à la grippe<sup>51</sup>.

A l'inverse, la saison 2018-2019 a été marquée par une nette prédominance des IAV (99 %), avec une majorité de souches A(H1N1)pdm09 dans le Nord de l'Europe et A(H3N2) en Europe du Sud-Ouest<sup>52</sup>. Les virus A(H3N2) ont été difficiles à caractériser sur le plan antigénique, en raison de leur diversité génétique croissante observée au cours de la saison. Finalement, 23 % des souches génotypées appartenaient au sous-groupe 3C.3a, distinct de celui entrant dans la composition vaccinale. Ainsi, même si l'épidémie a été de courte durée en France, plus de 1 800 personnes ont été admises en réanimation et 8 100 décès ont été attribués à la grippe, selon Santé publique France<sup>53</sup>.

Pendant la saison 2019-2020, des proportions équivalentes d'A(H1N1)pdm09, d'A(H3N2) et B/Victoria ont été isolées. Les IAV ont représentés 63 % des échantillons testés, parmi lesquels 59 % d'A(H1N1)pdm. Les pays d'Europe du Nord ont été majoritairement touchés par du H3N2 (71 % des IAV). B/Victoria a représenté 99 % des échantillons IBV testés. La majorité des cas sévères ont été enregistrés chez les plus de 65 ans infectés par des IAV<sup>49,54</sup>. L'émergence du virus SARS-CoV-2 fin 2019 et la pandémie de COVID-19 qui s'en est suivie ont eu des répercussions majeures sur la circulation des virus grippaux (Figures 4 et 5). Ainsi, seuls 3 700 décès ont été attribués à la grippe en France sur cette période<sup>55</sup> et aucune épidémie grippale n'a été détectée dans l'hémisphère Nord sur la saison 2020-2021, d'après le bilan préliminaire du 21/04/21<sup>56</sup>.

D'après Santé publique France, ce phénomène est multifactoriel et peut s'expliquer par (i) la mise en place des mesures barrières et du confinement qui ont permis de limiter la circulation des virus grippaux dans la population, (ii) une augmentation de la couverture vaccinale chez les personnes à risque (55.8 % en 2020-2021 contre 47.8 % en 2019-2020), et (iii) un taux exceptionnellement faible de prélèvements de diagnostic enregistrés par le réseau sentinelle, du fait de la similitude des symptômes entre la grippe et la COVID-19 et des difficultés d'accès aux services de soins<sup>56</sup>. Par ailleurs, la littérature fait état d'interactions possibles entre les virus, comme l'étude de Halfmann et al. qui suggère que le virus SARS-CoV-2 pourrait limiter la réplication des virus influenza, notamment par la stimulation de l'expression de facteurs antiviraux comme Mx1 (*Myxovirus resistance protein 1*)<sup>57</sup>.

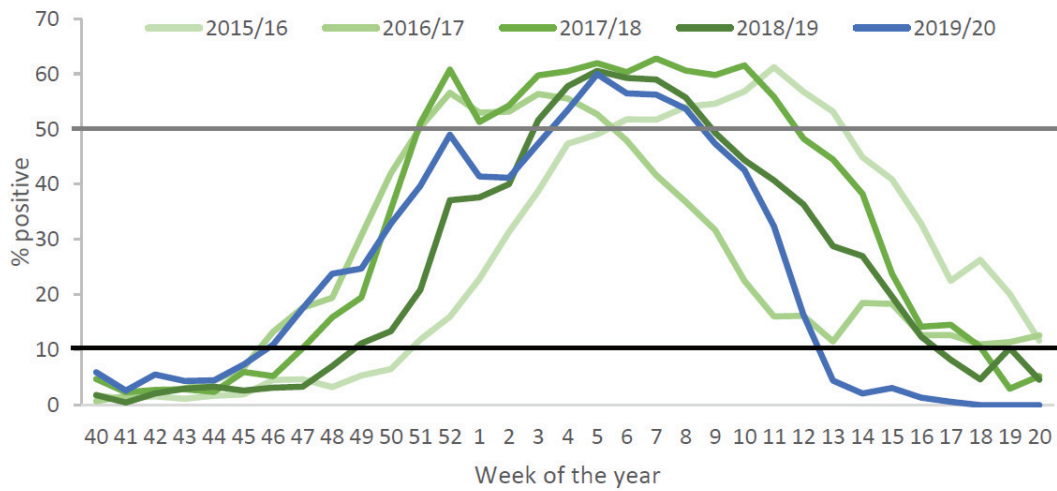


Figure 4 : Epidémiologie de la grippe saisonnière sur la saison 2019-2020, d'après le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies<sup>54</sup>. En Europe, l'épidémie a pris fin de manière précoce (semaine 13) et l'activité grippale mondiale a été minime les mois suivants.

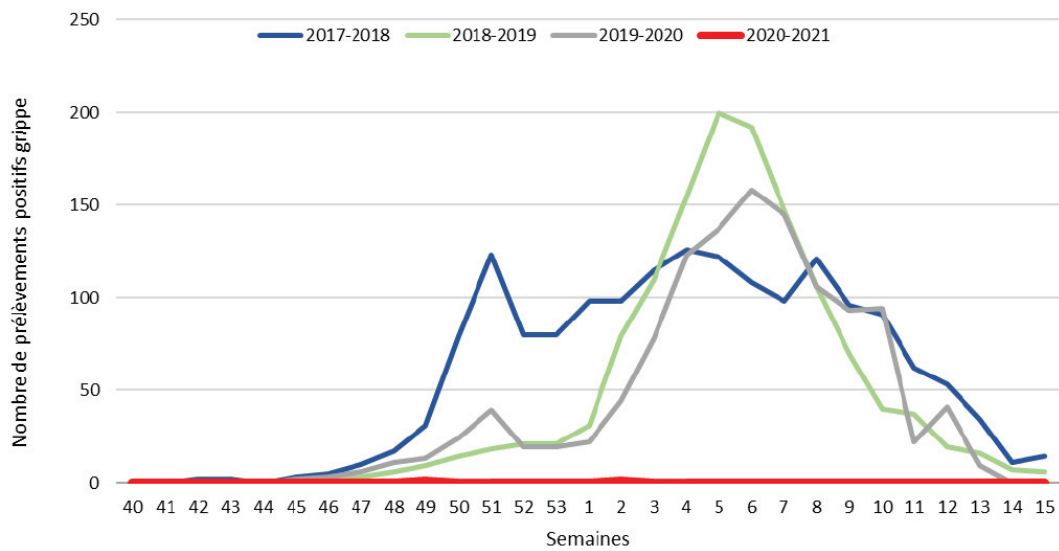


Figure 5 : Nombre hebdomadaire de prélèvements positifs à influenza en France métropolitaine d'après le bilan préliminaire du réseau sentinelle<sup>56</sup>. Aucune épidémie détectée sur 2020-2021.

#### 4.1.4. Structure et composition des virus influenza

##### 4.1.4.1. Organisation du virus

Les virus influenza sont des virus enveloppés de formes sphériques ou filamenteuses mesurant entre 80 et 120 nm (Figure 6). L'enveloppe à bicouche lipidique des IAV est hérissée des glycoprotéines de surface HA et NA et de canaux ioniques membranaires formés par la protéine M2. La protéine de matrice M1 soutient la face interne de l'enveloppe virale. A l'intérieur de la particule, le génome viral est sous la forme de 8 segments d'ARN complexés à la nucléoprotéine (NP). Avec l'ARN polymérase virale, ils forment des complexes ribonucléoprotéiques (vRNP), entités autonomes pour la réplication et la transcription. L'ARN polymérase est elle-même composée de 3 sous-unités PB1, PB2 et PA (pour *polymerase basic 1* ou 2 et *polymerase acidic protein*, respectivement). Les IBV ont une structure similaire mais présentent 4 glycoprotéines de surface : HA, NA, NB et BM2<sup>58</sup>.

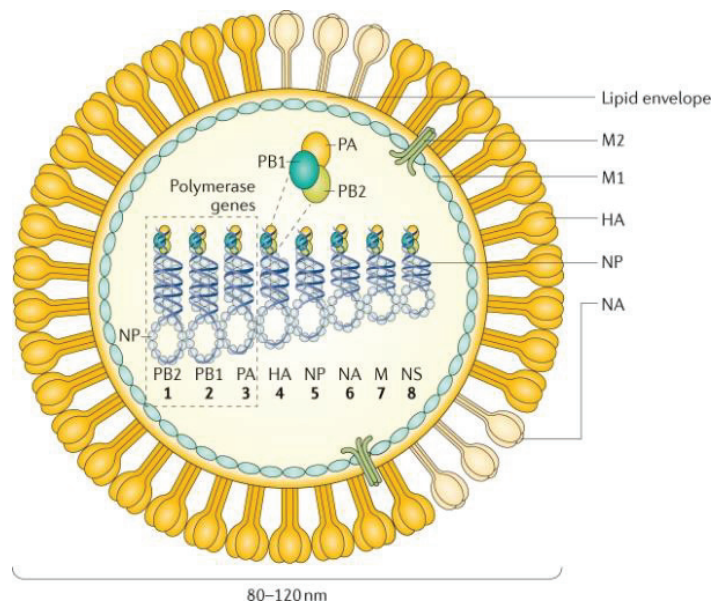


Figure 6 : Organisation du virus Influenza, d'après Krammer et al. (2018)<sup>35</sup>

##### 4.1.4.2. Génome et protéines virales

Le génome viral est composé de 8 segments d'ARN monocaténaire à polarité négative d'une taille variable entre 10 et 14.6 Kb<sup>35</sup>. Chaque segment possède un cadre de lecture ouvert (*Open Reading Fragment* : ORF) codant pour une ou plusieurs protéines. Aux extrémités (3' et 5') sont positionnées deux séquences strictement conservées de 12 et 13 nucléotides respectivement. Ces séquences sont les éléments promoteurs de la transcription et de la réplication virale, leur complémentarité partielle permettant leur appariement. Les vRNP sont capables de coder jusqu'à 17 protéines différentes via différents mécanismes de régulation, tels que l'épissage ou le décalage de cadre de lecture (17 identifiées pour les IAV et 11 pour les IBV). La démocratisation des analyses de séquences ont permis l'identification de 7 nouvelles protéines ces vingt dernières années<sup>59</sup>.

Ainsi, il est établi que les 8 segments des IAV et des IBV codent pour les 9 protéines communes HA, PB2, PB1, PA, NP, NA, M1, NS1 et NS2 (Protéines non structurales 1 et 2). Les IAV codent spécifiquement pour la protéine M2 via un épissage alternatif (Figure 7). Certaines souches d'IAV expriment également une petite protéine PB1-F2 (décalage du cadre de lecture ORF + 1) ou encore

une version tronquée de PB1, PB1-N40 (codon d'initiation décalé dans le même cadre de lecture)<sup>58,60-62</sup>. Plusieurs protéines dérivées de PA ont également été identifiées telles que PA-X (saut de cadre de lecture au cours de la traduction) et PAXΔC20 (délétion de PA-X) ou encore PA-N155 et N-182 (codon d'initiation décalé dans le même cadre de lecture)<sup>63-65</sup>.

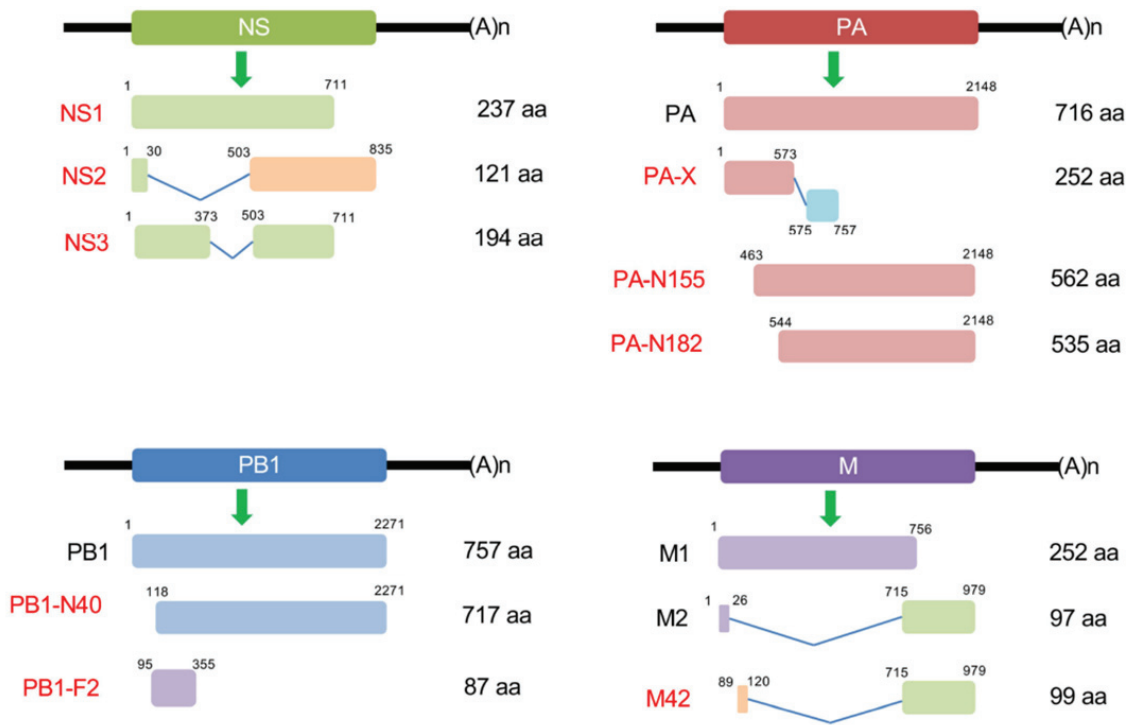


Figure 7 : Schéma des segments NS, PA, PB1 et M des virus influenza A et de la transcription des protéines, Hao et al. (2020)<sup>66</sup>. L'expression et la taille des protéines peut varier en fonction des souches. Les cadres de lectures identiques sont représentés de la même couleur. Les épissages sont représentés par les lignes bleues.

Le génome des IBV code pour deux protéines transmembranaires qui leur sont spécifiques, issues de décalages de cadres de lecture : BM2 qui possède un codon d'initiation chevauchant avec le codon de terminaison de la protéine M1 et la glycoprotéine NB dont la fonction reste encore à préciser<sup>67</sup>. Aussi, les génomes des IAV et IBV présentent globalement peu de similitudes, se traduisant par des différences fonctionnelles.

Les principales caractéristiques et fonctions de ces protéines virales sont présentées dans le Tableau 1 ci-après.

Tableau 1 : Liste des protéines virales codées et exprimées par les IAV et IBV humains, ainsi que leur(s) fonction(s), adapté de Bouvier et al. (2008), Vasin et al. (2014) et Koutsakos et al. (2016)<sup>61,67,68</sup>. Les protéines spécifiquement codées par les IAV sont surlignées en bleu, en vert pour IBV.

Segment de gènes	Protéine	Taille de la protéine (AA)	Type de virus Influenza	Fonction	
1	PB2 (Polymérase basique 2)	759	IAV/IBV	Complexe de l'ARN polymérase	Reconnaissance, fixation de la coiffe de l'ARNm
2	PB1 (Polymérase basique 1)	757	IAV/IBV		ARN polymérase Elongation
	PB1-F2	87-90	IAV		Facteur de virulence Activité pro-apoptotique
	PB1-N40	718	IAV		Forme tronquée de PB1 Maintien la balance PB1/PB1-F1
3	PA (Polymérase acide)	716	IAV/IBV		Endonucléase
	PA-X	191 + (41 ou 61)	IAV		Endonucléase fonctionnelle Modulation de la réponse antivirale
	PAXΔC20	[191 + (41 ou 61)] - 20	IAV		PA-X délétée Endonucléase réduite
	PA-N155	568	IAV		?
	PA-N182	535	IAV		?
4	HA (Hémagglutinine)	560	IAV/IBV		Glycoprotéine de surface
5	NP (Nucléoprotéine)	498	IAV/IBV	vRNP	Ancrage de l'ARN Régulation de l'import nucléaire
6	NA (Neuraminidase)	454	IAV/IBV	Glycoprotéine de surface	Activité sialidase Relargage des virions
	NB	100	IBV	Glycoprotéine de surface	Canal ionique ?
7	M1 (Matrice 1)	252	IAV/IBV	Matrice	Protéine de matrice Interaction avec les vRNP Régulation du transport nucléaire Bourgeoisement
	M2 (Matrice 2)	97	IAV	Canal ionique transmembranaire	Fusion membrane virale / endosome
	M42	99	IAV		Alternative à M2
	BM2	109	IBV		Similaire à M2
8	NS1 (Protéine Non Structurale 1)	230	IAV/IBV		Antagoniste des interférons Régulation de l'expression des gènes de l'hôte
	NEP/NS2 (Protéine d'Export Nucléaire)	121	IAV/IBV		Export nucléaire de l'ARN



#### 4.1.4.3. Sauts et glissements antigéniques

La plasticité génétique des virus influenza est à l'origine de leur variabilité antigénique, selon deux mécanismes distincts<sup>35</sup>.

D'une part, la nature segmentée du génome des virus influenza rend possible les échanges génétiques, qualifiés de sauts antigéniques ou « *antigenic shift* ». Les IAV sont ainsi capables d'acquérir un ou plusieurs segments provenant d'un autre sous-type, en particulier d'origines humaine, aviaire ou porcine (Figure 8). Ces événements de réassortiments ont été à l'origine des pandémies historiques (Paragraphe 4.1.3.1) ; en permettant l'acquisition brutale de nouvelles propriétés par les virus, comme le clivage basique de la HA dans le cas de la grippe espagnole ; et/ou caractéristiques antigéniques, pour lesquelles la population mondiale était alors naïve<sup>46</sup>.

D'autre part, le manque de fidélité de la polymérase virale lors de la réplication du génome provoque l'accumulation récurrente de mutations, notamment sur les segments HA et NA, induisant des modifications antigéniques mineures, à l'origine de la variabilité génétique des IAV et IBV. On parle alors de glissement antigénique ou « *antigenic drift* » (Figure 8). Bien que ces phénomènes n'aboutissent pas à l'émergence de virus pandémiques, ils conduisent à la circulation de virus antigéniquement différents, échappant plus facilement à l'immunité préexistante des individus, à l'origine des épidémies saisonnières<sup>69</sup>. Ainsi, les glissements antigéniques impliquent une mise à jour régulière de la composition vaccinale et constituent un argument en faveur de la recommandation d'une vaccination annuelle.

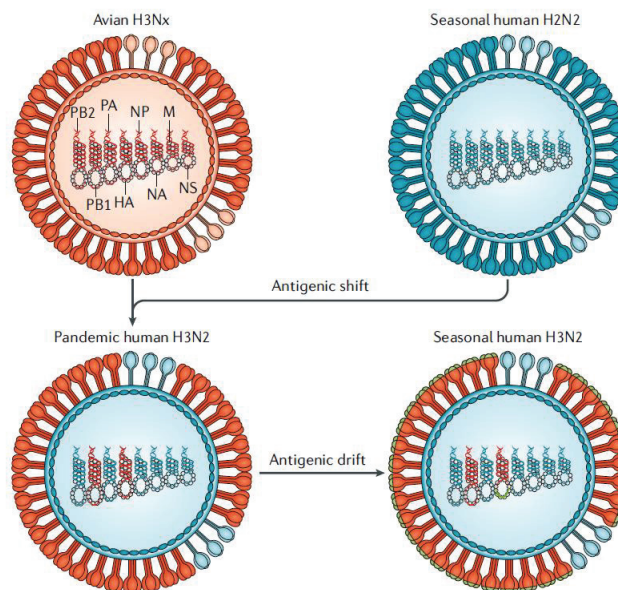


Figure 8 : Sauts et glissements antigéniques, d'après Krammer et al. (2018)<sup>35</sup>. L'acquisition d'un ou plusieurs segment(s) d'une souche par une autre, ici l'acquisition des segments PB1 et HA humains par une souche aviaire (saut antigénique) constitue un nouveau virus avec un tropisme humain potentiellement pandémique. Ce virus peut ensuite acquérir des mutations mineures (ici un changement de conformation de la HA), (glissement antigénique) pouvant induire un échappement à l'immunité acquise sur à une infection ou la vaccination.

#### 4.1.5. Cycle de réplication virale des virus influenza

Les virus influenza ont un tropisme pour les cellules épithéliales respiratoires des mammifères, dont l'Homme, ainsi que pour l'épithélium intestinal des oiseaux. Comme tous les virus, ils détournent les machineries cellulaires afin de les utiliser à leur profit pour se répliquer.

Le cycle viral (Figure 9) débute par **l'attachement du virus à la cellule-hôte** au moyen de l'hémagglutinine virale qui reconnaît les acides sialiques cellulaires (N-acétylneuraminique, composant des sucres aminés)<sup>35</sup>. Pour être effective, la HA doit subir un clivage de son précurseur H0 en HA1 et HA2 par les protéases spécifiques de l'épithélium respiratoire et intestinal. Les IAV humains reconnaissent préférentiellement les liaisons de type  $\alpha 2,6$  (majoritaires dans le tractus respiratoire supérieur humain), tandis que les virus aviaires se fixent sur les liaisons de type  $\alpha 2,3$  (abondantes dans le tractus intestinal aviaire et présentes dans le tractus respiratoire inférieur humain). Cette spécificité hôte-dépendante constitue une barrière d'espèce entre les virus de la grippe aviaire et humaine. Chez le porc, les deux types de récepteurs sont présents sur l'épithélium trachéal, ce qui fait de cet animal un réceptacle de recombinaisons possibles entre les virus de la grippe humaine et aviaire.

**L'entrée du virus** a lieu par endocytose via les endosomes. Le pH acide des endosomes entraîne deux événements déterminants pour l'infection<sup>58,61</sup> : (i) un changement de conformation de la HA libérant le peptide de fusion situé sur la zone terminale de HA2, conduisant à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane interne des endosomes ; (ii) le passage de protons à travers le canal ionique M2 provoquant la dissociation des vRNP de la particule virale, puis leur relargage dans le cytoplasme de la cellule-hôte.

Les étapes de transcription et de réplication des virus influenza sont nucléaires, contrairement à la majorité des virus à ARN pour lesquels ces étapes sont cytoplasmiques. Les 8 segments sont transportés dans le noyau cellulaire grâce à l'intervention des protéines M1 et NS2/NEP qui possèdent des signaux de localisation nucléaire pouvant se lier à la machine d'importation nucléaire cellulaire. Dans le noyau de la cellule infectée, la transcription en ARN messager (ARNm) et la réplication du génome viral sont dépendantes du complexe polymérase (PB1, PB2 et PA).

La **transcription des ARN viraux (ARNv) en ARNm** nécessite le détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte<sup>35,70</sup>. Elle débute par le vol des coiffes en 5' des ARNm cellulaires (*cap-snatching*) par le complexe de la polymérase virale. PB2 se lie à la coiffe d'un ARNm de l'hôte, puis la sous-unité PA réalise un clivage 10 à 15 nucléotides en aval de la coiffe (endonucléase) et la repositionne sur la sous-unité PB1, permettant ainsi à la polymérase virale d'utiliser la coiffe comme amorce pour initier et réaliser la synthèse de l'ARNm viral. Chaque transcrite est ensuite polyadénylé par le complexe de polymérase virale par une séquence poly-U à l'extrémité 3' de l'ARNm viral. Les protéines NS1 et NP contribuent également au détournement de l'ARN polymérase II cellulaire au profit du cycle viral, en empêchant les événements d'épissage des ARNm cellulaires de l'hôte<sup>71</sup>. Les ARNm viraux coiffés en 5' et polyadénylés en 3' sont alors exportés dans le cytoplasme pour y être traduits, directement ou après un éventuel épissage alternatif.

La **réplication du génome viral** se déroule en deux étapes : (i) la transcription du génome viral en ARN complémentaire (ARNc) à polarité positive puis (ii) la transcription de celui-ci en nouveaux ARN génomiques viraux. Cette réplication est réalisée de manière autonome par un complexe polymérase, la ribonucleoprotéine complémentaire (cRNP), grâce à la complémentarité inverse des extrémités 5' et 3' du génome<sup>35,70</sup>. Les mécanismes de régulation conduisant au changement d'activité de la polymérase de la transcription à la réplication ne sont pas encore pleinement caractérisés. L'abondance des ARNm cellulaires à l'extrémité 5' de l'ARNv favoriserait l'activité transcriptionnelle tandis qu'une concentration importante des complexes polymérase ferait basculer l'activité vers la réplication<sup>72</sup>. Plusieurs autres effecteurs pourraient être impliqués, comme l'abondance nucléaire de NP nouvellement synthétisées, nécessaires à la stabilisation de l'ARNc et de l'ARNv, mais aussi NS1 interagissant avec NP, ou NS2/NEP, associée à la génération de petits ARNv, stimulant la réplication<sup>73,74</sup>.

La **synthèse des protéines virales** est entièrement dépendante de la machinerie cellulaire de l'hôte. La traduction des ARNm viraux est répartie entre les ribosomes cytosoliques (pour PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 et M1) et les ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) pour les protéines membranaires HA, NA et M2<sup>70</sup>. La protéine NS1 est rapidement synthétisée et réimportée dans le noyau pour son rôle dans la régulation des ARNm viraux et de l'hôte. On notera son action inhibitrice sur la réponse interféron, son implication dans l'export nucléocytoplasmique des ARNm viraux via ses interactions fonctionnelles multiples avec les protéines cellulaires TAP/NXF1, p15, Rael, E1B-AP5 et la nucléoporine NUP98, et son impact positif sur le recrutement des ribosomes cellulaires<sup>75</sup>.

Les sous-unités de polymérase virale nouvellement synthétisées (PA, PB1 et PB2) et la nucléoprotéine (NP) sont également réimportées dans le noyau cellulaire pour déclencher la néo-synthèse d'ARNv à partir de copies d'ARNc et s'y associer pour former de nouvelles vRNP fonctionnelles. Les vRNP néoformées peuvent ainsi transcrire des ARNm et des ARNc viraux supplémentaires ou s'associer aux protéines virales M1 et NS2/NEP nouvellement synthétisées pour assurer leur export nucléaire et leur incorporation dans de nouveaux virions. Le transport actif des vRNP est réalisé grâce au détournement des protéines cellulaires, telles que CRM1 pour leur export nucléocytoplasmique ou Rab11 et les microtubules cytosoliques pour leur trafic vers la membrane plasmique<sup>70,71,76</sup>.

Les glycoprotéines de surface NA et HA et le canal ionique M2, sont quant à elles, après traduction dirigées vers l'appareil de Golgi pour modifications post-traductionnelles (clivage de la HA) et adressage vers leur site d'incorporation au niveau des zones riches en radeaux lipidiques de la membrane plasmique, enrichies en cholestérol et en sphingolipides, initiant ainsi le **bourgeonnement des virions**<sup>77</sup>. Les 8 vRNP associées à M1 sont incorporées dans de nouvelles particules virales formées par la membrane plasmique dérivée de la cellule-hôte et exprimant les glycoprotéines de surface (**assemblage**). A la fin du cycle viral, la NA intervient en clivant des résidus sialiques des glycoprotéines de surface pour permettre le **relargage des particules virales** bourgeonnantes. L'activité sialidase facilite également la dissémination des virions en clivant les mucines présentes dans le mucus des voies respiratoires<sup>70,78</sup>.

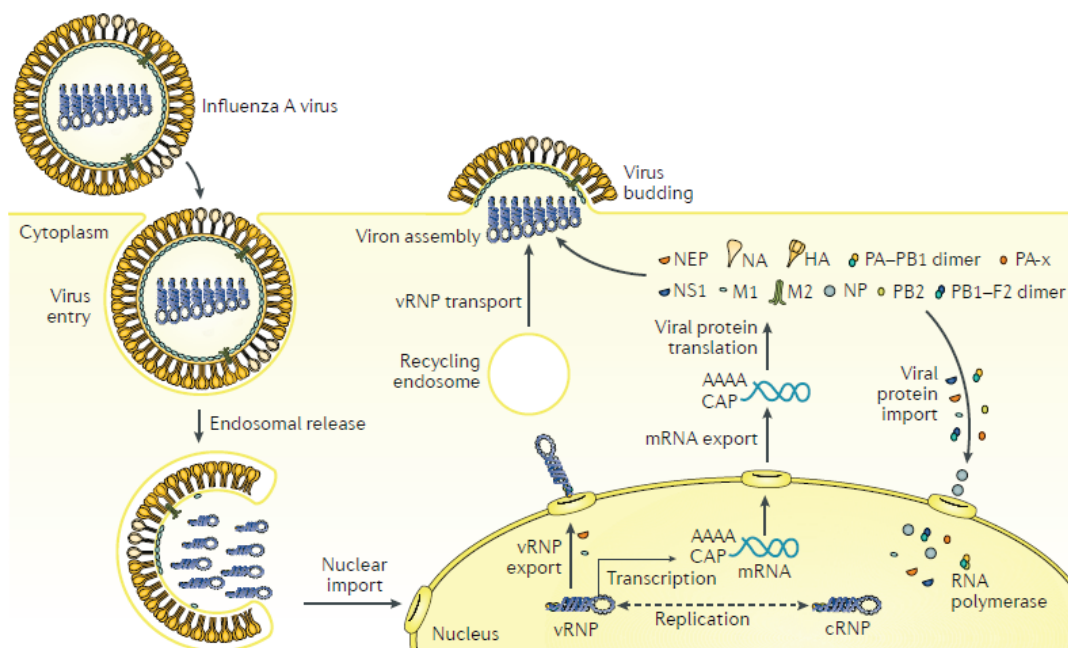


Figure 9 : Cycle de réplication virale des virus influenza, d'après Krammer et al. (2018)<sup>35</sup>

## 4.2. Le virus SARS-CoV-2

### 4.2.1. La famille des Coronavirus

Les coronavirus (CoV) forment une grande famille de virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive<sup>79</sup>. Ils appartiennent à l'ordre des *Nidovirales*, sous-ordre *Coronavirineae*, famille *Coronaviridae*, sous famille *Orthocoronavirinae*, elle-même divisée en 4 genres : alpha-, beta-, gamma- et deltacoronavirus. Ce sont pour la plupart des virus zoonotiques mais seuls les alpha et bêta infectent les mammifères. Ils sont responsables de maladies respiratoires et entériques, affectant le bétail, les animaux de compagnie et l'Homme.

Les CoV humains tels que HCoV-229E (alpha) et HCoV-OC43 (bêta A) découverts dans les années 1960<sup>80,81</sup>, et plus récemment HCoV-NL63<sup>82</sup> (alpha ; 2004) et HCoV-HKU1<sup>83</sup> (bêta A ; 2005), sont connus pour être les agents étiologiques des rhumes saisonniers<sup>84</sup>. En revanche, les virus émergents tels que le *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV, bêta B ; 2002), le *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV ; bêta C ; 2012) et plus récemment le SARS-CoV-2 (bêta B ; 2019), ont été responsables d'épisodes épidémiques et/ou de pandémies ces vingt dernières années. Avec un tropisme pour les cellules épithéliales bronchiques, les pneumocytes et l'épithélium respiratoire supérieur, l'infection par ces virus peut déclencher des pathologies pulmonaires sévères.

### 4.2.2. Spécificité des Coronavirus pandémiques

Les hCoV saisonniers représentent globalement 5 à 10 % des détections virales dans les prélèvements respiratoires hospitaliers, avec une prédominance des souches OC43 et 229E<sup>84</sup>. Les études de séroprévalence démontrent un contact majoritaire dans les trois premières années de la vie, avec des réinfections fréquentes. Les symptômes associés sont catégorisés de rhume commun, une infection respiratoire aigüe spontanément résolutive et peu sévère. *In vitro*, ces virus ne génèrent pas d'effets cytopathiques importants (jonctions serrées intactes et excrétion uniquement apicale)<sup>85</sup>. Le virus 229E a un tropisme pour les cellules épithéliales pseudostratifiées non ciliées, mais ne se réplique pas dans les tissus bronchiques ou alvéolaires tandis qu'OC43, NL63 et HKU1 infectent préférentiellement des cellules ciliées<sup>85,86</sup>. Les virus 229E, OC43 et HKU1 se répliquent dans le tractus respiratoire supérieur, ce qui facilite la transmission mais limite leur pathogénicité. Le virus NL63 peut affecter les voies respiratoires hautes et basses, c'est le principal agent étiologique de la laryngite obstructive<sup>87</sup>.

L'expression et la distribution des récepteurs d'entrée dans les tissus respiratoires déterminent le tropisme viral et la pathogénicité associée. Les récepteurs cellulaires d'entrée identifiés des CoV sont l'aminopeptidase humaine N (APN/CD13; HCoV-229E), les acides sialiques<sup>88</sup> (9-O-Ac-Sia ; HCoV-OC43 et HCoV-HKU1), l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2<sup>89-92</sup> (ACE2; HCoV- NL63, SARS- CoV et SARS- CoV-2) et la dipeptidyl-peptidase 4<sup>93</sup> (DPP4; MERS- CoV).

En ce qui concerne le récepteur ACE2, celui-ci est présent sur la membrane cellulaire de nombreux organes dont les poumons (pneumocytes de type II, cellules épithéliales stratifiées), les artères, les reins, le cœur et les intestins<sup>90,94</sup>. Son abondance dans le tractus respiratoire profond a été largement documentée mais sa présence a été discutée dans les voies respiratoires hautes<sup>95</sup>. L'équipe de Sungnak a cependant confirmé son expression dans les cellules ciliées et les cellules productrices de mucus de l'épithélium nasal, avec une abondance dépendante du niveau de différenciation des cellules<sup>95</sup>. Ainsi, les muqueuses présentent un haut niveau d'expression d'ACE2<sup>91,94</sup>. Dans la sphère ORL, les cellules épithéliales de la langue expriment particulièrement ce récepteur et constituent une

porte d'entrée pour les virus NL63 et SARS<sup>91</sup>. L'abondance d'ACE2 dans le poumon profond permet ensuite l'établissement de l'infection. La sécrétion d'interférons qui s'ensuit stimule l'expression endogène des récepteurs dans le tractus respiratoire et augmente leur abondance, favorisant ainsi la réplication du virus<sup>94</sup>.

Le virus NL63 et les virus SARS ciblent le même récepteur mais la zone d'ancrage de la protéine Spike (S) de la souche NL63 exerce une plus faible affinité avec ACE2 que celles des virus SARS. De plus, le virus NL63 ne possède qu'un seul gène accessoire, ce qui rend sa pathogénicité moins importante<sup>92</sup>. Les virus SARS-CoV et SARS-CoV-2 exercent en revanche une forte pathogénicité sur les alvéoles pulmonaires et sont responsables de détresses respiratoires sévères. Le MERS-CoV provoque des symptômes similaires en ciblant la DPP4, hautement exprimée dans les poumons et les bronches<sup>86</sup>.

#### **4.2.2.1. SARS-CoV**

Le SARS-CoV a émergé en Chine en novembre 2002<sup>79,96</sup>. La maladie se traduit par des symptômes pseudo-grippaux, (forte fièvre et symptômes respiratoires modérés). L'évolution clinique est spontanément résolutive dans la première semaine pour 80 % des patients. Les 20 % restants évoluent vers un syndrome de détresse respiratoire aigüe sévère (*Severe Acute Respiratory Syndrome* : SARS ou SRAS) nécessitant une hospitalisation en soins intensifs et une ventilation mécanique<sup>84</sup>. La gravité des symptômes, la transmission inter-individus et la propagation de l'épidémie en Amérique du Nord et en Europe, a poussé l'OMS à lancer une alerte pandémie en mars 2003. Plusieurs épidémies nosocomiales ont ensuite été décrites avec la mise en évidence d'individus « super propageurs »<sup>84</sup>.

Le réservoir naturel principal du SARS-CoV est constitué par les chauves-souris. Sa transmission à l'Homme aurait été facilitée par l'intermédiaire d'animaux sauvages comme la civette ou le chien viverrin, consommés en Chine<sup>97</sup>.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) a rapidement été identifiée comme le récepteur d'entrée du virus, permettant l'ancrage de sa protéine S<sup>89,90</sup>. Ainsi, le virus SARS-CoV cible préférentiellement les cellules ciliées, les pneumocytes alvéolaires de type I et les macrophages pulmonaires dans le tractus respiratoire inférieur, où ACE2 est exprimé de manière prédominante<sup>90,98</sup>. La monopolisation anormale d'ACE2 dans les poumons entraîne un excès d'angiotensine II et augmente le risque de fibrose pulmonaire, en lien avec la pathogénèse viro-induite<sup>99,100</sup>. Chez les patients sévères, la détresse respiratoire se caractérise par de graves dommages alvéolaires (œdèmes, membranes hyalines, fibrose) et des infiltrats cellulaires (macrophages et polynucléaires) causés par une sécrétion exacerbée de cytokines pro-inflammatoires (IL1- $\beta$ , IL8, IL6, CXCL10 et CCL2), liée à une augmentation précoce d'interféron  $\alpha$  et une réponse adaptative inefficace<sup>84,99</sup>.

Malgré la gravité des pathologies observées, l'infection ne provoque que peu de symptômes respiratoires hauts et demeure faiblement transmissible (R0 situé entre 1.7 et 3, augmenté par les « super-contamineurs »<sup>84,101</sup>). Grace aux mesures de santé publique internationales, l'épidémie a été rapidement maîtrisée et déclarée terminée en juillet 2003 après environ 8 500 cas rapportés dans 29 pays et 916 décès, soit une mortalité de 10 %<sup>99,102</sup>.

#### **4.2.2.2. MERS-CoV**

En juin 2012, un premier cas humain de MERS-CoV est identifié en Arabie Saoudite<sup>16</sup>. La maladie se caractérise par une pneumonie rapidement évolutive, entraînant une détresse respiratoire mortelle dans 30 % des cas, accompagnée d'atteintes rénales. Deux clusters ont été identifiés en

Jordanie et au Royaume-Uni en avril et en septembre 2012<sup>99</sup>. La maladie s'est ensuite propagée par épidémies nosocomiales sporadiques, majoritairement issues de la péninsule arabe.

L'infection est majoritairement zoonotique, les chameaux et les dromadaires constituent le réservoir principal du virus. Environ 90 % des chameaux et dromadaires d'Afrique et du Moyen-Orient sont séropositifs au MERS-CoV<sup>99,103</sup>.

Pour l'entrée du virus, la protéine S cible la Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) dont la répartition tissulaire est différente entre les espèces<sup>93,104</sup>. Chez le chameau, le MERS-CoV se réplique majoritairement dans les épithéliums nasaux, facilitant la transmission inter-individus<sup>105</sup>. Chez l'Homme, le récepteur est hautement exprimé dans les cellules épithéliales non ciliées pulmonaires, bronchiques et rénales ainsi que dans les endothéliums pulmonaires, mais peu exprimé dans le tractus respiratoire supérieur. Le virus se réplique donc dans les voies respiratoires basses, ciblant majoritairement les pneumocytes alvéolaires de type I et type II<sup>86,106</sup>. La physiopathologie sévère associée se caractérise par la destruction des jonctions serrées et l'apoptose des cellules infectées<sup>105</sup>. En revanche, la transmission interhumaine reste très limitée ( $RO < 1$ ); les nouvelles épidémies résultant majoritairement de contacts Homme-chameau<sup>84</sup>.

Depuis avril 2012, le nombre de cas s'amenuise au fil des années (une centaine de cas rapportés en 2016, une cinquantaine en 2018 et seulement 7 en 2020). Au niveau mondial, environ 2 600 cas ont été confirmés dans 27 pays (83 % en Arabie Saoudite), incluant près de 900 décès, ce qui représente 35 % de mortalité<sup>18</sup>.

#### 4.2.2.3. SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 a émergé en Chine fin 2019, responsable d'infections respiratoires évoluant dans 30 % des cas sur des pneumonies sévères, nécessitant une oxygénation des patients voire une hospitalisation en réanimation<sup>19</sup>. L'infection s'est rapidement propagée, avec des cas rapportés dans au moins 18 pays à la fin du mois de janvier 2020 ( $RO$  estimé entre 2.2 et 3.3<sup>107</sup>), poussant l'OMS à déclarer l'état d'urgence de santé publique de portée internationale<sup>108</sup>. Au mois d'avril 2020, 870 000 cas et 43 000 décès ont été rapportés au niveau mondial<sup>109</sup>.

Les premiers séquençages du virus ont mis en évidence sa forte homologie (> 85 %) avec un SARS-CoV de la chauve-souris (bat-SL-CoVZC45)<sup>19</sup>. La séquence d'acides aminés (AA) de la protéine S possède 76 % d'identité avec celle du SARS-CoV humain et plus de 95 % avec celle du CoV RaTG13 de chauve-souris<sup>19,97,110</sup>, guidant les chercheurs vers l'identification du récepteur d'entrée cellulaire ACE2. La zone d'interaction avec ACE2 (460-520 AA) est hautement conservée, mais celle du SARS-CoV-2 présente un niveau d'affinité 10 à 20 fois supérieur à celle du SARS-CoV<sup>94,111</sup>. Des mutations au niveau du récepteur d'ancrage laissent penser à une adaptation à l'Homme lors de la transmission inter-espèce apportant des améliorations sur la stabilité structurale de S (liaisons hydrophobes, ponts hydrogène et interactions électrostatiques) et une diminution de la susceptibilité aux anticorps (Ac)<sup>102,110,112</sup>. La présence de nouvelles séquences au niveau des sites de clivages (et/ou de leur profil de glycosylation) et/ou l'évolution des sites connus ont également permis une adaptation à d'autres protéases cellulaires de l'hôte (plasmine, furine), facilitant ainsi l'activation de S<sup>113,114</sup>.

Contrairement au SARS-CoV qui utilise des alternatives telles que les protéases cystéines endosomales (CatB/L), la répllication du SARS-CoV-2 est dépendante du facteur cellulaire TMPRSS2 (protéase transmembranaire à sérine 2)<sup>97</sup>. Le virus se réplique donc uniquement dans les cellules co-exprimant ACE2 et TMPRSS2, notamment les Pneumocytes de type II et les cellules ciliées<sup>94</sup>.

Par ailleurs, le virus possède des capacités immunomodulatrices plus performantes que les autres CoV, lui permettant de différer la réponse interféron dans les premières heures d'infection, afin d'atteindre un niveau plus important de réplication avant la mise en place de la réponse antivirale de l'hôte<sup>115,116</sup>. Ensuite, il utilise cette réponse à son avantage pour augmenter l'abondance des récepteurs cellulaires dans le tractus respiratoire supérieur et ainsi faciliter la réplication virale. En effet, l'infection déclenche notamment l'activation des voies des interférons  $\alpha 2$  et  $\gamma$ , induisant l'expression de STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), qui conduit à l'augmentation de l'expression des récepteurs ACE2 et TMPRSS2 dans les *goblet cells*<sup>94</sup>.

Ainsi, le SARS-CoV-2 se réplique plus facilement dans le tractus respiratoire supérieur et présente un plus haut niveau de transmission que le SARS-CoV. Son taux de mortalité est en revanche plus bas, estimé à 1.4 % (d'après le nombre de cas et de décès rapportés dans le monde ; Santé publique France au 08/02/2022)<sup>117</sup>.

#### 4.2.3. Transmission

De manière identique aux virus influenza, le SARS-CoV-2 se transmet majoritairement de façon directe par les voies respiratoires (respiration, toux, discussion) ou via les aérosols, favorisé par la présence des récepteurs ACE2 dans la cavité orale<sup>118,119</sup>. L'expression des récepteurs ACE2 et TMPRSS2 dans les tissus nasaux augmente avec l'âge et demeure assez faible chez les enfants de moins de 10 ans, ce qui limiterait la transmission du virus dans cette population<sup>118,120</sup>.

Le virus reste infectieux pendant plusieurs heures dans les aérosols (> 3h ; demi-vie estimée à 1h)<sup>121</sup>. Ainsi, une exposition prolongée à une personne infectée (+ de 15 minutes) ou une brève exposition à une personne symptomatique constitue le plus haut risque de contamination<sup>122</sup>. La transmission présymptomatique représente une part importante des contaminations, appuyant l'importance des gestes barrières<sup>123,124</sup>.

Dans une moindre mesure, une transmission indirecte manuportée ou via du matériel contaminé est également possible. La stabilité et l'infectiosité des virus dans le milieu extérieur sont dépendantes des conditions environnementales (température, hygrométrie, pH, environnement protéique) et du type de surface ; elles peuvent varier de quelques heures à quelques jours. Le virus peut être maintenu sur des surfaces pendant plusieurs jours comme sur le plastique (demi-vie de 7h), où du virus infectieux est toujours détectable après 72h, ou sur l'acier (demi-vie 6h) où il reste détectable pendant plus de 48h<sup>121</sup>. Il est en revanche moins stable sur le cuivre et le carton, sur lesquels le virus infectieux n'est plus détectable après 24h.

L'abondance intestinale d'ACE2 et la détection d'ARN dans les selles pourraient suggérer une contamination oro-fécale possible, mais aucun cas n'a été rapporté, et l'OMS a classé ce risque de transmission comme faible<sup>122</sup>.

De même que pour la grippe et en l'absence de mesures restrictives, la propagation du virus est favorisée par les fortes densités de populations en milieux confinés (lieux très fréquentés comme les écoles ou maisons de retraite) et des facteurs environnementaux tels que de faibles taux d'humidité, températures, aération et niveaux d'UV<sup>125</sup>. Ainsi, dans ce contexte pandémique la mise en place des gestes barrières simples comme la distanciation physique, l'aération des pièces, l'hygiène des mains et le port du masque permettent de ralentir la transmission. Les études démontrent un impact de la distanciation sur la transmission à partir d'un mètre (réduction du risque de 10 %, augmente avec la distance) et l'efficacité du port du masque (réduction du risque de 15 %)<sup>126</sup>.

#### 4.2.4. Symptômes

Après une période d'incubation estimée entre 2 et 7 jours, les symptômes suivant une infection par le SARS-CoV-2 apparaissent en moyenne sous 5 jours. Pour 30 % des individus infectés, la maladie de COVID-19 est totalement asymptomatique. La majorité des malades (55 %) présentent des symptômes pseudo-grippaux mineurs à modérés, tels que de la fièvre accompagnée de maux de tête et de douleurs musculaires, une toux, une fatigue et la perte de l'appétit<sup>127,128</sup>. La perte du goût et de l'odorat est également fréquemment rapportée (> 30 %)<sup>129</sup>.

En moyenne 30 % des patients développent des problèmes de dyspnée 5 jours après le début des symptômes<sup>127,128</sup>. Lorsque le profil clinique des patients se détériore, généralement au cours de la deuxième semaine, ils nécessitent une hospitalisation (en moyenne entre les jours 7 et 8), présentant une hypoxie et une pneumonie bilatérale, parfois associée à des troubles gastro-intestinaux. La majorité des patients hospitalisés pour une COVID-19 ont plus de 50 ans (environ 80 %<sup>130</sup>) ; les personnes de plus de 65 ans présentent un facteur de risque plus élevé<sup>128</sup>. Ces malades présentent pour la plupart des comorbidités, l'hypertension et le diabète étant les plus fréquemment rapportées, mais aussi une obésité ou des maladies cardiovasculaires ou pulmonaire<sup>119,131</sup>. Les traitements inhibiteurs d'ACE (qui ont pour conséquences d'augmenter ACE2) indiqués pour le diabète et l'hypertension augmenteraient ces facteurs de risque<sup>132</sup>. L'expression des récepteurs ACE2 et TMPRSS2 serait également augmentée chez les fumeurs<sup>120</sup>.

Dans la majorité des cas, le standard de soins et l'oxygénation suffisent à rétablir la capacité respiratoire des patients<sup>133</sup>. Malheureusement, 20 % des malades hospitalisés se dégradent avec un syndrome de détresse respiratoire et un profil inflammatoire accru. Des complications cardiaques (crises cardiaques, thrombopathies), hépatiques (augmentations des transaminases) ou neurologiques (confusions) peuvent également apparaître<sup>110</sup>. Dans de rares cas, la défaillance du système immunitaire entraîne une tempête cytokinique, précipitant la défaillance multi-organe et le décès. Le taux de mortalité de la COVID-19 est estimé à 1 %, majoritairement des patients de plus de 80 ans<sup>127</sup>. Le profil évolutif de la maladie est schématisé ci-dessous dans la Figure 10.

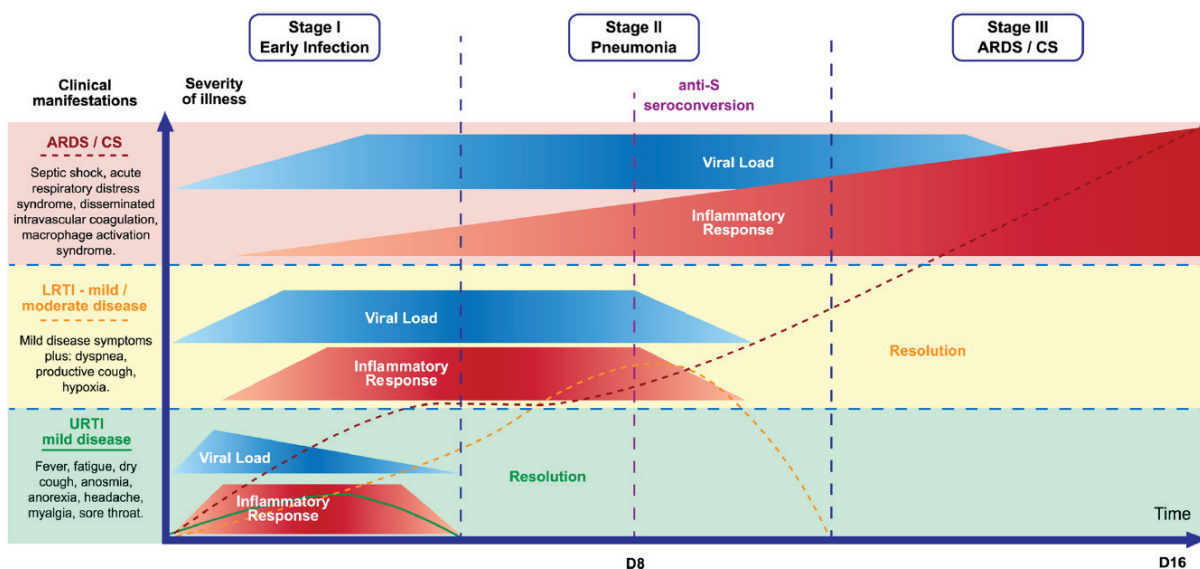


Figure 10 : Chronologie de l'évolution et de la sévérité de la maladie de COVID-19, Bordallo et al. (2020)<sup>134,135</sup>. La maladie se déroule en 3 phases : (i) phase virale dans le tractus respiratoire supérieur, comprenant la phase d'incubation et les premiers symptômes, la majorité des malades avec une immunité effective ne développent pas de symptômes plus graves ; (ii) la phase pulmonaire pendant laquelle la pneumonie s'installe (fièvre, toux et dans certains cas hypoxie) ; (iii) les patients les plus critiques évoluent vers une phase d'hyper-inflammation pouvant entraîner une détresse respiratoire et une défaillance multi-organes.



La réplication du SARS-CoV-2 entraîne d'importants dommages physiologiques dans le poumon profond. De plus, la monopolisation du récepteur ACE2 par le virus dans les pneumocytes alvéolaires entraîne la nécrose des cellules par l'angiotensine II et une hypertension<sup>119</sup>. Dans les phases tardives d'infection, les dommages aux alvéoles et aux cellules endothéliales (desquamation des pneumocytes, formation de membranes hyalines (fibrose)) compromettent la barrière épithélio-endothéliale et provoquent le dysfonctionnement de la transmission de l'oxygène à l'interface alvéolo-capillaire, se traduisant par la détresse respiratoire du patient<sup>136</sup>. La destruction de cette barrière augmente également l'inflammation. L'afflux anarchique de monocytes et de macrophages constituent des infiltrats interstitiels et œdèmes pulmonaires visibles par radiographies.

La dégradation des patients sévères est fréquemment associée à une suractivation de la coagulation. Plusieurs études rétrospectives confirment le lien entre des symptômes thrombotiques, provoqués par l'hyper-inflammation et la destruction des endothéliums, et le décès des patients<sup>137-140</sup>. Les analyses de biologies sanguines montrent chez ces patients une thrombopénie et une élévation anormale de facteurs de la coagulation et particulièrement du D-dimère<sup>141,142</sup>. De même, on retrouve une lymphopénie caractérisée par un faible nombre mais une hyper-activation des lymphocytes CD4 et CD8 exprimant le marqueur Th17, corrélée à une élévation des marqueurs de l'inflammation (taux de sédimentation érythrocytaire, protéine C réactive, ferritine, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, facteurs de coagulation)<sup>143</sup>. La surveillance régulière de ces biomarqueurs de dégradation permet d'identifier les patients les plus à risque et de mettre en place un traitement adapté<sup>142</sup>.

#### 4.2.5. Epidémiologie

La pandémie mondiale de COVID-19 a connu une évolution importante, des premiers cas identifiés fin décembre 2019 à la prise en charge sanitaire (diagnostic, gestes barrières, vaccination) et la mise en œuvre de mesures économiques, ponctuée par l'émergence de nombreux variants du SARS-CoV-2. La chronologie de ces 2 années est résumée en un certain nombre de faits marquants (non exhaustifs), ci-après.

##### 4.2.5.1. Chronologie de la pandémie de SARS-CoV-2 : faits marquants

<b>Les premiers mois de la pandémie</b>	
<b>2019</b>	
<b>Décembre</b>	Les établissements de santé de Wuhan signalent un cluster de patients atteints d'une pneumonie dont l'agent étiologique est inconnu dans la province de Hubei en Chine, en lien avec le marché alimentaire de Wuhan où sont vendus des animaux sauvages <sup>19</sup> .
<b>31 déc.</b>	Une enquête est ouverte par le CDC.
<b>2020</b>	
<b>5 janvier</b>	Un coronavirus proche des SARS-CoV humains et de chauve-souris est identifié : 2019-nCoV.
<b>11 janvier</b>	Wuhan annonce le premier décès lié au nCoV.
<b>13 janvier</b>	L'OMS publie le premier protocole pour des tests RT-PCR pour le diagnostic du nCoV.
<b>22 janvier</b>	La province de Hubei est mise en quarantaine ainsi que plusieurs grandes villes chinoises. Officiellement, l'épidémie a fait plus de 4000 morts en Chine <sup>144</sup> mais de nombreux médias accusent le gouvernement d'avoir délibérément sous-estimé l'ampleur de l'épidémie.
<b>Fin janvier</b>	Alors que l'épidémie progresse en Asie, les premiers cas européens sont rapportés en France et en Amérique du Nord à la fin du mois de janvier <sup>107,145</sup> .
<b>30 janvier</b>	L'OMS déclare l'état d'urgence de santé publique de portée internationale <sup>108</sup> . Le virus est identifié dans plus de 18 pays, la transmission interhumaine semble élevée.
<b>11 février</b>	Le nCoV est nommé SARS-CoV-2 et la maladie associée COVID-19.

<b>Février</b>	Un groupe de 300 experts de 48 pays se réunit pour identifier les priorités des recherches à mener et prévenir de la flambée pandémique.
<b>8 mars</b>	Les premières mesures de confinement européennes sont décidées en Italie, particulièrement touchée par une forte flambée épidémique <sup>146</sup> .
<b>11 mars</b>	Devant l'évolution exponentielle du nombre de cas (> 120 000) et de décès (> 4 000) au niveau mondial, l'OMS qualifie la COVID-19 de pandémie et appelle chaque gouvernement à prendre « les mesures urgentes et agressives » pour limiter sa progression, accompagnées des aménagements sanitaires et sociaux nécessaires à la gestion de cette crise <sup>145,147</sup> . Le taux de mortalité est alors estimé à 3.4 % <sup>148</sup> .
<b>Mars</b>	Les frontières se ferment et un confinement strict est mis en application en Espagne, en France et en Belgique pour tenter de limiter la propagation de la pandémie et la saturation des services hospitaliers.
<b>Mars</b>	Début de l'essai clinique international <i>Solidarity</i> évaluant des médicaments repositionnés (remdesivir, hydroxychloroquine, lopinavir, interféron $\beta$ ) sur les patients sévères hospitalisés.
<b>4 avril</b>	Le cap du million de cas rapportés au niveau mondial est franchi, avec près de 50 000 décès <sup>149</sup> (Figure 11). Les Etats-Unis deviennent le nouvel épice de l'épidémie, représentant 28 % des nouveaux cas <sup>146</sup> .
<b>8 avril</b>	Le confinement est levé en Chine.
<b>1<sup>er</sup> mai</b>	La FDA approuve en urgence le premier traitement de la COVID-19, le remdesivir à destination des patients sévères hospitalisés.
<b>Avr. à juin</b>	Le déconfinement progressif est entamé dans tous les pays d'Europe et un plan de relance européen est engagé pour rétablir la santé de l'économie, durement touchée par les mesures de restrictions. Les gestes barrières et le port du masque s'imposent mondialement, en particulier dans les espaces publics fermés et un système de traçage des cas positifs est mis en place.
<b>4 juillet</b>	L'OMS annonce l'arrêt de l'essai clinique international <i>Solidarity</i> débuté en mars 2020 pour manque d'efficacité des composés testés.

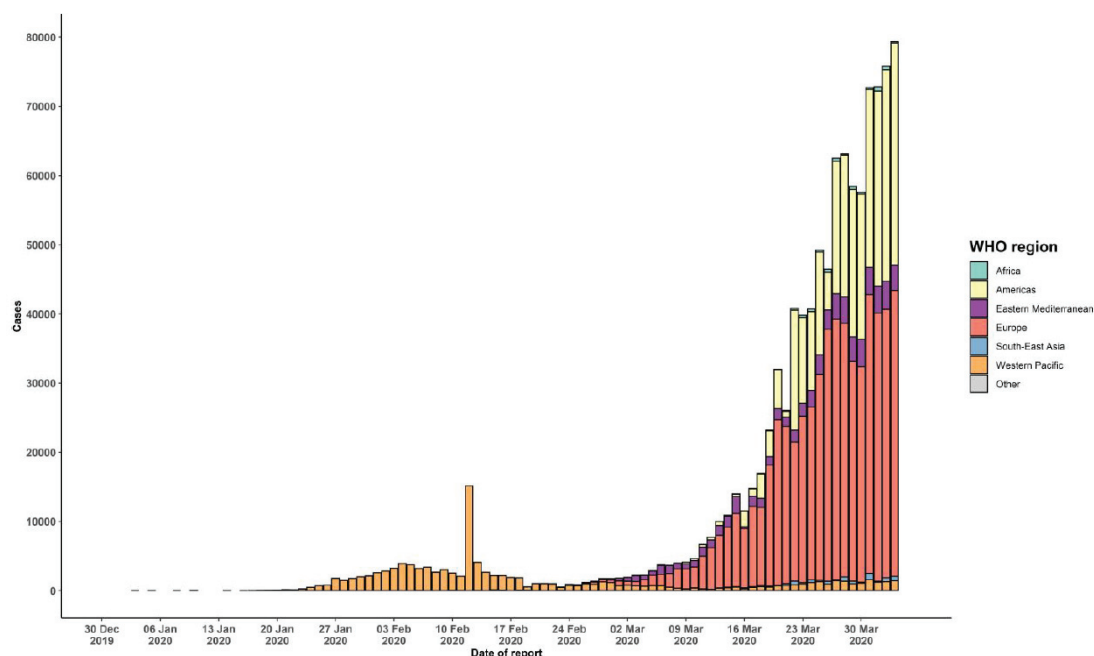


Figure 11 : Nombre de nouveaux cas journaliers de COVID-19 rapportés par continent. La pandémie évolue majoritairement en Europe (Italie, Espagne, Allemagne et France) et en Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada), source rapport de l'OMS du 4 avril 2020<sup>149</sup>.

## L'émergence des variants

<b>Automne 2020</b>	Une seconde vague est observée pour la rentrée de septembre, liée au relâchement des mesures barrières pendant l'été. De nouvelles restrictions sont mises en place (couvre-feux, fermeture des commerces non-essentiels).
<b>Novembre</b>	Nouveau confinement européen.
<b>Novembre</b>	Pfizer/bioNTech annonce l'efficacité clinique de son vaccin à plus de 90 %, suivi par Moderna (94 %) et Astra Zeneca (62 %).
<b>Début décembre</b>	La campagne de vaccination débute au Royaume-Uni, le gouvernement approuve le vaccin Pfizer.
<b>14-18 décembre</b>	La FDA approuve l'utilisation d'urgence des vaccins Pfizer et Moderna.
<b>14 décembre</b>	Le Royaume-Uni signale à l'OMS la circulation d'un variant particulier du SARS-CoV-2, identifié rétrospectivement sur un premier cas fin septembre dans le Sud-Est de l'Angleterre. Ce variant est dénommé VOC 202012/01 pour « <i>Variant Of Concern, year 2020, month 12, variant 01</i> » <sup>150</sup> (Alpha) et classé comme préoccupant de par sa contagiosité augmentée de 70 % <sup>146,151</sup> .
<b>18 décembre</b>	L'Afrique du Sud signale à son tour l'émergence d'un autre variant désigné « 501Y.V2 » (Bêta).
<b>Décembre</b>	Un nouveau variant est signalé au Brésil « 20J/501Y.V3 » (Gamma).
<b>Fin décembre</b>	Le vaccin Pfizer obtient l'AMM de la commission européenne.
<b>31 décembre</b>	L'OMS rapporte 80 453 105 cas confirmés de COVID-19 dans le monde, dont 1 775 776 décès (Figure 12).
<b>2021</b>	
<b>6 janvier</b>	La commission européenne valide la mise sur le marché du vaccin Moderna.
<b>Jan. – mars</b>	Le variant Alpha entraîne une flambée de l'épidémie en Europe. Le Royaume-Uni est le premier pays à franchir le seuil des 100 000 morts à la fin du mois de janvier. Les variants sud-africain et brésilien sont identifiés progressivement dans des dizaines de pays.
<b>Janvier</b>	La vaccination débute dans 42 pays par la protection des personnes les plus vulnérables mais la fréquence importante des variants met en doute leur efficacité. Le programme COVAX est déployé pour organiser la distribution mondiale des vaccins.
<b>Janvier/Février</b>	L'épidémie progresse en Afrique, majoritairement touchée par le variant Bêta.
<b>25 mars</b>	Une hausse des cas au niveau mondial est observée portant à 123 419 065 de cas confirmés et 2 719 163 décès, liée à la propagation des 3 variants Alpha, Beta et Gamma isolés respectivement dans 125, 75 et 41 pays <sup>152</sup> . Ces variants présentent une transmissibilité accrue. Gamma est associé à un risque accru de décès au Brésil.
<b>Mars</b>	L'Inde subit à son tour une explosion de nombre de cas.
<b>31 mars 2021</b>	Le variant Alpha est majoritaire en France, nécessitant un nouveau confinement.
<b>Avril 2021</b>	La campagne de vaccination européenne est lente mais s'accélère au mois d'avril avec 100 millions de vaccinés en Europe. A la fin du mois, 1 personne sur 4 est vaccinée dans les pays développés, 1 sur 500 dans les autres pays du monde.
<b>25 avril</b>	L'Inde connaît une flambée épidémique record (350 000 nouveaux cas en vingt-quatre heures), concomitante avec l'identification du variant préoccupant « B.1.617 » (Delta). L'aide internationale se mobilise pour envoyer de l'oxygène et des médicaments. A la fin avril, le variant indien représente 20 % des séquençages dans le pays.
<b>10 mai</b>	Le variant Delta est classé comme variant préoccupant en lien avec sa contagiosité accrue de 50 %.
<b>Avril à juin</b>	L'Europe sort progressivement des restrictions
<b>Juin</b>	Le variant Delta est majoritaire dans le monde, supplantant les variants Alpha, Bêta et Gamma
<b>1<sup>er</sup> juillet</b>	Mise en application d'un pass sanitaire européen
<b>Eté</b>	Mobilisation internationale pour accélérer la vaccination en Afrique
<b>31 août</b>	L'UE annonce la vaccination de 70 % des adultes (2 doses), 54 % aux Etats-Unis
<b>Automne</b>	La vaccination mondiale se poursuit
<b>24 novembre</b>	Identification d'un nouveau variant « Omicron » en Afrique du Sud
<b>Décembre 2021</b>	Omicron devient mondialement majoritaire

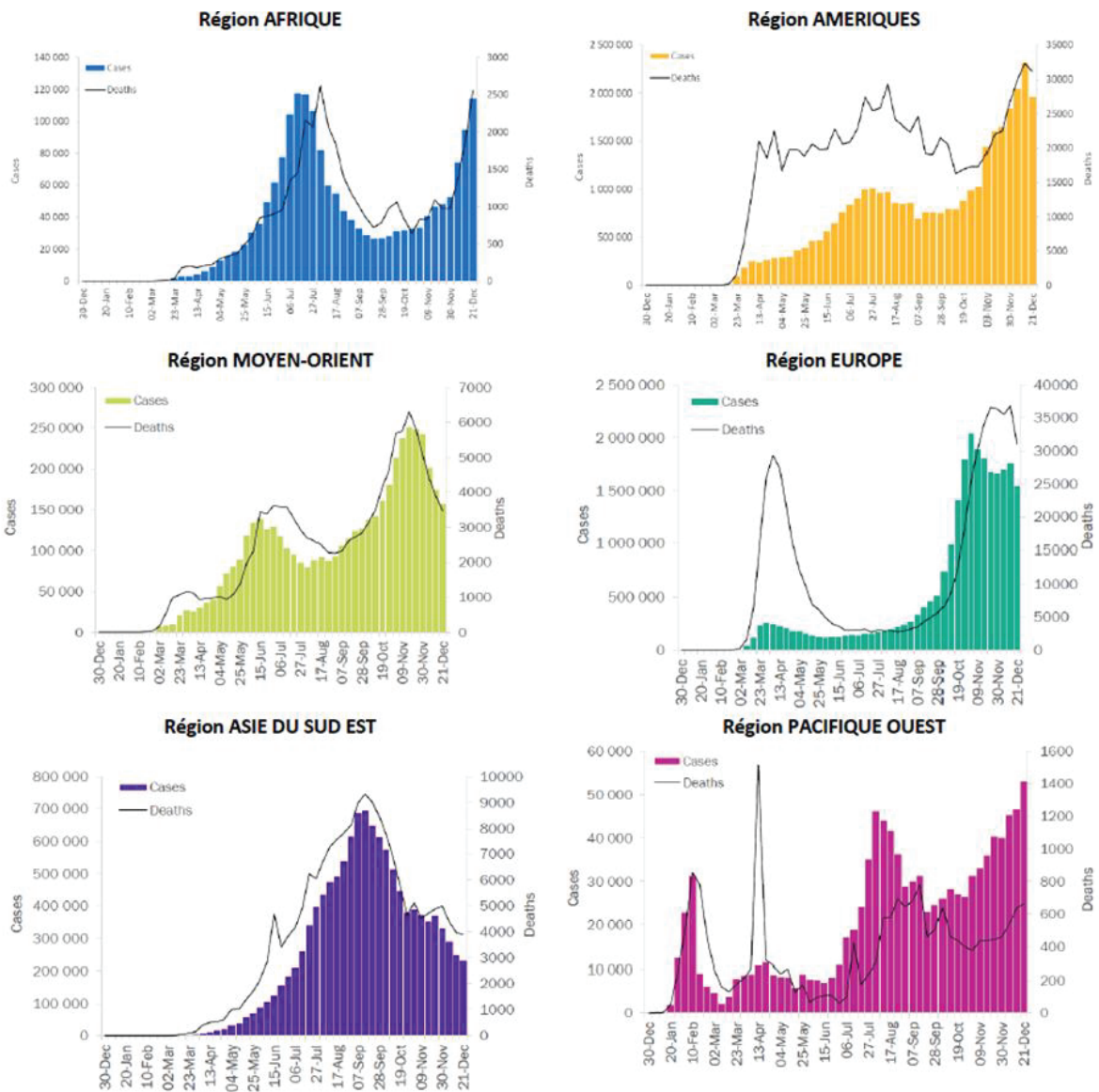


Figure 12 : Situation pandémique par continent du 30 décembre 2019 au 21 décembre 2020, d'après le rapport de Santé Publique France du 31/12/20<sup>150</sup>, représentée par le nombre de nouveaux cas et de décès rapportés par semaine. Les foyers majeurs de l'épidémie sont l'Europe (Royaume-Uni, France, Espagne, Italie) et les Amériques (Etats-Unis, Brésil, Colombie et Mexique). Un ralentissement global est observé en Asie, mais l'épidémie est sur une phase ascendante en Inde et au Japon.

Au 5 décembre 2021, 265 millions de cas ont été rapportés dont 5.2 millions de décès (Figure 13).

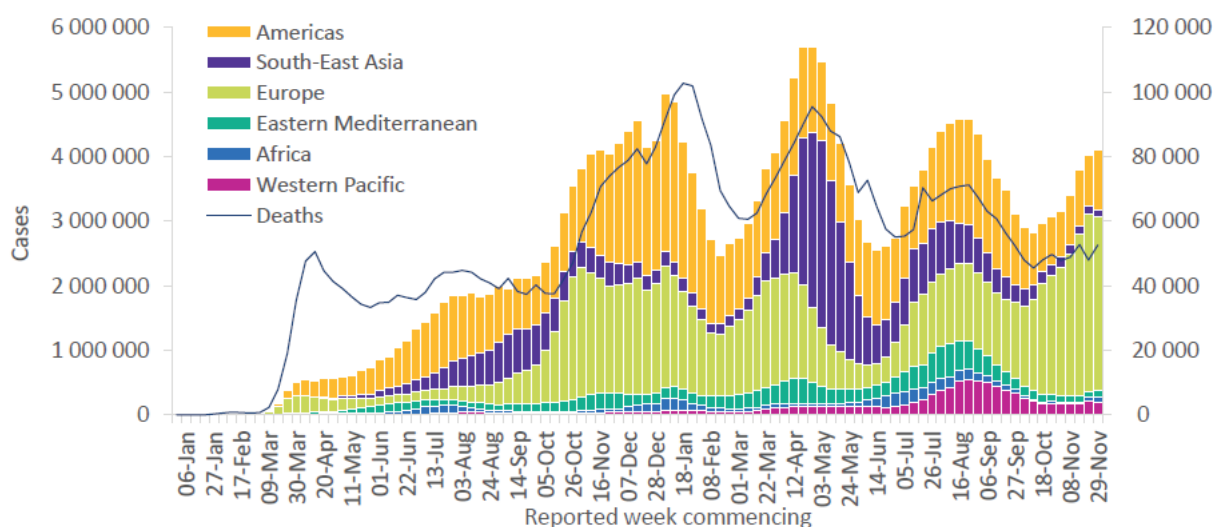


Figure 13 : Cas reportés et nombre de décès par semaine de la COVID-19 dans le monde par région, d'après le bilan épidémiologique de l'OMS du 7 décembre 2021<sup>153</sup>. Le plus grand nombre de décès ont été reportés aux Etats-Unis (815 000), en Inde (474 000) et au Brésil (616 000)<sup>154</sup>.

Le SARS-CoV-2 touche principalement les adultes. Les enfants et les adolescents sont moins susceptibles d'être infectés et sont en grande majorité asymptomatiques<sup>155,156</sup>. La plupart des cas sévères concernent les plus de 60 ans. Le nombre d'hospitalisations et de décès semble plus important chez les hommes que chez les femmes, en lien avec l'incidence des comorbidités (diabète et hypertension) plus fréquentes chez les hommes<sup>151,157,158</sup>.

Cependant, l'émergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2 est associée à des modifications de l'épidémiologie.

#### 4.2.5.2. Les variants du SARS-CoV-2

La pandémie de COVID-19 est rythmée par l'émergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2. Depuis janvier 2020, l'OMS surveille leur dynamique et répertorie les variants présentant des caractéristiques génétiques particulières comme variants d'intérêt « *Variant of Interest* » (VOI). Si l'un d'entre eux constitue une nouvelle menace sanitaire, par sa transmissibilité accrue, sa virulence ou une moindre sensibilité aux anticorps neutralisants (risque de réinfection et/ou baisse de l'efficacité des vaccins), il devient préoccupant « *Variant of Concern* » (VOC)<sup>159</sup>.

Ces adaptations sont principalement apportées par des mutations sur le domaine d'ancrage de la protéine Spike, améliorant son affinité avec le récepteur cellulaire ACE2 et produisant des changements des conformation de l'antigène<sup>160</sup>. La mutation D614G est la première identifiée au mois de juillet 2020 en Europe. Ce variant devient rapidement mondialement majoritaire. Tous les VOC identifiés ensuite sont porteurs de cette mutation, conférant une meilleure affinité pour le tractus respiratoire supérieur mais sans changement rapporté sur la virulence<sup>155,161,162</sup>. Dès le mois de décembre 2020, plusieurs VOC sont identifiés (Tableau 2).

Tableau 2 : Variants classés comme préoccupants par l'OMS et leurs caractéristiques<sup>159</sup>

Classification de l'OMS	Alpha	Bêta	Gamma	Delta	Omicron
<b>Pango lineage</b>	B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.2	B.1.1.529
<b>GISAID clade</b>	GRY	GH/501Y.V2	GR/501Y.V3	G/478K.V1	GRA
<b>Région d'émergence</b>	Royaume-Uni	Afrique du Sud	Brésil	Inde	Afrique du Sud et pays limitrophes
<b>Date d'identification</b>	Septembre 2020	Mai 2020	Novembre 2020	Octobre 2020	Novembre 2021
<b>Date de classement VOC</b>	Décembre 2020 <sup>151</sup>	Décembre 2020	Janvier 2021	Avril 2021 (VOI) Mai 2021	Novembre 2021
<b>Période de circulation majoritaire</b>	Janvier à juin 2021 <sup>163,164</sup>	Janvier à juillet 2021 <sup>163,164</sup>	Avril à Aout 2021 <sup>163</sup>	Mai à décembre 2021 <sup>163</sup>	Dès novembre 2021 à février 2022 (au moins)
<b>Zone de circulation majeure</b>	Royaume-Uni Europe Etats-Unis <sup>163,164</sup>	Afrique du Sud Philippines Europe <sup>163,164</sup>	Brésil Etats-Unis Chili, Pérou <sup>163</sup>	Etats-Unis Royaume-Uni Inde	Afrique du Sud Royaume-Uni Monde entier
<b>Transmission accrue</b>	50 à 75 % <sup>165,166</sup>	50 % <sup>160,167</sup>	50- 160 % <sup>167,168</sup>	+ 40 à 60 % par rapport à Alpha <sup>169-172</sup>	Oui <sup>173</sup>
<b>Sévérité</b>	↗sévérité chez les plus de 55 ans <sup>158,174</sup> ↗hospitalisation chez les moins de 60 ans <sup>158</sup>	↗taux d'hospitalisations et nombre de cas sévères <sup>155,160</sup>	↗nombre de cas sévères <sup>155</sup> ↗Létalité <sup>167,175</sup>	↗durée des symptômes et de l'excrétion virale <sup>176</sup> ↗taux d'hospitalisations) <sup>169</sup> ↗ Létalité <sup>171</sup>	Non
<b>Réduction de la sensibilité aux anticorps neutralisants</b>	Mineure <sup>167,177</sup>	Significative <sup>167,177,178</sup>	Significative <sup>178,179</sup>	Significative <sup>167</sup>	Oui ? <sup>173</sup>

Le variant **Alpha** a émergé au Royaume-Uni à partir de décembre 2020 où il devient majoritaire dès le mois de janvier 2021<sup>163,164,180</sup> (Figures 14 et 15). Il touche ensuite l'Europe, l'Amérique du Nord puis l'Asie à partir du mois de janvier et reste le variant majoritaire en Europe de mars 2021 à juin 2021 (environ 80 % des séquençages) et d'avril à juin en Amérique du Nord (60 % des séquençages). Il représente 30 % des séquençages au niveau mondial de mars à mai 2021. Sa transmission accrue (notamment induite par la mutation N501Y) est responsable d'une augmentation des cas sévères au Royaume-Uni, en particulier chez les plus de 55 ans (attaques cardiaques et mortalité) mais aussi une augmentation du taux d'hospitalisation chez les plus jeunes.

Le variant **Bêta** circule dès le mois de novembre 2020 en Afrique du Sud où il devient rapidement le variant majoritaire (80 % des séquençages), de décembre 2020 à fin janvier 2021<sup>163,164</sup> (Figures 14 et 15). Il circule encore dans cette région de février à mai (60 % des séquençages). Il est identifié en Europe, en Asie et en Amérique du Nord de février 2021 à juillet 2021 mais ne représente qu'un faible pourcentage des séquençages (< 1 %). Sa vitesse de propagation en Afrique a rapidement suggéré une augmentation de sa transmissibilité. La mutation E484K a été associée à un échappement vis-à-vis des anticorps issus de plasma de patients convalescents<sup>181</sup>.

Le variant **Gamma** (porteur des mutations N501Y et E484K) touche particulièrement le Brésil dès décembre 2020, où il restera le variant majoritaire de février à juillet, avant de s'étendre progressivement aux autres pays d'Amérique du Sud et aux Etats-Unis (Figures 14 et 15). Il représente environ 50 % des séquençages en Amérique du Sud de mars à juillet 2021. Il circule à cette période en Amérique du Nord et en Europe mais ne représente qu'un faible pourcentage des séquençages (< 1 %). Ce variant, plus sévère, a généré un pic de mortalité au Brésil, jusqu'à 4 000 décès par jours début avril.

Le variant **Delta** est d'abord prédominant en Inde à partir du début du mois d'avril 2021 avant de circuler en Amérique du Nord, au Royaume-Uni et en Europe dès le mois de mai jusqu'au mois de décembre. Dès le mois de juin, Delta est devenu le variant prédominant au niveau mondial, supplantant tous les autres variants qui gardaient jusqu'à lors une incidence épidémiologique continentale (Figures 14 et 15). Plusieurs études ont démontré son niveau de transmission très élevé, jusqu'à 60 % plus contagieux que le variant Alpha, associé à une augmentation de la durée des symptômes. Il infecte également plus facilement les adolescents et les enfants, en grande partie du fait qu'ils constituent la plus grande part de la population non vaccinée<sup>182</sup>. Son échappement au système immunitaire a été responsable d'un plus grand nombre de réinfections.

Bien que ces quatre variants présentent une susceptibilité moindre aux anticorps neutralisants, suggérant de potentielles réinfections, l'étude de Charmet et al. a confirmé le pouvoir de protection apporté par les vaccins à base d'ARN messager<sup>183</sup>.

Le variant **Omicron** a été identifié plus récemment, en novembre 2021, en Afrique du Sud où il représentait alors 85 % des séquençages. Il est ensuite identifié début décembre au Royaume-Uni et en Europe avant de devenir majoritaire partout dans le monde dès la fin décembre 2021 (Figure 15). Les séquençages ont mis en évidence de nombreuses mutations dans son génome (au moins 30 sur la Spike), dont certaines sont associées à une augmentation de la transmissibilité et l'échappement aux anticorps neutralisants chez les précédents VOC<sup>173,184</sup>. Omicron a engendré des vagues de contaminations sans précédent (plus de 500 000 nouveaux cas enregistrés en France le 25 janvier 2022, et plus de 4 millions dans le monde le 19 janvier 2022<sup>185</sup>).

Fin janvier 2022, le Conseil Scientifique français a qualifié cette 5<sup>ème</sup> vague comme différente des précédentes avec (i) une transmissibilité très élevée, (ii) une couverture vaccinale élevée, avec une efficacité vaccinale limitée contre les infections symptomatiques en absence de dose de rappel, mais

conservée contre les formes sévères et graves, et donc (iii) une gravité des formes cliniques moins importante<sup>186</sup> ; laissant présager une évolution positive de la pandémie à moyen terme.

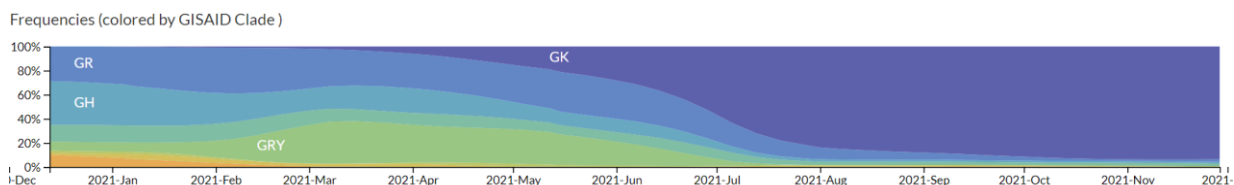


Figure 14 : Fréquence des séquençages des variants du SARS-CoV-2 enregistrés dans GISAID au niveau mondial de décembre 2020 à décembre 2021<sup>187</sup>. Les variants brésilien, sud-africain puis anglais exercent une incidence constante et majoritaires localement pendant plusieurs mois, avant l'arrivée du variant Delta qui devient mondialement majoritaire dès la fin du mois de juin 2021. (GISAID clades : GRY= Alpha, GR = Gamma, GH = Bêta, GK= Delta)

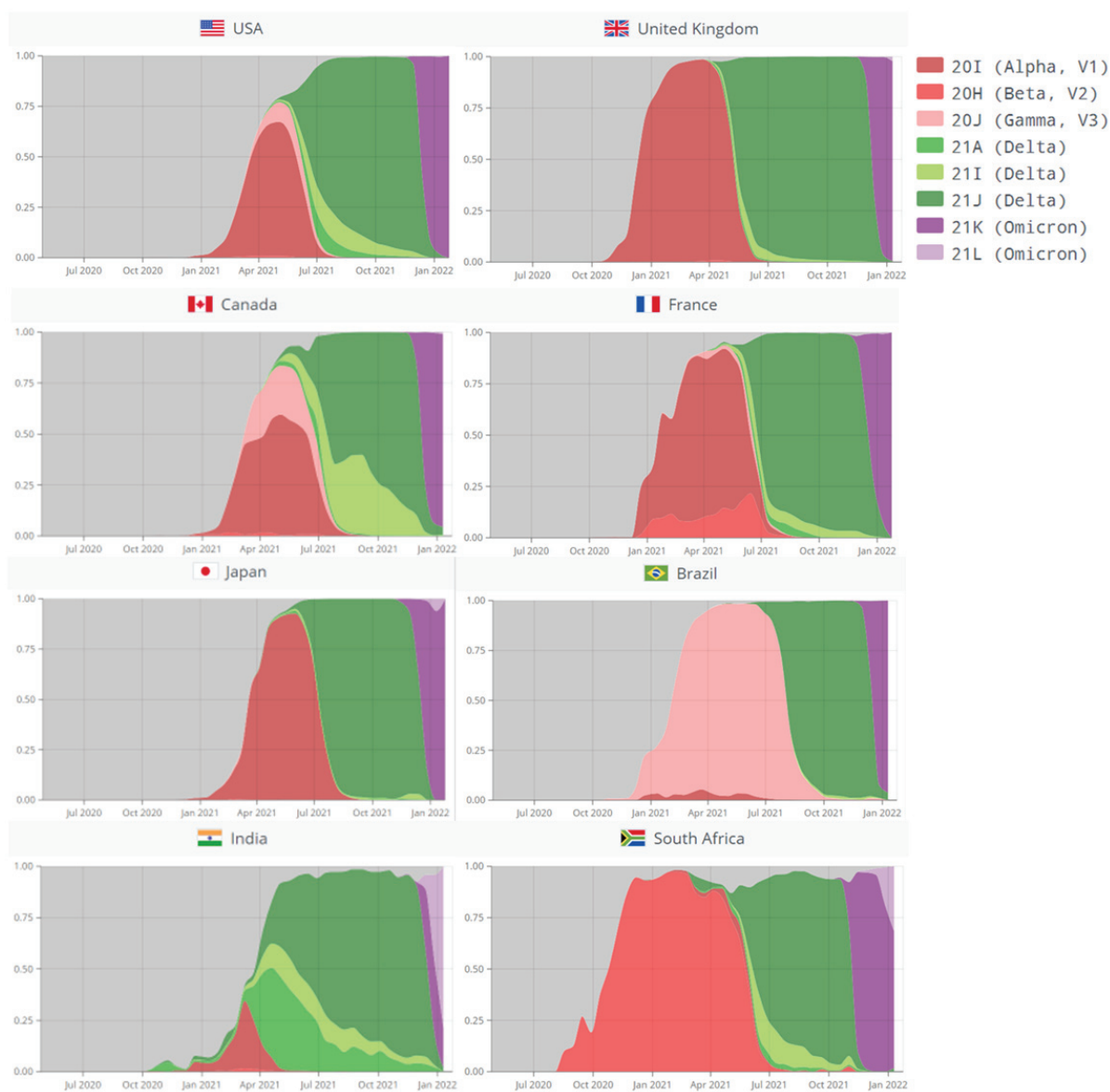


Figure 15 : Fréquence des séquençages des variants du SARS-CoV-2 enregistrés dans GISAID d'avril 2020 à début janvier 2022, à partir des prélèvements des USA, du Royaume-Uni, du Canada, de la France, du Japon, du Brésil, de l'Inde et de l'Afrique du Sud, réalisés à partir des données disponibles au 01/02/22 sur covariants.org<sup>180</sup>.



## 4.2.6. Structure et composition du virus SARS-CoV-2

### 4.2.6.1. Organisation du virus

Le SARS-CoV-2 est un virus majoritairement sphérique, de 60 à 140 nM de diamètre<sup>19</sup>, enveloppé d'une bicouche lipidique constituée des protéines d'enveloppe (E), des protéines transmembranaires (M) et parsemée des glycoprotéines de surface Spike (S) caractéristiques des Coronavirus. Le génome à ARN simple brin est empaqueté dans la Nucléoprotéine (N)<sup>79,102,188</sup> (Figure 16).

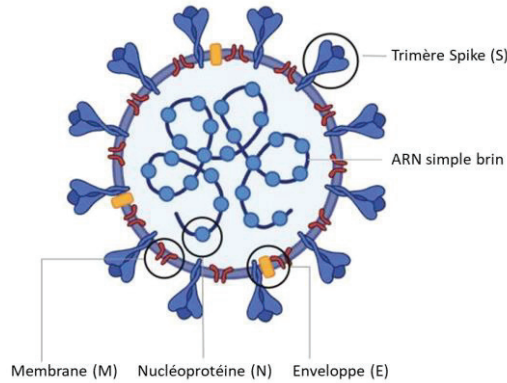


Figure 16 : Organisation du virus SARS-Cov-2, d'après Bar-on et al. (2020)<sup>188</sup>

### 4.2.6.2. Génome et protéines virales

Le génome du SARS-CoV-2 (Figure 17) est composé d'ARN monocaténaire de grande taille (> 30 kb) à polarité positive<sup>79,102</sup>. La partie codante est constituée de 2 cadres de lectures ouverts : ORF1a et ORF1b, qui représentent les deux tiers du génome, et codent pour 2 polyprotéines, donnant lieu par clivage protéolytique à l'expression de 16 protéines non-structurales (nsp) impliquées dans la réplication virale et la pathogénicité. Vers l'extrémité 3', des séquences plus courtes forment un set imbriqué d'ARN messager subgénomique (sg mRNAs) codant pour les 4 protéines structurales (S, M, E et N) et les protéines accessoires. Le génome viral est entouré de régions non transcrites en 5' et 3' (séquence *leader* et queue poly-A), permettant, entre autres, la première étape de traduction<sup>109</sup>.

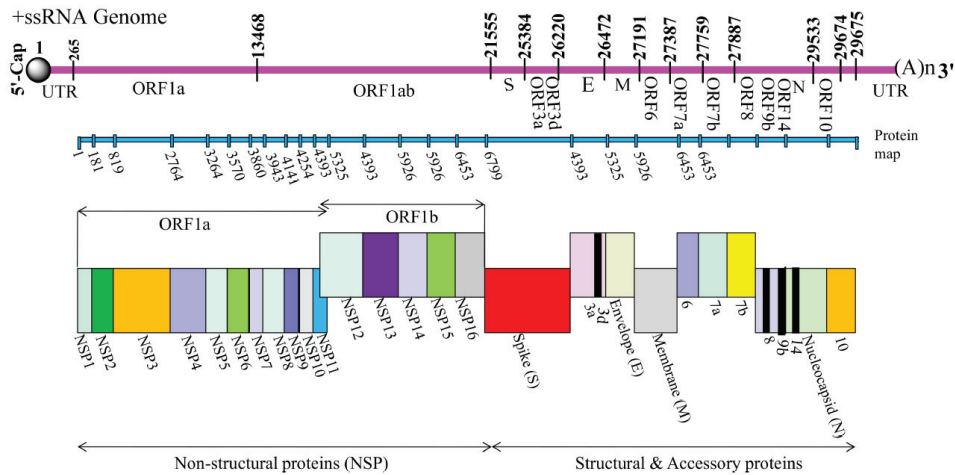


Figure 17 : Structure du génome du SARS-CoV-2, d'après Yadav et al. (2021)<sup>189</sup>

#### 4.2.6.2.1. Les protéines structurales

Les 4 protéines S, E, M et N assurent des fonctions structurales et occupent des rôles majeurs dans le cycle viral. La protéine S, composée de deux sous-unités fonctionnelles dirige l'entrée du virus dans la cellule-hôte, tandis que les protéines E, N et M participent aux étapes de réplication et d'assemblage, tel que décrit dans le Tableau 3 suivant :

Tableau 3 : Caractéristiques et fonctions des protéines structurales du SARS-CoV-2, adapté de Kadam et al. (2021), V'kovski et al.(2021) et Yadav et al. (2021)<sup>79,102,189</sup>

Protéine	Taille (kDa)	Caractéristiques	Fonctions dans le cycle viral	Fonctions dans la pathogénèse
<b>Spike (S)</b>	150-200	Glycoprotéine de fusion de classe I de forme trimérique contenant 2 parties fonctionnelles (sous-unités S1 et S2) et 2 sites de clivage (limite S1/S2 = R685 et et S2' = R815)		
<b>S1</b>			Attachement aux récepteurs cellulaires d'entrée <sup>79</sup> Antigène majeur de surface	Tropisme cellulaire Activation de la réponse au stress du RE
<b>S2</b>			Peptide de fusion	
<b>Enveloppe (E)</b>	8-12	Protéine la plus conservée (Identique au SARS-CoV à l'exception de 4 variations mineures sans impact sur la structure)	Transport ionique (viroporines)  Assemblage et relargage des virions	Favorise dans certains cas l'apoptose de la cellule-hôte
<b>Membrane (M)</b>	25-30	Constituant majoritaire des CoV  Peut avoir 2 conformations « compacte » ou « allongée », influant sur l'abondance de S (plus faible si compacte)	Assemblage viral et le maintien de l'homéostasie	
<b>Nucléocapside (N)</b>	40-50	3 domaines conservés : « <i>arm</i> », « <i>central link</i> » et « <i>C tail</i> » 90 % d'identité avec SARS-COV	Protéine d'ancrage de l'ARNg  Réplication et transcription de l'ARNv, formation et maintien du complexe RNP  Assemblage viral	Régulation de l'apoptose pour faciliter la multiplication et la dissémination

#### 4.2.6.2.2. Les protéines non structurales

ORF1a et ORF1b codent pour 2 polyprotéines pp1a et pp1b, donnant lieu par clivage protéolytique (par les protéases nsp3 et nsp5) à l'expression de 16 protéines non-structurales, qui occupent de multiples rôles dans le cycle viral et dans la modulation de la réponse immunitaire, tel que résumé dans le Tableau 4 ci-après<sup>79,102,189,190</sup>. Les interactions entre ces protéines sont essentielles au bon déroulement des différentes étapes du cycle viral. Les nsp 2 à 16 forment le complexe de réplication et transcription (RTC), impliqué dans la synthèse l'ARN génomique (ARNg) à partir duquel les protéines structurales et accessoires sont traduites. Nsp3 et 5 initient la réplication virale par leur activité protéase, tandis que nsp7 et 8 facilitent l'activité polymérase de nsp12 (ARN polymérase ARN-dépendante ; RdRP). Nsp3 exerce également un rôle dans la pathogénèse, agissant sur la modulation de STAT1 et le recrutement de macrophages. Cette modulation est impliquée dans l'induction de la tempête cytokinique et provoque également une surexpression des récepteurs ACE2 favorisant l'infection<sup>102</sup>. Nsp1 et nsp2 modulent spécifiquement la réponse immunitaire de l'hôte, en inhibant la synthèse de protéines antivirales ou en portant atteinte au cycle cellulaire.

Tableau 4 : Rôle des protéines non structurales du SARS-CoV-2 dans la réplication virale et la pathogénèse, adapté de Kadam et al. (2021), V'kovski et al. (2021), Yadav et al. (2021) et Malone et al. (2021)<sup>79,102,189,190</sup>

Protéine	Taille (AA)	Rôle dans le cycle viral	Rôle dans la pathogénèse de l'hôte
<b>Nsp1</b>	180		Interaction avec la sous-unité ribosomale 40S Bloque la traduction des protéines inhibitrices de l'hôte
<b>Nsp2</b>	638		Cible les prohibitines 1 et 2 Perturbation du cycle cellulaire
<b>Nsp3</b>	1945	<i>Papain-like protease</i> Protéase, clivage de multiples sites pour la génération des nsp 1, 2 et 3 Assemblage	Points d'ancrage multiples dans la régulation de l'immunité innée Perturbations de NFKB et STAT1 pouvant appuyer la tempête cytokinique
<b>Nsp4</b>	500	Assemblage des organelles à doubles-membranes	
<b>Nsp5</b>	306	<i>3C-like protease</i> Protéase, clivage de multiples sites pour la génération des nsp	
<b>Nsp6</b>	290	Induction des autophagosomes Assemblage des organelles à doubles-membranes	
<b>Nsp7</b>	83	Cofacteur de nsp12 et nsp8 Primer de l'activité de la polymérase	
<b>Nsp8</b>	198	Cofacteur de nsp12 et nsp7 Primer de l'activité de la polymérase	
<b>Nsp9</b>	113	Amplification des protéines	
<b>Nsp10</b>	139	Méthylation de l'ANRm Cofacteur de nsp 16 pour l'activité de nsp14	
<b>Nsp11</b>	13	Non connu à ce jour <sup>191</sup>	
<b>Nsp12</b>	932	Polymérase virale Synthèse de l'ARN	
<b>Nsp13</b>	601	Hélicase (synthèse ARN), cofacteur de la polymérase Réplication et transcription	
<b>Nsp14</b>	527	Exoribonucléase (ExoN), inhibition des erreurs de réplication, empêche les mutations délétères <sup>192</sup> Méthylation de l'ARNm	
<b>Nsp15</b>	346	Endoribonucléase Protection face à la réponse immunitaire	
<b>Nsp16</b>	298	Méthylation de l'ANRm Forme un complexe avec nsp10	

#### 4.2.6.2.3. Les protéines accessoires

Bien que peu conservées entre les espèces, les protéines accessoires sont multiples et possèdent un rôle déterminant dans la pathogénicité, en contribuant entre-autres à la modulation de la réponse de l'hôte<sup>79,102</sup>. De manière générale, les CoV en possèdent 8, dont certaines spécifiques de chaque souche. Chez le SARS-CoV-2, il y aurait 9 protéines accessoires, ORF3a, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 14, et 10, codées par au moins 5 gènes accessoires ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, et ORF8<sup>189</sup> mais leurs fonctions précises nécessitent encore d'être étudiées. Certaines déjà rapportées, comme ORF3a et 7a, sont connues pour avoir un rôle dans la dynamique ionique, l'inflammation, l'induction de NFκB, ou l'apoptose<sup>102</sup>. ORF3b, ORF6, ORF8 et ORF9b seraient, quant à elles particulièrement impliquées dans l'évasion du virus au système immunitaire en interagissant avec le complexe major d'histocompatibilité 1 (MHC-1) et en participant à la suppression de la réponse interféron de type I<sup>189,193</sup>.

#### 4.2.7. Cycle de réplication virale du virus SARS-CoV-2

La protéine spike (S) des coronavirus est responsable de l'attachement aux récepteurs cellulaires d'entrée<sup>79</sup>. Cette glycoprotéine de fusion de classe I est divisée en 2 parties fonctionnelles S1 et S2. A la différence des glycoprotéines de classe II dont le peptide de fusion est interne, ces protéines subissent un clivage post traductionnel générant un peptide de fusion aminoterminal<sup>194</sup>. La sous-unité S1 exposée à la surface contient le domaine d'ancrage des récepteurs de l'hôte (*receptor domain binding* ; RDB) et détermine ainsi le tropisme cellulaire et la pathogénicité. Le domaine transmembranaire S2 contient une région à 7 répétitions de domaines dite « *heptad repeat* » et le peptide de fusion, qui nécessite d'être clivé pour être actif.

Le cycle de réplication virale du SARS-CoV-2 (Figure 18) débute avec l'ancrage de la sous-unité S1 au récepteur cellulaire ACE2. La fusion des membranes (virale et cellulaire), orchestrée par la sous-unité S2 nécessite un clivage protéolytique. Le virus utilise essentiellement la protéine de surface (sérine protéase) TMPRSS2 (clivages en R685 puis R815), hautement exprimée dans le tractus respiratoire. Le matériel génétique est ainsi libéré dans le cytoplasme de la cellule.

A partir de l'ARNg à polarité positive, utilisé comme de l'ARNm, le virus utilise les ribosomes cellulaires pour traduire en premier lieu les protéines pp1a et pp1a/b à partir des ORF1a et ORF1b. Les protéases virales nsp3 et nsp5 permettent de générer l'ensemble des protéines non structurales nécessaires à la réplication et la transcription virale par clivage des protéines pp1a et pp1a/b. Nsp1 intervient rapidement pour bloquer la traduction des effecteurs antiviraux de l'hôte. Les protéines nsp2 à 16 constituent le RTC qui assure le bon déroulement du cycle viral ainsi que des actions immunomodulatrices retardant la réponse de l'hôte. En parallèle, nsp3, 4 et 6 détournent les doubles-membranes de l'hôte afin de constituer des organelles pour protéger le matériel génétique pendant les étapes de réplication et de transcription de l'ARNm subgénomique.

La réplication est assurée par la RdRP et ses co-facteurs nsp7 et nsp8. Nsp14 fournit une aide complémentaire pour la relecture de l'ARN grâce à son activité exoribonuclease. A partir de l'ARNg à polarité positive, le complexe de réplication produit l'ARNg antisens servant de base à la génération du nouvel ARNg. Il peut être traduit pour générer de nouvelles nsp ou intégré dans les particules virales néoformées. Également, des fragments d'ARN subgénomique antisens sont générés de manière discontinue à partir de l'extrémité 3', servant de base à la génération d'ARNm qui sera ensuite traduit en protéines structurales et accessoires. A l'issue de la transcription, l'ARNm est coiffé en 5' par les nsp 13, 14, 16 et 10, pour le protéger de la dégradation des facteurs de l'hôte.

Le SARS-CoV-2 utilise ensuite les ARN de transfert de l'hôte pour assurer la traduction de ses protéines. Les protéines structurales et accessoires (à l'exception de la protéine N) sont traduites dans les ribosomes du RE. La protéine N est traduite par les ribosomes du cytosol de la cellule. Les protéines traduites transitent par un compartiment spécifique du RE (ERGIC : *ER- to- Golgi intermediate compartment*). Les interactions protéines-protéines pour l'assemblage viral (M-S et M-E) sont dirigées par la protéine M. L'ARNg produit forme un complexe avec les protéines N puis s'assemble avec M. Les virions néoformés sont ensuite acheminés vers la membrane plasmique en utilisant la voie sécrétoire<sup>189</sup>. La protéine accessoire codée par ORF3a, une viroporine à hélices transmembranaires, peut faciliter la sortie du virus en formant des canaux ioniques. La sortie des virions est réalisée par exocytose.

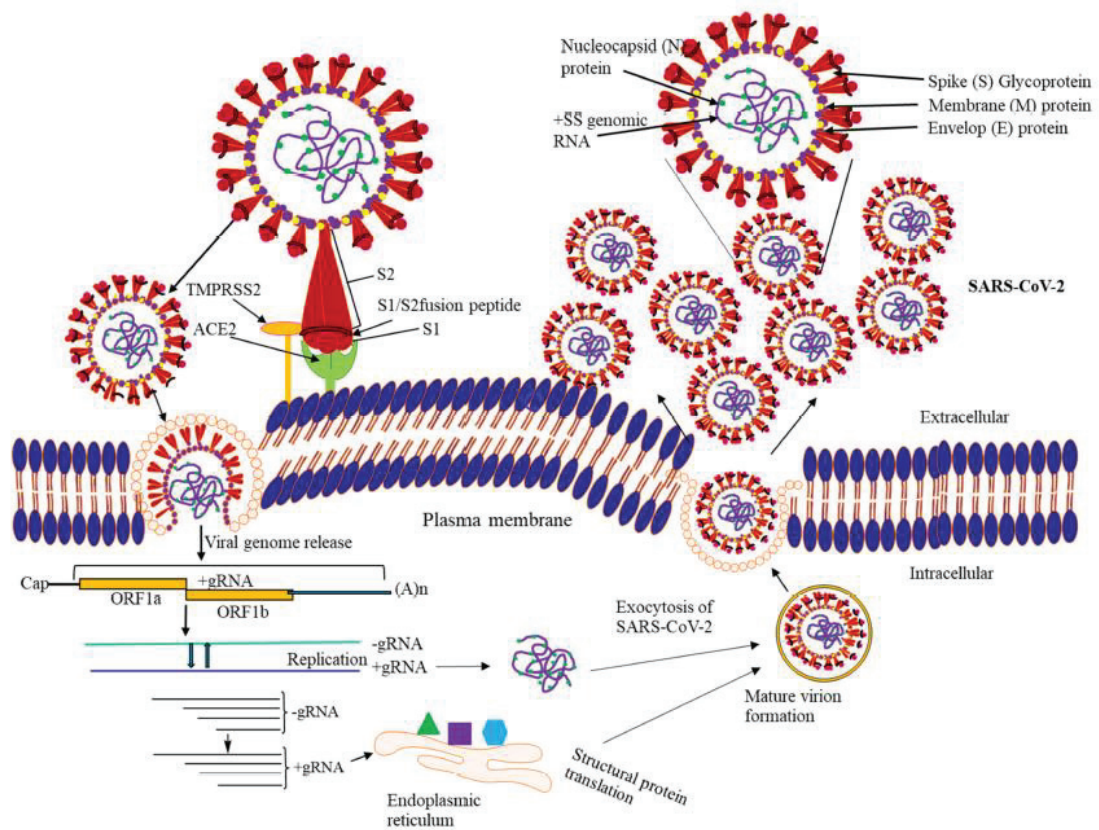


Figure 18: Cycle de réplication virale du SARS-CoV-2, d'après Yadav et al. (2021)<sup>189</sup>

## 5. Diagnostic des virus respiratoires

La majorité des infections des voies respiratoires supérieures sont d'origine virale (> 80 %) <sup>195</sup>. L'examen clinique constitue une première orientation du diagnostic mais les virus respiratoires provoquent souvent des symptômes similaires. L'identification de l'agent étiologique est toutefois importante pour proposer un traitement adapté au patient, éviter l'usage inapproprié des antibiotiques et limiter la propagation des épidémies.

Deux approches sont couramment utilisées pour discriminer les virus respiratoires :

- (i) Diagnostic direct : détection de la présence d'ARNv ou d'antigène dans le tractus respiratoire du patient
- (ii) Diagnostic indirect : détection et quantification d'Ac spécifiques dans le sérum du patient

Si le diagnostic de la grippe n'est que peu pratiqué en routine, la pandémie de COVID-19 a généré le développement de nombreux outils pour le diagnostic du SARS-CoV-2. A ce jour, il y a 235 tests moléculaires, 88 tests sérologiques et 34 tests antigéniques approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) <sup>196</sup>. En France, le ministère de la santé indique 525 kits de diagnostic disponibles, dont 170 tests moléculaires, 165 tests antigéniques et 190 tests sérologiques <sup>197</sup>.

### 5.1. Examen clinique

Dans le contexte pandémique, les patients souffrant de symptômes pseudo-grippaux (de fièvre et de toux), bien que communs à d'autres infections virales respiratoires, sont suspectés d'être infectés par le SARS-CoV-2 <sup>198</sup>. Un historique d'exposition (voyage, contact avec un individu infecté) peut faciliter l'orientation du diagnostic, les symptômes survenant en moyenne 5 jours post exposition. La perte du goût et de l'odorat ainsi que des troubles digestifs peuvent constituer des éléments supplémentaires.

Dans le cas d'une gêne respiratoire nécessitant une hospitalisation, l'évolution de la maladie sur une pneumonie peut être confirmée par une radiographie des poumons <sup>128,199</sup>. Elle permet de visualiser des infiltrats pulmonaires bilatéraux, caractérisés par des taches sombres. Ces infiltrats ne sont pas forcément spécifiques des pneumonies à COVID-19 mais elles peuvent constituer un bon outil pour identifier les patients graves, susceptibles de se dégrader. Des analyses sanguines peuvent compléter le tableau clinique <sup>128</sup>. Une lymphopénie, l'augmentation des transaminases, des troubles des facteurs de la coagulation (thrombopénie, augmentation du D-dimère) ou une augmentation des marqueurs de l'inflammation (taux de sédimentation érythrocytaire, protéine C réactive, ferritine, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, ...) constituent des marqueurs d'une réponse inflammatoire exacerbée nécessitant une surveillance accrue et la mise en place de soins adaptés.

### 5.2. Diagnostic direct

Pour réaliser le diagnostic, un prélèvement est réalisé dans les voies respiratoires du patient à l'aide d'un écouvillon. Le prélèvement nasopharyngé (alternativement oropharyngé ou salivaire) est privilégié pour le dépistage des infections à un stade précoce, en particulier chez les cas contact asymptomatiques ou présentant des symptômes bénins <sup>200</sup>. Si le prélèvement a lieu plus tardivement dans l'évolution de la maladie ou chez des patients ayant un prélèvement des voies respiratoires

supérieures négatif mais qu'il subsiste une forte suspicion clinique, un prélèvement dans les voies respiratoires inférieures (lavage bronchoalvéolaire) peut être pertinent.

### 5.2.1. Diagnostic moléculaire

Historiquement, l'identification des pathogènes viraux était réalisée par la mise en culture des prélèvements sur des lignées cellulaires, complétée par des observations en microscopie électronique ou par des marquages d'immunofluorescence<sup>195</sup>. L'avènement de la biologie moléculaire a révolutionné la facilité et la rapidité des diagnostics.

Le diagnostic moléculaire par RTqPCR (*reverse-transcription polymerase chain reaction*) permet la détection génomique de l'ARNv par une méthode d'amplification des acides nucléiques et constitue aujourd'hui le *gold standard*<sup>201</sup>. L'ARNv est extrait du prélèvement, puis une zone ciblée spécifiquement est amplifiée et quantifiée par des réactions enzymatiques, à l'aide d'un thermocycleur. De nombreux kits de détection sont approuvés par la FDA pour le diagnostic moléculaire des virus influenza<sup>202</sup>. Des kits de PCR multiplexes sont également disponibles sur le marché, permettant de détecter facilement et rapidement des co-infections, qui peuvent être fréquentes chez les jeunes enfants<sup>195</sup>. En ce qui concerne le SARS-CoV-2, l'OMS a rapidement rendu publiques les séquences des amorces et de la sonde permettant de réaliser le diagnostic<sup>203</sup>. De nombreux kits sont aujourd'hui disponibles, ciblant des séquences d'ARN situées sur ORF1ab, N ou E<sup>204–206</sup>.

De manière générale, ces tests ont une sensibilité élevée (< 90 %) mais présentent parfois un manque de spécificité. Il est à noter que la fiabilité de la détection génomique varie en fonction du stade de l'infection. Le test est plus sensible dans les phases précoces, quand le virus se réplique dans les voies aériennes supérieures. Dans les phases plus tardives, le test peut donner des faux négatifs. Cette méthode de diagnostic est également limitée par le caractère évolutif continu des virus (glissement antigénique, mutations, variants). Pour pallier cela, plusieurs outils ont été développés afin de surveiller l'épidémiologie des virus et l'émergence de nouveaux variants. Il est par exemple possible d'utiliser des *pools* amorces spécifiques de mutations d'intérêt dans des RTqPCR multiplexes pour surveiller la propagation d'une souche mutante. Cependant, cette alternative ne permet pas d'identifier de nouvelles mutations. Pour caractériser entièrement le génome viral, il faut réaliser un séquençage à haut débit (NGS). Des banques de petits fragments d'ARNv sont amplifiés puis séquencés. La technologie Illumina est la plus fréquemment utilisée, chaque base ajoutée en cours de synthèse émet un signal fluorescent permettant de l'identifier<sup>207</sup>.

Pour permettre le regroupement, le partage, l'accès et l'archivage de ces données de séquençages, la plateforme GISAID a été créée en 2008, initialement pour permettre la surveillance des virus influenza<sup>208</sup>. Dans le contexte de la pandémie de COVID-19, cette plateforme a démontré tout son intérêt, permettant l'analyse épidémiologique en temps réel des variants du SARS-CoV-2 (poussée épidémique, transmission) et la compréhension de sa dynamique évolutive<sup>200,209</sup>.

### 5.2.2. Diagnostic antigénique

Bien que le diagnostic moléculaire soit devenu le standard, cette stratégie est très coûteuse et parfois difficile à mettre en œuvre dans un contexte de diagnostic de masse, en collectivité par exemple. Des alternatives existent, comme les tests antigéniques qui permettent l'identification rapide (10 à 30 minutes) et simple (sans besoin matériel complémentaire) des protéines virales dans les sécrétions respiratoires, buccales ou salivaires<sup>200</sup>. Ils reposent sur une méthode d'immunodétection

de type sandwich, sans étape d'amplification de la cible détectée, et sont donc moins sensibles que les tests moléculaires. Ils sont plus efficaces chez les individus ayant une charge virale importante, au début de l'infection et sont donc particulièrement recommandés pour les individus symptomatiques et les cas contact, dans un environnement avec une forte prévalence du virus.

Devant la difficulté à discriminer les symptômes grippaux de ceux du COVID-19<sup>198</sup>, des kits de diagnostic combinés apparaissent sur le marché, à l'image du « COVID-19 and Influenza A+B Antigen Combo Rapid Test (Nasopharyngeal Swab) », commercialisé par AllTest<sup>®210</sup> (Figure 19) , permettant d'identifier avec un seul prélèvement la présence des virus influenza A et B et/ou du SARS-CoV-2 avec une sensibilité de 96.4 % et une spécificité de 99.2 %.



Figure 19 : Le test de diagnostic rapide commercialisé par AllTest permet d'identifier rapidement un individu infecté par le SARS-CoV-2 ou des virus influenza A ou B à partir d'un écouvillon nasopharyngé. Après avoir plongé l'écouvillon quelques secondes dans un liquide d'extraction, 3 gouttes sont déposées dans la fenêtre S. Le liquide migre ensuite dans une membrane sur laquelle sont adsorbés des anticorps couplés à une molécule colorée. S'il y a présence d'antigènes viraux dans le prélèvement, les anticorps vont s'y fixer et migrer jusqu'à une ligne contenant des Ac spécifiques de l'Ag, formant une ligne colorée. Au bout de la membrane, une autre ligne contenant des Ac dirigés contre la molécule colorée sert de témoin de migration. Le résultat est lisible au bout de 15 minutes.

### 5.3. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect permet de mettre en évidence la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection, par la production d'anticorps spécifiques dirigés contre le ou les virus recherchés. En pratique, le test consiste à détecter (et quantifier dans certains cas) des immunoglobines IgM (produits immédiatement après l'exposition à la maladie) et/ou des IgG (correspondant à une réponse ultérieure et conférant généralement l'immunité spécifique à un patient) dans le sérum des patients. La sérologie repose généralement sur des méthodes immuno-enzymatiques de type sandwich (similaire aux tests antigéniques) ou ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)<sup>206</sup>.

Bien que ces méthodes soient simples d'utilisation, elles ne sont pas adaptées au diagnostic des infections aiguës. La détection des IgM est peu sensible et peut, par exemple, croiser avec entre plusieurs coronavirus. Les IgG peuvent mettre plusieurs semaines à être détectés et peuvent être témoins d'infections anciennes. Ainsi, la détection des anticorps n'est pas recommandée pour le diagnostic ni de la grippe, ni de la COVID-19. Cependant, cette méthode joue un rôle important dans la détection d'infections passées, dans le cadre d'activités de recherche et de surveillance. Elle est également pertinente pour évaluer la protection apportée par la vaccination.



## 6. Prophylaxie

Deux approches complémentaires sont employées pour lutter efficacement contre les infections respiratoires d'origine virale : la prophylaxie et les traitements thérapeutiques antiviraux. Les approches prophylactiques reposent en premier lieu sur les mesures barrières (hygiène des mains, distanciation, aération et port du masque) et sur l'immunisation par la vaccination.

### 6.1. Les vaccins contre la grippe

La vaccination contre la grippe est recommandée pour tous dès l'âge de 6 mois (sauf contre-indication) et particulièrement indiquée pour les personnes de plus de 65 ans, les jeunes enfants, les femmes enceintes et toute personne présentant des facteurs de risques (malades chroniques ou professionnels de santé)<sup>211</sup>. Dans le contexte pandémique, cette vaccination est d'autant plus importante pour limiter l'engorgement des services de soins et la confusion liée à la similitude des symptômes entre la grippe et la COVID-19<sup>212</sup>. En France, d'après le ministère de la Santé, la saison 2020-2021 a été marquée par une nette progression (8 points) du taux de vaccination des individus à risque jusqu'à 55.8 %<sup>213</sup>. L'immunisation prend environ 2 semaines, il est donc pertinent de se vacciner aux alentours du mois d'octobre.

Dès le mois de février, l'OMS établit chaque année des recommandations sur la composition vaccinale pour l'hiver suivant pour l'hémisphère Nord, à partir des informations collectées par le réseau de surveillance mondial de la grippe (GISRS) sur la circulation des souches dans les deux hémisphères au cours des mois précédents et leurs caractéristiques antigéniques. La composition vaccinale est décidée en coordination avec le CDC puis transmise à la FDA qui la communique aux fabricants.

La majorité des vaccins sont tétravalents, composés de 2 souches d'influenza A et de 2 souches d'influenza B. Pour la saison 2021-2022, les vaccins contiennent des antigènes de A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09-like virus, A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-like virus, B/Washington/02/2019-like virus (Lineage Victoria) et B/Phuket/3073/2013-like virus (Lineage Yamagata)<sup>214</sup>.

La plupart des vaccins disponibles sur le marché (Tableau 5) sont fabriqués avec des virus inactivés produits sur des œufs de poule embryonnés (Figure 20). La quantité d'antigène est calibrée sur 15 µg d'HA de chaque souche, par dose de vaccin. Depuis quelques années, des vaccins avec un niveau plus élevé en antigènes (60 µg) permettent d'améliorer l'immunogénicité chez les personnes âgées de plus de 65 ans, chez qui on observe une diminution de l'efficacité vaccinale.

Cependant, ce procédé de fabrication est long (en moyenne 6 à 8 mois) et la dérive antigénique des virus influenza limite l'efficacité de la protection, qui peut varier de 10 et 60 %, en fonction de la conformité de la composition vaccinale par rapport à la réalité de circulation des virus influenza<sup>198</sup>. En conséquence, l'innovation se porte aujourd'hui vers le développement à grande échelle de procédés alternatifs à l'œuf. En 2012, le Flucelvax® (Seqirus) a été le premier vaccin approuvé par la FDA produit en bioréacteur de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). Plus récemment, Sanofi-Pasteur a fait l'acquisition de la société *Protein Sciences*, qui a obtenu en 2016 l'accord de la FDA pour la commercialisation de son vaccin quadrivalent recombinant Flublok® produit en système cellulaire sf9/baculovirus<sup>215</sup>. Enfin, une réflexion sur le mode d'administration des vaccins a été initiée avec la mise sur le marché du FluMist® (AstraZeneca), un vaccin vivant atténué tétravalent (produit en œufs) pulvérisé en intranasal.

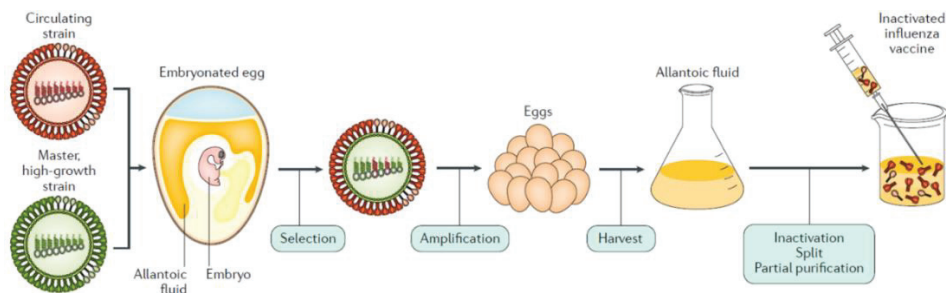


Figure 20 : Procédé de fabrication allantoïque du vaccin inactivé influenza A, Krammer et al. (2018)<sup>35</sup>. Chaque œuf embryonné est inoculé avec deux souches virales : influenza A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) (souche spécifiquement adaptée pour la production virale avec des capacités répliquatives importantes) et la souche circulante d'intérêt. La co-infection favorise les évènements de réassortiment afin d'augmenter les capacités de multiplication de la souche circulante. Le virus se réplique au sein de l'œuf embryonné et le liquide allantoïque est récolté. Le virus est fragmenté au triton (ou split), inactivé au formol, filtré et purifié pour l'enrichir en HA et NA virale.

Tableau 5 : Vaccins contre la grippe approuvés par l'ANSM en France et par la FDA aux Etats-Unis pour la saison 2021-2022 dans l'hémisphère Nord<sup>214,216</sup>. Les vaccins tétravalents produits en œufs contiennent les antigènes de 2 souches d'influenza A : A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09-like virus et A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-like virus, et 2 souches d'influenza B : B/Washington/02/2019-like virus (B/Victoria lineage) et B/Phuket/3073/2013-like virus (B/Yamagata lineage). Les vaccins recombinants ont une composition similaire mais contiennent les antigènes de la souche A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) pdm09-like virus en remplacement de A/Victoria. Les vaccins trivalents contiennent 2 souches A : A(H1N1) pdm09, A(H3N2) et 1 souche B/Washington/02/2019-like virus (B/Victoria lineage). L'indication du vaccin repose sur l'âge du patient et ses éventuels facteurs de risque.

Pays	Nom commercial	Fabricant	Technologie/ Composition	Administration	Population cible
France (ANSM)	Vaxigrip Tetra®	Sanofi Pasteur	Inactivé Tétravalent 15 µg d'HA	Intramusculaire	Enfants > 6 mois Adultes
	Influvac Tetra®	Mylan			Enfants > 3 ans Adultes
	Eflueda®	Sanofi Pasteur	Inactivé Tétravalent 60 µg d'HA		Personnes âgées > 65 ans
Etats-Unis (FDA)	Fluarix Quadrivalent®	GSK	Inactivé Tétravalent 15 µg d'HA	Intramusculaire	Enfants > 6 mois Adultes
	FluLaval Quadrivalent®	ID Biomedical Corp. of Quebec			
	Flucelvax Quadrivalent®	Seqirus			
	Fluzone Quadrivalent®	Sanofi Pasteur			
	Afluria Quadrivalent®	Seqirus			Enfants > 5 ans Adultes
	Flublok Quadrivalent®	Sanofi Pasteur	Recombinant Tétravalent 45 µg d'HA		Adultes > 18 ans
	Fluad®	Seqirus	Inactivé Trivalent 15 µg d'HA		Personnes âgées > 65 ans
	Fluzone High- Dose®	Sanofi Pasteur	Inactivé Trivalent 60 µg d'HA		
	FluMist Quadrivalent®	AstraZeneca	Tétravalent Vivant atténué 10 <sup>6.5-7.5</sup> FFU		

## 6.2. Les vaccins contre la COVID-19

Le développement d'un nouveau vaccin est un processus long, de plusieurs mois à plusieurs années. Ainsi, répondre à l'urgence de la pandémie a été un véritable défi technologique<sup>109</sup>. L'innovation dans le domaine vaccinal a marqué une véritable avancée ces dernières années, en ajoutant aux techniques de production classiques (virus inactivé, vivant atténué) des vaccins à base de virus vecteurs recombinants comme Ervebo® (MSD) autorisé en Europe contre Ebola en 2019 ou le développement de vaccins candidats à base d'ARN comme le mRNA-1653 contre hMPV et hPIV3 par Moderna<sup>217</sup>.

Dès les premiers jours de la pandémie, les recherches se sont focalisées sur le développement d'une immunité envers l'antigène de surface majoritaire, la protéine Spike, dont la séquence a été très rapidement publiée.

La technologie basée sur l'ARN messager présente de nombreux avantages dans ce contexte pandémique<sup>218</sup>. Ces vaccins sont simples et rapides à produire, facilement adaptables et présentent un haut niveau d'immunogénicité. La séquence est administrée en intramusculaire, encapsulée dans une nanoparticule lipidique lui permettant de pénétrer la cellule, qui produit elle-même la protéine Spike à la surface de sa membrane. Ce procédé permet d'accélérer la fabrication en s'affranchissant des étapes complexes de production des protéines recombinantes. Ainsi, les vaccins de Pfizer<sup>219</sup> et Moderna<sup>220</sup> ont rapidement fait l'objet d'essais cliniques et ont été les premiers approuvés dans de nombreux pays au moyen de procédures d'autorisation accélérées de la part des autorités de santé, en décembre 2020. Initialement indiqué chez l'adulte, le vaccin de Pfizer est progressivement autorisé chez les enfants depuis octobre 2021<sup>221</sup>.

D'autres vaccins ont été rapidement introduits sur le marché mondial, reposant sur des vecteurs viraux. Cette technologie consiste à modifier le génome d'un autre virus non répliquatif afin qu'il exprime à sa surface des antigènes d'intérêt, ici la Spike du SARS-CoV-2. Avec leur génome à ADN de grande taille, leur grande capacité de production et leur forte immunogénicité, les Adénovirus sont particulièrement adaptés et ont été utilisés contre d'autres pathogènes<sup>222</sup>. Les vaccins Janssen et AstraZeneca ont été développés avec cette technologie, en utilisant respectivement des adénovirus humain (Ad5) ou du chimpanzé (ChAdOx1)<sup>223</sup>.

En décembre 2021, seuls les vaccins de Pfizer-BioNTech, Moderna, Janssen et AstraZeneca sont approuvés par la FDA et/ou l'Agence Européenne du Médicament (EMA) (Tableau 6)<sup>224,225</sup> mais d'autres compositions sont utilisées dans de nombreux pays du monde, comme par exemple le Sputnik V® russe (Ad26 et Ad5)<sup>226</sup>, les deux vaccins chinois Convidecia® (Ad5) et Sinopharm BIBP® (inactivé) ou le vaccin indien Covaxin® (inactivé). De nombreux nouveaux vaccins devraient également renforcer cet arsenal. Novavax a initié la procédure de mise sur le marché de son vaccin recombinant et d'autres produits sont en cours d'examen par les autorités de santé à l'issue de leur phase III d'essai clinique comme les candidats de Sanofi (recombinant) ou Valneva (inactivé). Le site <https://clinicaltrials.gov/> affiche actuellement 1146 études pour les mots clés [COVID-19] AND [vaccin].

A l'heure actuelle, la vaccination mondiale se poursuit, avec l'administration de doses de rappel (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> doses) nécessaires au maintien de la concentration plasmatique des anticorps. D'après « *Our World In Data* », 56.4 % de la population mondiale a reçu au moins une dose de vaccin contre la COVID-19 mais seulement 7.3 % dans les pays à bas revenu (Mali, Namibi, par exemple)<sup>144,227</sup>.

Plusieurs études rapportent l'impact de la protection apportée par les vaccins sur l'évolution de l'épidémie. En octobre 2021, le groupement EPI-PHARE (service épidémiologique de l'ANSM et la Caisse Nationale de l'assurance maladie) a publié deux rapports sur l'efficacité de la vaccination à

prévenir les formes graves de COVID-19 en France sur 15,4 millions de personnes âgées de 50 à 74 ans et sur 7,2 millions de personnes âgées de 75 ans et plus, en utilisant le Système National des Données de Santé<sup>228</sup>. Les rapports mettent en évidence l'efficacité importante des trois vaccins Pfizer, Moderna et AstraZeneca, contre les formes graves de COVID-19 (hospitalisation pour COVID-19 et décès au cours d'une hospitalisation pour COVID-19), avec une réduction du risque d'hospitalisation à partir du 14ème jour après l'injection de la seconde dose supérieure à 90 % dans les deux cohortes et pour chaque vaccin. La protection est maintenue à l'encontre du variant Delta avec une efficacité mesurée sur une période de circulation importante du variant (juillet 2021) de 84 % dans la cohorte des 75 ans et plus et de 92 % dans la cohorte des 50-74 ans. Cette tendance est confirmée au niveau mondial. Aux Etats-Unis, une réduction globale du taux d'attaque de la COVID-19 a été rapportée à 4.6 % (contre 9 % chez les non vaccinés) ainsi qu'une réduction de 63 % des hospitalisations et de 69 % des décès<sup>229</sup>. A ce sujet, l'étude de Chen et al. démontre une inversion de la courbe des nouvelles infections dans 8 pays du monde avec une forte couverture vaccinale (Israël, Chili, Royaume-Uni, Qatar, ...) et suggère qu'une couverture minimale de 50 % de la population est requise pour maintenir un niveau de protection suffisant<sup>230</sup>.

Tableau 6 : Vaccins contre la COVID-19 approuvés par le FDA et/ou l'EMA en décembre 2021. Il s'agit de vaccins à ARNm ou composés d'un adénovirus vecteur. Seul le vaccin Pfizer est autorisé chez les enfants<sup>224,225</sup>.

Nom commercial	Fabricant	Technologie/ Composition	Administration	Autorisation	Population cible
COMIRNATY®	Pfizer-BioNTech	ARNm (Spike) 30µg	Intramusculaire	Europe Etats-Unis  Autres pays	Adultes Enfants > 5 ans (USA) Enfants > 12 ans (> 5 ans si à risque) (Eu)
Spikevax®	Moderna	ARNm (Spike) 100µg	Intramusculaire	Europe Etats-Unis  Autres pays	Adultes >18 ans (USA) Adultes >30 ans (Eu)
Janssen COVID-19 Vaccine	Janssen Biotech (Johnson & Johnson)	Adénovirus recombinant exprimant la Spike du SARS-CoV-2 5.10 <sup>10</sup> particules virales	Intramusculaire	Europe Etats-Unis  Autres pays	Adultes >55 ans (Eu) Adultes >18 ans (USA)
Vaxzevria®	AstraZeneca University of Oxford	Adénovirus recombinant exprimant la Spike du SARS-CoV-2  2.5.10 <sup>8</sup> unités infectieuses	Intramusculaire	Royaume-Uni Europe  Autres pays	Adultes >55 ans (Eu)

La vaccination demeure donc notre option la plus sérieuse pour sortir de la pandémie de COVID-19. Avec la perspective que le SARS-CoV-2 devienne un virus épidémique saisonnier comme influenza, des laboratoires travaillent actuellement au développement de vaccins efficaces contre la grippe et la COVID-19 à l'image de Vivaldi Biosciences qui développe un candidat-vaccin Delta-19® utilisant un virus influenza atténué, délété de NS1 et exprimant des protéines de la Spike du SARS-CoV-2 en administration intranasale<sup>231,232</sup>.

## 7. Traitements

Malgré la disponibilité des vaccins qui constituent la première ligne de défense contre l'infection, les traitements antiviraux demeurent la seule option thérapeutique, particulièrement indiqués dans les cas sévères et chez les immunodéprimés. L'arsenal thérapeutique contre la grippe se compose de trois familles principales de médicaments mais reste limité et menacé par l'émergence de mutations de résistances. Contre le SARS-CoV-2, l'urgence de la pandémie a joué en faveur du repositionnement de médicaments et à la mise en place de thérapies alternatives avec des anticorps monoclonaux et l'usage des immunomodulateurs.

### 7.1. Les antiviraux dirigés contre les virus influenza

Parmi les antiviraux approuvés contre les virus influenza, trois classes principales de molécules se distinguent : (i) les inhibiteurs du canal calcique M2, l'amantadine et la rimantadine, qui ne sont plus utilisés (ii) les inhibiteurs de la neuraminidase (INA), tels que l'oseltamivir et le zanamivir, et (iii) les inhibiteurs de la polymérase virale développés plus récemment, comme le favipiravir ou le baloxavir marboxil. Un inhibiteur de fusion, l'umifenovir est également utilisé en Chine et en Russie. A ce jour, 9 médicaments sont disponibles sur le marché (Tableau 7), mais seuls les INA sont recommandés par l'OMS pour le traitement de la grippe<sup>41</sup>.

*Tableau 7 : Médicaments antiviraux disponibles sur le marché comme traitements contre la grippe et mutations de résistances associées, adapté d'après Pizzorno et al. (2019)<sup>233</sup>. Quatre familles d'antiviraux existent, mais seuls les inhibiteurs de neuraminidase sont encore recommandés par l'OMS aujourd'hui. La fréquence des mutations de résistance aux Adamantanes est trop importante pour maintenir leur utilisation. Le baloxavir marboxil est le dernier médicament nouvellement mis sur le marché, mais des mutations de résistances ont été observées dès la phase II d'essais clinique.*

Médicament	Nom commercial	Pays d'usage	Classe d'antiviral	Mécanisme d'action	Année de mise sur le marché	Mutation de résistance reportées
<b>Amantadine hydrochloride</b>	Mantadix® Symmetrel® Symadine® Osmolex ER®	Usage non recommandé	Inhibiteurs des canaux ioniques M2	Entrée Bloque la libération du matériel viral au niveau des endosomes	1963 <sup>234</sup>	S31N <sup>235-237</sup> V27A
<b>Rimantadine hydrochloride</b>	Roflual® Flumandine®				1969 <sup>238</sup>	
<b>Oseltamivir phosphate</b>	Tamiflu®	Europe Etats-Unis	Inhibiteurs de NA	Libération des virions Analogues des acides sialiques, inhibiteurs compétitifs de NA	1998 <sup>239</sup>	H275Y <sup>240-243</sup> E119G/V N294S I222R
<b>Zanamivir</b>	Relenza®	Autres pays			1993 <sup>244</sup>	
<b>Peramivir</b>	Rapivab® Peramiflu® Rapiacta®	Asie Amérique du Nord			2000 <sup>245</sup>	
<b>Laninamivir octanoate</b>	Inavir®	Japon			2009 <sup>246</sup>	E119G <sup>247</sup>
<b>Favipiravir</b>	Avigan® Favilavir®	Japon Chine	Inhibiteurs de polymérase	Analogie nucléosidique Inhibiteur de la polymérase PB1	2002 <sup>248</sup>	K229R <sup>249</sup> P653L
<b>Baloxavir marboxil</b>	Xofluza®	Japon Etats-Unis Taïwan Europe		Inhibiteur de l'endonucléase PA	2018 <sup>250</sup>	I38T/M/F <sup>25</sup> 1,252
<b>Umifenovir</b>	Arbidol®	Russie Chine	Inhibiteur de fusion	Incorporation dans les lipides de la membrane virale Interaction avec la HA	1990 <sup>253</sup> ,254 2006	Non rapportée

### 7.1.1. Les adamantanes

L'amantadine et son dérivé la rimantadine ont été les premiers antiviraux contre la grippe mis sur le marché dans les années 1960. Ils inhibent les premières étapes de cycle viral en bloquant la dynamique ionique du canal M2. Largement utilisés pendant plus de 30 ans, la circulation majoritaire de souches résistantes a compromis leur utilisation après 2009<sup>235-237</sup>. En effet, des mutations de résistances ont été observées à partir des années 2000, en particulier la substitution S31N. Une étude réalisée au Mexique entre 2000 et 2017 a indiqué que 100 % des séquences de H1N1pdm09 et 83.6 % des séquences H3N2 portaient les marqueurs de résistance aux inhibiteurs de M2<sup>255</sup>. Face à ce constat, il a été nécessaire de développer de nouveaux médicaments, avec un mécanisme d'action différent.

### 7.1.2. Les inhibiteurs de neuraminidase

Les inhibiteurs de la NA sont des analogues compétitifs de l'acide sialique, récepteur cellulaire des virus influenza. Leur liaison au site actif de la NA interfère avec l'activité enzymatique de la sialidase, essentielle à la libération des nouveaux virions et empêche la propagation de l'infection au reste du tissu respiratoire<sup>256</sup>. Quatre médicaments appartenant à cette famille sont disponibles sur le marché depuis une vingtaine d'années. L'oseltamivir en administration *per os* est le plus utilisé, tandis que le zanamivir est utilisé alternativement sous forme de poudre inhalable. Ces deux médicaments sont approuvés par la FDA et l'EMA et génériqués dans de nombreux pays. Le peramivir, approuvé en Asie et en Amérique du Nord, est injecté par voie intraveineuse chez les patients en réanimation ou sous ventilation mécanique, ne pouvant recevoir de traitement par voie orale. Le laninamivir octanoate est un dérivé du zanamivir inhalable, seulement approuvé au Japon.

Les INA permettent une réduction significative de la durée des symptômes grippaux et améliorent la survie des patients, surtout s'il sont administrés dans des temps précoces d'infection<sup>257,258</sup>. Cependant, leur efficacité globale reste modérée et l'émergence de mutations de résistance est préoccupante.

Les premières études rapportant des résistances à l'oseltamivir ont été documentées pendant la saison 2007-2008. Dans le sud de la France, une prévalence de 38 % de virus résistants à l'oseltamivir a été mesurée parmi les souches H1N1 circulantes. Un constat similaire a été fait aux Etats-Unis (19 %), ainsi qu'en Asie, en Océanie et Afrique du Sud (64 %)<sup>32,241,259,260</sup>. En grande majorité, ces phénotypes de résistance sont portés par la substitution H275Y sur la NA (concentration inhibitrice médiane (IC50) augmentée environ 250 fois)<sup>32,241</sup>. La fréquence de la souche A/Brisbane/59/2007 (H1N1), porteuse de cette mutation acquise sans pression de sélection, a notamment été associée à ces épidémies. Au cours des saisons suivantes, d'autres mutations de résistance ont été documentées comme N294S sur H1N1 (IC50 augmentée de 200 fois) ou E119V sur H3N2 qui confère une multirésistance aux INA (IC50 augmentée entre 25 et 71 fois)<sup>242</sup>.

Heureusement, ces souches virales résistantes restent mondialement peu représentées parmi les souches circulantes (< 1 %). Plusieurs études suggèrent un mauvais *fitness* de ces virus mutants, ne favorisant pas la propagation du phénotype de résistance<sup>233,241,261</sup>. Cependant, ces mutations sont fortement inductibles en clinique chez les immunodéprimés, sous la pression de sélection des traitements, ce qui génère un risque important de mutations multiples. L'association des mutations H275Y et I223R a par exemple été rapportée chez un adolescent sous traitement immunosuppresseur ayant reçu des traitements prolongés avec de l'oseltamivir puis du zanamivir, générant une forte résistance à l'oseltamivir (10 000 fois l'IC50), mais aussi au peramivir<sup>243</sup>.

### 7.1.3. Les inhibiteurs de polymérase

Les inhibiteurs de polymérase constituent la classe des antiviraux nouvellement développés<sup>262</sup>. Deux médicaments sont actuellement disponibles, le favipiravir et le baloxavir marboxyl.

Le favipiravir est un analogue nucléosidique de pyrazine, inhibant la polymérase virale des virus à ARN. Initialement développé au début des années 2000 comme antiviral contre influenza, son mécanisme d'action lui confère une activité à large spectre (rhinovirus, RSV)<sup>248,263</sup>. *In vitro*, le favipiravir est efficace contre tous les sous-types de virus grippaux saisonniers (IC<sub>50</sub> < 6 µM), y compris des virus porteurs de mutations de résistances aux adamantanes et aux INA et contre des virus aviaires<sup>264</sup>. En modèle murin, il améliore la survie des souris lors de *challenges* infectieux mortels avec un virus aviaire<sup>265</sup>. Le favipiravir a fait l'objet de nombreuses études cliniques au Japon, en Chine et aux Etats-Unis, rapportant un bénéfice sur la durée d'amélioration des symptômes, mais peu de résultats significatifs sur la réduction de la mortalité ou la sévérité de la maladie ont été publiés à ce jour. De plus, la pharmacocinétique du favipiravir contraint à utiliser de fortes doses en clinique (entre 800 et 1 800 mg) favorisant la survenue d'effets secondaires<sup>262</sup>. Ainsi, seul le Japon a approuvé le favipiravir en 2014 avec une indication limitée aux patients infectés par un virus de la grippe nouveau ou ré-émergent résistant aux autres antiviraux<sup>262</sup>. Les autres pays poursuivent son évaluation clinique. Le favipiravir demeure une option thérapeutique très étudiée dans la quête d'une thérapie efficace contre de nombreux virus émergents. En 2016, son potentiel antiviral a été exploré pour faire face aux épidémies du virus Ebola sans toutefois pouvoir conclure à son efficacité. Des études rapportent également son efficacité contre le virus de la Vallée du Rift<sup>266-268</sup>. Aujourd'hui, son potentiel est largement étudié contre la COVID-19<sup>269</sup>. Actuellement, 99 essais cliniques apparaissent dans <https://clinicaltrials.gov/> dont 5 concernent influenza, 3 Ebola et 60 la COVID-19.

Depuis 2018, un nouveau médicament a fait son entrée sur les marchés japonais et américain : le baloxavir marboxil (Xofluza®). Il a ensuite été approuvé à Taiwan en 2019 et en Europe en 2021. Il est le premier antiviral nouvellement approuvé contre la grippe depuis près de 20 ans. Son mécanisme d'action ciblant l'endonucléase virale (PA) lui confère une forte activité *in vitro* (IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire). En clinique, le baloxavir a démontré une efficacité similaire à celle de l'oseltamivir sur la réduction des symptômes et a permis d'apporter un bénéfice sur la réduction de la charge virale par rapport au groupe traité à l'oseltamivir, y compris chez les sujets à risque<sup>250,270,271</sup>. Malheureusement, dès les essais cliniques de phases II et III, des substitutions au niveau du site actif de l'endonucléase (I38T/F) ont été identifiées chez 2.2 et 9.7 % des patients traités, corrélées à une baisse de l'efficacité antivirale (IC<sub>50</sub> augmentée de 100 à 200 fois<sup>272</sup>). Ainsi, peu de temps après sa mise sur le marché, des souches circulantes résistantes au baloxavir ont été décrites, y compris chez des individus jamais traités<sup>273</sup>. Les études évaluant le fitness *in vitro* des virus H1N1 et H3N2 possédant la substitution I38T ont suggéré un effet néfaste de la mutation<sup>252,272</sup>, mais *in vivo*, les virus sélectionnés par le traitement conservent leurs capacités de réplication et de transmission, laissant craindre une potentielle dissémination exacerbée de ces virus résistants<sup>274,275</sup>. En clinique, ces virus ont un impact significatif sur la durée des symptômes et l'excrétion virale chez les enfants traités au baloxavir<sup>276</sup>.

### 7.1.4. Les inhibiteurs de fusion

Cette famille ne comporte à l'heure actuelle qu'un seul représentant sur le marché, l'umifenovir (Arbidol®), approuvé en Russie depuis les années 1990 et en Chine depuis 2006 pour le traitement prophylactique et curatif des infections grippales<sup>277</sup>.

Synthétisé à partir des années 1970 en URSS, l'umifenovir est un dérivé d'indole possédant une activité antivirale à large spectre par inhibition de la fusion des membranes dans les étapes précoces du cycle viral. Une fois métabolisé *in vivo*, le principe actif s'accumule dans les structures lipidiques telles que les membranes des cellules, des lysosomes, des mitochondries et des virus<sup>254</sup>. Son activité est favorisée par un pH acide. Ainsi, l'arbidol possède plusieurs mécanismes d'action antiviraux, dirigés contre le virus mais aussi ciblant l'hôte. D'une part, il s'accumule dans l'enveloppe virale, la rendant plus rigide et moins propice à l'endocytose. Des interactions avec la sous-unité HA2 sont également décrites, stabilisant le changement de conformation du peptide de fusion<sup>278</sup>. D'autre part, le traitement induit une accumulation de clathrine sur les membranes cellulaires, capable de piéger les particules virales, motivant l'usage du médicament en prophylaxie<sup>279</sup>. Par ailleurs, des effets immunomodulateurs ont été rapportés, notamment une diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires *in vivo* (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-8 et IL-6)<sup>280</sup>. Un essai clinique de phase IV mené en Russie a récemment démontré un bénéfice de l'arbidol sur la réduction de la durée et la gravité des symptômes<sup>281</sup>. Aucune mutation de résistance n'a été officiellement rapportée<sup>282</sup>. Toutefois, des études *in silico* ont permis d'identifier des mutations sur la HA induisant de potentiels phénotypes de résistance<sup>278,283</sup>. Peu d'informations sont disponibles sur l'usage réel de ce médicament. A ce jour, seule une étude clinique de phase III est enregistrée en Chine (NCT03787459), évaluant l'efficacité de l'arbidol en combinaison d'un traitement à l'oseltamivir chez les patients sévères hospitalisés<sup>284</sup>.

#### 7.1.5. Candidats en développement

D'autres antiviraux sont actuellement en développement comme le pimodivir, un inhibiteur de la polymérase virale ciblant PB2 pour lequel deux essais cliniques de phase III viennent de se terminer (NCT03376321, NCT03381196). Les résultats ne sont pas encore disponibles<sup>285</sup>.

Également, les recherches se tournent vers le développement d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les sites de glycosylation de la HA des IAV. Plusieurs candidats (CR8020, CR6261, MEDI8852, TCN-032, VIS410) ont fait l'objet d'essais cliniques de phase II sans toutefois apporter de bénéfice significatif<sup>286-289</sup>.

#### 7.1.6. Les alternatives et nouvelles stratégies antivirales

Finalement, bien que les antiviraux ciblant des déterminants viraux soient très efficaces, leur développement est long et coûteux, et une fois sur le marché, les mêmes problématiques de résistance touchent toutes les classes de médicaments et mettent en péril le succès thérapeutique. Une surveillance accrue de ces mutations et la mise en place de nouvelles thérapies sont donc nécessaires.

C'est dans cette dynamique que s'inscrivent les travaux de notre équipe ainsi que mon travail de thèse. Plusieurs alternatives sont pertinentes pour accélérer le développement de nouvelles molécules antivirales et pallier les phénomènes de résistances, comme :

- (i) Le repositionnement de médicaments, permettant d'accélérer le développement de nouvelles thérapeutiques, à moindre coût. Cette thématique est développée dans le Chapitre 3 ;
- (ii) Cibler la cellule-hôte pour s'affranchir des mutations de résistances et proposer une approche globale pouvant s'affranchir d'une cible thérapeutique ;
- (iii) La combinaison d'antiviraux, permettant de multiplier les cibles thérapeutiques par l'association de médicaments de classes différentes.



Avec ces perspectives, d'autres candidats sont actuellement en développement, avec des propriétés antivirales ciblant la cellule-hôte. C'est le cas du composé DAS181 (Fludase) qui permet un clivage enzymatique des acides sialiques de la cellule épithéliale, empêchant la fixation de multiples virus respiratoires dont les virus influenza ou parainfluenza<sup>290</sup>. Ce composé fait aujourd'hui l'objet d'un essai clinique de phase III évaluant son efficacité chez des patients immunosupprimés, sous ventilation mécanique et présentant une infection des voies aériennes basses induite par un virus parainfluenza ou le SARS-CoV-2 (NCT03808922).

Les combinaisons de médicaments constituent également un axe majeur de recherche. Dès les années 2000, des bithérapies avec des INA ont été envisagées contre la grippe (oseltamivir-zanamivir ou oseltamivir-peramivir) mais n'ont pas permis d'obtenir un bénéfice clinique suffisant contre H1N1pdm ou H7N9<sup>291,292</sup>. De plus, les phénotypes de résistances croisées observés en cliniques ont conforté les médecins et chercheurs à associer des molécules issues de différentes classes, ciblant différentes étapes du cycle cellulaire<sup>243,293</sup>. Le développement des inhibiteurs de polymérase a permis d'évaluer l'effet du favipiravir en combinaison avec des inhibiteurs de neuraminidase. En modèles murins, la combinaison de l'oseltamivir et du favipiravir a permis d'augmenter la fenêtre thérapeutique et d'améliorer la survie des souris immunodéprimées, sans toutefois avoir d'impact sur l'émergence de mutations de résistance<sup>294,295</sup>. Cette association fait actuellement l'objet d'études cliniques, mais les résultats des essais de phase IIb rapportent des difficultés à obtenir les bonnes concentrations plasmatiques<sup>296</sup>. Également, dès la mise sur le marché du baloxavir, son association avec l'oseltamivir a été proposée et validée en modèle murin<sup>297-299</sup>. Un essai clinique conduit entre 2018 et 2020 a rapporté une réduction de la charge virale chez les patients traités<sup>300</sup>.

Par ailleurs, des synergies sont recherchées par l'association de molécules ciblant la cellule-hôte avec des antiviraux classiques, ciblant les déterminants viraux, afin de limiter les échecs thérapeutiques causés par les mutations de résistance. Nous pouvons citer l'exemple de l'itraconazole, un antifongique repositionné, dont la synergie avec l'oseltamivir a été documentée contre influenza sur des cellules Calu-3 et a permis de réduire drastiquement les doses d'antiviraux<sup>301</sup> ; ou du nitazoxanide, un médicament antiparasitaire repositionné contre la grippe, dont la synergie avec les inhibiteurs de neuraminidase a été démontrée *in vitro* et *in vivo*<sup>302</sup>. Le nitazoxanide en association avec l'oseltamivir est efficace et potentialise l'effet de la molécule contre des virus résistants, mais n'a en revanche pas d'impact sur l'émergence des mutations de résistance<sup>303-305</sup>. Finalement, lors des essais cliniques de phase II (NCT02057757), l'association du nitazoxanide n'a pas apporté de bénéfice au standard de soins avec des inhibiteurs de neuraminidase chez les patients sévères hospitalisés<sup>306</sup>. Une étude de phase III (NCT01610245) a été également menée jusqu'en 2015 chez des patients non sévères mais les résultats n'ont pas été publiés<sup>307</sup>.

## 7.2. Les traitements contre le virus SARS-CoV-2

Pour répondre à l'urgence de la pandémie, le développement *de novo* de molécules spécifiques contre le SARS-CoV-2 n'était pas envisageable. Ainsi, la recherche et les essais cliniques se sont essentiellement concentrés vers des repositionnements de médicaments déjà approuvés ou en cours de développement contre d'autres pathogènes<sup>135</sup> (Chapitre 3).

Deux médicaments repositionnés avec une activité antivirale contre le SARS-CoV-2 ont été approuvés par la FDA : le remdesivir (Veklury®, Gilead), un analogue nucléosidique d'adénosine (nucléoside triphosphate ; NTP) développé initialement contre Ebola<sup>308</sup> et le molnupiravir, un analogue nucléosidique de cytidine ( $\beta$ -d-N4-hydroxycytidine ; NHC) déjà décrit comme antiviral *in vitro* et *in vivo*

contre plusieurs virus à ARN<sup>309</sup> ; respectivement en octobre 2020 et décembre 2021. Le remdesivir est approuvé pour le traitement de la COVID-19 nécessitant une hospitalisation. L'EMA a émis une autorisation de mise sur le marché conditionnelle en juillet 2020 pour les patients sévères sous oxygénothérapie, dans l'attente de nouveaux résultats cliniques<sup>310</sup>. Cependant, l'OMS a déconseillé son utilisation en novembre 2020, faute de preuve significative de son efficacité<sup>311</sup>. L'usage du molnupiravir est réservé pour le traitement des cas modérés de COVID-19 chez l'adulte, avec un risque élevé d'évolution vers une forme grave et pour lesquels il n'existe aucune autre alternative de traitement<sup>309</sup>. L'EMA a émis un avis favorable à son utilisation en novembre 2021 mais laisse la main aux autorités de santé nationales quant à sa mise sur le marché<sup>312</sup>.

Fin décembre 2021, la FDA a annoncé la mise sur le marché du premier antiviral développé spécifiquement contre le SARS-CoV-2, le Paxlovid® (Pfizer), une combinaison de nirmatrelvir (PF-07321332), un inhibiteur de la protéase 3C-like, et de ritonavir, un inhibiteur métabolique déjà utilisé dans les multithérapies contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), destiné à protéger le principe actif de la dégradation<sup>313</sup>. Ce médicament par voie orale est indiqué pour le traitement de la COVID-19 légère à modérée chez les adultes et enfants (dès 12 ans) avec un résultat positif de diagnostic direct, et qui présentent un risque élevé de progression vers une forme grave. L'EMA a émis une autorisation conditionnelle le 27 janvier 2022 pour son utilisation chez les patients à risque de progression vers une forme grave, ne nécessitant pas d'oxygénothérapie, validée par la Haute Autorité de Santé (HAS)<sup>314</sup>. Ces autorisations ont été accordées sur la base des résultats intermédiaires de l'essai clinique de phases III (NCT04960202<sup>315</sup>), évaluant l'efficacité du traitement (2 comprimés par jour pendant 5 jours) sur la diminution de la mortalité et du taux d'hospitalisation<sup>313</sup>. Les premiers résultats portent sur 1 039 adultes. L'initiation du traitement dans les trois jours suivant l'apparition des symptômes a été associée à une diminution de 89 % du risque d'évolution vers une hospitalisation (données non publiées). Après les communications de Pfizer, quelques études *in silico* d'interactions moléculaires ont confirmé le potentiel d'ancrage du composé PF-07321332 avec la protéase du SARS-CoV-2<sup>316-318</sup>.

En attendant la mise sur le marché de nouveaux médicaments antiviraux efficaces, d'autres stratégies thérapeutiques sont employées comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques de la Spike du SARS-CoV-2. En 2021, la FDA a approuvé l'utilisation d'urgence du sotrovimab (GSK) et de la bithérapie casirivimab-imdevimab (Ronapreve), déjà approuvés au Japon et en cours d'évaluation par l'EMA<sup>319-321</sup>. S'ils sont utilisés dans les phases précoces d'infection, les AcM permettent de réduire de 85 % le risque d'évolution de la maladie vers une forme sévère<sup>322</sup>.

Par ailleurs, les premiers essais cliniques « *Solidarity* » et « *RECOVERY* » menés en 2020, ont permis de mettre en évidence le bénéfice apporté par les anti-inflammatoires (dexaméthasone) pour diminuer la mortalité dans les cas de COVID-19 sévères<sup>323,324</sup>. Ainsi, l'OMS recommande aujourd'hui l'utilisation des antagonistes du récepteur de l'IL-6 (tocilizumab ou sarilumab) chez les patients atteints d'une forme grave ou critique de la COVID-19<sup>325</sup>.

De très nombreux composés font actuellement l'objet d'essais cliniques. D'après <https://clinicaltrials.gov>, 933 études de phases III et IV sont en cours pour les mots clés [COVID] et [drug], 224 études concernent spécifiquement des molécules antivirales [COVID] et [antiviral drug]. Parmi les candidats, de nombreux antiviraux repositionnés, des AcM ou des inhibiteurs d'ACE2 proposés en mono- ou multithérapies. D'autres essais concernent des traitements des symptômes associés tels que des anti-hypertenseurs, anticoagulants ou immunomodulateurs.

## 8. Les modèles d'études précliniques

Du fait de la gravité, la contagiosité et la prévalence des infections respiratoires dans la population, il est nécessaire d'en comprendre les mécanismes biologiques afin de pouvoir traiter et prévenir ces pathologies. Les virus étant des parasites cellulaires obligatoires, il est indispensable de développer des modèles biologiques adaptés à la caractérisation des infections, des interactions hôte-pathogène mais aussi à l'évaluation et l'accélération vers la clinique de solutions thérapeutiques et/ou prophylactiques candidates.

On distingue trois types de modèles précliniques :

- (i) les cultures cellulaires *in vitro* en monocouche en 2D,
- (ii) les modèles animaux *in vivo*,
- (iii) les modèles de culture tissulaire *in vitro* en 3D.

Historiquement, les cultures de lignées cellulaires ou de cellules primaires en monocouche constituaient les seules options pour maintenir et répliquer les virus *in vitro*. Même si elles sont toujours couramment utilisées, elles ne reproduisent ni l'architecture complexe du tissu ni la physiologie de l'organe, générant ainsi des conditions d'infections et de traitements artificielles.

L'utilisation de modèles d'études *in vivo* permet de pallier les problèmes majeurs rencontrés avec les cultures monocouches *in vitro* en étant plus proche des conditions physiologiques humaines. Concernant les virus influenza, les modèles murins sont fréquemment utilisés, bien que le furet, le cochon ou les primates non humains soient plus proches des conditions physiologiques humaines<sup>326</sup>. Pour l'étude du SARS-CoV-2, les chercheurs utilisent majoritairement les souris modifiées génétiquement, les hamsters et les primates non humains<sup>327</sup>. Cependant, ces études *in vivo* sont très onéreuses et la physiopathologie des infections n'est pas toujours identique à celle de l'Homme. De plus, les évolutions éthiques tendent vers une utilisation limitée de ces modèles.

C'est pourquoi, on observe depuis quelques années l'émergence de systèmes innovants de culture tissulaire en 3D reproduisant plus fidèlement l'architecture complexe de l'épithélium respiratoire. Certains modèles permettent la co-culture de types cellulaires différents et même de simuler la dynamique de la respiration. Ces techniques de culture nécessitent un vrai savoir-faire et sont des modèles de plus en plus prisés pour l'étude des infections virales et le criblage de nouveaux traitements. Ils constituent une étape de validation intermédiaire pertinente entre l'*in vitro* et l'*in vivo*, limitant ainsi l'utilisation de modèles animaux.

### 8.1. Les différents types cellulaires

Les cellules *in vitro* sont à l'origine prélevées chez des volontaires sains ou des patients. Pour les maintenir en vie, leurs conditions environnementales (température, humidité, équilibre gazeux) et nutritives sont reproduites en laboratoire. En fonction de leur type et de leurs utilisations futures, elles peuvent être modifiées, immortalisées ou encore différenciées. Pour l'étude des pathologies respiratoires, trois types de cellules sont couramment utilisés :

- (i) Les cellules primaires

Ces cellules sont prélevées chez les donneurs à partir de lavages broncho-alvéolaires, de biopsies, ou récoltées post-mortem. Non modifiées et non immortalisées, elles sont utilisées en l'état physiologique *in vivo* et subissent le phénomène de sénescence. Elles sont donc peu durables dans le temps et les difficultés d'obtention en font des modèles onéreux, peu utilisés en routine<sup>328,329</sup>.

(ii) Les lignées cellulaires immortalisées

Elles peuvent être issues de cellules cancéreuses prélevées chez un patient ou de cellules primaires immortalisées par l'insertion d'un oncogène. L'immortalisation induit un profil génétique différent de celui des cellules saines, pouvant modifier leurs fonctions natives et les réponses aux *stimuli*. Malgré cela, ces modèles cellulaires sont les plus couramment utilisés du fait de leurs nombreux avantages : faible coût, facilité de prise en main, durée d'utilisation prolongée et résultats reproductibles. Du point de vue éthique, elles évitent les multiples collections de tissus<sup>330</sup>.

(iii) Les cellules souches embryonnaires adultes ou les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

Après le prélèvement, ces cellules sont cultivées avec un cocktail de facteurs de croissance permettant leur différenciation dirigée en un type cellulaire particulier. Ces modèles sont principalement utilisés dans des thématiques de régénérescence<sup>331</sup>.

## 8.2. Les modèles de cultures cellulaires *in vitro*

Les modèles cellulaires d'origine humaine les plus fréquemment utilisés pour l'étude des pathogènes respiratoires sont rassemblés dans le Tableau 8 ci-dessous. Ils peuvent être cultivés sur divers modèles allant de la culture *in vitro* 2D monocouche aux modèles tissulaires de culture en 3D, détaillés dans le paragraphe suivant.

Tableau 8 : Les modèles cellulaires d'origine humaine adaptés à l'étude des pathologies respiratoires. Certaines cellules nasales et bronchiques comme les Calu-3 sont capables de se différencier en tissus polarisés, cultivés à l'interface air-liquide (ALI), plus proche des conditions physiologiques de l'épithélium respiratoire.

Epithélium	Cellules	Caractéristiques
Nasal	NHNE (Normal Human Nasal Epithelial cells) ou hAEC Nasal (Human Airway Epithelial cells)	Cellules primaires de l'épithélium nasal Phénotype et métabolisme proches des cellules <i>in vivo</i> Reproduction d'un épithélium respiratoire nasal en ALI <sup>332</sup>
Bronchique	NhBEC (Normal Human Bronchial Epithelial cells)	Cellules primaires de l'épithélium bronchique Phénotype et métabolisme proche des cellules <i>in vivo</i> Reproduction d'un épithélium respiratoire nasale en ALI <sup>333</sup>
	Calu-3	Lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome des glandes sous-muqueuses de l'épithélium bronchique. Non ciliées et pavimenteuses Polarisation et jonctions serrées en ALI <sup>334,335</sup>
	HBEC3-KT	Cellules primaires saines de l'épithélium bronchique, immortalisées par CDK4 et hTERT <sup>336</sup>
	16HBE	Cellules primaires saines de l'épithélium bronchique, non ciliées, immortalisées SV40 <sup>337</sup>
	BEAS-2B	Cellules primaires saines de l'épithélium bronchique, immortalisées Ad12SV40 <sup>338</sup>
Alvéolaire	A549	Lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome alvéolaire. Pneumocyte de Type II, sécrétion de surfactant et différenciation en pneumocytes de Type I <sup>339</sup>
	HPAEpiC	Cellules primaires alvéolaires, Pneumocytes de type I et II <sup>340</sup>
	NCI-H441	Lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome alvéolaire. Phénotype de Pneumocyte de Type II et cellule de Clara <sup>341,342</sup>

### 8.2.1. La culture monocouche en phase liquide

La culture en monocouche concerne généralement la culture d'un seul type cellulaire. Ce système, qui consiste à cultiver les cellules sur un support en plastique, immergées dans un milieu nutritif, est le plus simple à mettre en œuvre et le moins coûteux. Il concerne tous les types cellulaires et est adaptable à une multitude de tests et analyses. Il est donc largement utilisé pour tout type d'études *in vitro*, constituant un premier niveau de validation préclinique.

Dès les débuts de la caractérisation des virus influenza, les cellules embryonnaires humaines d'origine pulmonaire et rénale ainsi que les cellules primaires de rein de singes se sont montrées permissives à leur réplication<sup>326,343</sup>. Puis, peu de temps après la mise au point de la lignée cellulaire de reins de chien MDCK en 1958, les chercheurs ont découvert que ce modèle constituait un excellent support de réplication des virus influenza<sup>344,345</sup>. Bien que peu pertinentes physiologiquement, ces cellules sont encore très utilisées aujourd'hui pour la production de virus comme alternative à l'œuf, pour la détermination des titres infectieux ou pour l'évaluation préclinique *in vitro* de composés antiviraux<sup>326</sup>. Récemment, les équipes de Furuta et Noshi ont utilisé les cellules MDCK pour réaliser la caractérisation de l'activité antivirale (détermination des CC50 (concentration médiane cytotoxique)/IC50) du favipiravir et du baloxavir, respectivement, contre plusieurs IAV<sup>250,263</sup>. Une lignée dérivée a été générée avec une surexpression du gène bêta-galactoside alpha2,6-sialyltransférase I (ST6-Gall-MDCK) pour améliorer la permissivité des isolats du virus de la grippe humaine, afin d'évaluer leur sensibilité aux INA<sup>346</sup>. Cette lignée est également utilisée pour caractériser le *fitness* des virus résistants, comme illustré par l'étude de Checkmahomed et al., qui compare la réplication et la stabilité génétique de virus H1N1 et H3N2 portant la mutation de résistance I38T sur le segment PA par rapport à une souche sauvage<sup>272</sup>.

En revanche, la caractérisation des interactions hôte-pathogène nécessite d'utiliser des modèles plus pertinents physiologiquement<sup>326</sup>. Ainsi, les cellules A549 et Calu-3 sont privilégiées pour ce type d'études. Par exemple, l'étude de Terrier et al. utilise des cellules A549 pour étudier les interactions entre la protéine NP des virus influenza et la nucléoline de l'hôte permettant aux vRNP de détourner la machinerie d'exportation de la cellule<sup>76</sup>. Également, l'étude de Dissanayake et al. utilise des cellules Calu-3 pour établir les signatures transcriptomiques d'infection des virus influenza et rhinovirus, mettant en évidence une réponse de l'hôte dominée par l'induction des interférons et l'expression des gènes codants pour un panel de cytokines<sup>347</sup>.

Pour la culture *in vitro* du SARS-CoV-2, le choix s'est rapidement orienté vers les cellules VeroE6 (cellules épithéliales rénales de primate africain) exprimant les récepteurs ACE2 en abondance et déjà utilisées comme modèle d'étude pour le SARS-CoV<sup>348</sup>. Ces cellules constituent le support majeur de production du virus<sup>327</sup>. Elles comportent une expression incomplète du système interféron de type I, ce qui augmente les capacités répliquatives du SARS-CoV-2<sup>349-352</sup>. De nombreuses études les utilisent comme support d'évaluation des composés antiviraux à l'image de la publication de Choy et al. qui détermine les CC50/IC50 *in vitro* du remdesivir, du lopinavir, de l'émétine, et de l'homoharringtonine<sup>353</sup>.

Cependant, de la même manière que les MDCK avec les virus influenza, les cellules Vero E6 ne constituent pas un support d'étude relevant pour les interactions hôte-pathogène, d'autant plus que les coronavirus possèdent des capacités d'échappement au système interféron et que les cas sévères de COVID-19 sont souvent associés à un emballement de cette réponse. Ainsi, les études se tournent vers des cellules comme les Calu-3 ou les A549-ACE2, modifiées pour exprimer le récepteur d'entrée du SARS-CoV-2<sup>115</sup>. L'étude de Li et al. utilise ces deux modèles cellulaires pour caractériser et comparer l'induction des gènes des interférons de type I et III induite par des infections avec le SARS-CoV-2 et le

MERS-CoV. Les auteurs concluent que le SARS-CoV-2 n'exerce pas le même mécanisme d'échappement immunitaire que le MERS-CoV (basé sur une inhibition OAS-RNase L et PKR), conduisant à une induction minimum d'interféron, pouvant ainsi causer l'emballement de la réponse inflammatoire chez les personnes qui présentent un défaut d'immunité innée<sup>354</sup>.

Malgré leurs avantages, les cultures en monocouches présentent cependant plusieurs limites. En plus des phénomènes de sénescence, les monocultures de cellules primaires peuvent être sujettes à une dédifférenciation ou une perte du phénotype. Les lignées cellulaires immortalisées subissent moins ces phénomènes mais présentent des profils génétiques et métaboliques parfois très différents des cellules saines, modifiant le profil d'expression des gènes et donc la réponse aux infections et aux traitements. Enfin, elles ne permettent pas de reproduire les éléments essentiels de l'architecture naturelle de l'épithélium à l'interface avec le milieu extérieur, tels que les mouvements ciliaires, la production de mucus et la formation de jonctions serrées<sup>355,356</sup>.

## **8.2.2. Les systèmes complexes tridimensionnels**

Les limites du modèle de culture cellulaire en monocouche motivent le développement de systèmes tridimensionnels innovants qui tendent à se rapprocher au maximum des conditions physiologiques du tissu respiratoire humain. Quelques modèles pertinents pour l'étude des pathogènes respiratoires sont décrits ci-après.

### **8.2.2.1. La culture d'organoïdes en phase liquide**

Un organoïde est une version microscopique d'un organe *in vitro*, généré à partir de cellules souches (embryonnaires, pluripotentes induites ou issues de tissus adultes) capables de se développer puis de se différencier en plusieurs types cellulaires, qui vont alors s'auto-assembler, s'auto-organiser sur une matrice extracellulaire pour former une microanatomie et une architecture très proche de celle retrouvée en physiologie humaine<sup>357</sup>. De manière générale, ces modèles sont très utilisés en biologie du développement, en médecine régénérative et en cancérologie mais quelques exemples sont retrouvés en virologie. Le premier organoïde reproduisant un épithélium respiratoire humain a été décrit en 1993<sup>358</sup>. Depuis, plusieurs organoïdes pulmonaires ont été décrits dans la littérature et générés à partir de cellules souches pluripotentes<sup>359-361</sup>. Ces modèles semblent particulièrement pertinents pour l'étude du tropisme et de la physiopathologie des infections par des virus respiratoires<sup>362,363</sup>.

Par exemple, plusieurs articles utilisent des organoïdes pulmonaires pour étudier l'émergence et la physiopathologie des virus influenza. A partir de cellules souches résidentes, des auteurs ont généré un épithélium composé de cellules épithéliales ciliées, de cellules sécrétrices de mucus, de *club cells* et de cellules basales, mais dépourvu de structures alvéolaires. Ils ont comparé l'infectiosité des souches aviaires (H7N2, H7N9) et de la souche humaine pandémique H1N1 de 2009 dans ces modèles mais soulignent le désavantage de ne pas avoir un pôle apical accessible pour l'infection directe des virus, à la différence de modèles cultivés à l'interface air-liquide<sup>364</sup>. Dans une étude similaire, les auteurs induisent une légère dissociation sur des organoïdes générés à partir de cellules souches pulmonaires pour permettre l'accès des virus aux pôles apical et basal des épithéliums. Ils démontrent ainsi que des cinétiques d'infection avec diverses souches d'IAV obtenues dans les organoïdes sont comparables à celles obtenues sur des cultures *ex-vivo* d'explants bronchiques<sup>365</sup>.

Ce modèle se prête également à l'étude du SARS-CoV-2. Des organoïdes alvéolaires, générés à partir d'un Pneumocyte de Type II et des organoïdes bronchiolaires, à partir de cellules basales KRT5+ provenant de biopsies récoltées chez des patients ont été récemment utilisés pour étudier le tropisme du SARS-CoV-2 sur les cellules de l'appareil respiratoire profond<sup>366</sup>. Une autre étude génère des organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes pour le criblage de molécules approuvées par la FDA<sup>367</sup>.

### 8.2.2.2. La culture en interface air-liquide

Les modèles de culture décrits précédemment ne reproduisent pas fidèlement l'architecture tridimensionnelle et polarisée de l'épithélium respiratoire. Ainsi, des systèmes de culture en interface air-liquide (ALI) ont été développés afin de reproduire cette polarisation *in vitro*.

Certaines lignées cellulaires ont la capacité de former des tissus différenciés si elles sont cultivées en ALI. C'est le cas des Calu-3 par exemple qui peuvent former un tissu différencié et polarisé avec des microvillosités et des vésicules sécrétoires<sup>368-370</sup>. Ce modèle, durable dans le temps, constitue une première étape vers l'obtention de conditions expérimentales plus proches de la physiologie. Cependant, leur niveau de différenciation n'est pas optimal, puisqu'elles sont formées d'un seul type cellulaire immortalisé et non cilié<sup>370,371</sup>. Aujourd'hui, il est possible d'obtenir des épithéliums pleinement différenciés à partir de cellules primaires d'origines nasales, bronchiques ou alvéolaires, ou à partir de cellules souches pluripotentes.

De manière générale, le système de culture en ALI se compose d'un insert comprenant une membrane poreuse en polycarbonate, adapté à un support de culture cellulaire liquide en plaque (Figure 21). Les cellules primaires sont d'abord mises en culture en interface liquide-liquide pendant la phase de prolifération, puis placées à l'interface air-liquide pour induire la différenciation.

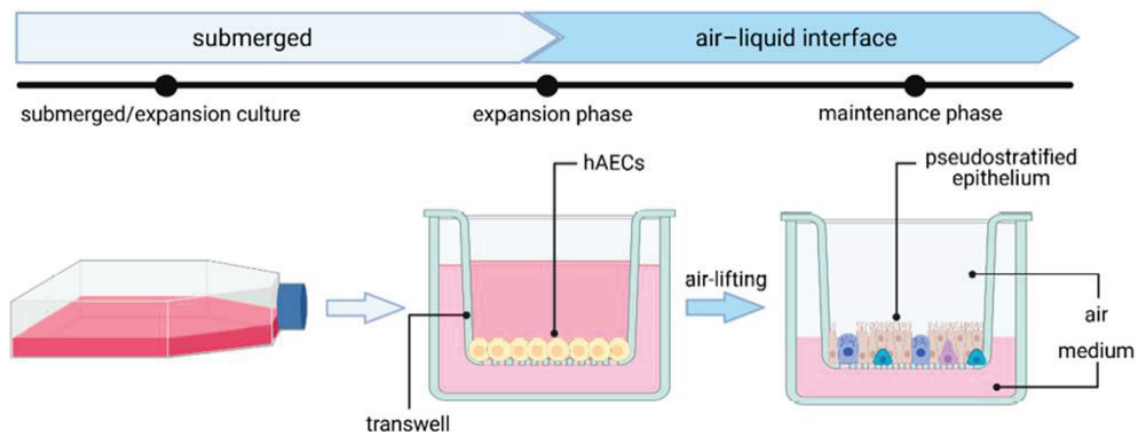


Figure 21 : Procédé de génération d'un tissu épithélial différencié à l'interface air-liquide à partir de cellules primaires humaines, Heinen et al. (2021)<sup>372</sup>. Les cellules primaires d'origines nasales, bronchiques ou alvéolaires sont d'abord mises en culture sur la membrane poreuse de l'insert en interface liquide-liquide pendant 3 à 7 jours, jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent (phase de prolifération). Le milieu de culture est ensuite retiré de l'insert pour placer le tissu à l'interface air-liquide, la membrane maintenant physiquement les cellules séparées du milieu de culture. Le contact avec l'air va induire la différenciation des cellules primaires pour reproduire, en quelques semaines (environ 6) l'architecture d'un épithélium nasal, bronchique ou alvéolaire *in vitro*. Les cellules basales, à l'interface liquide, accèdent aux nutriments par diffusion à travers les pores de la membrane.

Après la phase de prolifération des cellules, la différenciation induit des évolutions structurales au cours du temps, traduisant l'abondance et la distribution des différents types cellulaires (Figure 22). Dès la formation du tapis cellulaire, l'apparition de jonctions serrées constitue l'intégrité du tissu, mesurable grâce à la résistance transépithéliale (*Transepithelial/transendothelial electrical resistance* ; TEER)<sup>373</sup> (Figure 23). La mesure se stabilise au cours du temps avec la polarisation des cellules et les sécrétions. Les cellules deviennent progressivement plus petites et polarisées et s'organisent en colonnes, induisant l'augmentation de l'épaisseur du tissu.

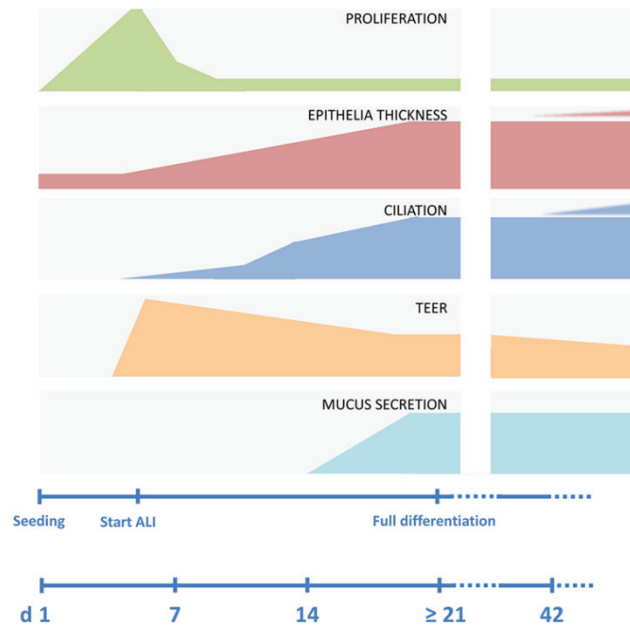


Figure 22 : Suivi des paramètres indicateurs de la différenciation des épithéliums à l'interface air-liquide au cours du temps, Chen et al. (2019)<sup>374</sup>

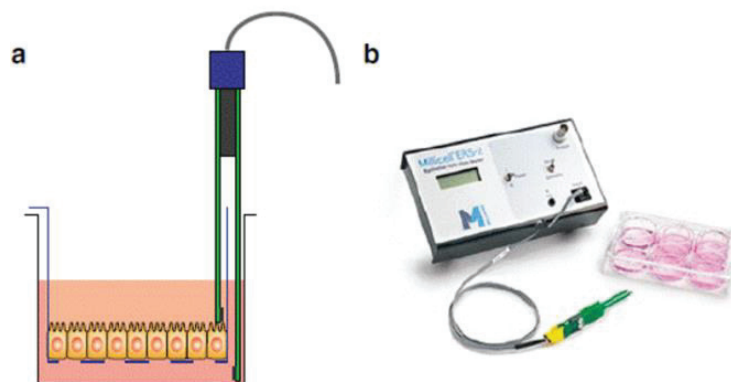


Figure 23 : Mesure de la résistance transépithéliale (TEER), source : ebrary.net<sup>375</sup>. (a) Schéma de réalisation de la mesure de TEER. Du liquide isotonique au milieu de culture en basolatéral est placé au pôle apical de l'épithélium. La sonde de mesure est composée de deux électrodes d'argent adaptées pour chaque compartiment, l'une plonge dans le compartiment basolatéral, tandis que l'autre s'arrête au pôle apical de l'épithélium sans le toucher. Les électrodes sont séparées par la monocouche cellulaire. L'appareil relié à la sonde permet d'effectuer une mesure de la résistance électrique entre les 2 compartiments ( $\Omega$ ), traduisant l'intégrité du tissu. La mesure brute inclut la résistance résiduelle de la membrane. Ainsi la résistance du tissu rapportée à sa surface est calculée via la formule :  $TEER (\Omega.cm^2) = (résistance\ brute (\Omega) - résistance\ membrane) \times surface (cm^2)$ . (b) Exemple d'appareil commercialisé EVOM2® et la sonde STX2®, commercialisés par World Precision Instruments, que nous utilisons au laboratoire.



Dès la 3<sup>ème</sup> semaine, la différenciation des cellules est visible par l'apparition des cils, dont les mouvements sont visibles au microscope, et de mucus observable à l'œil nu. Selon l'origine des cellules primaires, l'architecture de l'épithélium ainsi que les types cellulaires retrouvés seront différents. Des cellules d'origine nasale ou trachéale donneront un épithélium pseudostratifié cylindrique ; des cellules bronchiques, un épithélium simple cylindrique ; et des cellules alvéolaires, un épithélium cubique simple, très fin et pavimenteux. Des marquages en immunohistochimie permettent de différencier les différents types cellulaires (FOXJ1 : ciliogenèse, MUC5AC : cellules à mucus, P63 : cellules basales, CC10 : cellules de Clara, ZO-1 : jonctions serrées, Ki-67 : marqueur de différenciation) (Figure 24)<sup>374,376,377</sup>.

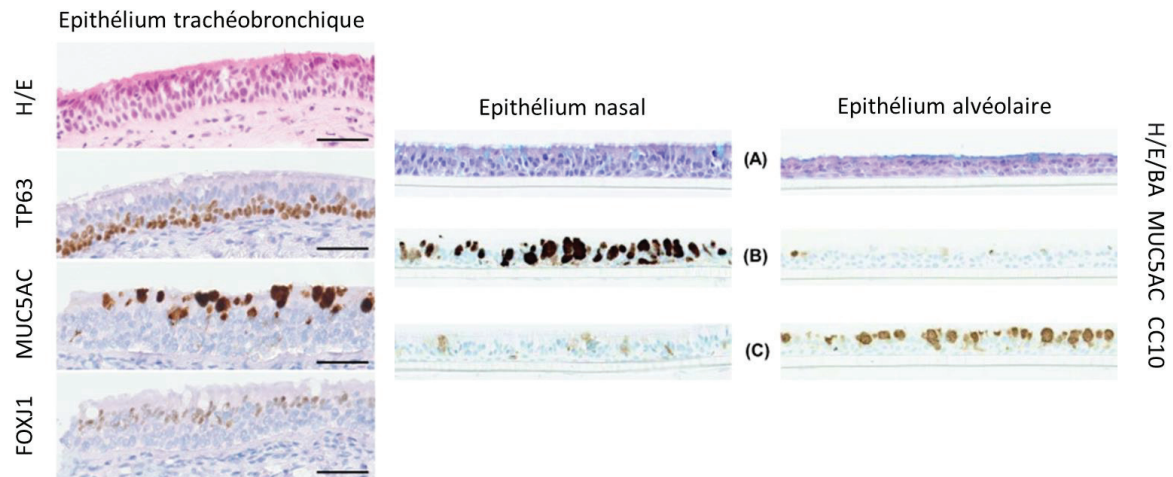


Figure 24 : Marquages immunohistochimiques de l'expression des marqueurs tissulaires, traduisant la différenciation des épithéliums. L'hématoxyline, l'éosine et le bleu alcian permettent de colorer les noyaux et cytoplasmes. TP63 marque les cellules basales, MUC5AC les cellules à mucus, FoxJ1 les cellules ciliées et CC10 les cellules de Clara. Le panel de gauche est issu de l'étude de Maughan et al. et représente les protéines tissulaires d'un épithélium respiratoire adulte différencié à partir de cellules primaires issues de biopsies trachéobronchiques<sup>378</sup>. Les panels du milieu et de droite sont issus de l'étude de Huang et al., qui compare la composition cellulaire des épithéliums MucilAir® du tractus respiratoire supérieur et des épithéliums alvéolaires SmallAir® générés à partir de cellules primaires<sup>376</sup>. Les couches supérieures des épithéliums nasaux et trachéobronchiques sont composées des cellules ciliées et des cellules à mucus. Les cellules basales se situent entre ces cellules et l'endothélium. Contrairement au tractus respiratoire supérieur, l'épithélium alvéolaire est peu cilié et peu abondant en cellules à mucus. On constate en revanche une forte présence des cellules de Clara, occupant un rôle majeur de régénération et de sécrétion.

Les premiers modèles de culture d'épithélium respiratoire en ALI ont été développés en 1988<sup>379</sup>, mais on observe depuis une dizaine d'années une démocratisation de leur utilisation liée à la commercialisation de modèles prêts à l'emploi tels que MucilAir® et SmallAir® (Epihelix)<sup>380</sup> ou EpiAirway® (MatTek)<sup>381</sup> et la publication de protocoles de différenciation et de génération des tissus. Par exemple, l'étude de Rayner et al. génère des épithéliums pseudostratifiés pleinement différenciés à partir de cellules primaires bronchiques en 4 semaines, à l'aide de milieux de culture commerciaux adaptés<sup>377</sup>. L'utilisation de cellules souches pluripotentes, pertinente pour des études de médecine régénératives, permet d'obtenir des tissus exprimant jusqu'à 6 types cellulaires différents, comme illustré dans l'étude de Huang et al., et en particulier l'obtention de Pneumocytes alvéolaires<sup>382</sup>.

L'architecture très proche des conditions physiologiques, les mouvements ciliaires, la sécrétion de mucus, les capacités de régénération des épithéliums et la possibilité de générer des épithéliums à partir de cellules de patients (sains ou malades) en font un modèle de choix pour étudier la physiopathologie des maladies respiratoires. Ainsi, malgré leur coût élevé, ils sont très utilisés dans les

études de toxicologie, des maladies chroniques (BPCO, mucoviscidose) mais aussi pour l'étude de la physiopathologie des infections virales et le criblage de molécules antivirales<sup>383-385</sup>.

Dans l'étude de Pharo et al., les auteurs ont mis au point un modèle de culture en ALI à partir de cellules primaires épithéliales bronchiques (NHBE) pour étudier la physiopathologie des virus influenza<sup>386</sup>. L'épithélium bronchique pseudostratifié et polarisé obtenu est caractérisé par la sécrétion de mucus et la présence de cellules ciliées, de cellules basales, de *goblet cells* et *club cells*. Une cinétique d'infection et des marquages en immunofluorescence ont confirmé qu'à 30h post-infection la majorité des cellules étaient infectées par le virus influenza H1N1pdm09. La physiopathologie induite a été caractérisée par (i) une atteinte des jonctions serrées mise en évidence par une chute du TEER et des marquages d'immunofluorescence, (ii) un relargage de LDH dans le milieu basal traduisant la mort cellulaire, et (iii) une diminution de l'expression du gène MUC5B impliqué dans la sécrétion de mucine. Par ailleurs, l'étude caractérise l'activation de la défense immunitaire en mettant en évidence la surexpression de plusieurs gènes codant pour des cytokines inflammatoires comme CXCL10 ou IFNB1 ainsi que la sécrétion de ces cytokines.

Une autre étude reproduit des épithéliums respiratoires à partir de cellules primaires trachéales de furet, comportant des acides sialiques de type  $\alpha 2,6$  similaires à ceux du tractus respiratoire humain afin d'étudier le tropisme de différents virus influenza d'origine humaine ou aviaire<sup>387</sup>. Les auteurs concluent que les influenza humains (H1 ou H3) se répliquent préférentiellement dans les cellules ciliées, tandis que les virus aviaires hautement pathogènes (H5N1) se répliquent efficacement dans les cellules non-ciliées.

Par ailleurs, la société Epithelix met en évidence la relevance de son modèle MucilAir® généré à partir de cellules primaires nasales issues d'un pool de 14 donneurs différents pour évaluer l'efficacité antivirale de composés dans son étude de 2018<sup>388</sup>. Le rupintrivir, efficace contre les rhinovirus est utilisé comme traitement contre plusieurs rhinovirus et des IAV (H1N1 et H3N2). La validation du modèle est réalisée par l'étude de plusieurs paramètres modulés par l'infection comme la production de virus au pôle apical, la clairance muco-ciliaire, l'intégrité des tissus (TEER) ainsi que la production de peptides antiviraux comme les défensines et les cathelicidines.

En 2008, des articles décrivaient déjà le tropisme et la pathogénicité du SARS-CoV sur ce type de modèles. L'étude de Sims et al. caractérise et compare des infections sur des Calu-3 différenciées en ALI et sur des épithéliums générés à partir de cellules primaires<sup>389</sup>. Les auteurs mettent en évidence les capacités répliquatives du virus dans les cellules ciliées et le tropisme majeur du virus pour le récepteur ACE2, exprimé par les deux modèles.

Ainsi, dès l'identification d'un nouveau coronavirus en 2019 en Chine, l'isolement du SARS-CoV-2 a été réalisé en plaçant directement les prélèvements de patients (lavages bronchoalvéolaires) en contact avec des cellules épithéliales pulmonaires en ALI<sup>19,390</sup>. 96 heures post infection, des effets cytopathiques ont été observés ainsi qu'un arrêt des battements ciliaires, traduisant une infection effective, alors qu'aucun signe d'infection n'avait été observé sur les lignées cellulaires VeroE6 et Huh-7. Ce premier article publié sur le SARS-CoV-2 souligne la relevance physiologique majeure de ce modèle en comparaison de lignées cellulaires, plus difficilement permissives aux isolats de virus humains.

*A posteriori*, de nombreuses études ont utilisé ce modèle pour décrire la physiopathologie du SARS-CoV-2. Nous pouvons citer l'étude de Robinot et al. qui a caractérisé l'infection sur des épithéliums différenciés en ALI à partir de cellules primaires bronchiques<sup>391</sup>. L'article souligne le tropisme majoritaire du virus pour les cellules ciliées, entraînant des dommages sur la motilité des cils et leur régénération.

De même que pour influenza, les épithéliums sont utilisés pour la validation préclinique de l'efficacité des molécules antivirales. Récemment, le molnupiravir (NHC) a été évalué sur des cellules épithéliales pulmonaires en ALI contre 5 coronavirus (SARS-CoV-2, MERS-CoV et des Coronavirus zoonotiques à potentiel émergent : Bat-CoV SHC014, HKU3 et HKU5)<sup>392</sup>. Une diminution dose-dépendante de la production virale a été décrite contre toutes les souches, soulignant le potentiel antiviral à large spectre de la molécule. Ces résultats ont été confirmés en modèle murin.

Ce modèle d'épithélium en ALI s'inscrit pleinement dans nos travaux de recherche au laboratoire. Depuis 2016, l'utilisation des supports MucilAir® et SmallAir® est déterminante dans l'ensemble de nos projets pour caractériser les interactions hôte-pathogène, produire des virus respiratoires, évaluer des candidats-médicaments ou déterminer leur(s) mode(s) d'action. Cependant, ce modèle comporte quelques limites : le temps de génération est long et nécessite un réel savoir-faire, tandis que les systèmes prêts à l'emploi sont onéreux et le maintien des tissus est limité dans le temps. De plus, les épithéliums ne reproduisent pas complètement l'environnement physiologique du système respiratoire car ils omettent certains types cellulaires. C'est pourquoi, des modèles de co-culture sont aujourd'hui développés, avec des cellules endothéliales, des fibroblastes ainsi que des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques), qui jouent des rôles clés dans l'immunité innée et adaptative<sup>393-395</sup>.

### 8.2.2.3. Les systèmes « *lung-on-chip* »

Bien que les systèmes ALI permettent une architecture fidèle de l'épithélium respiratoire, ils ne reproduisent pas la structure de l'organe dans son entièreté, ni les contraintes mécaniques ou les interactions avec d'autres organes. De nouveaux systèmes alliant biologie et *engineering* ont été développés ces dernières années, avec l'objectif de reproduire l'architecture complexe d'un ou plusieurs organe(s) sur une carte micro-fluidique : « *organ-on-a-chip* ». Ce système utilise comme base un appareil micro-fluidique constitué de chambres perfusées contenant une membrane flexible et poreuse sur laquelle les cellules peuvent être greffées<sup>396</sup>. Les chambres communiquent entre elles par des monocanaux, afin de placer les différents tissus ou organes dans un environnement dynamique. Le dispositif permet de simuler les interactions cellules-cellules, tissu-tissu, les mouvements fluidiques ou mécaniques que peut subir un organe dans un contexte physiologique.

Pour le tractus respiratoire, les systèmes « *lung-on-chip* » constituent une bio-interface entre des cellules épithéliales avec le système vasculaire, sur laquelle sont reproduits les mouvements de la respiration (Figure 25)<sup>372,396</sup>.

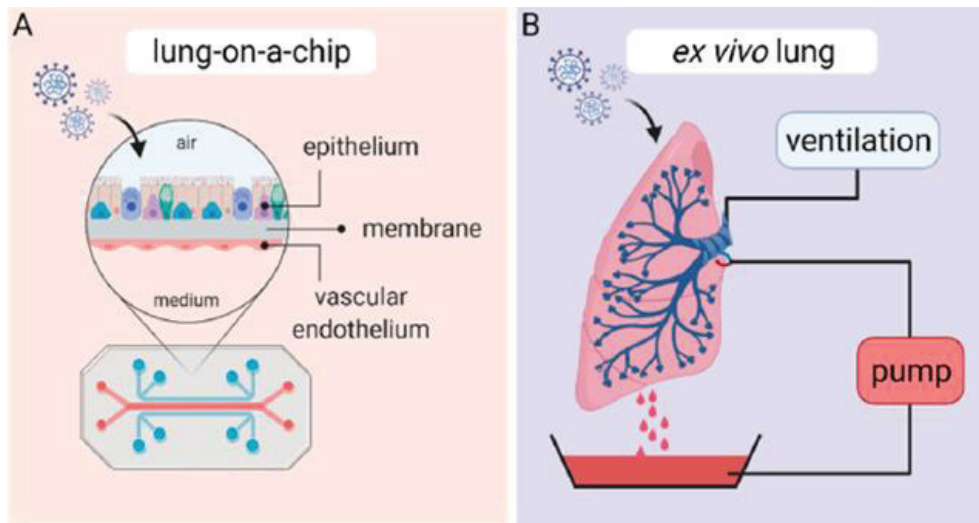


Figure 25 : Le système « *lung-on-chip* » (A) reproduit les interactions mécaniques *in vivo* (B) entre les poumons et le système vasculaire, sur un support *in vitro* en micro-fluidique, Heinen et al. (2021)<sup>372</sup>. La couche de cellules endothéliales est située dans un canal vasculaire tandis que la couche épithéliale alvéolaire est cultivée dans un deuxième canal en ALI. Les deux canaux sont séparés par une membrane poreuse en polydiméthylsiloxane, recouverte d'une matrice extracellulaire capable de se déformer, sur laquelle des forces mécaniques sont appliquées afin de reproduire les mouvements de la respiration<sup>396</sup>.

Plusieurs dispositifs commerciaux sont disponibles sur le marché comme Lung-on-Chip® (Alveolix)<sup>397</sup>, un système micro-fluidique alvéolaire mimant la respiration et adaptable en version 96 puits, ou les systèmes Lung-chip® et Airway lung-chip® (Emulate)<sup>398</sup>, particulièrement adaptés au criblage de candidats-médicaments. Ce marché en développement présente un grand potentiel d'évolution et devrait fournir à la recherche les outils du futur, à l'image du « *human-on-a-chip* » développé par TissUse, permettant de simuler les interactions entre tous les groupements d'organes du corps humain (Figure 26)<sup>399</sup>.



Figure 26 : Schéma commercial du « *human-on-a-chip* » développé par TissUse. Le système permet de mettre en relation à façon différents compartiments cellulaires du corps humain, comme la peau, les reins, le cœur, le cerveau, les cellules lymphatiques, les intestins, le pancréas, ...

Dans le contexte des infections respiratoires, l'utilisation de ces systèmes dynamiques est notamment pertinente pour l'étude des interactions hôte-pathogène et du recrutement des cellules immunitaires, mais aussi pour évaluer des traitements antiviraux.

Par exemple, l'étude de Si et al. utilise un système micro-fluidique « *lung-chip* » composé d'un épithélium pseudostratifié et d'un endothélium pulmonaire, obtenus à partir de cellules primaires humaines pulmonaires et endothéliales pour caractériser des infections avec influenza<sup>400</sup>. Les auteurs décrivent la physiopathologie induite avec des dommages à la barrière épithéliale et endothéliale ainsi qu'une perte des cellules ciliées au pôle apical. En co-culture avec des cellules immunitaires, ils démontrent que les virus de type H3N2 ou H5N1 provoquent un syndrome pro-inflammatoire plus important que H1N1, contribuant à la physiopathologie de l'infection. Par ailleurs, ils utilisent plusieurs systèmes *lung-chip* pour mimer la transmission interhumaine et étudier l'émergence de mutations de résistance. Au bout de plusieurs passages en présence d'amantadine ou d'oseltamivir, ils constatent une diminution de l'activité antivirale liée à l'émergence de mutations.

Cette même équipe a récemment utilisé un système *lung-chip* commercialisé par Emulate pour le criblage de médicaments à repositionner (chloroquine, arbidol, toremifene, clomiphene, amodiaquine, verapamil et amiodarone) contre le SARS-CoV-2, à l'aide d'un pseudovirus rapporteur<sup>401</sup>. Le système de perfusion a permis de mimer l'administration par voie orale des candidats, dont l'efficacité avait été démontrée sur les lignées Vero et Huh-7 dans une étude préliminaire. Les résultats ont mis en évidence l'efficacité de l'amodiaquine et du tomeriphene, confirmée par la suite *in vivo* en modèles de hamster. Les auteurs soulignent ainsi l'utilité prédictive de ces modèles *lung-chip* plus physiologiques, pour le criblage de nouveaux médicaments.

Par ailleurs, l'équipe de Zhang a reproduit un système « alvéole-chip » à partir de cellules alvéolaires immortalisées (HPAEpiC) et des cellules microvasculaires pulmonaires (HULEC-5a), dans lequel des cellules immunitaires PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) peuvent circuler, afin d'étudier leur recrutement dans un contexte d'infection par le SARS-CoV-2<sup>402</sup>. Les auteurs ont décrit une forte infection des cellules épithéliales mais pas des cellules endothéliales. Pourtant, l'activation de la voie des interférons de type I a été mise en évidence dans l'épithélium consécutive à l'activation de JAK/STAT (Janus Kinase/ Signal transducers and activators of transcription) dans l'endothélium, traduisant la communication entre les deux compartiments. En présence des PBMC, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-6 a été mesurée dans les fluides circulants, ainsi que l'attachement de monocytes dans le compartiment endothélial.

Ainsi, ces systèmes permettent de franchir une étape supérieure dans la relevance des modèles d'études précliniques en décuplant les possibilités d'interactions *in vitro* entre les différents compartiments du corps humain. A l'heure actuelle, ces dispositifs restent cependant très onéreux et nécessitent un vrai savoir-faire pour leur prise en main et leur maintien dans le temps. De plus, ils ne sont pas encore adaptés à la démultiplication des conditions expérimentales. Ce marché promet donc de belles perspectives d'innovation vers des modèles plus simples d'utilisation et la combinaison avec d'autres technologies comme l'impression 3D, permettant de créer des supports plus reproductibles<sup>403</sup>.

## Chapitre 2. Les interférons de type III

Lors de l'infection par un virus respiratoire, les senseurs cellulaires déclenchent l'activation d'un système d'alarme conduisant à la mise en place de l'immunité de la cellule-hôte. Les interférons (IFN) sont les premiers effecteurs de l'immunité innée antivirale conduisant à la production des *interferon-stimulated genes* (ISG) visant à contenir l'infection<sup>404</sup>. Les interférons de type I entraînent notamment la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Si l'inflammation n'est pas modulée, une hyperstimulation peut entraîner une aggravation de la physiopathologie induite. Par exemple, l'infection par le virus influenza pandémique de 1918 a entraîné une réponse inflammatoire beaucoup plus importante que les virus influenza saisonniers<sup>405</sup>. Non régulée, l'inflammation induite a été impliquée dans une pathogénicité accrue, résultant en une dégradation rapide du tableau clinique des cas sévères et une mortalité importante. Tel que décrit précédemment, un phénomène similaire est observé dans les pneumonies sévères de COVID-19 avec la formation d'œdèmes pulmonaires inflammatoires<sup>136</sup>.

Dans les muqueuses respiratoires, un autre type d'interférons décrits plus récemment occupent un rôle majeur : les interférons de type III. Ils présentent la particularité d'établir une défense locale contre l'infection, sans activer les effecteurs de l'inflammation. Une étude récente comparant la physiopathologie induite par le SARS-CoV-2 chez les adultes et les enfants a d'ailleurs mis en évidence une activation préférentielle des interférons de type III dans la population pédiatrique, corrélée à des formes moins sévères, voire asymptomatiques de COVID-19 ; à la différence des adultes, chez qui il est constaté une modulation des interférons de type I et l'induction de cytokines pro-inflammatoires<sup>406</sup>.

Ainsi, la compréhension des interactions hôte-pathogène conduisant à l'expression des interférons de type III constitue un axe majeur de recherche au sein de notre laboratoire.

### 1. Généralités

Les interférons sont de petites glycoprotéines appartenant à la famille des cytokines, naturellement produites lors de la réponse immunitaire innée. L'activation des voies des IFN conduit à la sécrétion de produits codés par les ISG qui possèdent des activités antimicrobiennes et constituent la première ligne de défense de la réponse innée en cas d'infection par un pathogène, en particulier d'origine virale. On distingue trois familles d'IFN, regroupés en fonction de leur affinité pour leurs récepteurs et des similarités de séquences de leurs AA (types I, II et III). Si les IFN de type I sont connus et étudiés depuis de nombreuses années, les IFN de type III ne sont décrits que depuis une vingtaine d'années.

#### 1.1. Les différents types d'interférons

##### 1.1.1. Interférons de type I

Les IFN de type I sont les premiers à avoir été découverts en 1957 par Isaacs and Lindenmann<sup>407</sup>. Il s'agit de la plus large famille chez l'Homme et la souris, regroupant 13 types d'IFN- $\alpha$ , les IFN- $\beta$  mais aussi les IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$  (humain) et IFN- $\zeta$  (souris). L'ensemble des gènes codants sont situés sur le chromosome 9. Les récepteurs des IFN de type I (IFNAR1 et IFNAR2) sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées. Ils sont donc ubiquitaires même si les différents isotypes

présentent des différences d'affinité. Ils possèdent un large panel d'activités antimicrobiennes (antivirales, antibactériennes et antifongiques) systémiques mais également des propriétés immunomodulatrices et antiprolifératives.

### 1.1.2. Interférons de type II

Les IFN de type II sont uniquement des IFN- $\gamma$  produits par des lymphocytes NKT (*natural killer*) ou les cellules lymphoïdes. Ils jouent un rôle dans l'immunité innée et/ou adaptative mais aussi dans l'auto-immunité et l'inflammation. Les gènes codants sont situés sur le chromosome 12 et leur récepteur est un hétérodimère constitué de IFNGR1, ligand majoritaire, et IFNGR2 retrouvés à bas niveau dans tous les types cellulaires à l'exception des érythrocytes<sup>408</sup>.

### 1.1.3. Interférons de type III

Les IFN de type III sont les derniers à avoir été décrits en 2003 par deux groupes de recherche indépendants : Kotenko et al<sup>409</sup> et Sheppard et al<sup>410</sup>. Ils identifient une famille de 3 cytokines appelées interleukine 28A (IL-28A), IL-28B et IL-29 présentant des homologies avec des IFN de type I. Les premières caractérisations de ces protéines recombinantes ont permis de démontrer une action préférentiellement antivirale. La 4<sup>ème</sup> cytokine IFN- $\lambda$ 4 n'est décrite que 10 ans plus tard lors d'une étude génétique chez des patients atteints d'hépatites chroniques. Son activité reste encore à préciser. Les interférons de type III sont les premiers effecteurs de l'immunité innée antivirale à la surface des muqueuses, intestinales comme respiratoires. Ils exercent donc un rôle critique dans le contrôle des infections virales dans le tractus respiratoire supérieur.

## 1.2. Les gènes des interférons lambda

### 1.2.1. IFNL1, IFNL2, IFNL3, IFNL4

Kotenko<sup>409</sup> et Sheppard<sup>410</sup> décrivent pour la première fois les interférons de type III en 2003, au cours d'analyses génomiques visant à identifier de nouvelles cytokines de classe II. Ils identifient 3 interleukines présentant des homologies avec des IFN de type I et l'IL-10. Bien que fonctionnellement proches des IFN de type I, ces cytokines sont structurellement plus proches de la famille de l'IL-10, notamment par leur affinité avec le récepteur IL-10R2. Elles possèdent 15 à 19 % d'homologie des acides aminés avec l'IFN- $\alpha$  et 11 à 13 % avec IL-22<sup>411,412</sup>.

Les 3 gènes codants, IFNL1 pour l'IL-29, IFNL2 pour l'IL-28A et IFNL3 pour IL-28B, se situent sur la même région 19q13.13 du chromosome 19 (Figure 27). Les 3 protéines IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3 sont hautement similaires. En effet, IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3 présentent des séquences d'AA similaires à 96 % et leur similitude avec IFN- $\lambda$ 1 est d'environ 81 %.

En 2009, des résultats d'études du *genome wide association studies* (GWAS) ont indiqué que des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) identifiés en amont d'IFNL3 étaient fortement associés à la réponse au traitement par l'interféron- $\alpha$  et la ribavirine ainsi qu'à la clairance naturelle du virus de l'hépatite C (HCV), chez des patients issus de diverses ethnies<sup>413,414</sup>. Le 4<sup>ème</sup> gène IFNL4 n'est identifié qu'en 2013 lors d'une étude génétique visant à l'analyse des SNP chez des patients atteints d'hépatites chroniques<sup>415</sup>. L'IFN- $\lambda$ 4 est d'abord considérée comme une variante de l'IFN- $\lambda$ 3, pourtant les deux protéines ne comportent que 30 % d'AA similaires.

### 1.2.2. Polymorphismes de l'IFNL4

Dans le génome, IFNL4 est situé en amont d'IFNL3. Son polymorphisme inhabituel modifie considérablement la capacité des individus à produire de l'IFN $\lambda$ 4<sup>416</sup>.

Le variant IFNL4- $\Delta$ G/TT (rs368234815) dans l'exon 1 de IFNL4 est parmi les plus décrits (Figure 27). Il s'agit d'un polymorphisme dinucléotidique composé des SNP rs11322783 ( $\Delta$ /T) et rs74597329 (G/T), en déséquilibre de liaison. En effet, l'allèle ancestral IFNL4- $\Delta$ G crée un cadre de lecture ouvert qui permet à la protéine IFN- $\lambda$ 4 entière d'être fabriquée, tandis que l'allèle alternatif IFNL4-TT entraîne un décalage du cadre de lecture à la position d'AA 22 qui termine prématurément la protéine<sup>415</sup>. Bien que le gène IFNL4 soit présent chez tous les primates, l'Homme est la seule espèce chez laquelle cet allèle a été trouvé. Au cours de l'évolution, le gène a subi une très forte sélection pour IFNL4-TT, conduisant la production d'IFN- $\lambda$ 4 inactive. Ainsi, on estime que 95 % de la population africaine, 50 % des européens et moins de 15 % des asiatiques possèdent au moins une copie de l'allèle  $\Delta$ G. L'allèle défaillant est présent à 93 % dans les populations asiatiques, 68 % des européens et à seulement 23 % dans la population africaine<sup>415</sup>. Le déséquilibre de liaison entre IFNL4- $\Delta$ G/TT et IFNL4 est donc complet dans les populations asiatiques et fort parmi ceux d'ascendance européenne, mais plus faible dans les populations africaines.

Un autre polymorphisme, identifié sur l'exon 2 rs117648444 à la position d'acide aminé 70 (P70S) exerce un impact sévère sur l'expression de la protéine.

Biologiquement, plusieurs études ont largement démontré que le génotype du variant IFNL4- $\Delta$ G/TT, ainsi que des SNP en déséquilibre de liaison avec ce polymorphisme produisent des niveaux inférieurs d'expression des ISG et une efficacité antivirale moindre<sup>417,418</sup>. Mais de manière contre-intuitive, une clairance naturelle du virus HCV plus rapide ainsi qu'une meilleure réponse aux traitements antiviraux de l'hépatite C chronique à base d'IFN- $\alpha$  sont observées chez les patients exprimant une IFN- $\lambda$ 4 moins active.

Ainsi, bien qu'IFNL4 n'ait pas encore livré tous ses secrets, l'étude de ces polymorphismes constitue une piste sérieuse d'amélioration des traitements de l'hépatite C chronique.

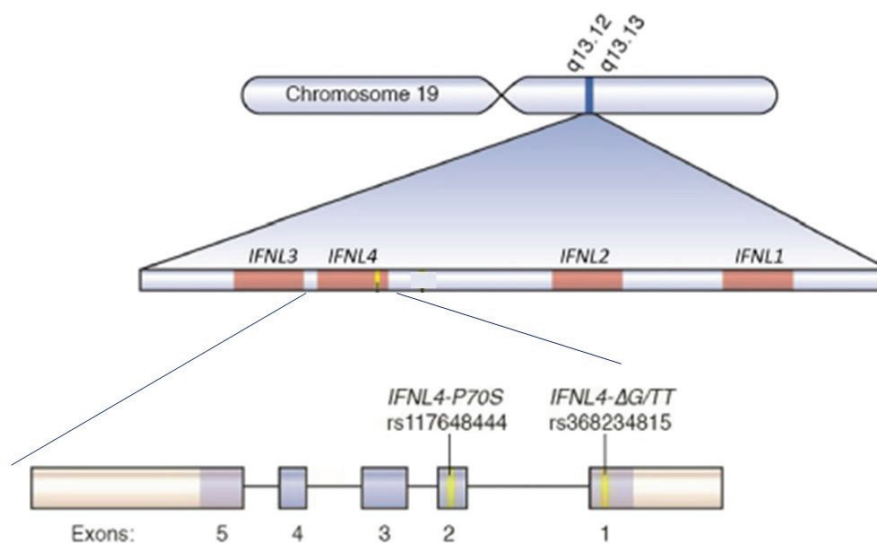


Figure 27 : Schéma des gènes des interférons lambda et emplacements des polymorphismes des variants fonctionnels d'IFNL4 : IFNL4- $\Delta$ G/TT (rs368234815) dans l'exon 1et IFNL4-P70S (rs117648444) dans l'exon 2, d'après Fang et al. (2020)<sup>416</sup>



### 1.3. Récepteurs

Les récepteurs des IFN de type III sont composés d'un hétérodimère constitué de 2 sous-unités : la sous-unité  $\alpha$  (IL28RA ou IFNLR1) et la sous-unité  $\beta$  (IL10RB) ; cette dernière est partagée avec les cytokines de la famille de l'IL10 tels que IL-22 et IL-26<sup>411,419,420</sup>. Alors que l'IL10RB semble être exprimée de manière ubiquitaire, l'expression d'IFNLR1 est restreinte à certains types cellulaires. Le récepteur est majoritairement exprimé dans les cellules épithéliales respiratoires, intestinales, vaginales et hépatocytaires et quelques cellules immunitaires dont les macrophages, les cellules dendritiques et les leucocytes. L'IFN- $\lambda$ 1 montre une plus grande affinité pour IFNLR1.

Les cellules épithéliales respiratoires, qui ont la particularité d'être polarisées, présentent un haut niveau d'expression de ces récepteurs<sup>419,421,422</sup>. Les récepteurs type I IFNAR ( $\alpha/\beta$ ) sont situés au pôle basolatéral tandis que les IFNLR ( $\lambda$ ) sont présents à la fois au pôle apical et au pôle basolatéral. Ainsi, les IFNLR1 sont les seuls récepteurs à l'interféron au pôle apical. De ce fait, les interférons de type III ne sont pas en mesure d'apporter une protection contre des infections virales systémiques, mais apportent une protection au niveau des muqueuses. Il est de plus en plus évident que les IFN de type III constituent la réponse IFN dominante dans l'épithélium respiratoire.

## 2. Du stimulus à la sécrétion des ISG : schéma général

L'expression basale des gènes des interférons est maintenue faible en l'absence de stimulus<sup>423</sup>. Lorsqu'un signal d'alerte est détecté, une cascade de signalisation est déclenchée visant à la production d'effecteurs antiviraux : les ISG (Figure 28). Ce processus se déroule en deux étapes, du signal à la production des interférons, puis de la fixation des interférons sur les récepteurs à la sécrétion des ISG.

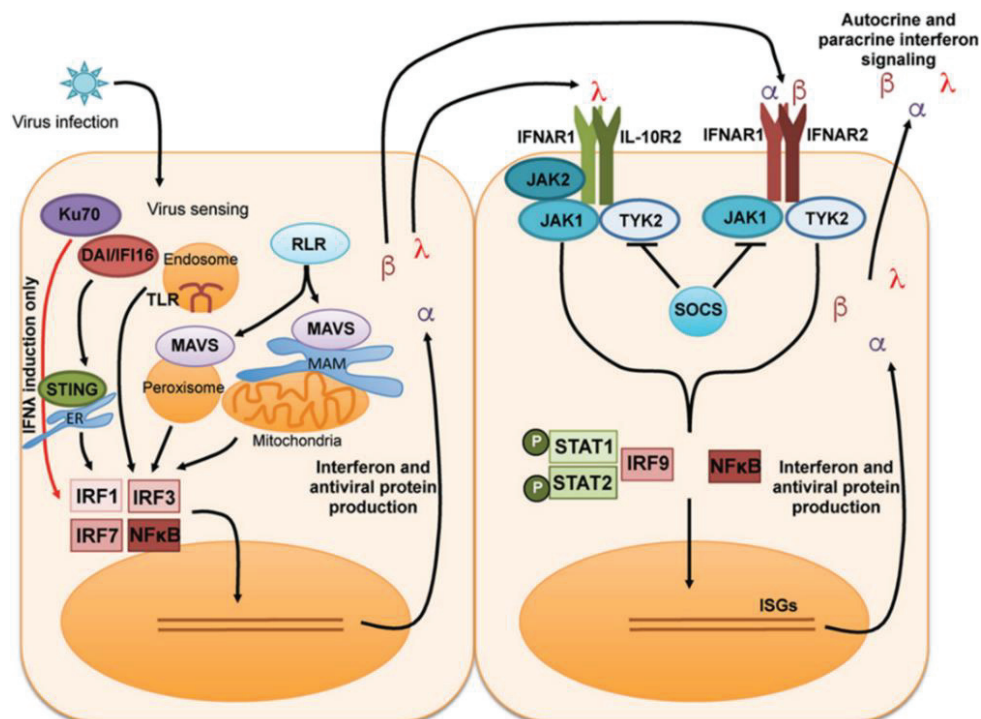


Figure 28 : Schéma général des voies de signalisation des interférons, Hemann et al. (2017)<sup>412</sup>. Lorsqu'un virus est détecté, la cascade d'activation menant aux IFN de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type III ( $\lambda$ ) est identique. Une fois sécrétés, les IFN exercent une activité paracrine et exocrine mais leurs récepteurs sont différents et ne sont pas présents sur les mêmes types cellulaires. Ainsi, les IFN de type I ont une activité antivirale systémique tandis que les IFN de type III sont impliqués dans l'immunité locale des muqueuses. Les deux types d'IFN induisent la sécrétion d'effecteurs antiviraux : les ISG, notamment par l'activation des voies JAK/STAT.

## 2.1. Induction des interférons

Les stimuli conduisant à la sécrétion des interférons type III sont identiques à ceux des interférons type I. En revanche, les récepteurs et les facteurs de transcription impliqués diffèrent<sup>411,412</sup>. Lorsque l'hôte détecte des déterminants moléculaires viraux (*Pathogen Associated Molecular Patterns* : PAMP) par les récepteurs de l'immunité innée (*Pattern recognition receptor* : PRR), les 2 types d'interférons peuvent être sécrétés.

Au niveau des endosomes, les acides nucléiques viraux sont reconnus par les *Toll-like Récepteurs* (TLR) 3,7,8 et 9. Dans le cytosol, ils sont détectés par les *RIG-I-like receptors* (RLR) comme RIG-I (*retinoic acide inducible gene I*), MDA-5, cGAS ou STING<sup>422</sup>. La détection des PAMP entraîne le recrutement de MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) qui peut être associée aux membranes du peroxyosome ou des mitochondries. Des protéines auxiliaires peuvent être recrutées pour initier la transduction du signal comme MyD88 ou Ku70<sup>424,425</sup>. MAVS déclenche l'activation des facteurs de transcriptions NFκB (*nuclear factor-kappa B*) et des IRF (*interferon regulatory factors*), en particulier IRF 3, 7 et 9 induisant la transcription, traduction et sécrétion des cytokines d'interféron de type I comme de type III. Les promoteurs des gènes IFNL possèdent des sites de fixation à NFκB, IRF1, IRF3 et IRF7 de manière similaire aux interférons de type I. IFNL1 présente une plus forte affinité avec IRF3 tandis que IFNL2/3 pour IRF7<sup>426</sup>. NFκB est inductible indépendamment des IRF, ce qui confère une plus grande flexibilité d'induction des promoteurs des IFN de type III comparée à celle des type I<sup>411,427</sup>.

## 2.2. Induction des ISG

Une fois sécrétés, les IFN se fixent sur leurs récepteurs spécifiques, qui peuvent être situés sur la même cellule ou des cellules environnantes. La fixation déclenche une boucle d'auto-amplification se traduisant par une augmentation de l'abondance des récepteurs à la surface des cellules. Les IFN de type I se fixent sur leur récepteur IFNAR1/2 exprimé de manière ubiquitaire sur tous les types cellulaires tandis que les IFN de type III se fixent aux récepteurs IFNLR1/IL10-R2 majoritairement exprimés sur les cellules épithéliales des muqueuses. La liaison avec ces récepteurs déclenche des cascades d'activation, en particulier la signalisation de la voie JAK/STAT. JAK1, TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*) et potentiellement JAK2 sont phosphorylées et activent à leur tour STAT1 et STAT2. Plusieurs études suggèrent que JAK2 pourrait être spécifiquement activée lors d'une induction par les IFN-λ, au détriment de la TYK2<sup>428,429</sup>. STAT 1 et STAT 2, une fois phosphorylés, forment un complexe avec IRF9 appelé ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*). Après une translocation dans le noyau de la cellule, le complexe se fixe sur les éléments de réponse aux interférons ISRE (*interferon stimulated response element*), promoteurs des ISG, initiant la transcription d'un large panel d'effecteurs antiviraux.

Une régulation négative des interférons est assurée par la sécrétion des suppresseurs de cytokines, comme SOCS 1 et 3, interagissant avec TYK2<sup>430-432</sup> ou par USP18, spécifique des IFN de type I, inhibant IFNAR<sup>433</sup>.

### 3. Spécificité des cellules épithéliales

La contribution des différents facteurs impliqués dans l'induction des voies interférons est dépendante du type cellulaire<sup>427</sup>. Dans les voies respiratoires, la détection des agents étiologiques a lieu au point d'entrée de l'infection, au niveau des muqueuses, dans les cellules épithéliales nasales et/ou pulmonaires. Comme vu précédemment, les cellules épithéliales respiratoires sont polarisées et présentent un niveau élevé d'expression des récepteurs IFNLR<sup>419,421,422</sup>. Ainsi, des infections par les virus de la grippe, rhinovirus, virus respiratoire syncytial, coronavirus et les bactéries comme *S.pneumonie*, *H. influenza*, *S. aureus* et *M. tuberculosis* déclenchent toutes une stimulation importante d'IFN- $\lambda$ , qui constitue la réponse IFN initiale et dominante dans l'épithélium des voies respiratoires supérieures<sup>434-436</sup>. L'induction des interférons dans l'épithélium respiratoire semble principalement dépendante de RIG-I, MAVS et IRF7 tandis que NF $\kappa$ B joue un rôle de régulateur<sup>427</sup>. Dans l'exemple d'une infection par les virus influenza, la détection des déterminants viraux par les PRR et/ou TLR a lieu dès leur internalisation<sup>425</sup>.

#### 3.1. RIG-I est un PRR majeur

Dans les épithéliums respiratoires, les TLR 3 sont situés à la surface cellulaire et dans les endosomes des tissus bronchiques et alvéolaires. Ils reconnaissent les ARN double brins. Les ARN simple brin sont reconnus par les TLR 7 et 8 dans les endosomes des cellules épithéliales bronchiques. L'activation des TLR 7 semble particulièrement associée à la sécrétion d'IFN- $\lambda$  et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6. Les RLR sont peu abondants dans les cellules épithéliales mais leur niveau d'expression augmente lors d'une infection à influenza<sup>425,437</sup>. Le récepteur le plus important pour la détection d'une infection par influenza est RIG-I situé dans les jonctions serrées et dans les endosomes. Il exerce un rôle majeur dans l'activation de MAVS et NF $\kappa$ B. Lorsqu'il est inhibé, la réponse interféron est fortement diminuée dans les cellules A549<sup>438</sup>. De plus, des souris délétées de RIG-I présentent un temps de clairance virale très allongé, associé à une augmentation de la mortalité face à un challenge avec influenza<sup>435,437</sup>. La signalisation par RIG-I permet d'induire les interférons de type I et III via le facteur de transcription IRF7 essentiellement<sup>439,440</sup>. Dans le cas du SARS-CoV-2, un profil similaire est observé, avec une reconnaissance exercée par MDA5<sup>441</sup>.

#### 3.2. La localisation de MAVS détermine l'espèce produite

Comme présenté dans le schéma général (Figure 28), de nombreux facteurs clés (RIG-I, IRF3, IRF 7 et NF $\kappa$ B) interviennent dans l'activation des IFN mais ils ne sont pas spécifiques des type I ou III. En revanche, la localisation subcellulaire de MAVS est déterminante pour l'espèce d'interféron produite<sup>422</sup>. D'abord identifiée dans les mitochondries, cette protéine a ensuite été localisée dans le peroxysome et les membranes du RE associées aux mitochondries<sup>442</sup>.

L'équipe de recherche de Charlotte Odendall démontre en 2014 que, située dans les mitochondries, MAVS active les voies des interférons de type I comme de type III par les facteurs de transcription communs NF $\kappa$ B, IRF3 ou les MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) comme p38, ERK ou AP-1 (*activator protein-1*). En revanche, située dans le peroxysome, MAVS est capable d'induire des ISG indépendamment des IFN type I, activant préférentiellement NF $\kappa$ B et IRF3, mais pas les facteurs MAPK impliqués dans l'expression de l'IFN de type I<sup>428,443</sup>. L'article montre également que la capacité des cellules épithéliales intestinales à produire des IFN de type III est directement contrôlée par leur état de différenciation. La polarisation des cellules épithéliales permet une abondance de

peroxysomes et favorise ainsi la production d'IFN- $\lambda$  au détriment des IFN type I. Il existe donc un lien fonctionnel entre la biogenèse des peroxysomes et la capacité de ces cellules à exprimer l'IFN- $\lambda$ .

Les peroxysomes sont des organites contenant des enzymes catalase et oxydase indispensables à la régulation du métabolisme et du stress oxydatif, mais plusieurs études soulignent leur rôle important dans la réponse antivirale de l'hôte<sup>444</sup>. Plusieurs virus en font une cible de choix pour altérer la réponse innée de l'hôte, comme le virus de la dengue, le VIH ou encore Zika, qui inhibe un précurseur de peroxysome Pex19 pour établir une infection durable<sup>445</sup>. Par ailleurs, un désordre péroxisomal peut constituer un facteur de risque dans les infections virales respiratoires. C'est le cas du trouble de Zellweger, souvent associé à un décès par pneumonie. Les cellules dérivées de ces patients présentent une réponse antivirale aberrante<sup>428</sup>.

### 3.3. NF $\kappa$ B joue un rôle régulateur

L'induction des IFN- $\lambda$  dans les cellules épithéliales semble plus dépendante de NF $\kappa$ B que les IFN de type I, ses deux sous-unités exerçant des rôles opposés dans la modulation. En effet, l'équipe de Siegel démontre que NF $\kappa$ B joue un rôle régulateur dans l'induction de IFNL1 dans les cellules bronchiques BEAS-2B. La sous-unité p65/c-REL augmente l'expression d'IFNL1 avec un pic observé 90 minutes après stimulation avec du Poly IC, tandis que p50 induit une *down* régulation<sup>426</sup>. Une inhibition de p50 induit une sécrétion d'IFN- $\lambda$ 1 durable dans le temps, tandis qu'une inhibition de P65 empêche totalement cette sécrétion. Un constat similaire est observé dans les cellules épithéliales du colon, où p65 stimule la production d'IFN- $\lambda$  et des ISG comme OAS1 (2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1), tandis que p50 l'inhibe<sup>446</sup>. En clinique, l'étude de Salka et al. confirme que l'activation des IFN- $\lambda$  est dépendante de la sous-unité p65 dans les cellules primaires épithéliales nasales *in vivo*<sup>447</sup>. P65 stimule la production d'IFN- $\lambda$  en augmentant l'activité du promoteur du gène codant l'IRF7<sup>448</sup>. Cette activité semble plus importante pour les IFN de type III puisque l'inhibition de NF $\kappa$ B dans les cellules épithéliales vaginales induit une diminution des IFN- $\lambda$  mais n'a qu'un faible impact sur les IFN de type I<sup>449</sup>.

## 4. Les interférons $\lambda$ constituent la première ligne de défense antivirale du tractus respiratoire supérieur

Plusieurs études s'accordent sur le fait que les IFN- $\lambda$  ont des fonctions biologiques redondantes des IFN de type I, capables respectivement d'effectuer des boucles de régulations compensatoires pour assurer la production des ISG et l'activité antivirale<sup>427,450</sup>. Pourtant, leurs activités antivirales n'interviennent pas simultanément, ni en termes d'amplitude, de cinétique, ni de site d'action. Tel que décrit précédemment, les récepteurs des IFN de type I sont ubiquitaires. Leur activité antivirale est donc systémique contrairement aux interférons de type III dont l'activité est particulièrement concentrée au niveau des muqueuses respiratoires et la réponse cellulaire est limitée à un entourage cellulaire proche.

#### 4.1. Les interférons $\alpha$ , $\beta$ et $\lambda$ ont des activités non redondantes

Plusieurs études récentes ont permis de mieux caractériser l'activité antivirale non redondante des deux espèces d'interférons, notamment par l'utilisation de modèles murins délétés des récepteurs des interférons type I et/ou type III<sup>451,452</sup>.

L'équipe de Galani et al. a étudié la mise en place de l'immunité innée chez des souris infectées avec différentes doses de virus influenza<sup>452</sup>. Quel que soit l'inoculum viral, les résultats soulignent une sécrétion précoce d'IFN- $\lambda$  dès les premières heures d'infection dans les lavages bronchoalvéolaires, confirmant leur activité antivirale de première ligne. En revanche, l'intervention des IFN- $\alpha/\beta$  est dépendante de la charge virale. Si la charge virale est faible, l'activité des IFN- $\lambda$  est suffisante pour maîtriser l'infection, sans activation des effecteurs de l'inflammation<sup>452</sup>. En revanche, une charge virale importante entraîne une propagation de l'infection au tractus respiratoire inférieur, nécessitant l'intervention rapide des deux types d'interférons<sup>427,450,452</sup> (Figure 29). Les IFN de type I interviennent en aval des IFN- $\lambda$  et activent une réponse pro-inflammatoire, nécessaire à la clairance virale, mais pouvant causer des dommages tissulaires. L'étude de Klinkhammer et al. confirme ces observations. Après une infection par instillation nasale de virus influenza, les souris dépourvues de récepteurs aux IFN- $\lambda$  ont présenté une grippe sévère avec une rapide évolution pulmonaire. Les auteurs démontrent que l'IFN- $\lambda$  a une fonction décisive et non redondante dans les voies aériennes supérieures qui limite fortement la transmission des virus respiratoires aux contacts naïfs<sup>451</sup>. Ainsi, ces résultats mettent en évidence l'activité antivirale locale des IFN- $\lambda$  au point d'entrée de l'infection pour limiter sa propagation au tractus respiratoire inférieur, sans activer les médiateurs de l'inflammation<sup>452</sup>.

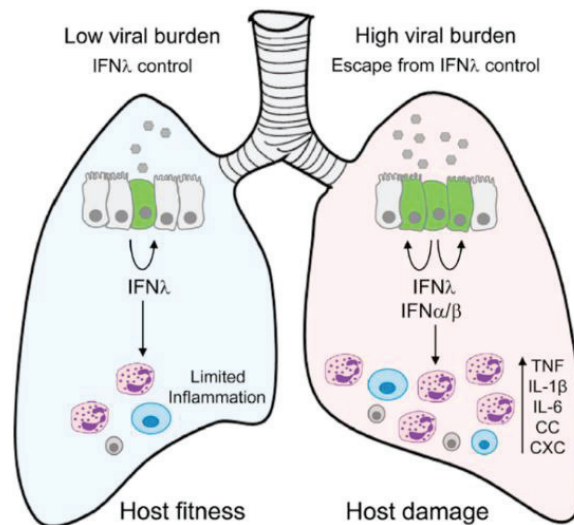


Figure 29 : Les interférons de type III constituent la première ligne de défense antivirale locale, Galani et al. (2017)<sup>452</sup>. Ils interviennent de manière précoce, tant que la charge virale demeure faible. Leur activité antivirale permet de contenir l'infection dans le tractus respiratoire supérieur et de limiter la transmission, sans activer les effecteurs de l'inflammation. Les IFN type I, plus performants pour stopper l'infection virale avec leur action antivirale systémique, interviennent en seconde ligne quand les type III ne suffisent pas, activant le système inflammatoire en plus des médiateurs antiviraux.

L'induction des IFN- $\lambda$  permet également la sécrétion de nombreux ISG par les neutrophiles, avant le déclenchement de la réponse inflammatoire, suggérant une activité collaborative des IFN- $\lambda$  avec les IFN- $\alpha/\beta$  pour le recrutement de effecteurs de l'immunité<sup>452</sup>. D'ailleurs, les souris dépourvues des IFN- $\lambda$  présentent une réponse inflammatoire démesurée. Mais de manière inattendue, une réponse IFN type I non efficace entraîne la mise en place de mécanismes compensatoires aboutissant

à une réponse innée aberrante et délétère. Ainsi, les deux familles d'IFN sont importantes pour obtenir une clairance virale rapide et améliorer la survie des souris.

Enfin, les deux mécanismes semblent exercer une modulation mutuelle de l'expression l'un sur l'autre. *In vivo*, l'IFN- $\lambda$  recombinant, en plus de son activité antivirale, permet de réguler négativement les IFN de type I<sup>452</sup>. De la même manière, Pervolaraki décrit dans son étude que, dans les cellules épithéliales intestinales, la présence d'un récepteur fonctionnel de l'IFN de type III régule négativement la signalisation et l'activité de l'IFN de type I, tandis que la présence du récepteur de l'IFN de type I renforce positivement la signalisation et la fonction de l'IFN de type III<sup>453</sup>. Ainsi, ce mécanisme favoriserait l'expression des interférons de type III dans les cellules épithéliales.

#### **4.2. Les interférons $\lambda$ n'activent pas d'inflammation**

Contrairement aux IFN de type I, il est clairement documenté que les IFN- $\lambda$  n'activent pas d'inflammation. Cependant, étant donné que les voies de signalisations menant aux ISG sont globalement identiques, seules quelques études donnent des éléments mécanistiques pour expliquer cette différence.

Récemment, l'étude de Foreo et al. a exploré ce mécanisme en traitant des hépatocytes, des A549 et des souris avec des IFN- $\beta$  et  $\lambda 3$  recombinants<sup>454</sup>. L'instillation nasale d'IFN- $\beta$  par les souris a bien conduit à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires CXCR3, CXCL9, CXCL10, et CXCL11, ainsi qu'au recrutement des monocytes, macrophages et cellules dendritiques pulmonaires, à la différence de l'IFN- $\lambda 3$ . Pour expliquer cela, l'équipe a suivi la cinétique d'activation des ISG et des facteurs de transcription *in vitro*. L'étude indique que l'IFN- $\beta$  induit une production très rapide mais limitée dans le temps des ISG, à la différence d'IFN- $\lambda 3$  qui génère une production moins rapide mais plus durable des ISG comme ISG15, Mx1 ou OAS1. Cette induction plus rapide des ISG est associée à une phosphorylation de STAT1 plus précoce. Par ailleurs, une forte induction de IRF1 a été observée après traitement des cellules par les IFN- $\beta$  et  $\alpha$ , alors qu'une faible induction a été constatée avec les IFN- $\lambda 1$ , 2 ou 3. L'étude met en évidence que STAT1 est le premier facteur de transcription nécessaire à la production d'IRF1 et émet l'hypothèse que l'abondance restreinte d'IFNLR1 dans les cellules épithéliales explique la faible phosphorylation de STAT1 par les IFN de type III. En effet, dans des conditions où l'abondance des récepteurs est augmentée, les IFN- $\lambda 3$  conduisent bien à la production d'IRF1. Les auteurs suggèrent que la mise en place du système IFN de type III dans les cellules épithéliales est une adaptation sélectionnée par l'évolution pour induire un état antiviral sans activer l'inflammation.

Ainsi, IRF1 joue un rôle crucial dans la régulation des IFN de type I en induisant la production rapide mais transitoire des ISG et permet l'expression des cytokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires. Dans des conditions d'infection avec une faible charge virale, les IFN de type III induisent une activité antivirale durable sans activer l'inflammation. Si nécessaire, dès l'activation des IFN de type I, ceux-ci sont capables d'induire rapidement la production des ISG et le recrutement des cellules immunitaires, grâce à l'intervention de IRF1.

## 5. Activité antivirale des ISG

Les ISG possèdent de multiples activités antimicrobiennes ciblant différentes étapes du cycle viral, mais aussi des activités régulatrices (Figure 30). A ce jour, aucun ISG n'a été déterminé comme spécifique d'une famille d'interféron. En revanche, leurs cinétiques d'induction sont corrélées avec celles des IFN. Ainsi, dans les cellules épithéliales, la signalisation IFN de type I est caractérisée par une induction aiguë des ISG et confère une protection antivirale rapide. Au contraire, la protection antivirale médiée par l'IFN de type III à action durable est caractérisée par une induction plus faible des ISG de manière retardée par rapport à l'IFN de type I<sup>454,455</sup>.

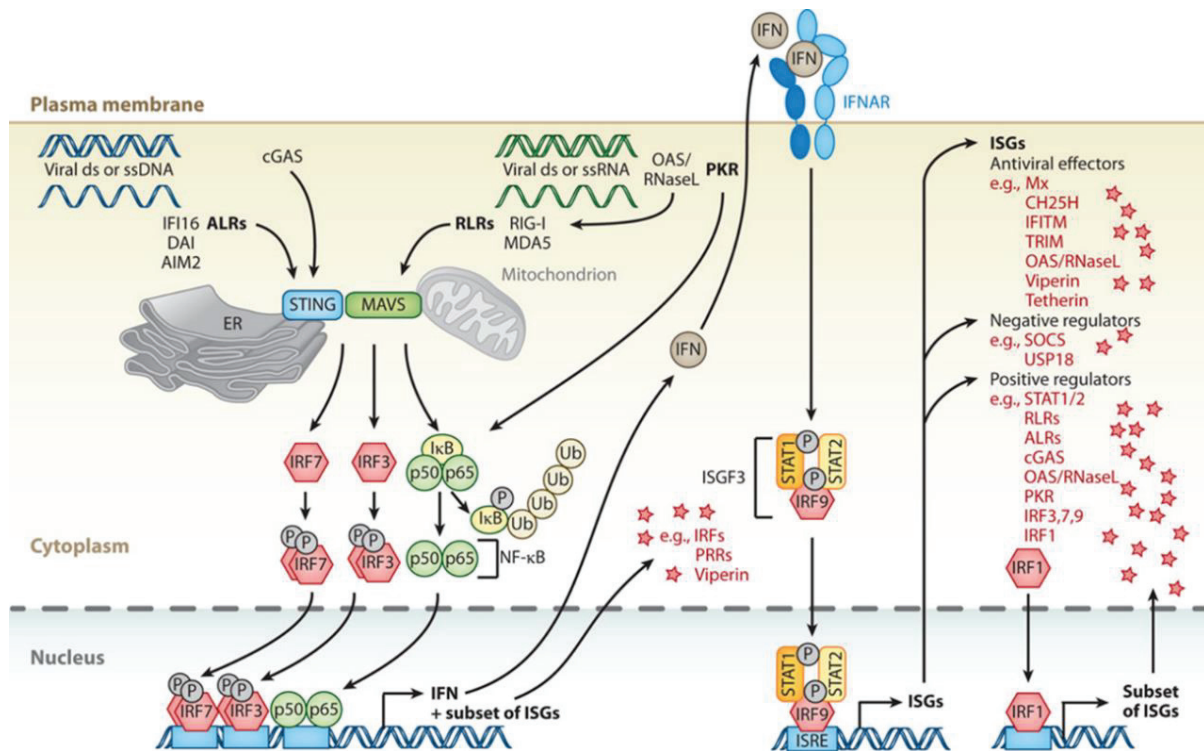


Figure 30 : Schéma général de la voie de signalisation des interférons de type I conduisant à la sécrétion des ISG, Schneider et al. 2014<sup>433</sup>. Trois familles d'ISG sont représentées en fonction de leur activité : les effecteurs antiviraux, les inhibiteurs et les amplificateurs.

Les effecteurs antiviraux issus des ISG ciblent différentes étapes du cycle viral. Par exemple, l'entrée du virus est bloquée par les effecteurs IFITM (*Interferon Induced Transmembrane Protein*), l'ARN viral est ciblé par les effecteurs OAS et IFIT (*Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats*), la réplication est inhibée par les produits des gènes ISG15, ISG20, OAS, GBP, et IFI ; l'assemblage et le bourgeonnement viral sont ciblés par les effecteurs ISG15, BST2 ou RASD2<sup>433</sup>.

Dans le cas d'infections à influenza, certains ISG tels que Mx1, la Viperin (*virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum [ER]-associated, IFN-inducible*, ou RSAD2), ou IFITM3 sont particulièrement décrits comme des effecteurs essentiels à la clairance virale.

Concernant le SARS-CoV-2, les systèmes d'échappement aux senseurs cellulaires et l'inhibition des facteurs impliqués dans les voies des IFN, dans les phases précoces d'infection, rendent l'activité antivirale des ISG plus tardive et moins efficace, notamment par l'intervention des protéines non structurales et accessoires, ou encore l'interaction de la protéine M avec la voie de signalisation de RIG-I et MAVS pour bloquer l'induction des IFN<sup>456-458</sup>. Une induction intense et rapide des IFN-λ est en

revanche observée dans un second temps. La dérégulation des systèmes IFN conduit à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires qui sont les plus fréquemment identifiées suivant l'infection par le virus, comme IP-10 ou CXCL10. Également, une induction d'ACE2 est rapportée, dépendante de la charge virale, dans les premières heures d'infection<sup>94,457</sup>. Quelques ISG antiviraux sont tout de même identifiés comme IFIT3, IFIT1, IFITM1, ISG15, OAS1 ou Mx1<sup>441,457,459</sup>. Parmi eux, OAS1 semble exercer un rôle protecteur essentiel contre les formes sévères de COVID-19<sup>460-462</sup>.

### 5.1. Mx1

Les protéines de la famille Mx ont été découvertes chez des souris anormalement résistantes aux infections influenza, porteuses d'un gène fonctionnel codant pour la protéine Mx1<sup>463,464</sup>. L'expression du gène MxA, l'équivalent chez l'Homme, peut être activée indépendamment par l'action des IFN de type I ou de type III mais des études comme celle de Klinkhammer s'accordent à dire que les IFN- $\lambda$  induisent un niveau plus important et une action plus durable de Mx1 chez la souris<sup>451,465</sup>. Son mode d'action contre influenza diffère en fonction de sa localisation cellulaire. MxA cytoplasmique bloque la translocation nucléaire des vRNP entrants et inhibe la transcription secondaire et la réplication tandis que Mx1 nucléaire inhibe la transcription primaire réalisée par l'ARN polymérase virale<sup>465</sup>.

### 5.2. Viperin (RSAD2)

La viperin est un effecteur antiviral majeur, inductible via les IRF1/3 et la voie JAK/STAT (Figure 30)<sup>433</sup>. Son mécanisme d'action n'est pas encore bien décrit mais elle semble inhiber la libération des nouveaux virions, en se fixant à l'enzyme *farnesyl diphosphate synthase* (FPPS) impliquée dans la biosynthèse du cholestérol et des isoprénoïdes, perturbant ainsi les radeaux lipidiques<sup>466</sup>. Elle interagit également avec un facteur de biogénèse des peroxysomes (Pex19) pour augmenter leur abondance et améliorer l'effet antiviral<sup>444</sup>.

### 5.3. IFITM3

IFITM3 est une protéine associée aux membranes des endosomes et lysosomes qui inhibe l'entrée virale dans le cytoplasme de la cellule-hôte en empêchant la formation du pore de fusion du virus<sup>467,468</sup>. C'est un effecteur antiviral majeur contre influenza, chez l'Homme comme chez la souris, exprimé par les cellules épithéliales respiratoires trachéales et bronchiques ainsi que les pneumocytes de type II<sup>469</sup>. Des études en modèles murins ont démontré que les souris délétées du gène IFITM3 présentaient des symptômes sévères avec un inoculum de virus influenza normalement peu pathogène, associés à une augmentation de la mortalité et des dommages cardiovasculaires<sup>469,470</sup>. Cela a été confirmé chez l'Homme en 2012 dans une étude rétrospective soulignant la présence d'un polymorphisme génétique sur le gène IFITM3 chez un pourcentage significatif de patients hospitalisés pour grippe grave<sup>471</sup>. L'étude de ces polymorphismes a révélé la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative inefficace<sup>467</sup>.



#### 5.4. OAS1

Une fois sécrétés, les OAS (oligoadenylate synthetase) jouent un rôle de senseurs des ARN double brins et provoquent la synthèse de 2'-5' oligoadenylate, exerçant une activité RNase du matériel génétique viral, mettant fin à la réplication<sup>472</sup>. OAS1 est considéré comme le senseur majoritaire et possède une activité antivirale significative contre le SARS-CoV-2<sup>473</sup>. En effet, l'étude de Zhou et al. décrit qu'un niveau plasmatique élevé de OAS1 est associé à une clairance naturelle du virus et une réduction de 50 % du risque de COVID-19 sévère. L'étude rapporte cette protection à la présence d'un isoforme ancestral OAS1-p46 (rs1131454-G)<sup>460</sup>. Cependant, des polymorphismes d'OAS1 conduisant à une diminution de son expression, ou à un non-sens, ont été identifiés en clinique comme des facteurs de risques de COVID-19 sévère lié à une clairance virale non efficace (rs1156361 ; rs2660)<sup>461,462</sup>. Les auteurs de l'étude précisent que cette déficience peut être compensée *in vitro* par un traitement avec de l'IFN-λ1 recombinant. Ce gène ancestral semble hérité de Neandertal, ainsi les populations d'Europe et d'Asie porteuses de l'allèle protecteur présenteraient un avantage face à la maladie mais celles porteuses de polymorphismes seraient prédisposées à une COVID-19 plus sévère<sup>460-462</sup>. Au contraire, les populations africaines non concernées par un génome issu de Neandertal, ne sont ni avantagées ni défavorisées.

## Chapitre 3. Le repositionnement de médicaments

### 1. Définition du médicament

L'Article L5111-1 du Code de la Santé Publique définit le médicament comme : « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'Homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* ».

### 2. Le marché du médicament

La pandémie de COVID-19 a plongé l'économie mondiale dans une récession en 2020 avec une chute historique du PIB aux Etats-Unis (-3.5 %) et dans la zone Euro (-6.8 %) <sup>474</sup>. Seule la Chine a su récupérer une croissance positive sur le dernier trimestre.

Pourtant, la part de l'industrie pharmaceutique dans l'économie mondiale ne cesse de croître, et a fait figure d'exception en 2020 avec un chiffre d'affaires (CA) historique de 1 203 milliards de dollars (environ 987 milliards d'euros), ce qui représente une croissance de 8 % par rapport à 2019 <sup>475</sup>. Les Etats-Unis ont réalisé 46 % des ventes et demeurent au premier rang mondial, loin devant l'Europe (15.5 %), le Japon (6.6 %) et les pays émergents, la Chine et le Brésil qui réalisent 9.8 %. La France se classe au 5<sup>ème</sup> rang mondial, deuxième marché européen derrière l'Allemagne. Toutefois, sa part de marché a reculé de 2.2 points en dix ans. L'industrie pharmaceutique française a réalisé 62 milliards de CA dont 50 % à l'export, majoritairement à destination des Etats-Unis, de la Belgique et de l'Allemagne.

Le contexte économique mondial a cependant contraint les groupes pharmaceutiques à ralentir leur politique de fusions et acquisitions, en se recentrant sur des alliances plus ciblées dans des domaines thérapeutiques prioritaires, avec pour objectifs de renforcer leur présence sur des marchés clés ou d'acquérir de nouvelles technologies <sup>476</sup>.

### 3. Processus de développement d'un médicament *de novo*

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, affichant un très faible pourcentage de réussite. En moyenne, on estime que sur 10 000 molécules criblées lors d'étapes précliniques, 10 feront l'objet d'un dépôt de brevet et seulement 1 molécule obtiendra une autorisation de mise sur le marché (AMM) (Figure 31) <sup>477</sup>.

Le processus débute par une phase de recherche exploratoire visant à l'identification de nouvelles cibles ou au *design* de nouvelles molécules. Elle peut être encouragée par l'enrichissement des connaissances sur les interactions hôte-pathogène ou sur des mécanismes et/ou effecteurs impliqués dans les maladies. Les principes actifs les plus intéressants (0.001 % en moyenne) sont protégés par un dépôt de brevet pour une durée de 20 ans <sup>477</sup>.

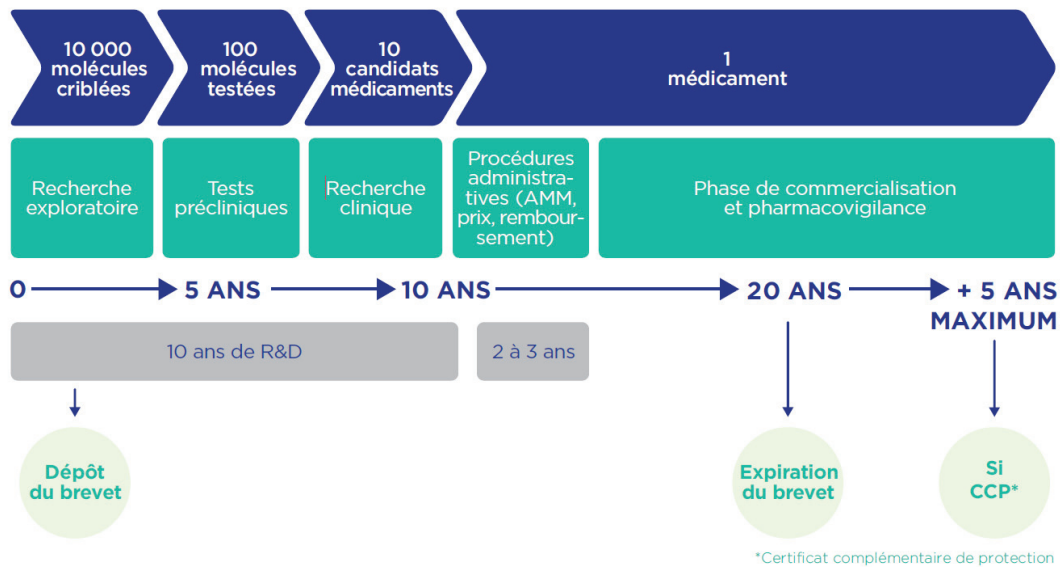


Figure 31 : Schéma récapitulatif du processus de développement d'un médicament de novo, source : LEEM<sup>478</sup>.

Les étapes de criblages sont suivies d'études précliniques *in vitro* puis *in vivo* en modèles animaux, selon des critères réglementaires, visant à déterminer les propriétés d'Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité (ADMET) des candidats-médicaments, ainsi qu'à évaluer leur efficacité, constituant ainsi une première preuve de concept.

Si les résultats précliniques sont convaincants, les essais cliniques sur l'Homme débutent. Ils sont réalisés en milieu hospitalier sous la responsabilité de médecins investigateurs et se composent de trois phases<sup>479,480</sup> :

- (i) La phase I vise à vérifier l'innocuité et la tolérance du produit par l'administration de quantités croissantes du médicament sur une petite cohorte de volontaires sains sous surveillance médicale étroite. Taux de réussite : 70 %.
- (ii) La phase II se déroule sur une cohorte plus importante de volontaires malades, afin de déterminer la dose optimale, pour laquelle l'effet thérapeutique est le meilleur avec le moins d'effets secondaires. L'objectif est de démontrer une balance bénéfico-risque favorable. Taux de réussite : 33 %.
- (iii) La phase III vise à valider sur une cohorte de grande importance de volontaires malades, l'efficacité et la sécurité du nouveau traitement dans des conditions habituelles d'utilisation de façon comparative au traitement de référence ou à un placebo. Les précautions d'emploi, effets indésirables et interactions avec d'autres composés sont identifiés et surveillés sur plusieurs années. Taux de réussite : 70 à 90 %.

A l'issue des essais cliniques, un dossier d'AMM peut être déposé. Il doit ensuite être validé par les autorités de santé nationales (*Food and Drug Administration* - FDA aux Etats-Unis, Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé - ANSM en France) ou Européenne (Agence Européenne des Médicaments – EMA) avant la commercialisation du médicament. Un suivi de pharmacovigilance accompagne le médicament pendant toute la durée de sa commercialisation avec une surveillance accrue les premières années afin d'ajouter des précautions d'usage ou de mettre à jour les problèmes potentiels de sécurité et la fréquence d'effets secondaires éventuels. Par ailleurs, des études interventionnelles (dites de phase IV) peuvent être menées notamment si l'AMM le demande en raison du faible nombre de patients durant les essais cliniques (L5121-8-1 code de la Santé publique).

L'AMM garantit une période de protection des données de 8 + 2 + 1 ans (Règlement CE n°726/2004, art. 14(11))<sup>481</sup> :

- (i) 8 ans de protection sont accordés, période pendant laquelle personne ne peut accéder ou faire référence au dossier AMM (R5121-28 code de la santé publique) ;
- (ii) 2 ans de protection supplémentaires, période pendant laquelle il est possible de faire référence au dossier AMM, mais pendant laquelle il n'est pas possible d'obtenir d'AMM sur cette base (L5121-10-1 code de la santé publique) ;
- (iii) 1 an de protection supplémentaire (par rapport aux 2 ans précédents) si une nouvelle indication thérapeutique est accordée pendant la période des 8 ans et que celle-ci apporte un avantage important (L5121-10-1 code de la santé publique).

Sous certaines conditions, une demande de certificat complémentaire de protection (CCP) peut être effectuée, permettant de prolonger la durée de protection du brevet (i) d'un principe actif entrant dans la composition d'un médicament, (ii) du procédé d'obtention ou de (iii) son application<sup>482</sup>. Dans le contexte du développement d'un nouveau médicament, le CCP permet de compenser le temps nécessaire à l'obtention de l'AMM, qui peut considérablement retarder l'exploitation du produit sous monopole du brevet. Il prend alors le relais du brevet à l'expiration de celui-ci pour une durée maximale de 5 ans et demi.

A l'expiration du brevet, la molécule tombe dans le domaine public, offrant la possibilité à d'autres laboratoires de fabriquer le médicament sous forme générique.

Il s'écoule en moyenne 15 ans entre le dépôt de brevet et la mise sur le marché du médicament, représentant un investissement estimé à 2 milliards de dollars pour un taux de succès estimé à moins de 10 %<sup>483</sup>. A noter que ces dernières années ont été marquées par une augmentation significative des coûts de recherche et développement (R&D) estimés à plus de 10 % par an, liée à l'allongement des phases d'études cliniques engendré par une aversion sociétale des risques liés aux médicaments. Cela représente donc un énorme investissement, sans assurance de rentabilité. Cet investissement est toutefois fonction de la classe thérapeutique des médicaments. Une étude statistique menée sur des études cliniques entre 2010 et 2015 rapporte que seulement 3.4 % des médicaments pour l'oncologie contre 33.4 % des vaccins mènent à une AMM<sup>484</sup>. Concernant les molécules anti-infectieuses, ce pourcentage de réussite est estimé à 25 %.

Ces données peuvent également être modulées par le contexte et les enjeux sanitaires. Dans un contexte pandémique, certains médicaments peuvent faire l'objet de procédures accélérées par la FDA : «*Fast Track Designation*», donnant lieu à un examen prioritaire des dossiers par les autorités de santé pour une mise sur le marché du produit en moins de 6 mois<sup>485,486</sup>. Cela a par exemple été le cas de 82 % des molécules évaluées contre le VIH entre 1982 et 2001, ainsi que de tous les médicaments et vaccins développés contre le SARS-CoV-2 entre 2020 et 2022.

## 4. Le repositionnement de médicaments

Le repositionnement de médicaments est devenu une stratégie incontournable dans l'industrie pharmaceutique et représente environ 30 % des nouveaux médicaments approuvés par la FDA ces dernières années<sup>487</sup>. Il constitue un atout majeur dans la lutte contre les maladies infectieuses et/ou émergentes, comme la grippe ou la COVID-19.

Cette thématique a fait l'objet d'une revue de la part de notre laboratoire sur les stratégies de repositionnement de médicaments contre les virus influenza *“Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection : Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy”* publiée en 2019 dans *Frontiers in Immunology*, présentée en Annexes.

### 4.1. Définition du repositionnement

Tel que décrit précédemment, le développement *de novo* d'un médicament est un processus long et coûteux, affichant un faible taux de réussite. Pour pallier ce manque de rentabilité, les groupes pharmaceutiques se tournent aujourd'hui de plus en plus vers des stratégies alternatives comme le criblage à haut débit et le repositionnement de médicaments. Cette approche apparue dans les années 1990, consiste en l'utilisation d'une molécule existante, soit déjà approuvée, soit dont le développement a été interrompu au cours des études cliniques, pour une indication thérapeutique différente de celle pour laquelle elle a été développée initialement<sup>488,489</sup>. Elle permet ainsi la mise sur le marché de médicaments plus sûrs, plus rapidement et à moindre coût.

Le repositionnement s'accompagne d'une évolution du paradigme « un médicament = une cible thérapeutique » vers la polypharmacologie<sup>490,491</sup>. L'étude de Paolini et al. publiée en 2006 a en effet estimé que parmi les 276 122 composés actifs évalués, environ 35 % présentait une activité envers plus d'une cible thérapeutique<sup>492</sup>. On estime qu'un médicament possède en moyenne 6 à 13 cibles différentes, pouvant varier en fonction des conditions de formulation et de concentration<sup>493,494</sup>. Ainsi, en plus des perspectives économiques, ce nouveau paradigme de polypharmacologie offre la possibilité d'atteindre plusieurs cibles thérapeutiques simultanément pour traiter plus efficacement les maladies et limiter les phénomènes de résistances<sup>490</sup>.

### 4.2. Avantages du repositionnement

#### 4.2.1. Réduction du temps et des coûts de R&D

L'avantage majeur de la stratégie de repositionnement des médicaments tient dans la réduction très significative des délais et des coûts de leur développement, jusqu'à leur mise sur le marché pour la nouvelle indication thérapeutique (Figure 32).

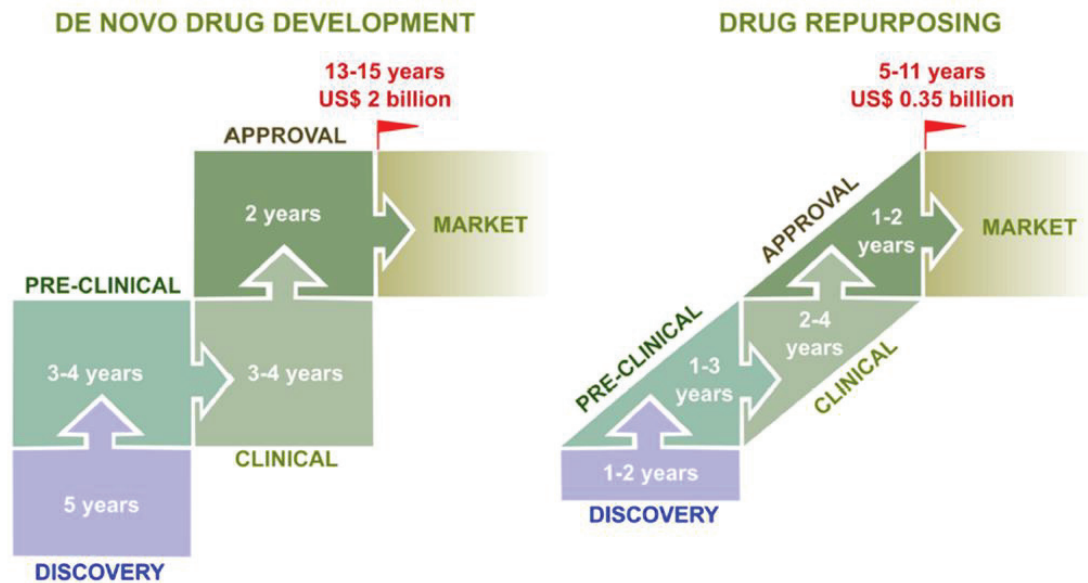


Figure 32 : Schéma comparatif du développement clinique d'un médicament de novo versus un médicament repositionné, d'après Pizzorno et al. (2019)<sup>233</sup>. Des étapes précliniques à la mise sur le marché, le processus classique est long et coûteux. Le repositionnement permet une réduction importante des coûts de R&D (jusqu'à 5 fois moins chers), un développement plus rapide et un meilleur taux de réussite (estimé à 30 % contre 10 %), notamment lié à l'existence des données cliniques et précliniques générées lors du développement du médicament princeps.

En effet, les médicaments déjà approuvés ont passé avec succès les étapes précliniques et cliniques lors de leur développement initial, et leur utilisation chez l'Homme est donc bien documentée en termes de sécurité et de tolérance. Leurs dossiers d'AMM contiennent toutes les données d'intérêt (résumé des caractéristiques du produit, biodisponibilité, caractéristiques ADMET, effets secondaires) nécessaires pour accélérer le développement du médicament repositionné. Pour les composés interrompus en phase I ou II d'essais cliniques, les profils de toxicité et de tolérance déjà disponibles permettent de réduire considérablement la durée des étapes de R&D et donnent des bases solides pour guider les nouvelles études cliniques<sup>495</sup>. Dans certains cas, les formulations sont également déjà établies. Ce temps gagné permet un investissement financier moindre, estimé à environ 300 millions de dollars contre 2 à 3 milliards pour le développement d'un composé *de novo*<sup>496</sup>. Ainsi, le repositionnement de médicaments permet aux industriels un retour sur investissement plus rapide avec un risque d'échec diminué.

#### 4.2.2. Valorisation de composés abandonnés

Par ailleurs, le repositionnement apparaît comme une seconde chance pour des milliers de composés dont le développement a été abandonné lors de phases cliniques avancées, ayant nécessité de lourds investissements, permettant ainsi aux industriels un retour sur investissement supplémentaire. Plusieurs entreprises se sont d'ailleurs positionnées sur ce nouveau marché en faisant l'acquisition des licences de chimiothèques afin de les valoriser, à l'instar de Signia Therapeutics ou Anaxomics<sup>497-499</sup>.

#### 4.2.3. Nouvelle activité inventive

Une nouvelle indication et/ou mode d'administration d'un médicament peuvent constituer des exemples de critères de brevetabilité, offrant l'opportunité pour un industriel de prolonger la

protection d'un produit ou de protéger l'utilisation d'un médicament repositionné. Toutefois, la législation ne dispose pas de texte précisant cette situation<sup>500</sup>. La mise en place de la protection repose donc sur la démonstration de l'activité inventive que constitue le repositionnement, tel que le décrit l'article de Pierick Rousseau, Directeur de la propriété intellectuelle chez Pierre Fabre SA : « *Le droit et la jurisprudence se sont adaptés au cours du temps : outre la protection classique produit (actif, composition pharmaceutique ou combinaison d'actifs) et procédé, il est possible de protéger des nouvelles indications, le cas échéant adaptées à une population limitée ou encore des dosages particuliers. Le tout étant de répondre aux critères de suffisance de description, nouveauté et d'activité inventive.* »<sup>501</sup> Ainsi, pour limiter le risque concurrentiel, les industriels ont tendance à breveter très largement le spectre d'indication des composés<sup>502</sup>.

#### **4.2.4. Enjeux sanitaires**

Au-delà des enjeux économiques, le repositionnement de médicaments constitue une opportunité d'identification rapide et à moindre coût de potentielles thérapies efficaces contre des maladies négligées ou orphelines pour lesquelles moins de budgets sont alloués. C'est le cas par exemple des maladies parasitaires tropicales comme la trypanosomiase africaine, la malaria, la leishmaniose ou encore la maladie de Chagas<sup>503-505</sup>.

En conséquence, cette stratégie est particulièrement adaptée aux contextes épidémiques ou pandémiques pour identifier rapidement des médicaments disponibles et efficaces contre les pathogènes. Lors des épidémies d'Ebola entre 2014 et 2016, plusieurs criblages systématiques de composés approuvés ont été réalisés afin d'identifier rapidement des candidats-médicaments à évaluer en clinique<sup>506-508</sup>. De même, dès le début de la pandémie de SARS-CoV-2, plusieurs études ont mis en avant cette stratégie pour identifier des traitements potentiels par des criblages basés ou non sur une cible thérapeutique, avec l'apport de l'intelligence artificielle<sup>509-511</sup>.

### **4.3. Stratégies et modes de repositionnement des médicaments**

Le repositionnement d'un médicament peut être initié selon plusieurs méthodes. Les exemples historiques reposent le plus souvent sur des découvertes fortuites, comme l'observation d'un effet secondaire non attendu lors des essais cliniques ou l'utilisation dérivée de médicaments approuvés, dite « *off-label* ». Ce phénomène est appelé sérendipité.

Aujourd'hui, les repositionnements sont majoritairement issus de stratégies de criblages plus systématiques de chimiothèques de molécules approuvées. On distingue ainsi des approches complémentaires expérimentales et computationnelles pour le repositionnement de médicaments, reposant soit sur l'analyse de la cible thérapeutique par une approche classique, voisine à celle du *drug discovery*, soit indépendamment de la cible thérapeutique par un criblage phénotypique (Figure 33)<sup>233,487</sup>. L'innovation constante en génomique, modélisation et bio-informatique permet d'apporter de nouveaux outils pour améliorer la connaissance des cibles thérapeutiques, la prédiction de l'affinité des molécules pour leurs récepteurs, mais aussi le développement de stratégies plus spécifiques au repositionnement comme les signatures transcriptomiques.

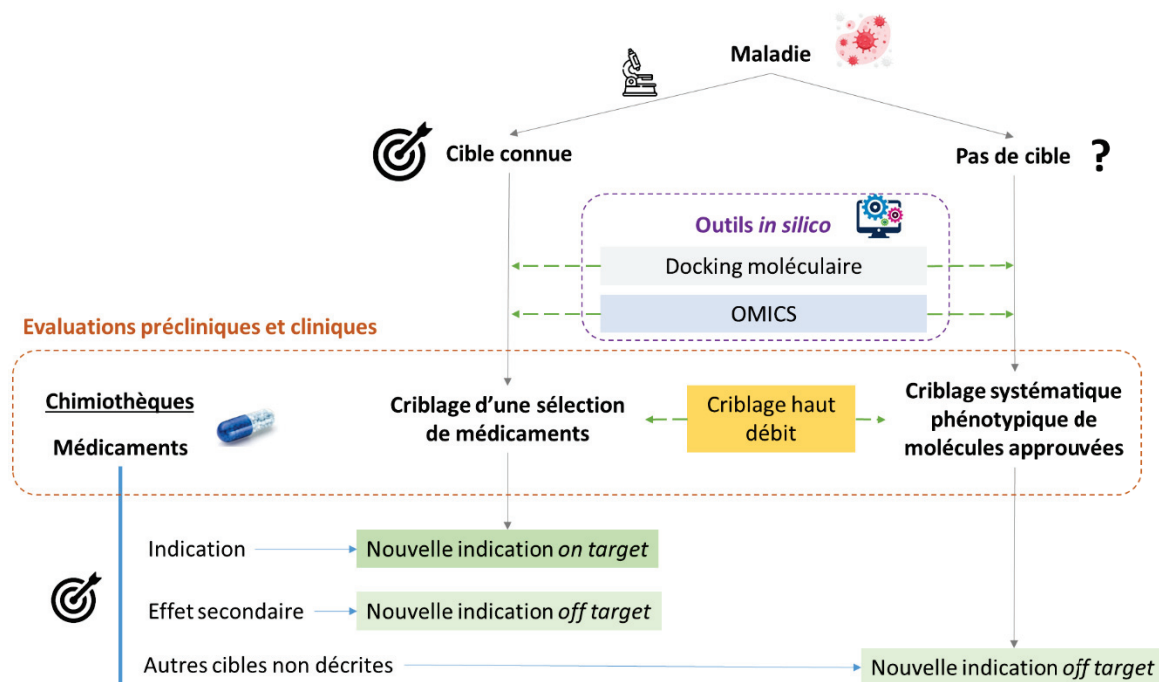


Figure 33 : Schéma des différentes stratégies de repositionnement de médicaments. Si une cible thérapeutique est identifiée au préalable, une sélection restreinte de candidats à cribler est déterminée en fonction des effets déjà connus des médicaments (indication(s) et effets secondaires) et des propriétés ADMET des composés. Dans le cas contraire, des criblages systématiques de médicaments approuvés sont réalisés. Le criblage à haut débit permet d'accélérer les étapes précliniques de criblages *in vitro*. Des outils *in silico* peuvent faciliter les étapes en amont de ce criblage, comme le docking moléculaire qui permet de simuler les interactions cibles/molécules, ou les outils Omics qui permettent notamment d'affiner la sélection des candidats par la confrontation de signatures transcriptomiques des maladies avec les signatures chimogénomiques, d'identifier une cible thérapeutique ou encore d'explorer les modes d'actions potentiels des molécules.

#### 4.3.1. La sérendipité, « découverte scientifique au hasard »

Le repositionnement de molécules existantes pour de nouvelles indications n'est pas une pratique récente. En effet, même si cette stratégie est aujourd'hui incontournable pour l'industrie pharmaceutique, quelques exemples historiques sont restés célèbres. Leurs nouveaux effets ont été découverts « par un heureux hasard » par l'observation d'effets secondaires dans le cadre des études cliniques, repositionnement en amont de l'AMM, ou pendant le suivi en pharmacovigilance conduisant à l'exploitation d'une nouvelle indication thérapeutique pour le médicament<sup>489</sup>.

Le sildénafil reste le repositionnement le plus emblématique. Développé dans les années 1980 pour le traitement des angines de poitrine, il n'a jamais atteint le marché pour cette indication. Les effets secondaires sur le dysfonctionnement érectile observés lors des études cliniques ont conduit Pfizer à repositionner cette molécule comme traitement de l'impuissance, indication pour laquelle il n'existait encore aucune molécule. Le sildénafil est alors approuvé par la FDA et le Viagra® fait son apparition sur le marché en 1998<sup>512</sup>. Il s'agit du plus gros *blockbuster* de l'industrie pharmaceutique, le plus grand succès thérapeutique de Pfizer, lui rapportant plus d'un milliard de dollars par an, et du médicament le plus contrefait du monde<sup>513</sup>. Plus récemment, le sildénafil a été approuvé pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire, sous le nom de Revatio®<sup>512</sup>.

Un autre exemple de repositionnement réussi est celui de la thalidomide, utilisée dans les années 1950 comme alternative aux barbituriques du fait de ses propriétés sédatives et hypnotiques puis prescrite comme antiémétique aux femmes enceintes dans plus de 46 pays. En quelques années, des milliers de cas de malformations congénitales ont été répertoriées et la molécule a été retirée du



marché en 1961 suite à la démonstration de son caractère tératogène<sup>514</sup>. Elle est de nouveau utilisée à partir de 1964 en dehors de son indication (prescription *off-label*) pour ses propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires démontrées par la suite. Elle fait aujourd'hui l'objet d'une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) en France pour le traitement de l'érythème noueux lépreux, des formes sévères du lupus érythémateux, la maladie de Crohn, ainsi qu'en association pour le traitement du myélome multiple et les réactions chroniques du greffon contre l'hôte<sup>515</sup>. Un dérivé synthétique, la lénalidomide, est synthétisé pour ses propriétés antinéoplasiques, antiangiogènes et immunomodulatrices. Actuellement, le potentiel de la thalidomide est toujours très étudié notamment dans le cadre du traitement des maladies secondaires à l'infection par le VIH, comme l'herpès<sup>516</sup>. Cette molécule fait partie de la catégorie des « *Multi-Target Drugs* », candidates idéales pour le repositionnement.

Enfin, nous pouvons citer l'acide acétylsalicylique, ou aspirine, connu depuis plus d'un siècle pour ses propriétés analgésiques, utilisé depuis plusieurs années comme anti-agrégant plaquettaire dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et plus récemment étudié dans les cancers colorectaux<sup>517</sup>.

#### **4.3.2. Repositionnement basé sur la cible thérapeutique**

Dans l'organisme, les médicaments interagissent avec des récepteurs membranaires ou nucléaires (protéines, canaux ioniques, enzymes, hormones ou acides nucléiques) pour provoquer un changement biologique ; on parle alors de cible(s) thérapeutique(s)<sup>518</sup>. Pour le traitement des maladies infectieuses, le médicament peut cibler directement un déterminant de l'agent pathogène ou agir sur un facteur cellulaire de l'hôte pouvant impacter la pathologie.

Le repositionnement basé sur la cible thérapeutique consiste à sélectionner et évaluer des médicaments ciblant spécifiquement ce facteur cellulaire ou viral, et repose donc sur la caractérisation préalable de sa structure ainsi que de son rôle fonctionnel dans une ou plusieurs pathologies données.

Par exemple, selon cette méthode, des inhibiteurs connus de l'activité de l'enzyme polymérase (RdRp) commune aux virus respiratoires à ARN, ont été évalués contre plusieurs virus. C'est le cas, par exemple, du favirpiravir, initialement développé pour inhiber la réplication des virus influenza, qui a été évalué pour sa potentielle activité antivirale à large spectre à l'encontre d'Ebola ou encore du SARS-CoV-2<sup>248,263,266-269</sup>. De la même manière, cette stratégie est très largement employée dans la recherche d'un traitement efficace contre la COVID-19, en ciblant la polymérase mais aussi d'autres structures comme les protéases, tel que développé dans le paragraphe 4.5.

Dans cette configuration, où la nouvelle indication thérapeutique du médicament est basée sur une cible identique à celle de son indication première, on parle d'un effet « *on-target* » (Figure 33). Alternativement, en s'appuyant sur le principe de la polypharmacologie, l'activité biologique du médicament est qualifiée de « *off-target* » lorsqu'elle est liée à son interaction avec une cible thérapeutique différente<sup>490,493,494,519</sup>.

Le plus souvent, la découverte d'une nouvelle cible thérapeutique est liée à l'observation d'effet(s) secondaire(s). C'est le cas par exemple des statines, des médicaments hypocholestérolémiants dont on a découvert les effets immunomodulateurs, actuellement évalués dans la prise en charge des formes sévères de grippe et de COVID-19<sup>520,521</sup>. Un autre exemple d'importance est celui des médicaments anti-hypertenseurs impactant l'abondance d'ACE2. En effet, ACE2 étant le récepteur d'entrée cellulaire du SARS-CoV-2, cette enzyme est considérée comme une cible thérapeutique pertinente. Elle intervient dans la balance du système rénine/angiotensine, en

contribuant à la dégradation de l'angiotensine II (ATII), responsable de la vasoconstriction et pouvant être impliquée dans l'inflammation (Figure 34)<sup>522</sup>. Tel que décrit précédemment, l'infection par le SARS-CoV-2 provoque des perturbations de cette balance, d'une part en stimulant l'expression d'ACE2 dans les muqueuses respiratoires dans les phases précoces d'infection, et d'autre part en monopolisant ACE2 dans les phases pulmonaires conduisant à une augmentation de l'abondance d'ATII impliquée dans l'hyper-inflammation et la vasoconstriction des tissus<sup>102,119,523</sup>.

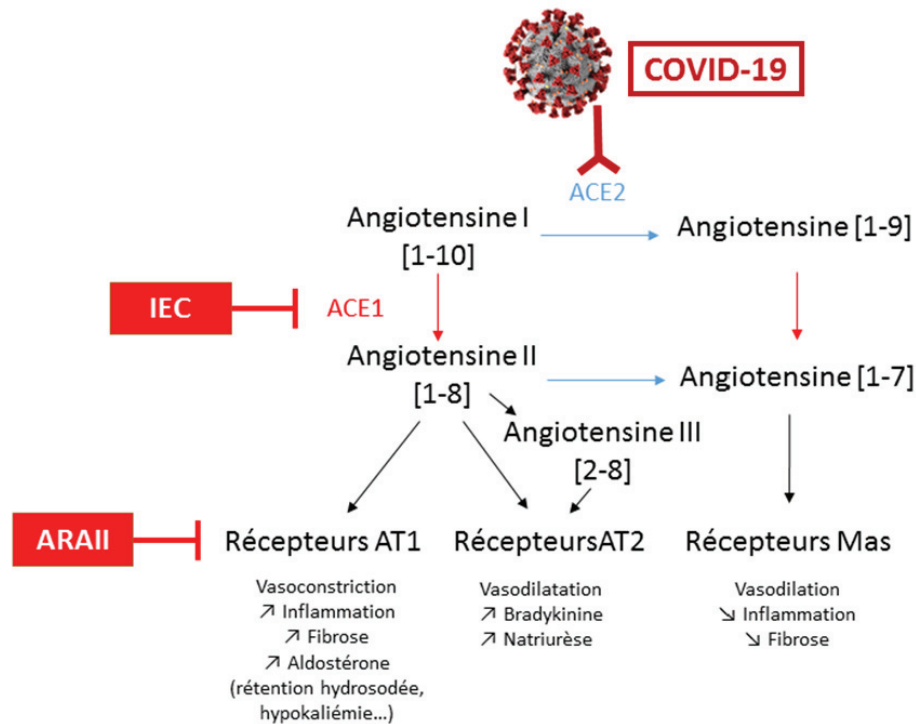


Figure 34 : Perturbation de la balance du système rénine-angiotensine par le SARS-CoV-2, d'après « Système rénine-angiotensine-aldostérone et infections à COVID-19 » par la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (2020)<sup>522</sup>. L'angiotensine II provoque la vasoconstriction et l'inflammation. Elle est régulée positivement par ACE1 et négativement par ACE2. Les médicaments inhibiteurs d'ACE1 (IEC) et bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (ARAII), indiqués dans le traitement de l'hypertension, du diabète et des maladies cardiovasculaires sont associés à une abondance plasmatique d'ACE2 libre, récepteur du SARS-CoV-2.

Deux types de traitement sont couramment prescrits contre l'hypertension, les inhibiteurs d'ACE et les bloqueurs des récepteurs de l'ATII comme le losartan ou le telmisartan. Ces médicaments ont pour conséquences d'augmenter le niveau d'ACE2. Ainsi, les patients sous traitement pourraient présenter un facteur de risque supplémentaire d'être infectés mais seraient également mieux protégés d'une détresse pulmonaire<sup>132,522,524</sup>. Ces deux hypothèses sont actuellement discutées et évaluées en clinique, tel que discuté dans le point 4.5.5.

#### 4.3.3. Criblage à haut-débit

Des plateformes à haut débit « *High-throughput screens* » (HTS) permettent d'optimiser le criblage de molécules. Il s'agit de systèmes robotisés capables de réaliser des criblages systématiques *in vitro* sur des centaines de milliers de molécules en fonction de leur structure, sélectivité, cytotoxicité et de leurs propriétés ADMET, sur la base d'une requête spécifique.

Le criblage est réalisé à partir de banques de molécules constituées par différents laboratoires ou organismes qui mettent leurs travaux à disposition du public afin d'encourager le

repositionnement. La *National Library of Medicine* détient la plus grande base de données de criblage « *PubChem* » mais nous pouvons aussi citer « *ChemBank* » ou la « *Collaborative Drug Discovery's Database* ». Dans cette dynamique, la FDA a mis à disposition dès les années 1990 le « *Orange Book* », un recueil de tous les médicaments approuvés, dans le but d'encourager les bioéquivalences<sup>525</sup>. Les grands groupes pharmaceutiques rendent également leurs chimiothèques accessibles comme Pfizer (2 984 composés) ou GlaxoSmithKline (5 853 composés orientés vers la cancérologie) avec l'objectif de motiver des collaborations<sup>526</sup>.

Le HTS permet de réaliser rapidement et à moindre coût une première sélection de molécules d'intérêt. Par exemple, l'équipe de Yamamoto a adapté son système de criblage afin de pouvoir évaluer une chimiothèque de 1 017 molécules approuvées par la FDA contre le MERS-CoV, ciblant la fusion des membranes via TMPRSS2<sup>527</sup>. L'étude décrit la mise en place d'une méthode basée sur la lignée cellulaire 293FT possédant le système d'expression « *dual split protein* », qui permet l'émission d'un double signal luminescence-fluorescence lorsqu'une cellule infectée exprimant la protéine S du MERS-CoV fusionne avec une cellule cible exprimant TMPRSS2 et CD26, adaptée à des expérimentations en plaques 384 puits. A l'issue du premier criblage avec une concentration de 1  $\mu$ M, trois composés ont permis d'inhiber la fusion des membranes à plus de 80 %. Le plus performant, le nafamostat est un inhibiteur de protéase à sérine, utilisé comme anticoagulant dans les hémodialyses. TMPRSS2 étant une protéase à sérine, le nafamostat ainsi que d'autres molécules de la même famille ont fait l'objet d'évaluations biologiques contre le MERS-CoV sur des cellules Calu-3. Le nafamostat et le camostat sont apparus comme les plus performants avec des IC50 de l'ordre du nanomolaire.

Dans le cadre du repositionnement, le criblage HTS est devenu une méthode chemoinformatique de routine de manière à identifier des molécules ayant le potentiel d'activer ou d'inhiber une cible thérapeutique déjà connue. En outre, son avènement a permis le développement des criblages systématiques phénotypiques de molécules approuvées, sans *a priori* sur une cible thérapeutique.

#### 4.3.4. Criblage systématiques phénotypiques

Dans les cas où aucune cible thérapeutique n'a été définie au préalable, la recherche d'un candidat-médicament est réalisée par un criblage systématique de molécules. Un criblage HTS peut être réalisé sans *a priori* sur la cible thérapeutique en utilisant des chimiothèques contenant un grand nombre de molécules annotées, comme par exemple la « *Prestwick Chemical Library* » contenant 1 280 médicaments approuvés par la FDA et l'EMA avec plus d'une centaine de cibles thérapeutiques différentes<sup>526</sup>. L'efficacité des composés est alors évaluée selon l'activité biologique et/ou des critères phénotypiques, telle que la réduction des effets cytopathogènes dans différents modèles d'études *in vitro* ou *in vivo*. Cette stratégie permet d'identifier rapidement des candidats potentiels, appelés « *hits* »<sup>526</sup>. La recherche et la démonstration du mode d'action des médicaments efficaces pourront être réalisées ultérieurement, à partir des informations contenues dans les banques. Cette méthode est particulièrement adaptée au repositionnement puisqu'elle permet la découverte de nouvelles capacités thérapeutiques de molécules déjà connues et utilisées, dites « *off-target* ». En revanche, le criblage HTS est souvent associé à l'utilisation de modèles expérimentaux très réductionnistes, favorisant les faux positifs. Ainsi les *hits* doivent systématiquement faire l'objet de tests précliniques complémentaires sur des modèles plus physiologiques, avant d'autres étapes de validation précliniques *in vivo*.

L'étude de Cao et al. publiée en 2015, décrit par exemple le criblage de la *NIH Clinical Collection* (727 composés) contre le MERS-CoV à l'aide d'un virus recombinant exprimant la luciférase et d'une

méthode statistique basée sur la différence moyenne strictement normalisée (SSMD)<sup>528</sup>. Les 84 candidats avec un score SSMD < -2 ont été sélectionnés pour la suite de l'étude et validés sur deux lignées cellulaires différentes. Puis, une classification a été établie en fonction de leur effet sur les phases précoces (prophylaxie, entrée) ou tardives (post entrées, réplication) d'infection. Au total, 51 composés impactaient l'entrée et 19 la réplication. L'activité antivirale des 3 meilleures molécules a été caractérisée en modèle cellulaire avec des IC50 de 11 nM pour l'homoharringtonine et 1 µM pour l'hexachlorophene et le nitazoxanide.

#### 4.3.5. Outils de criblage *in silico*

Des technologies innovantes permettent aujourd'hui d'améliorer considérablement l'efficacité des processus de repositionnement en affinant la sélection des composés en amont des étapes de criblage *in vitro*.

D'une part, des outils permettent d'améliorer la caractérisation des cibles thérapeutiques. Par exemple, l'étude récente de Gordon et al. a caractérisé par spectrométrie de masse les interactions de 26 protéines recombinantes du SARS-CoV-2 avec les cellules humaines. 332 interactions protéines-protéines ont été identifiées et ont permis de sélectionner 69 molécules candidates dont 29 déjà approuvées par la FDA<sup>529</sup>. D'autres techniques comme la cristallographie par rayons X (XRD) ou la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sont également utilisées pour identifier les groupements moléculaires d'intérêts sur les récepteurs<sup>530,531</sup>. Une représentation tridimensionnelle de la structure est obtenue contenant sa carte de densité électronique, la position des atomes avec leurs contraintes (distance, angle, torsion) et la dynamique moléculaire permettant de la stabiliser. La représentation spatiale des molécules permet de réaliser des criblages virtuels *in silico*.

Par analogie avec les techniques expérimentales classiques de criblages *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, on parle de criblage *in silico* (ou virtuel) lorsqu'on utilise des ressources informatiques (calculs et modèles informatisés) pour identifier des candidats-médicaments<sup>532</sup>. Les méthodes *in silico* constituent une aide à la prise de décision et permettent d'orienter la recherche de molécules d'intérêt par un criblage virtuel<sup>532,533</sup>. Elles reposent sur l'accès à une masse très importante de données de natures diverses (données d'expression génique, d'interactions moléculaires, structures chimiques, génétiques ou protéomiques, données cliniques) et impliquent l'analyse systématique et intégrée de ces données pour le repositionnement de médicaments.

Le criblage virtuel utilise les connaissances préétablies par la communauté scientifique et les bases de données publiques ou propriétaires pour identifier des composés avec une activité biologique particulière ou identifier de nouvelles cibles potentielles. Il exerce une fonction « d'entonnoir » en permettant une sélection restreinte de molécules d'intérêt selon une requête précise<sup>532</sup>.

Le *docking* moléculaire, détaillé ci-après, permet par exemple de réaliser des analyses prédictives d'interactions entre les médicaments et les cibles thérapeutiques. Des bases de données spécialisées permettent également d'étudier au préalable les similarités entre les molécules comme PROMISCUOUS qui met en relation les médicaments avec les effets secondaires répertoriés et les cibles visées<sup>534</sup>.

D'autre part, l'avènement des technologies de séquençage a permis l'évolution de la compréhension des maladies vers des niveaux plus profonds, en mettant en évidence les modifications spécifiques induites sur le génome, l'épigénome, le transcriptome, le protéome et le métabolome, constituant des bases de données « Omics »<sup>535</sup>. L'utilisation de ces données a révolutionné la

recherche médicale, avec des approches computationnelles intégrées, détaillées dans le paragraphe 4.3.5.2.

#### 4.3.5.1. Docking moléculaire

Le *docking* (ou ancrage) moléculaire est un outil de prédiction *in silico* qui consiste à étudier la complémentarité d'un ligand (médicament) avec sa cible (récepteur impliqué dans une pathologie)<sup>536</sup>. A partir des structures d'un ligand ou d'un récepteur, ces programmes réalisent des simulations d'interactions avec des chimiothèques de molécules choisies, en utilisant les principes de complémentarité stérique et d'interactions moléculaires, pour prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules sélectionnées par rapport à la cible d'intérêt<sup>537,538</sup>. Les *Protein Data Bank* et *Drug Bank* sont les ressources les plus utilisées, contenant respectivement plus de 185 000 structures biologiques dont 16 000 en XRD et plus de 500 000 molécules<sup>539,540</sup>. L'ancrage est dit classique lorsque plusieurs ligands sont interrogés contre une même cible dans des bases de données. En revanche, on parle d'ancrage inverse lorsque des bibliothèques de molécules sont explorées contre un ensemble de différents récepteurs cibles (plusieurs cibles et un ligand). Le *docking* doit permettre de classer les ligands par ordre décroissant d'affinité prédite de façon à sélectionner les interactions d'intérêt. La fonction *scoring*, déterminée par des algorithmes de calculs, permet ensuite d'estimer la complémentarité ligand-protéine dans les complexes. Le plus souvent, elle est égale à l'estimation du gain d'énergie libre du ligand en interaction avec le récepteur par rapport à la forme libre. Le résultat est ensuite normalisé reposant sur les similarités de formes, distances entre les structures et ligands, par un score allant de 0 à 1. Des équations réalisent ensuite une prédiction de l'activité expérimentale de ces molécules afin de corriger ce score. Si le score est de 1, le test des ligands est considéré comme non-liant.

Le *docking* est une technique de criblage très utilisée en *drug discovery*, adaptable dans le cadre du repositionnement des médicaments. Cela reste cependant une simulation informatique et le complexe protéine-ligand avec la plus faible énergie n'est pas toujours la meilleure alternative. Les molécules sélectionnées doivent ensuite être testées *in vitro* afin de déterminer leur réelle activité.

Le naproxène constitue un bon exemple de repositionnement contre influenza par une approche de *docking* moléculaire. La structure par XRD de la protéine d'ancrage de l'ARNv (NP), essentielle à la réplication et hautement conservée entre les souches, a été modélisée afin d'identifier des sites de fixations potentiels pour un inhibiteur. Le choix s'est porté vers une chaîne aromatique composée des résidus Y148, R361, R355, et R152, dans laquelle une seule mutation suffit à stopper la réplication virale. Un *docking in silico*, réalisé à partir d'une banque de 100 337 composés de Sigma Aldrich, a permis d'identifier le naproxène, un inhibiteur de COX 2, anti-inflammatoire non stéroïdien comme inhibiteur compétitif de la liaison NP-ARN avec un niveau similaire d'énergie d'interaction<sup>541</sup>. Des effets antiviraux encourageants ont ensuite été décrits *in vitro* en cellules MDCK et *in vivo* en modèles murins, notamment sur la réduction des hémorragies pulmonaires.

Également, deux études récentes ont utilisé cette technique pour identifier des candidats-médicaments contre une protéase du SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup> ou protéase 3C-like), considérée comme une enzyme clé pour la réplication et la transcription virale<sup>530,542</sup>. L'équipe de Pinzi a utilisé la structure de la protéase obtenue par XRD et publiée dans *Protein Data Bank* pour réaliser un criblage *in silico* de composés de DrugBank par *docking* moléculaire<sup>510</sup>. Les résultats décrivent l'identification de 22 candidats potentiels, déjà décrits comme antiparasitaires ou antiviraux contre le VIH ou d'autres CoV. Les auteurs soulignent qu'un bénéfice « polypharmacologique » apporté par la première indication, pourrait être pertinent comme dans les cas des composés anti-thrombotiques ou anti-inflammatoires.

Très récemment, l'équipe de Ray a utilisé ces mêmes données pour réaliser un criblage de molécules approuvées par la FDA, choisies dans les chimiothèques de DrugBank 5.0 et SuperDrug2<sup>543</sup>. Le *docking* moléculaire a permis la sélection de 53 candidats, dont 5 à fort potentiel avec des scores d'affinité < - 8 : velpatasvir, glecaprevir, grazoprevir, baloxavir marboxil, et danoprevir. L'analyse approfondie des énergies de liaison a souligné le meilleur potentiel pour deux molécules : glecaprevir et nelfinavir. Toutefois les auteurs suggèrent de n'écarter aucun des 53 candidats sélectionnés pour les évaluations biologiques.

#### 4.3.5.2. Outils Omics

Les technologies de séquençage permettent la caractérisation de signatures « Omics » des maladies ou des médicaments, c'est-à-dire l'ensemble des modifications spécifiques induites par une molécule ou une pathologie donnée au niveau du génome, de l'épigénome, du transcriptome, du protéome ou du métabolome<sup>535</sup>. Des analyses *in silico* permettent de comparer ces signatures avec celles d'un autre médicament, d'une autre maladie ou d'un autre phénotype clinique afin d'identifier des candidats, de nouvelles cibles thérapeutiques ou des nouveaux modes d'actions des médicaments.

L'utilisation de signatures transcriptomiques pour l'identification de nouveaux antiviraux constitue un axe majeur des recherches menées au sein du Laboratoire VirPath. La transcriptomique consiste en l'analyse quantitative et qualitative des ARN transcrits (ARNm) à partir de l'ADN cellulaire, en réponse à des stimuli spécifiques pouvant modifier leur expression (maladie, infection, traitement). La signature transcriptomique est une analyse différentielle des transcrits entre deux états cellulaires<sup>544</sup>. Pour quantifier ces niveaux d'expression, trois types d'analyses sont possibles (Figure 35)<sup>532</sup> :

- (i) L'expression des gènes entre deux conditions physiologiques (sain vs malade par exemple)
- (ii) L'expression des gènes au cours du temps (suivi longitudinal d'une infection par exemple)
- (iii) Une généralisation de l'analyse différentielle entre plusieurs conditions ou types cellulaires

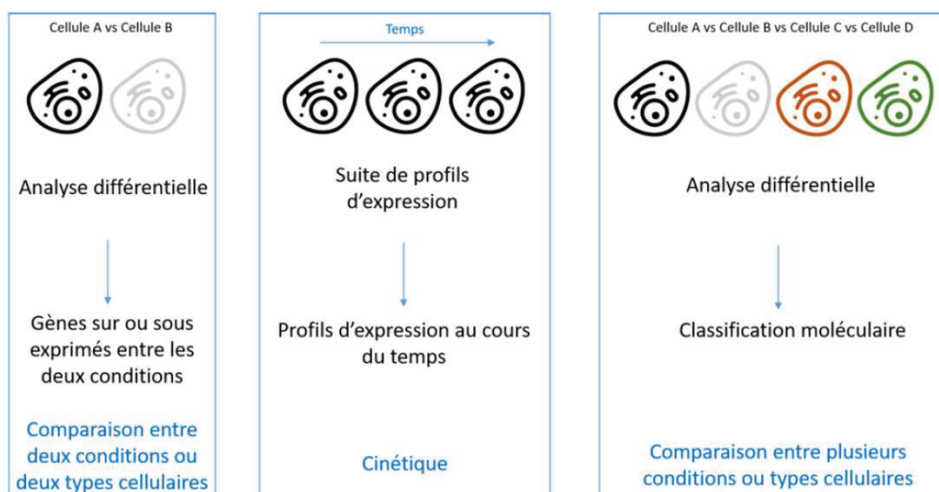


Figure 35 : Analyses quantitatives et transcriptome, d'après Claire Nicolas de Lamballerie<sup>532</sup>. De gauche à droite : (i) analyse différentielle permettant d'identifier les gènes exprimés différemment entre 2 conditions (ou 2 types cellulaires) (ii) analyse de l'expression au cours du temps permettant d'obtenir des cinétiques de profils d'expression (iii) généralisation de l'analyse différentielle ou classification moléculaire, où l'expression des gènes de plusieurs types cellulaires est comparée à des fins de classification et d'explication de phénotype (identification de groupes de gènes qui pourraient être des marqueurs moléculaires).

Ces données de transcriptomique sont rassemblées dans des bases de données accessibles pour réaliser des analyses comparatives et ainsi identifier :

- (i) De potentiels traitements : des médicaments possédant une signature transcriptomique anticorrélée à celle de la maladie ont le potentiel d'inverser son impact (évolution de la maladie, symptômes).
- (ii) Des cibles thérapeutiques d'intérêt : la maladie ou l'infection exerce des impacts transcriptomiques sur des voies de signalisations cellulaires ou des gènes pouvant constituer des cibles thérapeutiques. L'identification de cibles communes peuvent guider vers le développement de traitements à large spectre.
- (iii) De nouveaux modes d'action des médicaments : l'analyse de la signature transcriptomique d'un médicament peut mettre en évidence la modulation de voies de signalisations ou de gènes cellulaires spécifiques d'un mode d'action encore non décrit.

La plateforme « *Connectivity Map* » (CMap) du *Broad Institute* a été créée en ce sens, regroupant 1.5 millions de profils transcriptomiques de plus de 5 000 molécules sur diverses lignées cellulaires<sup>545-547</sup>. Notre équipe a utilisé cet outil pour comparer la signature transcriptomique d'infection des virus influenza et ainsi obtenir une liste de molécules candidates avec un potentiel antiviral (Résultats).

Plus récemment, et selon une méthode similaire à la nôtre, l'étude de Chen et al. a utilisé des données de transcriptomiques préalablement publiées, issues de cellules A549 et A549-ACE2 et d'épithéliums pulmonaires infectés par le SARS-CoV-2 pour constituer une liste de candidats potentiellement antiviraux par une analyse via CMap<sup>548</sup>. La liste principale de candidats a ensuite été réduite en utilisant des données publiées de l'interactome du SARS-CoV-2 sur QuartataWeb et l'interface d'interaction protéines-protéines BioSNAP. Les modules relatifs à l'entrée virale, la réplication et transcription, la modulation du signal cellulaire et la réponse immune ont été priorisés pour évaluer l'anticorrélation des candidats. Une liste restreinte de 13 molécules a finalement été établie après une revue de la littérature, dont 8 déjà approuvés par la FDA et 5 en cours de développement. L'étude met en évidence l'activité antivirale *in vitro* sur des cellules VeroE6 du salmeterol, du rottlerin et d'inhibiteurs de mTOR (Temsirrolimus et torin-1), ainsi que les capacités des composés linsitinib, imipramine, hexylresorcinol, ezetimibe, et brompheniramine à interagir avec l'entrée du virus. Les auteurs soulignent également les capacités anti-inflammatoires du linsitinib et émettent l'hypothèse que la stimulation de l'autophagie pourrait constituer une cible potentielle pour limiter l'échappement des coronavirus au système immunitaire.

#### 4.4. Exemples de repositionnement pour le traitement de la grippe

Actuellement, la littérature fait état de 17 médicaments décrits comme candidats pour leur repositionnement contre la grippe. La plupart des études s'appuient sur des résultats précliniques (metformine, gemcitabine, dapivirine, acide nalidixique, dorzolamide, ruxolitinib, lisinopril, etanercept, trametinib, gemfibrozil), mais quelques candidats-médicaments dans des phases plus avancées de développement clinique sont répertoriés dans le Tableau 9 ci-dessous<sup>233</sup>.

Tableau 9 : Médicaments candidats à un repositionnement comme antiviral contre les virus influenza, d'après Pizzorno et al. (2019)<sup>233</sup>. Seuls les médicaments en phases avancées de développement (Phases II ou III) sont listés. En majorité, ils exercent une action immunomodulatrice ciblant l'hôte, liée ou non à leur indication première, permettant de réduire l'inflammation ou d'activer la réponse innée de l'hôte. Leurs propriétés antivirales et immunomodulatrices en font des candidats de choix pour un repositionnement contre d'autres virus respiratoires et leur potentiel est activement étudié dans le contexte de la pandémie de SARS-CoV-2.

Médicament	Indication première	Mécanisme d'action	Approche de repositionnement	Mécanisme d'action antiviral	Phase de développement
<b>Statines</b> Atorvastatin Simvastatin	Hypocholestérolémiant	Inhibiteur de $\beta$ -Hydroxy $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase	Sérendipité	Immunomodulateur	Phase II <sup>521</sup>
<b>Nitazoxanide</b>	Antiparasitaire Hépatite C chronique	Inhibition du pyruvate	Sérendipité	Inhibiteur de la maturation et du transport de la HA	Phases II/ III <sup>306,307,549</sup>
<b>LASAG (BAY81-87981)</b>	Anti-inflammatoire	Inhibiteur d'NFkB	Sérendipité et cible thérapeutique	Inhibiteur d'NFkB	Phase II <sup>550</sup>
<b>Célécoxib</b>	Anti-inflammatoire	Inhibiteur de COX2	Cible thérapeutique	Immunomodulateur	Phase III <sup>551,552</sup>
<b>Naproxen</b>	Anti-inflammatoire non stéroïdien  Développement clinique contre le cancer	Inhibiteur de COX2	Cible thérapeutique assisté <i>in silico</i>	Inhibiteur de l'ancrage de l'ARN sur NP	Phase III <sup>553-555</sup>
<b>Midodrine</b>	Anti-hypertenseur	Agoniste des récepteurs adrénergiques alpha	Criblage phénotypique assisté <i>in silico</i>	Immunomodulateur ?	Phase II <sup>556</sup>
<b>Diltiazem</b>	Anti-hypertenseur	Inhibiteur des canaux calciques	Criblage phénotypique assisté <i>in silico</i>	Immunomodulateur Stimule la voie des interférons	Phase II <sup>557</sup>

Les **statines** sont des médicaments hypocholestérolémiants prescrits dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Leur action anti-lipidique s'accompagne d'effets anti-inflammatoires, notamment par une diminution significative de l'IL-6, IL-8, TNF et de la sous-unité p65 de NFkB, observée chez des patients traités par la simvastatin<sup>558</sup>. Une étude de 2014 a mis en évidence des propriétés antivirales du médicament *in vitro*, par l'inhibition de la prénylation des protéines RhoA et Rab nécessaires aux mécanismes d'endocytose et une stimulation de la protéine LC3 impliquée dans l'autophagie<sup>559</sup>. Néanmoins, malgré de nombreuses études rétrospectives et interventionnelles, les résultats cliniques n'ont pour l'instant pas permis de certifier leur rôle protecteur de manière significative dans la prise en charge des infections sévères par influenza. Les résultats d'un essai



clinique de phase II (NCT02056340), évaluant les effets de l'atorvastatine chez des patients infectés par des virus influenza, publiés en 2019, indiquent une réduction non significative des marqueurs d'inflammation 72h post traitement<sup>521</sup>. En revanche, leur administration chez des patients en réanimation pour des cas de pneumonies ou de sepsis pourrait conduire à une diminution de la mortalité et des soins d'oxygénothérapie<sup>560-563</sup>. L'usage des statines est aujourd'hui étudié dans la réduction de l'inflammation dans les cas graves de COVID-19, comme le souligne l'étude rétrospective de Tan qui décrit une maladie moins sévère chez les patients sous traitement<sup>520</sup>.

Le **nitazoxanide** est connu depuis les années 1980 pour son activité antiparasitaire à large spectre mais ses propriétés contre influenza n'ont été rapportées qu'à partir de 2009<sup>302,564</sup>. Il inhibe la fonction de la protéine ERp57 du RE, essentielle à la maturation de la HA virale, impactant ainsi le trafic intracellulaire et son insertion dans la membrane plasmique de l'hôte. Son action dirigée contre l'hôte lui confère une activité à large spectre, démontrée *in vitro* contre 210 souches d'influenza circulants, y compris porteuses de mutations de résistances contre les INA (H275Y, I223R, E119V, Q136K, D197N)<sup>303,565</sup>. En clinique, une étude de phase II (NCT02612922) a mis en évidence un bénéfice du nitazoxanide sur la réduction des symptômes chez des patients atteints de grippe non sévères<sup>549</sup>. Tel que mentionné précédemment, son association avec les INA a été évaluée dans le cadre de deux études, chez les patients non sévères lors d'un essai clinique de phase III (NCT01610245) terminé en 2015 dont les résultats n'ont pas été publiés<sup>307</sup> et chez les patients sévères hospitalisés dans un essai de phase II (NCT02057757) terminé en 2018 où l'association n'a pas apporté de bénéfice au standard de soins<sup>306</sup>.

Un dérivé de l'aspirine, le **LASAG** (BAY81-8781, *Lysine acetylsalicylate glycine*) a permis une diminution de l'inflammation et une réduction de la réplication virale d'influenza par son action sur la voie de signalisation cellulaire IKK/NFκB en modèle murin<sup>566</sup>. Un essai clinique de phase II a récemment démontré des améliorations apportées par le médicament en inhalation par rapport au placebo sur le délai de réduction des symptômes (38.3 heures contre 56.2 heures) et l'atténuation des signes cliniques (24.9 heures contre 44.1 heures) de la grippe<sup>550</sup>.

Le **célécoxib**, un anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibiteur de COX-2 a présenté des activités immunomodulatrices chez la souris infectée par influenza<sup>567</sup>. L'association du célécoxib avec l'oseltamivir a fait l'objet d'un essai de phase III (NCT02108366) entre 2014 et 2018 sur des patients atteints d'une infection grave par IAV<sup>551</sup>. Les résultats définitifs n'ont pas été publiés mais une communication de congrès indique une réduction significative de la mortalité dans le groupe traité par la combinaison, sans augmentation des effets secondaires<sup>552</sup>.

Un autre inhibiteur de COX-2 présente des perspectives intéressantes contre la grippe, le **naproxène**, dont l'approche de repositionnement par *docking* a été décrite précédemment<sup>541</sup>. L'étude de Zheng et al. a récemment confirmé l'efficacité à large spectre du médicament contre de nombreuses souches de virus influenza et a notamment souligné sa haute affinité avec la NP des virus B, interférant avec l'export nucléaire de la protéine en interaction avec l'effecteur cellulaire CRM1<sup>568</sup>. Un essai clinique de phase III a évalué son efficacité en combinaison avec la calrithromycin et l'oseltamivir en comparaison du traitement de référence à l'oseltamivir seul chez les adultes hospitalisés pour une grippe à H3N2<sup>553</sup>. Les résultats ont souligné une réduction significative de la mortalité à 30 puis à 90 jours dans le bras traité par la trithérapie. Un essai similaire s'est tenu entre 2017 et 2020 sur une population pédiatrique (NCT04315194). Les résultats décrivent une réduction du délai de l'amélioration des symptômes et un déclin plus précoce de la charge virale<sup>554,555</sup>. Par ailleurs, des dérivés du naproxène (A et C0) ont été synthétisés pour conserver l'activité antivirale de la molécule sans inhiber COX-2, dont l'activité a été décrite comme bénéfique pour l'activité

antivirale<sup>569,570</sup>. Ainsi, le naproxène CO s'est montré plus efficace et moins toxique que le naproxène originel contre les IAV en modèle cellulaire.

En résumé, le repositionnement de médicaments dans la prise en charge de la grippe présente de belles perspectives. Néanmoins, malgré un nombre conséquent d'essais cliniques initiés, aucun résultat véritablement concluant n'a été rapporté à ce jour.

Ce constat souligne le besoin de développer de nouvelles stratégies, notamment en s'éloignant du paradigme de la cible thérapeutique au profit d'approches plus globales, basées par exemple, sur la modulation des voies cellulaires.

Notre équipe du laboratoire Virpath s'est engagée depuis plusieurs années dans cette démarche, en exploitant les modulations viro-induites de l'expression des gènes de la cellule-hôte, les signatures virogénomiques, et celles induites par une ou plusieurs molécule(s), les signatures chemogénomiques, dans le but d'identifier des médicaments candidats au repositionnement comme antiviraux. Par cette approche, nous avons identifié deux médicaments avec un potentiel antiviral contre les virus influenza, la **midodrine** et le **diltiazem**, menés jusqu'en phase II d'essais cliniques (Résultats).

Le diltiazem est aujourd'hui le seul médicament repositionné contre la grippe toujours en cours d'évaluation clinique. Il a constitué le sujet central de mon travail de thèse. La caractérisation de son mode d'action sur l'induction des interférons profile les perspectives antivirales à large spectre de ce médicament, qui pourrait constituer un atout conséquent dans la lutte contre le SARS-CoV-2.

#### **4.5. Exemples de repositionnement pour le traitement de la COVID-19**

Face à un virus émergent, l'identification et la mise sur le marché d'outils prophylactiques et thérapeutiques peuvent être longues. Le repositionnement de médicaments, qui permet d'identifier rapidement et à moindre coût des candidats efficaces, a ainsi constitué une stratégie prioritaire dans les premiers mois de la pandémie de COVID-19<sup>511</sup>.

Les principales approches de repositionnement sont basées sur l'évaluation d'inhibiteurs des cibles thérapeutiques connues du SARS-CoV-2 comme la polymérase (RdRp) ou la protéase 3C-like (nsp5), mais aussi les inhibiteurs de facteurs cellulaires intervenant dans l'entrée ou la réplication du virus (ACE2, TMPRSS2, voie des importines) ou des médicaments modulateurs de l'inflammation. De très nombreux candidats sont actuellement en développement<sup>128,511,571,572</sup>. Les composés dans les phases les plus avancées sont rassemblés dans le Tableau 10, ci-après.

Tableau 10 : Médicaments repositionnés ou candidats au repositionnement contre la COVID-19, d'après les revues Singh et al. (2020), Siddiqui et al. (2020), Han et al. (2021) et Salian et al. (2021)<sup>128,511,571,572</sup>. Seuls les composés en phases avancées de développement sont listés (phases III et IV ou approuvé), à l'exception du diltiazem proposé par notre équipe.

Médicament	Indication première	Mécanisme d'action/Cible	Approche de repositionnement	Mécanisme d'action antiviral	Phase de développement
Remdesivir	Ebola (Phase III)	RdRp (réplication)	Cible	RdRp (réplication)	Approuvé par la FDA
Molnupiravir	Antiviral large spectre (préclinique)				Approuvé par la FDA
Favipiravir	Influenza Antiviral large spectre				Phase III Approuvé (Japon, Chine, Inde et Russie)
Ribavirine	Antiviral large spectre				Phases II/III
Sofosbuvir	Hépatite C		Docking moléculaire basé sur la cible RdRp		Phase III
Lopinavir-ritonavir	Thérapies antirétrovirales contre le VIH	Inhibiteurs de protéase (entrée)	Docking moléculaire basé sur la cible M <sup>pro</sup>	Protéase (entrée)	Phases III/IV
Darunavir-cobicistat					Phase III
Umifenovir	Influenza	Inhibiteur de fusion (entrée)	Cible	Inhibiteur de fusion (entrée)	Phases III/IV
Chloroquine	Antiparasitaire contre la Malaria	Liaison à la ferriprotoporphyrine IX, complexe toxique pour les parasites sanguins	Sérendipité	Interaction avec ACE2 et les acides sialiques (entrée)	Phases III/IV
Hydroxychloroquine	Anti-inflammatoire Polyarthrite rhumatoïde, lupus	Blocage des récepteurs Toll			Phases III/IV
Nafamostat Camostat mesylate	Anticoagulants utilisés dans l'hémodialyse Pancréatite	Inhibiteur de protéase à sérine	Cible, ciblage HTS	Inhibiteurs de TMPRSS2 (entrée, fusion des membranes)	Phase III
Nitazoxanide	Antiparasitaire Hépatite C chronique Phases II/III contre influenza	Inhibition du pyruvate	Sérendipité	Fusion	Phases III/IV
Ivermectin	Anthelminthique	Canaux chlorure glutamate-dépendants Paralysie neuromusculaire des parasites	Cible	Import nucléaire des vRNP Autres cibles ?	Phases III/IV
Naproxen	Anti-inflammatoire non stéroïdien Développement clinique contre le cancer et influenza	Inhibiteur de COX2	Cible thérapeutique assisté <i>in silico</i>	Inhibiteur de l'ancrage de l'ARN sur N	Phase III

<b>Losartan</b> <b>Telmisartan</b>	Anti-hypertenseurs approuvés dans la prise en charge du diabète, de l'HTA et des maladies cardiovasculaires	Agoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine II	Cible	Augmentation d'ACE2 pulmonaire	Phase IV
<b>Statines</b> <b>Atorvastatin</b> <b>Simvastatin</b>	Hypocholestérolémiants	Inhibiteurs de $\beta$ -Hydroxy $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase	Sérendipité	ACE2 Immuno-modulateur	Phase III
<b>Dexamethasone</b>	Anti-inflammatoire	Corticoïdes, inhibition de l'expression des gènes pro-inflammatoire			Phases III/IV
<b>Méthylprednisolone</b>					Phases III/IV
<b>Budesonide</b>	Anti-inflammatoire indiqué dans le traitement de l'asthme par inhalation	Corticoïde, synthèse de macrocortine, bloque la synthèse des leucotènes (médiateurs de l'inflammation lipidiques)	Cible	Immuno-modulateurs	Phases III/IV
<b>Tocilizumab</b>	Polyarthrite rhumatoïde	Anticorps monoclonal dirigé contre IL-6	Cible	Inhibiteur d'IL-6	Phases III/IV
<b>Ruxolitinib</b>	Néoplasies myéloproliférative	Inhibiteurs de JAK	Cible	Tempête cytokinique	Phase III
<b>Baricitinib</b>	Dermatites atopiques Polyarthrites rhumatoïdes				Phases III/IV
<b>Azithromycin</b>	Antibiotique de la famille des macrolides	50 S du ribosome bactérien	Sérendipité	Anti-inflammatoire	Phases III/IV
<b>Doxycycline</b>	Antibiotique de la famille des tétracyclines	30 S du ribosome bactérien			Phases III/IV
<b>Diltiazem</b>	Anti-hypertenseur	Inhibiteur des canaux calciques	Criblage phénotypique assisté in silico	Immuno-modulateur Stimule la voie des interférons	<i>Essai de phase II en préparation</i>

#### 4.5.1. Inhibiteurs de polymérase

La polymérase virale (RdRp) est hautement conservée entre les CoV. En effet, la séquences d'AA de la nsp 12 du SARS-CoV-2 comporte 96 % d'identité avec celle du SARS-CoV et 71 % avec celle du MERS-CoV<sup>573</sup>. Ainsi, les inhibiteurs nucléosidiques de cette enzyme déjà décrits ont constitué des candidats d'intérêt pour un repositionnement antiviral<sup>574</sup>.

C'est le cas du **remdesivir** (Veklury®, Gilead ; GS-5734), prodrogue d'un analogue d'adénosine, le nucléoside triphosphate (NTP), initialement développé contre Ebola<sup>308,575</sup>. L'incorporation du triphosphate dans l'ARN provoque la terminaison de la chaîne d'élongation, mettant fin à la réplication virale<sup>575,576</sup>. Ce mécanisme d'action fait du NTP un antiviral à large spectre, déjà décrit *in vitro* et *in vivo*

contre plusieurs familles de virus à ARN (Filo-, Pneumo-, et Paramyxoviruse), mais aussi l'hépatite C, le virus diarrhéique bovin (BVDV), et des CoV humains et zoonotiques (MERS, SARS et CoV de chauve-souris)<sup>576-579</sup>. L'étude de Gordon et al. a permis de confirmer l'interaction du remdesivir avec la RdRp du SARS-CoV-2, ainsi que son incorporation dans l'ARN en de multiples sites, conduisant à l'apparition d'une terminaison dans l'ARN répliatif en position i+3 post incorporation<sup>573</sup>. *In vitro*, le remdesivir est très actif avec une concentration efficace médiane (EC50) < 1 µM<sup>580</sup>. Ainsi, il a rapidement été considéré comme un candidat intéressant et a fait l'objet de nombreux essais cliniques de phase III (NCT04257656, NCT04292899, NCT04257656) en 2020<sup>572,581</sup>.

Notamment, le médicament a fait partie de la première sélection de composés inclus dans l'essai clinique mondial supervisé par l'OMS, *Solidarity*, avec l'objectif de réduire la mortalité chez les patients hospitalisés souffrant d'une COVID-19 sévère<sup>582</sup>. Malheureusement, les résultats n'ont pas démontré d'effet significatif du remdesivir sur la mortalité à J28<sup>583</sup>. D'autres études réalisées chez des patients avec une COVID-19 modérée (NCT04292730, NCT04280705), ont démontré une amélioration sur le délai de disparition des symptômes chez les patients traités (10 jours contre 15), sans toutefois démontrer de différence significative entre des posologies de 5 ou 10 jours<sup>584,585</sup>.

Les connaissances acquises sur la cinétique de la maladie nous permettent de comprendre que les objectifs compassionnels de ces essais, incluant des patients jusqu'à 12 jours après l'apparition des symptômes, déjà dans des phases pulmonaires et inflammatoires, n'étaient pas adaptés à l'évaluation de ce médicament, très efficace *in vitro* sur la réplication du virus et donc dans les phases précoces d'infection<sup>586</sup>. En effet, l'étude de Wit et al. a comparé l'efficacité du remdesivir contre le MERS-CoV en primates non humains selon deux protocoles de traitements de 6 jours : prophylactique avec début du traitement 24h avant inoculation, ou curatif avec début du traitement 12h post infection<sup>587</sup>. Les deux protocoles ont montré une efficacité significative avec une réduction de la charge virale pulmonaire et des signes cliniques. Le protocole prophylactique a montré de meilleurs résultats avec une réduction de plus de 2 log10 de virus/g de poumon et une réduction très importante des lésions pulmonaires. Les auteurs soulignent ainsi l'importance d'administrer le médicament dans les phases précoces d'infection.

En revanche, il est à noter que, du fait de sa pharmacocinétique, le remdesivir est administré uniquement par voie intraveineuse et nécessite donc une prise en charge hospitalière, non compatible avec un usage de ville et précoce du médicament<sup>588</sup>. Finalement, le remdesivir a été le premier médicament approuvé par la FDA en octobre 2020, pour le traitement de la COVID-19 nécessitant une hospitalisation<sup>589</sup>. L'EMA a, quant à elle, émis une AMM conditionnelle en juillet 2020 pour les patients sévères sous oxygénothérapie, dans l'attente de nouveaux résultats cliniques<sup>310</sup>. L'OMS a cependant déconseillé son utilisation en novembre 2020, faute de preuve significative de son efficacité<sup>311</sup>. Un essai clinique de phase III est en cours pour évaluer la sécurité d'administration, la tolérance et la pharmacocinétique du traitement dans la population pédiatrique<sup>590</sup>.

Très récemment, un autre composé a reçu l'autorisation de la FDA pour le traitement des cas modérés de COVID-19 chez l'adulte, avec un risque élevé de d'évolution vers une forme grave et pour lesquels il n'existe aucune autre alternative de traitement<sup>309</sup>. Il s'agit du **molnupiravir** (EIDD-2801) dont le métabolite actif (EIDD-1931) est un analogue nucléosidique de cytidine (β-d-N4-hydroxycytidine ; NHC) déjà décrit comme antiviral *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs virus à ARN (alphavirus, influenza, RSV, Chikungunya, l'hépatite C et le coronavirus)<sup>591-596</sup>.

La NHC s'incorpore dans l'ARN viral induisant des mutations délétères pour la réplication virale, par l'augmentation de mutations transitoires de types G : A et C : U<sup>592,596,597</sup>. Son activité n'est pas perturbée par celle de l'ExoN, mise en cause dans la résistance de certains antiviraux avec le même

mode d'action comme la ribavirine, suggérant une interaction différente avec les acides nucléiques et un risque diminué d'apparition de mutations de résistance<sup>593,598</sup>. L'efficacité de la NHC a été validée *in vitro* contre le SARS-CoV-2 sur des cellules Calu-3 avec une IC50 de 0.08 µM et sur des épithéliums pulmonaires reconstitués avec une réduction de 3 log<sub>10</sub> PFU/mL<sup>392</sup>. *In vivo*, le molnupiravir permet une réduction très significative (3 log<sub>10</sub>) de la charge virale mesurée dans les sécrétions nasales dès 36h post traitement, inhibant ainsi la transmission du virus chez le furet<sup>599</sup>. Les essais cliniques de phase III, évaluant l'efficacité du traitement sur des adultes non hospitalisés atteints de COVID-19 modérée, avec un risque de développer des formes sévères (NCT04575597) ont mis en évidence l'efficacité du traitement, avec la diminution de 50 % du risque d'hospitalisation (7.3 % contre 14.1 % avec le placebo) et de la mortalité (6.8 % contre 9.7 % avec le placebo)<sup>600,601</sup>.

Ces résultats positifs ont encouragé Merck à soumettre une demande d'autorisation d'utilisation d'urgence à la FDA en octobre 2021, acceptée en décembre<sup>602</sup>. A la différence du remdesivir, le molnupiravir est administré par voie orale et donc mieux adapté à un usage de ville, permettant ainsi la mise en place du traitement dans les phases précoces d'infection. Cependant, l'étude de Zhou et al. alerte sur la possibilité de synthèse d'un précurseur d'ADN, le dNHC (forme 2'-deoxyribose de la NHC), comme potentiel agent mutagène pour les cellules de l'hôte en division<sup>603</sup>. Les auteurs recommandent une étude approfondie de ces risques et de limiter l'usage de ce médicament à une population restreinte.

D'autres molécules antivirales avec le même mécanisme d'action sur la polymérase virale sont également en cours d'évaluation, comme le **favipiravir** ou la **ribavirine**. Leurs principes actifs respectifs, un dérivé de pyrazine, analogue de purine (ribofuranosyl-5B-triphosphate (favipiravir-RTP)) et un analogue de guanosine (ribavirin-RTP), s'incorporent à l'ARN viral induisant des mutations délétères pour la réplication<sup>604-606</sup>. Ces deux composés comportent également une bonne affinité avec RdRp mais sont moins bien incorporés dans l'ARN, obligeant ainsi à utiliser de plus grandes concentrations de principes actifs pour obtenir une inhibition de la réplication (EC50 = 109.5 et 61.88 µM, respectivement)<sup>573</sup>.

Le favipiravir a fait l'objet de nombreuses études cliniques de phase III dont certaines avec des résultats *a priori* encourageants<sup>269,607</sup>. D'après <https://clinicaltrials.gov/>, 10 études évaluant le favipiravir contre la COVID-19 sont terminées. Deux essais réalisés sur des patients hospitalisés non sévères ont mis en évidence une réduction du délai symptomatique face à un placebo (5 contre 7 jours)<sup>608</sup> ; et une réduction importante du délai de clairance virale (4 jours contre 11 jours dans le groupe contrôle traité avec du lopinavir-ritonavir) associée à une amélioration de la condition pulmonaire observée par radiographie 14j post traitement<sup>609</sup>. 16 études sont encore en cours ou en phase de recrutement. Le médicament est déjà approuvé pour le traitement des patients souffrant d'une COVID-19 modérée au Japon, en Inde, en Chine et en Russie, mais la FDA et l'EMA sont dans l'attente de nouvelles données plus robustes<sup>610</sup>.

La ribavirine est moins utilisée en clinique du fait de son index thérapeutique plus restreint et de son efficacité limitée par l'activité de l'ExoN<sup>598,604</sup>. Elle apparaît dans des essais cliniques de phases II et III, notamment dans le but d'évaluer son bénéfice en combinaison avec du nitazoxanide, de l'hydroxychloroquine, de l'interféron β ou de l'ivermectine.

Nous pouvons également citer le **sofosbuvir**, un analogue d'uridine approuvé contre l'hépatite C depuis 2013, identifié par plusieurs études de *docking* moléculaire comme antiviral potentiel contre le SARS-CoV-2<sup>611,612</sup>. Son intérêt clinique a été évalué dans quelques études de phase III, en particulier en association avec le daclatasvir ou le ledipasvir, en développement contre l'hépatite C. Des effets encourageants sur la réduction de la mortalité motivent la poursuite des études<sup>613-615</sup>.

#### 4.5.2. Inhibiteurs de protéase

La protéase majeure du SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup> ou protéase 3C-like), enzyme clé pour la réplication et la transcription virale constitue également une cible thérapeutique privilégiée<sup>530,542</sup>. Le potentiel d'inhibiteurs de protéases déjà sur le marché comme le saquinavir, le lopinavir, le ritonavir ou le darunavir a été notamment souligné par l'étude de *docking* moléculaire d'Ortega et al.<sup>616</sup>.

La combinaison **lopinavir-ritonavir**, prescrite dans le cadre des thérapies antirétrovirales contre le VIH, avait déjà été décrite contre le SARS-CoV et influenza lors d'études de *docking* moléculaire<sup>617</sup>. Lors des épidémies de MERS-CoV, la FDA avait autorisé son utilisation d'urgence même si les résultats précliniques *in vitro* ne suggéraient qu'une faible activité antivirale, y compris en association avec de l'interféron  $\beta$  recombinant<sup>618</sup>. Ces composés ont été inclus dans les deux essais cliniques internationaux menés en 2020, *Solidarity* et *RECOVERY*, visant à réduire la mortalité chez les patients sévères. Le lopinavir a été évalué en monothérapie et en bithérapie avec de l'interféron  $\beta$ -1a ou le ritonavir mais aucune de ces options thérapeutiques n'a permis une réduction significative de la mortalité à 28 jours<sup>582,619,620</sup>. D'autres essais de phases III et IV sont en cours ou programmés, notamment des trithérapies du lopinavir-ritonavir avec du remdesivir ou de l'hydroxychloroquine<sup>621,622</sup>.

De la même manière, la combinaison antirétrovirale **darunavir-cobicistat** est évaluée contre le SARS-CoV-2. *In vitro*, le darunavir n'a pas démontré d'activité antivirale significative contre le SARS-CoV-2<sup>623</sup>. Un premier essai de phase III (NCT04252274) a conclu à la sécurité d'administration du traitement, mais aucune amélioration sur le taux de positivité au virus 7 jours post traitement n'a été rapportée par rapport au standard de soins<sup>624</sup>. Par ailleurs, une étude rétrospective menée dans 33 hôpitaux italiens sur 3 451 patients a évalué l'impact des thérapies antirétrovirales lopinavir-ritonavir et darunavir-cobicistat sur la mortalité liée à la COVID-19. Les résultats ont conclu à une absence d'impact de l'association lopinavir-ritonavir et à une augmentation du risque de mortalité avec le traitement darunavir-cobicistat<sup>625</sup>.

#### 4.5.3. Inhibiteurs de fusion ou d'endocytose

L'**umifenovir (Arbidol)**, un inhibiteur de fusion approuvé en Russie et en Chine pour le traitement de la grippe, est décrit pour son activité antivirale à large spectre et présentait déjà une efficacité *in vitro* contre le SARS-CoV<sup>626</sup>. L'étude de Wang et al. a confirmé le potentiel antiviral de ce médicament contre le SARS-CoV-2 avec une EC50 de 4.11  $\mu$ M en cellules VeroE6<sup>627</sup>. Une étude de modélisation par *docking* moléculaire a récemment démontré l'interaction de l'Arbidol avec le complexe RDB-ACE2, induisant une rigidité structurelle dans la glycoprotéine virale, limitant ainsi les réarrangements conformationnels associés à la fusion membranaire et à l'entrée du virus<sup>628</sup>. Le médicament a été inclus dans des plusieurs essais de phases III et IV, notamment en comparaison des traitements lopinavir-ritonavir, de l'interféron  $\beta$ -1a et de l'hydroxychloroquine, évaluant le délai d'amélioration clinique chez des patients hospitalisés. Bien qu'un léger bénéfice ait été observé par rapport à la combinaison lopinavir-ritonavir sur la durée d'hospitalisation et le délai de négativité des tests PCR, les études concluent à un manque d'efficacité significative de l'Arbidol contre la COVID-19<sup>629-632</sup>.

La **chloroquine**, un médicament anti-malarique et son dérivé l'**hydroxychloroquine**, indiquée dans la prise en charge de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus pour ces capacités immunomodulatrices, ont démontré une activité antivirale *in vitro*, en inhibant l'endocytose. Le principe actif de la chloroquine est un composé basique se diffusant spontanément à travers les membranes des organelles des endosomes, des lysosomes ou des vésicules de Golgi,

induisant une augmentation de leur pH cytoplasmique<sup>633</sup>. L'acidification du pH endosomal étant une étape indispensable au relargage du matériel génétique viral pour de nombreux virus, la chloroquine et ses dérivés exercent une activité antivirale *in vitro* ciblée sur la cellule-hôte contre Ebola, Marburg, la Dengue, le Chikungunya, ou encore le VIH. En 2005, l'étude de Vincent et al. a démontré l'efficacité de la chloroquine contre le SARS-CoV en prophylaxie et traitement post infection avec des IC50 de 1 et 4.4  $\mu\text{M}$ , respectivement<sup>634</sup>. L'étude souligne que le principe actif impacte la glycosylation terminale d'ACE2, rendant moins efficace l'ancrage de la protéine S. En 2020, une analyse *in silico* a permis d'identifier un nouveau domaine d'ancrage gangliosidique des médicaments au niveau des acides sialiques, interagissant avec le domaine N-terminal de la protéine S de SARS-CoV-2, renforçant l'intérêt à évaluer ces candidats<sup>635</sup>. *In vitro*, la chloroquine et l'hydroxychloroquine ont largement démontré leur efficacité avec des IC50 inférieures à 4  $\mu\text{M}$ <sup>580,636,637</sup>.

Avec ses propriétés immunomodulatrices et une moindre toxicité, l'hydroxychloroquine a été choisie pour faire partie des premières évaluations cliniques chez l'Homme dans l'essai *RECOVERY*. Cependant, les résultats n'ont indiqué aucun bénéfice du traitement sur la mortalité des patients sévères hospitalisés<sup>638</sup>. Une étude *in vivo*, réalisée *a posteriori*, a évalué l'efficacité de l'hydroxychloroquine en monothérapie ou en association avec de l'azithromycine, selon deux protocoles de traitement (post infection ou prophylactique), sur des primates non humains<sup>639</sup>. Les auteurs ont conclu que l'hydroxychloroquine n'avait aucun effet antiviral *in vivo*, rappelant l'importance des différentes étapes de validation précliniques des candidats et les discordances souvent observées entre les modèles cellulaires *in vitro* et les modèles *in vivo*.

Pourtant, l'hydroxychloroquine a fait l'objet de nombreuses études dont 144 essais de phases III et IV, évaluant son efficacité prophylactique en pré et post-exposition et son efficacité post symptomatique, en monothérapie ou en association avec de l'azithromycine. Plusieurs méta-analyses des essais cliniques réalisés sur des patients hospitalisés concluent que l'hydroxychloroquine et la chloroquine n'apportent pas de bénéfice clinique sur la mortalité, la durée de la fièvre ou le développement d'un syndrome de détresse respiratoire, mais soulignent un risque accru d'effet secondaire sur l'arythmie cardiaque<sup>640-642</sup>. La combinaison hydroxychloroquine-azithromycine a même été associée à une augmentation de la mortalité. Une étude canadienne menée sur 821 patients (NCT04308668) a évalué l'efficacité de l'hydroxychloroquine comme traitement prophylactique post exposition (4 jours de traitement, 4 jours post exposition). 11.8 % des personnes traitées ont déclaré la maladie contre 14 % dans le groupe placebo, et 40 % ont déclaré des effets secondaires non sévères contre 16.8 %. L'étude conclut à un effet non significatif du traitement, exposant à un risque d'effet secondaire<sup>643</sup>. Un constat similaire est rapporté dans une méta-analyse portant sur 4 essais prophylactiques<sup>644</sup>.

Les inhibiteurs de protéase à serine, tel que le **nafamostat** et le **camostat mesylate** avaient déjà été identifiés comme inhibiteurs de TMPRSS2, inhibant la fusion des membranes lors d'une infection avec le MERS-CoV<sup>527</sup>. Ainsi, les études de Hoffmann et al. et Yamamoto et al. ont validé l'efficacité *in vitro* des deux composés contre le SARS-CoV-2, en soulignant un meilleur potentiel du nafamostat avec une EC50 de l'ordre du nanomolaire<sup>645,646</sup>. Récemment, l'étude en *docking* moléculaire de Sonawane et al. a confirmé que ces molécules interféraient bien avec le site catalytique de TMPRSS2 participant au clivage de la protéine S du SARS-CoV-2<sup>647</sup>. La protection apportée par un traitement intranasal au nafamostat a été démontrée en modèle murin, par une réduction de la perte de poids et du titre viral pulmonaire en traitement post infection, et réduction de la perte de poids, des symptômes et de la mortalité en traitement prophylactique<sup>648</sup>. Les résultats d'un essai clinique de phase II (NCT04623021) évaluant le nafamostat sur un groupe de 104 patients COVID-19 hospitalisés nécessitant un soutien en oxygène (hors réanimation) indiquent une différence non significative sur le



délai d'amélioration clinique entre les groupes traités et placebo mais soulignent une amélioration plus rapide dans un petit groupe de patients à haut risque<sup>649</sup>. 4 études de phase III sont en cours de recrutement.

Des criblages systématiques de molécules approuvées assistés *in silico* ont également mis en évidence le potentiel antiviral du **nitazoxanide** contre les CoV avec une activité inhibitrice de la protéine N<sup>528,636</sup>. Son activité *in vitro* contre le SARS-CoV-2 a été évaluée avec une IC50 d'environ 2  $\mu\text{M}$ <sup>580</sup>. Récemment, une nouvelle étude a démontré que le principe actif du médicament pourrait interférer avec la biogénèse de la Spike, limitant le clivage par l'endoglycose nécessaire à la fusion<sup>650</sup>. Des résultats de phase II (NCT04552483) indiquent que le traitement n'a pas permis de réduire le délai symptomatique chez des patients avec une COVID-19 modérée mais soulignent une réduction significative de la charge virale en cas d'administration précoce<sup>651</sup>. Des essais cliniques de phases III et IV sont en cours.

#### 4.5.4. Interactions avec la nucléocapside et les vRNP

L'**ivermectine** est un médicament antiparasitaire intervenant sur les récepteurs neuromusculaires des parasites, avec des effets immunomodulateurs variés<sup>652</sup>. Son potentiel antiviral a été décrit dans plusieurs études, et notamment contre influenza et le VIH, où le médicament apparaît comme un inhibiteur de l'import nucléaire des vRNP via le système d'importine  $\alpha/\beta$ <sup>653,654</sup>. En outre, plusieurs études de *docking* moléculaire ont souligné le potentiel de l'ivermectine contre le SARS-CoV-2, rapportant une haute affinité avec la nucléocapside, mais aussi avec la RdRp, la protéase 3CL, l'hélicase et ACE2<sup>655</sup>. *In vitro*, la molécule a présenté une efficacité avec une IC50 de 2  $\mu\text{M}$ <sup>656</sup>.

L'ivermectine a fait l'objet de nombreux essais cliniques dont 42 de phases III et IV (28 sont en cours ou en recrutement). Notamment, une étude de phase III a évalué l'efficacité prophylactique du traitement (2 doses à 72h d'intervalle) sur 203 patients dont les proches ont été infectés par le SARS-CoV-2 (NCT04422561). Seulement 7.4 % des personnes traitées ont développé la maladie contre 58.4 % avec le placebo, suggérant une action protectrice du traitement<sup>657</sup>. Une méta-analyse basée sur 9 études en traitement post symptomatique a conclu que le traitement à l'ivermectine serait associé à une réduction de la mortalité chez les patients sévères, avec toutefois un niveau de relevance faible, soulignant la nécessité d'études à plus large ampleur<sup>658</sup>. Par ailleurs, une autre analyse réalisée sur 10 études chez des patients non sévères indique que l'ivermectine n'a pas d'impact sur la mortalité, ni sur la durée de la maladie ou la clairance virale<sup>659</sup>. Enfin, la combinaison de l'ivermectine avec la doxycycline, évaluée dans un essai de phase III (NCT04523831), pourrait être associée à une maladie moins symptomatique chez les patients avec une COVID-19 non sévère<sup>660</sup>.

Les activités anti-inflammatoires et antivirales du **naproxène**, déjà décrites contre influenza, en ont fait un candidat de choix pour un repositionnement contre le SARS-CoV-2. La nucléoprotéine n'est pas une structure commune entre les virus à ARN mais la N de SARS-CoV-2 est tout aussi importante pour la réplication, formant le complexe vRNP avec l'ARN viral. Elle est également impliquée dans l'immunomodulation, en particulier l'inhibition de la réponse interféron. Des études préliminaires avaient mis en évidence l'interaction de la N du SARS-CoV avec COX2<sup>661</sup>. Ainsi, l'étude de Terrier et al. a récemment décrit une approche structurale pour identifier des sites de fixation du naproxène dans le domaine N terminal de la protéine N du SARS-CoV-2<sup>662</sup>. Le naproxène originel a démontré deux sites de fixations dans le site de l'oligomérisation (PDB 7ACT et PDB 6VYO) tandis que son dérivé CO se lie à un site de fixation de l'ARN. Les deux candidats ont démontré une efficacité antivirale significative *in vitro* sur des cellules VeroE6 et sur des épithéliums respiratoires humains (HAE) d'origine bronchique avec des IC50 de l'ordre du micromolaire. Le médicament a fait l'objet un

essai clinique de phase II sur les patients hospitalisés pour COVID-19 en Iran (IRCT20200324046850N3) face à un placebo<sup>663</sup>. Les résultats indiquent une amélioration du délai de réduction des symptômes et un effet préventif bénéfique sur la tension artérielle<sup>664</sup>. Un essai clinique de phase III est en cours en France, supervisé par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, pour évaluer l'efficacité du naproxène en complément du standard de soins chez les patients hospitalisés pour COVID-19, sur la réduction de la mortalité 30 jours post traitement, de la morbidité et de la charge virale (2020-001301-23)<sup>665</sup>.

#### 4.5.5. Interactions avec le système de l'angiotensine

Tel que décrit précédemment, des médicaments anti-hypertenseurs comme le **telmisartan** ou le **losartan** peuvent augmenter l'abondance d'ACE2<sup>522</sup>. Ainsi, les patients sous traitement pourraient présenter un facteur de risque supplémentaire d'être infectés mais seraient également mieux protégés d'une détresse pulmonaire<sup>132,522,524</sup>. Ces deux hypothèses sont actuellement discutées et évaluées en clinique. Le bénéfice de ces traitements au long cours fait l'objet de plusieurs études rétrospectives, comme celle de Hakeam et al. réalisée sur 338 patients admis à l'hôpital, qui a conclu que les patients hypertendus sous traitement n'étaient pas associés à un risque plus élevé d'évolution vers une forme sévère de la maladie<sup>666</sup>. D'autres études interventionnelles (NCT04355936) ont permis de démontrer qu'un traitement de 15 jours avec du telmisartan avait un impact positif sur la réduction de l'inflammation et pouvait réduire la mortalité et la morbidité chez les patients hospitalisés<sup>667</sup>.

De manière identique, des études décrivent l'augmentation d'ACE2 en modèle animal par les **statines**, prescrites contre le cholestérol. Notamment, l'atorvastatine permet de réguler l'athérosclérose par une augmentation de l'expression de la protéine ACE2 dans le cœur et le foie des lapins via des modifications épigénétiques<sup>668</sup>. Chez les rats diabétiques, la fluvastatine a été associée à une meilleure efficacité de l'insuline, en augmentant l'expression d'ACE2 dans la sphère cardiaque<sup>669</sup>. Ainsi, des études cliniques ont pour objectif de déterminer si les patients sous traitement sont moins sujets à des complications de la maladie, en particulier cardiaques. Les résultats d'une étude rétrospective sur 717 patients hospitalisés à Singapour ont mis en évidence une diminution de 10 % du risque d'aller en réanimation chez les patients sous traitement hypocholestérolémiant avec les statines<sup>520</sup>. Une autre étude réalisée sur 1 179 patients hospitalisés a évalué l'impact du traitement avec les statines, au long cours avant admission, ou en administration hospitalière. Les patients âgés de moins de 65 ans et traités (au long cours et nouvellement) ont été associés à un taux de mortalité réduit<sup>670</sup>.

Cependant, plusieurs méta-analyses précisent que la réduction de la mortalité (jusqu'à 35 %) et du taux d'admission en réanimation est majoritairement liée à des protocoles de traitements hospitaliers plutôt qu'à un traitement au long cours<sup>671-673</sup>. En ce sens, l'activité anti-lipidique des statines est également à considérer, puisqu'il a été démontré que ACE2 était colocalisée dans les radeaux lipidiques impliqués dans l'entrée du SARS-CoV<sup>674</sup>. En réduisant la synthèse du cholestérol endogène, les statines réduisent sa quantité dans les radeaux lipidiques, ce qui pourrait limiter la pénétration du SARS-CoV-2 dans la cellule-hôte. Enfin, leurs capacités immunomodulatrices peuvent également être un atout dans la réduction de la tempête cytokinique<sup>672</sup>.

#### 4.5.6. Médiateurs de l'inflammation

L'évolution de la COVID-19 vers une phase pulmonaire engendre une inflammation importante, voire démesurée, associée à la mortalité et la morbidité de la maladie. L'usage de

médicaments anti-inflammatoires, notamment dans la prévention de la tempête cytokinique a démontré un bénéfice dès les premiers essais cliniques menés en 2020<sup>675</sup>.

En particulier, l'usage des corticoïdes, anti-inflammatoires stéroïdiens tels que la **dexaméthasone** ou la **méthylprednisolone** a rapidement été envisagé car ils permettent de réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, des inquiétudes ont été formulées concernant l'inhibition de la réponse immunitaire<sup>675</sup>. Incluse dans l'essai mondial *RECOVERY*, la dexaméthasone a confirmé l'intérêt porté vers ces médicaments en permettant une réduction de 12 % de la mortalité chez les patients sous ventilation mécanique et la prolongation des soins ne nécessitant pas cette ventilation<sup>323,324</sup>. Leur utilisation fait l'objet de nombreuses études cliniques de phases III et IV. Récemment, une étude menée en Arabie Saoudite a rapporté l'intérêt d'un traitement par inhalation du **budesonide** (pendant 11 jours dès l'inclusion), un corticoïde indiqué dans le traitement de l'asthme, sur les malades sévères en soins intensifs, par une réduction de la mortalité à 30 jours<sup>676</sup>.

Diverses cibles thérapeutiques sont évaluées pour réduire l'inflammation. Nous pouvons par exemple citer les inhibiteurs de l'IL-6 comme le **tocilizumab**, un Ac monoclonal humanisé dirigé contre l'IL-6 approuvé dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde. *In vitro*, cet Ac est associé à une réduction de l'expression des TNF, de l'IL-10 et de l'inflammasome<sup>677</sup>. En clinique, plusieurs études soulignent un risque diminué de mortalité lorsque le médicament est administré dans les deux premiers jours de réanimation<sup>322</sup>.

Des inhibiteurs de JAK1 et JAK2, comme le **ruxolitinib** ou le **baricitinib**, provoquant une interruption du signal menant à l'expression de multiples cytokines pro-inflammatoires, sont également envisagés avec l'objectif de prévenir la survenue de la tempête cytokinique. Récemment, les résultats d'une étude de phase III (NCT04362137) évaluant l'efficacité d'un traitement de 14 jours avec le ruxolitinib n'a pas rapporté d'amélioration sur la dégradation des patients hospitalisés (décès, détresse respiratoire ou réanimation)<sup>678</sup>. Par ailleurs, quelques cas présentant des effets secondaires majeurs ont été rapportés lors d'autres études (purpura et désordres hématologiques), potentiellement liés à l'usage concomitant du médicament avec du ritonavir<sup>679</sup>.

Le baricitinib semble mieux toléré et une étude en intelligence artificielle a décrit sa capacité potentielle à interférer avec l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules alvéolaires par l'inhibition de AAK1 (protéine kinase 1 associée à AP2), impliquée dans la régulation de l'endocytose<sup>680</sup>. L'association du baricitinib (traitement de 14 jours) et du remdesivir (10 jours) a été évaluée dans un essai de phase III (NCT04401579) chez les patients hospitalisés. Une diminution de 2 % de la mortalité a été rapportée ainsi que des améliorations sur le délai de guérison (7 contre 8 avec le placebo), le statut clinique à J15 (plus favorable de 30 % par rapport au groupe témoin) et le temps nécessaire sous ventilation mécanique (10 jours contre 18)<sup>681</sup>.

D'autres médicaments aux propriétés anti-inflammatoires connues comme les antibiotiques **azithromycine** ou **doxycycline**, font l'objet de plusieurs études, notamment en combinaison de l'hydroxychloroquine ou de l'ivermectine<sup>660,682</sup>.

Enfin, le mode d'action antiviral du **diltiazem**, identifié dans le cadre de notre stratégie de repositionnement contre influenza, sur la modulation de l'expression des interférons, suggérant ainsi un potentiel antiviral à large spectre, a légitimé son évaluation contre le SARS-CoV-2. Son activité antivirale, documentée dans les Résultats, nous a mené jusqu'à la préparation d'un essai clinique de phase II visant à évaluer le bénéfice apporté par un traitement au diltiazem en complément du standard de soins pour une pneumopathie hypoxémiante à COVID-19.

# RESULTATS

# 1. Contexte de la thèse

## 1.1. Stratégie du laboratoire

Tel que développé dans l'introduction, les infections respiratoires aiguës d'origine virale ont des impacts sanitaires et socioéconomiques majeurs. Dans ce contexte, le développement de nouveaux traitements prophylactiques et thérapeutiques efficaces contre ces pathogènes respiratoires constitue un enjeu déterminant de santé publique. Le succès des nouvelles stratégies de contrôle repose en grande partie sur une meilleure caractérisation de la biologie cellulaire de ces virus respiratoires et la compréhension de leurs interactions moléculaires et fonctionnelles avec leur hôte. Pour répondre à ces besoins, le laboratoire VirPath travaille depuis 2008 sur ces thématiques avec l'objectif de développer de nouvelles thérapeutiques ciblant la cellule-hôte, en utilisant des approches transcriptomiques comme point de départ.

En effet, plusieurs études suggèrent que le mode d'action des médicaments est davantage dépendant de leur effet transcriptionnel sur la cellule-hôte que de leur interaction directe avec leur(s) cible(s) cellulaire(s)<sup>683,684</sup>. Ainsi, et en s'appuyant sur le principe de polypharmacologie, notre équipe a émis les postulats suivants :

- (i) Lorsque les infections sont efficaces, les signatures transcriptomiques des cellules infectées reflètent un état cellulaire globalement favorable à la réplication virale
- (ii) Des molécules induisant une signature cellulaire transcriptomique inverse à celle de l'infection pourraient induire un état cellulaire globalement défavorable à la réplication virale

Afin d'obtenir une preuve de concept pour cette stratégie, un programme de recherche translationnelle biomédicale (FLUMED) a été initié en 2010, avec un objectif de repositionnement de médicaments. A partir de cellules pulmonaires humaines A549 infectées par différentes souches d'influenza A (H1N1, H3N2, H5N1, H5N2 et H7N1), l'étude princeps (Josset et al., 2010) a caractérisé *in vitro* la signature transcriptomique d'infection sur une puce ADN<sup>685</sup>. Cette signature d'infection a ensuite été exploitée comme support pour le criblage des molécules possédant déjà une AMM contenues dans la base de données publiques *Connectivity Map* (Broad Institute, MIT)<sup>686</sup>. Huit molécules candidates associées à un profil transcriptomique cellulaire inverse à celui de l'infection ont ainsi été sélectionnées. A l'issue de leur évaluation dans différents tests cellulaires spécifiques d'infection, sept des huit molécules candidates ont démontré une activité antivirale significative *in vitro* :

- la midodrine, prodrogue de la desglymidodrine, agoniste des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, prescrite dans la prise en charge de l'hypotension orthostatique ;
- l'harmol, un alcaloïde  $\beta$ -carboline issu de la plante médicinale *Perganum harmala L.* ;
- la merbromine, un antiseptique topique ;
- la brinzolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique prescrit en collyre anti-glaucomeux ;
- la ribavirine, un médicament antiviral utilisé pour le traitement d'infections par hRSV, hépatite C et certaines fièvres hémorragiques ;
- la rilmenidine, un anti-hypertenseur ;
- le 2-aminobenzenesulfonamide, un antibiotique.

L'identification de ces molécules pour leur propriété antivirale *in vitro* à large spectre contre plusieurs virus influenza de type A humains et aviaires a fait l'objet d'un dépôt de brevet (FR n°0958810- PCT/EP2010/069023- WO 2011069990, US n° 61/279 997 ; FR 15 52284), puis d'un essai clinique de phase II mené en médecine générale, visant à l'évaluation du chlorhydrate de midodrine

chez les patients souffrant de grippe banale (FLUMED TRIAL, EUDRACT n°011-004552-19, NCT01546506)<sup>556</sup>. Une réduction de l'incidence et de la durée des symptômes a été observée dans le bras de patients traités par le chlorhydrate de midodrine (données non publiées), mais faute d'avoir inclus un nombre suffisant de patients, les résultats de l'essai clinique n'ont pas pu conclure sur l'efficacité de la midodrine.

Néanmoins, le niveau de validation préclinique de l'efficacité antivirale de la midodrine ayant permis l'initiation des études cliniques constitue une preuve de concept de la stratégie innovante du laboratoire de sélection et de repositionnement de molécules déjà sur le marché pour une nouvelle indication thérapeutique anti-infectieuse, par une approche globale de la cellule-hôte infectée et l'analyse croisée de signatures virogénomiques et chemogénomiques. En plus des nombreux avantages du repositionnement de médicaments sur la réduction des coûts et du temps de développement, cibler la cellule permet de limiter les possibilités d'émergence de résistances.

Sur la base de cette preuve de concept et dans un souci d'amélioration du procédé, notre équipe a optimisé cette stratégie avec l'exploitation d'échantillons cliniques plus pertinents d'un point de vue physiologique et la montée en échelle de la méthodologie et des outils bio-informatiques. Une nouvelle étude (FLUNEXT) a été initiée visant à établir les signatures transcriptomiques de l'infection à partir d'écouvillons nasaux réalisés chez des patients en phase aiguë d'infection à influenza (A/H1N1/pdm09) puis dans leur phase de convalescence. Ensuite, un criblage *in silico* via CMap a permis de constituer une liste de 35 molécules candidates pour un repositionnement possédant une signature transcriptomique inverse à celle de l'infection. C'est dans ce contexte que j'ai rejoint le laboratoire VirPath en 2014, à l'occasion de mon stage de première année de Master qui avait pour objectif d'évaluer le potentiel antiviral de ces molécules *in vitro* sur des cellules pulmonaires d'origine humaine A549 (encadrement : Dr Olivier Terrier). L'évaluation de molécules antivirales a par la suite constitué le fil conducteur de mon stage de Master 2 puis de mon travail d'ingénierie d'études au sein de l'équipe dirigée par le Dr Manuel Rosa-Calatrava. Le programme FLUNEXT nous a conduit à l'identification du diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques, prescrit contre l'hypertension, comme candidat au repositionnement contre la grippe.

Dans cette dynamique, notre équipe mène actuellement un programme international (RESPIROMIX) en collaboration avec l'Université Laval et le CHU de Québec (équipe du Dr Guy Boivin), l'Institut Pasteur de Paris (équipe du Dr Sylvie van der Werf), le Centre International d'Immunologie et le CHU de Lille (équipe du Dr Jean Dubuisson, équipe du Dr François Trottein), le Laboratoire des Pathogènes Émergents et la Fondation Mérieux (Dr Hubert Endtz, CIRI). Sur la base des preuves de concept obtenues avec les virus influenza A, ce programme de recherche vise à étendre la stratégie de criblage transcriptomique à différents virus respiratoires pathogènes, tels que les Pneumovirus et les Coronavirus, y compris dans les cas de co-infections bactériennes, en particulier influenza/*Streptococcus pneumoniae*. Depuis 2020, ce programme s'est étendu au SARS-COV-2, illustrant la flexibilité de mise en œuvre de cette stratégie dans un contexte pandémique.

Les objectifs de ces programmes sont :

- (i) L'exploitation des collections biologiques de patients infectés pour leur analyse par NGS,
- (ii) Le développement de nouvelles méthodes plus performantes d'analyse fonctionnelle et d'intégration de données « Omics » (Thèse CIFRE n°2015/1354 de Claire Nicolas de Lamballerie, soutenue en juillet 2020),
- (iii) La caractérisation par ces méthodes du mode d'action biologique des molécules candidates sélectionnées.

Pour renforcer le programme RESPIROMIX et accélérer sa mise en œuvre, un nouveau partenaire industriel a rejoint le consortium, la startup Signia Therapeutics, issue du laboratoire VirPath en 2017, avec laquelle un partenariat de recherche a été mis en place avec toutes les tutelles du laboratoire.

Les objectifs de ce partenariat sont :

- (i) L'apport d'un nouveau modèle physiologique (modèle 3D d'épithélium humain respiratoire) pour l'identification, l'évaluation des molécules candidates au repositionnement et la caractérisation de leur mode d'action pour leur propriété antivirale,
- (ii) La valorisation économique des nouvelles connaissances et de la propriété industrielle générées par le programme RESPIROMIX (Un contrat de transfert du portefeuille de brevet du laboratoire VirPath (FR 15 52284 – PCT/ep2016/056036 ; FR 16 53057 - PCT/EP2017/058009 ; FR 16 60223) pour son exploitation directe ou indirecte par Signia Therapeutics a été mis en place),
- (iii) Le développement d'un protocole de délivrance par aérosolisation de ces molécules

## 1.2. Présentation des travaux de thèse

Mon projet de thèse CIFRE en collaboration entre Signia Therapeutics et le Laboratoire VirPath s'est inscrit dans le cadre des projets FLUNEXT et RESPIROMIX. Initialement focalisé sur les virus influenza, l'émergence du virus pandémique SARS-CoV-2 en janvier 2020 a créé l'opportunité d'étendre la portée de mon projet, afin d'y inclure ce nouveau virus respiratoire émergent.

Ainsi, mes travaux de thèse ont porté sur les stratégies antivirales contre les virus influenza et le SARS-CoV-2. Le repositionnement du diltiazem comme antiviral à large spectre, ciblant la cellule-hôte, a constitué l'axe central de mon travail et notamment la caractérisation fonctionnelle de son mode d'action sur la voie des interférons de type III et son évaluation en combinaison avec des antiviraux classiques dirigés contre les déterminants viraux. Les objectifs de mon projet de thèse et le cheminement de mes travaux sont schématisés sur la Figure 36.

Notre stratégie de repositionnement de médicaments basée sur un criblage virogénomique et chemogénomique nous a menés vers l'identification du diltiazem comme antiviral à fort potentiel contre la grippe (**Article 1**). Nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait stimuler l'induction de l'expression des interférons lambda et potentialiser l'effet de médicaments antiviraux classiques, comme l'oseltamivir. En parallèle, nous avons mené une étude en collaboration avec l'équipe du Dr Guy Boivin, évaluant le potentiel synergique des antiviraux classiques contre la grippe (**Article 2**). Cette étude a permis la mise en place de modèles d'études *in vitro* robustes pour l'évaluation des interactions entre les molécules. L'émergence du SARS-CoV-2 a bouleversé nos activités de recherche. Nous avons utilisé toutes les ressources à notre disposition pour caractériser la physiopathologie induite par ce nouveau virus dans les tissus épithéliaux dans nos modèles d'infection *in vitro* (**Article 3**). Nous avons souligné l'importance des interférons de type III dans la réponse innée de la cellule-hôte contre ce virus émergent, différée par le virus, et validé le remdesivir comme antiviral à fort potentiel. Le mécanisme d'action du diltiazem lui offre un potentiel à large spectre, que nous avons validé contre le SARS-CoV-2. Enfin, nous avons caractérisé l'induction des interférons lambda par le diltiazem et validé le potentiel de cet antiviral ciblant la cellule-hôte pour améliorer l'activité antivirale et protectrice du baloxavir contre influenza et du molnupiravir contre le SARS-CoV-2 (**Manuscrit 4**).

Ces travaux ont nécessité le développement et l'optimisation de modèles expérimentaux *in vitro* physiologiquement pertinents pour l'étude des infections respiratoires virales et pour l'évaluation de potentielles approches thérapeutiques innovantes, qui constituent aujourd'hui un savoir-faire au cœur de nombreux projets du laboratoire. En outre, la valorisation du diltiazem pour une nouvelle indication anti-infectieuse représente une perspective d'importance pour Signia Therapeutics.

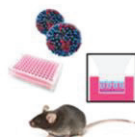
## Article 1



ORIGINAL RESEARCH  
Published: 29 January 2019  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00000

### Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures

Andrés Pizzorno<sup>1,2†</sup>, Olivier Terrier<sup>1†</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,3</sup>, Thomas Julien<sup>1,4</sup>, Blandine Padey<sup>1,4</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Magali Roche<sup>1</sup>, Marie-Eve Hamelin<sup>1</sup>, Chantal Rhéaume<sup>1</sup>, Séverine Croze<sup>1</sup>, Vanessa Escuret<sup>1,6</sup>, Julien Poissy<sup>7</sup>, Bruno Lina<sup>1,6</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>1,4</sup>, Julien Textoris<sup>1,6</sup>, Guy Boivin<sup>1</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,4\*</sup>



## Article 2



Article

### In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses

Liva Checkmahomed<sup>1,†</sup>, Blandine Padey<sup>2,3,†</sup>, Andrés Pizzorno<sup>2</sup>, Olivier Terrier<sup>2</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>2,4</sup>, Yacine Abed<sup>1</sup>, Mariana Baz<sup>1,4</sup> and Guy Boivin<sup>1,4</sup>

Received: 21 September 2020; Accepted: 1 October 2020; Published: 8 October 2020



## Article 3

Cell Reports Medicine



Report

### Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia

Andrés Pizzorno,<sup>1</sup> Blandine Padey,<sup>1,2</sup> Thomas Julien,<sup>1,3</sup> Sophie Trouillet-Assant,<sup>1,4</sup> Aurélien Traversier,<sup>1</sup> Elisabeth Errazuriz-Cerda,<sup>5</sup> Julien Fouret,<sup>2</sup> Julia Dubois,<sup>1</sup> Alexandre Gaymard,<sup>1,6</sup> François-Xavier Lescure,<sup>7,8</sup> Victoria Dulière,<sup>1,9</sup> Pauline Brun,<sup>1,9</sup> Samuel Constant,<sup>9</sup> Julien Poissy,<sup>10</sup> Bruno Lina,<sup>1,6</sup> Yazdan Yazdanpanah,<sup>7,8</sup> Olivier Terrier,<sup>1,11,12,\*</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,2,11,\*</sup>



## Manuscrit 2

### Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses

Authors : Blandine Padey<sup>1,2</sup>, Victoria Dulière<sup>1,3</sup>, Julien Fouret<sup>1</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,2</sup>, Cédrine Milesi<sup>1,3</sup>, Emilie Laurent<sup>1,3</sup>, Pauline Brun<sup>1,3</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Thomas Julien<sup>1,3</sup>, Bruno Lina<sup>1,4</sup>, Olivier Terrier<sup>1</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,3†</sup>, Andrés Pizzorno<sup>1†</sup>.

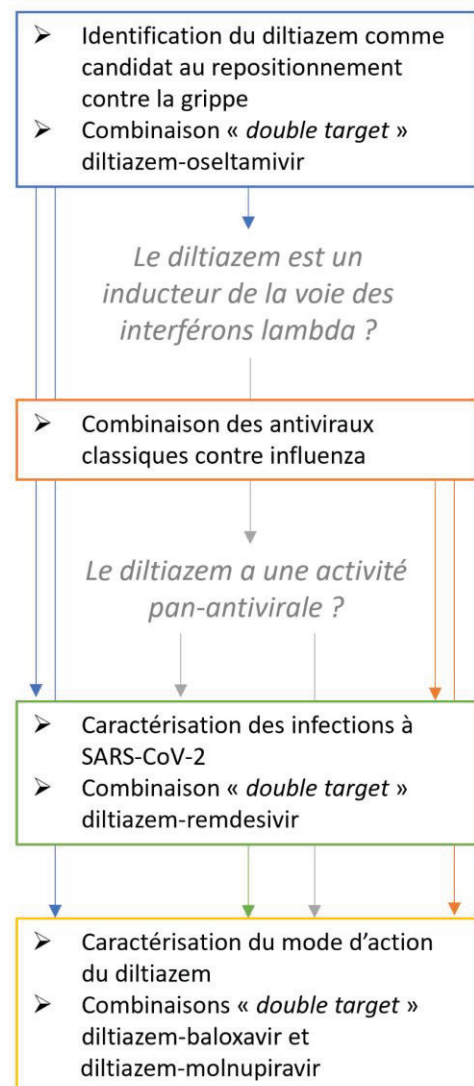
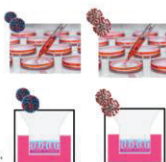


Figure 36 : Schéma général de mes objectifs et travaux de thèse.



## 2. Le repositionnement de médicaments ciblant la cellule-hôte pour leur activité antivirale contre les virus influenza

L'étude princeps Josset et al., 2010 a constitué la preuve de concept initiale de l'exploitation des signatures transcriptomiques de médicaments globalement anti-corrélées à celles induites par l'infection, comme point de départ de la stratégie innovante du laboratoire VirPath, pour la sélection et le repositionnement de médicaments pour une nouvelle indication antivirale ciblant la cellule-hôte.

Dans cette dynamique, l'équipe a travaillé à l'amélioration de cette stratégie avec le programme FLUNEXT visant à valider son application « *bedside to bench* », du chevet du malade au laboratoire, par l'exploitation d'échantillons cliniques *in vivo*, et l'optimisation significative de la méthodologie et des outils bio-informatiques.

FLUNEXT a ainsi permis l'identification et la validation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* du diltiazem comme candidat au repositionnement contre les infections par le virus influenza. Ces résultats ont donné lieu à un dépôt de brevet d'invention en 2016 (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186) et au démarrage d'un essai clinique de phase II/III en 2018, évaluant l'efficacité antivirale du diltiazem contre la grippe sévère dans 25 services de réanimation (FLUNEXT, PHRC #15-0442, NCT03212716). Les résultats de cet essai sont attendus pour 2022.

Notre étude a fait l'objet d'un article scientifique publié en 2019 dans *Frontiers in Immunology*, dans la section *Vaccines and Molecular Therapeutics*, présenté en **Article 1** : **“Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures”**.

J'ai pu contribuer à cette étude dès les phases de criblages *in vitro* en 2014, lors de mes stages de Master, encadrée par le Dr Olivier Terrier. L'identification et la validation de l'efficacité du diltiazem *in vitro*, la mise au point des modèles *ex vivo* MucilAir® d'infection et des protocoles de combinaison ainsi que l'évaluation du diltiazem en monothérapie et en association avec d'autres molécules antivirales telles que l'oseltamivir ont constitué une part majeure de mon travail au sein de notre équipe de recherche ces 6 dernières années et font partie intégrante de mes travaux de thèse.

## **2.1. Article 1: “Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures”**

### **Auteurs**

Andrés Pizzorno, Olivier Terrier, Claire Nicolas de Lamballerie, Thomas Julien, Blandine Padey, Aurélien Traversier, Magali Roche, Marie-Eve Hamelin, Chantal Rhéaume, Séverine Croze, Vanessa Escuret, Julien Poissy, Bruno Lina, Catherine Legras-Lachuer, Julien Textoris, Guy Boivin et Manuel Rosa-Calatrava

### **Journal**

*Frontiers in Immunology*

### **Date de publication**

29 janvier 2019

### **Références**

PMID: 30761132

PMCID: PMC6361841

DOI: 10.3389/fimmu.2019.00060



# Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures

Andrés Pizzorno<sup>1,2†</sup>, Olivier Terrier<sup>1\*†</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,3</sup>, Thomas Julien<sup>1,4</sup>, Blandine Padey<sup>1,4</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Magali Roche<sup>3</sup>, Marie-Eve Hamelin<sup>2</sup>, Chantal Rhéaume<sup>2</sup>, Séverine Croze<sup>5</sup>, Vanessa Escuret<sup>1,6</sup>, Julien Poissy<sup>7</sup>, Bruno Lina<sup>1,6</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>3,8</sup>, Julien Textoris<sup>9,10</sup>, Guy Boivin<sup>2</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,4\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Delphine Descamps,  
INRA Centre Jouy-en-Josas, France

### Reviewed by:

Rong Hai,  
University of California, Riverside,  
United States  
Sascha Trapp,  
INRA Centre Val de Loire, France

### \*Correspondence:

Olivier Terrier  
olivier.terrier@univ-lyon1.fr  
Manuel Rosa-Calatrava  
manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

†These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 18 September 2018

**Accepted:** 10 January 2019

**Published:** 29 January 2019

### Citation:

Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de  
Lamballerie C, Julien T, Padey B,  
Traversier A, Roche M, Hamelin M-E,  
Rhéaume C, Croze S, Escuret V,  
Poissy J, Lina B, Legras-Lachuer C,  
Textoris J, Boivin G and  
Rosa-Calatrava M (2019) Repurposing  
of Drugs as Novel Influenza Inhibitors  
From Clinical Gene Expression  
Infection Signatures.  
Front. Immunol. 10:60.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00060

<sup>1</sup> Virologie et Pathologie Humaine—VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>2</sup> Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec City, QC, Canada, <sup>3</sup> Viroscan3D SAS, Lyon, France, <sup>4</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>5</sup> ProfileXpert, SFR-Est, CNRS UMR-S3453, INSERM US7, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, <sup>6</sup> Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza Sud, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, <sup>7</sup> Pôle de Réanimation, Hôpital Roger Salengro, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, Lille, France, <sup>8</sup> Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France, <sup>9</sup> Service d'Anesthésie et de Réanimation, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, <sup>10</sup> Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (PI3), EA 7426 Hospices Civils de Lyon, bioMérieux, Université Claude Bernard Lyon 1, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

Influenza virus infections remain a major and recurrent public health burden. The intrinsic ever-evolving nature of this virus, the suboptimal efficacy of current influenza inactivated vaccines, as well as the emergence of resistance against a limited antiviral arsenal, highlight the critical need for novel therapeutic approaches. In this context, the aim of this study was to develop and validate an innovative strategy for drug repurposing as host-targeted inhibitors of influenza viruses and the rapid evaluation of the most promising candidates in Phase II clinical trials. We exploited *in vivo* global transcriptomic signatures of infection directly obtained from a patient cohort to determine a shortlist of already marketed drugs with newly identified, host-targeted inhibitory properties against influenza virus. The antiviral potential of selected repurposing candidates was further evaluated *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*. Our strategy allowed the selection of a shortlist of 35 high potential candidates out of a rationalized computational screening of 1,309 FDA-approved bioactive molecules, 31 of which were validated for their significant *in vitro* antiviral activity. Our *in vivo* and *ex vivo* results highlight diltiazem, a calcium channel blocker currently used in the treatment of hypertension, as a promising option for the treatment of influenza infections. Additionally, transcriptomic signature analysis further revealed the so far undescribed capacity of diltiazem to modulate the expression of specific genes related to the host antiviral response and cholesterol metabolism. Finally, combination treatment with diltiazem and virus-targeted oseltamivir neuraminidase inhibitor further increased antiviral efficacy, prompting rapid authorization for the initiation of a Phase II clinical trial. This original, host-targeted, drug repurposing strategy constitutes an effective and highly reactive process for the rapid identification

of novel anti-infectious drugs, with potential major implications for the management of antimicrobial resistance and the rapid response to future epidemic or pandemic (re)emerging diseases for which we are still disarmed.

**Keywords:** influenza viruses, antivirals, inhibitors of viral infection, transcriptome, host targeting, drug repurposing

## INTRODUCTION

Besides their well-known pandemic potential, annual outbreaks caused by influenza viruses account for several million respiratory infections and 250,000 to 500,000 deaths worldwide (1). This global high morbidity and mortality of influenza infections represents a major and recurrent public health threat with high economic burden. In this context, the suboptimal vaccine coverage and efficacy, coupled with recurrent events of viral resistance against a very limited antiviral portfolio, emphasize an urgent need for innovative treatment strategies presenting fewer obstacles for their clinical use (2).

For decades, the strategy for antiviral development was mostly based on serial screenings of hundreds of thousands of molecules to identify “hits” and “leads” that target specific viral determinants, a quite costly and time-consuming process. However, the dramatic reduction in successful candidate identification over time (3), along with a concomitant increase of regulatory complexity to implement clinical trials, have fostered rising interest in novel strategies. Indeed, new approaches, focused on targeting the host instead of the virus, as well as on marketed drug repurposing for new antiviral indications (3–5) have been recently proposed in the context of global health emergencies posed by Ebola (6) and Zika (7) viruses. Such innovative strategies are strongly supported by a shift of paradigms in drug discovery, from “one-drug-one-target” to “one-drug-multiple-targets” (8). In that sense, different *in silico* approaches based on structural bioinformatic studies (9, 10), systems biology approaches (11), and host gene expression analyses (12) have been applied to decipher multi-purpose effects of many US Food and Drug Administration (FDA)-approved drugs. Additionally, as successfully demonstrated in antiretroviral therapy (13), targeting host instead of viral determinants may confer a broad-spectrum antiviral efficacy, and also reduce the risk of emergence of drug resistance against influenza viruses (14). As a result, the last decade has witnessed several host-directed experimental approaches against influenza infections, notably nitazoxanide, DAS181 or acetylsalicylic acid (15–17).

In line with this emerging trend, we previously postulated that host global gene expression profiling can be considered as a “fingerprint” or signature of any specific cell state, including during infection or drug treatment, and hypothesized that the screening of databases for compounds that counteract virogenomic signatures could enable rapid identification of effective antivirals (18). Based on this previous proof-of-concept obtained from *in vitro* gene expression profiles, we further improved our strategy by analyzing paired upper respiratory tract clinical samples collected during the acute infection and

after recovery from a cohort of influenza A(H1N1)pdm09-infected patients and determined their respective transcriptomic signatures. We then performed an *in silico* drug screening using Connectivity Map (CMAP), the Broad Institute’s publicly available database of more than 7,000 drug-associated gene expression profiles (19, 20), and identified a list of candidate bioactive molecules with signatures anti-correlated with those of the patient’s acute infection state (Figure 1A). The potential antiviral properties of selected FDA-approved molecules were firstly validated *in vitro*, and the most effective compounds were further compared to oseltamivir for the treatment of influenza A(H1N1)pdm09 virus infections in both C57BL/6 mice and 3D reconstituted human airway epithelia. Altogether, our results highlight diltiazem, a calcium channel blocker with so far undescribed capacity to stimulate the epithelial antiviral defense, as a promising repurposed host-targeted inhibitor of influenza infection. Moreover, our results plead in favor of the combination of diltiazem with the virus-targeted antiviral oseltamivir for the improvement of current anti-influenza therapy, and possibly decreasing the risk of antiviral resistance. This study confirms the feasibility and interest of integrating clinical virogenomic and chemogenomic inputs as part of a drug repurposing strategy to accelerate bedside-to-bench and bench-to-bedside drug development.

## MATERIALS AND METHODS

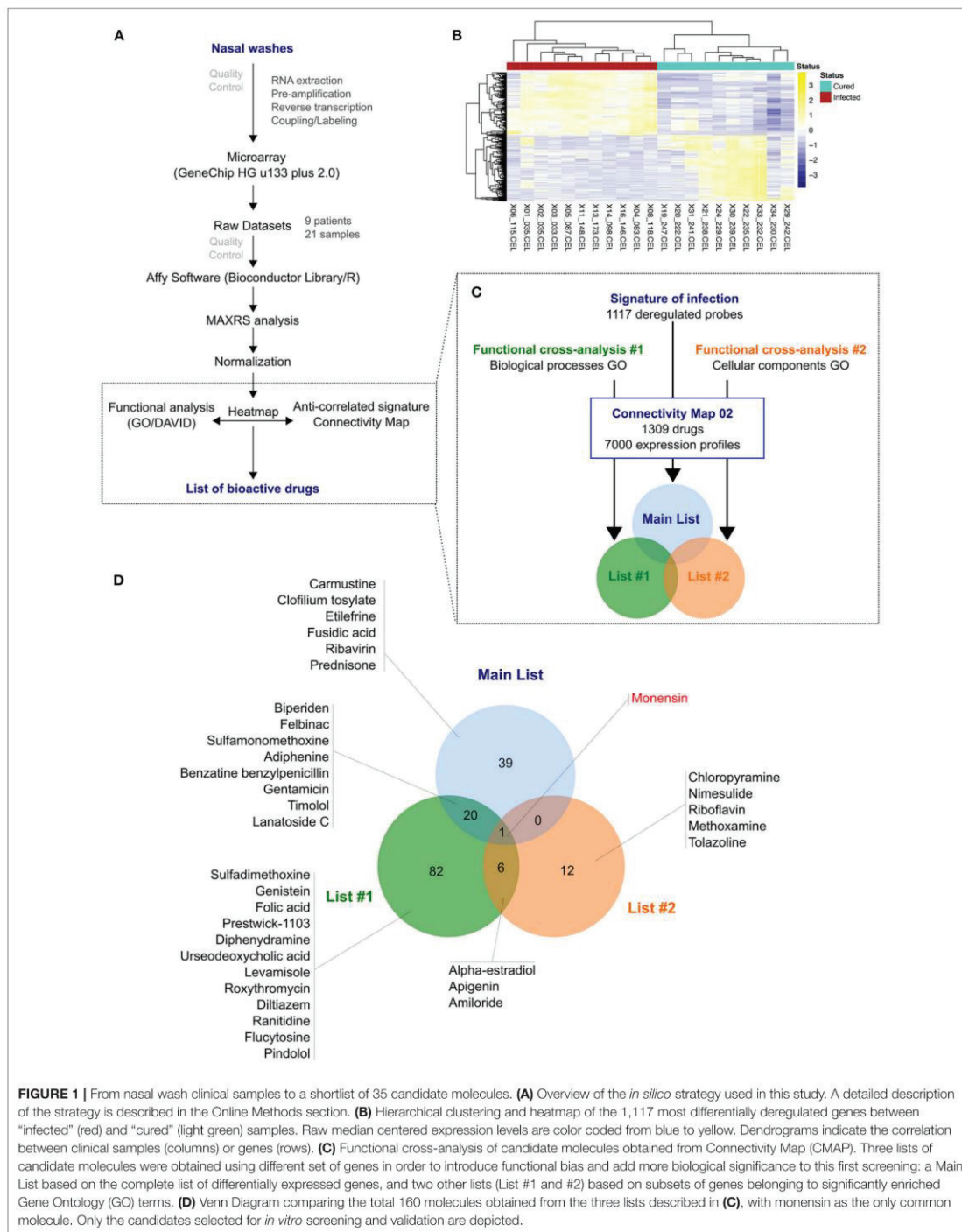
### Ethics Approval and Consent to Participate

Adult patients were recruited by general practitioners in the context of a previously published randomized clinical trial Escuret et al. (21) (ClinicalTrials.gov identifier NCT00830323) and all of them provided written informed consent. The study protocol was approved by the Lyon Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Lyon B) on September 9th, 2009 and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Center Hospitalier Universitaire de Québec (CPAC protocol authorization #2012-068-3) according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### Clinical Samples

A previously published randomized clinical trial (ClinicalTrials.gov identifier NCT00830323) was conducted in Lyon and Paris (France) during the peak circulation of the influenza A(H1N1)pdm09 virus, with the aim to assess the efficacy of oseltamivir-zanamivir combination therapy compared with oseltamivir monotherapy (21). Briefly, patients tested positive for influenza A infection by the QuickVue rapid antigen kit (Quidel) were randomized in one of the two treatment



**FIGURE 1 |** From nasal wash clinical samples to a shortlist of 35 candidate molecules. **(A)** Overview of the *in silico* strategy used in this study. A detailed description of the strategy is described in the Online Methods section. **(B)** Hierarchical clustering and heatmap of the 1,117 most differentially deregulated genes between “infected” (red) and “cured” (light green) samples. Raw median centered expression levels are color coded from blue to yellow. Dendrograms indicate the correlation between clinical samples (columns) or genes (rows). **(C)** Functional cross-analysis of candidate molecules obtained from Connectivity Map (CMAP). Three lists of candidate molecules were obtained using different set of genes in order to introduce functional bias and add more biological significance to this first screening: a Main List based on the complete list of differentially expressed genes, and two other lists (List #1 and #2) based on subsets of genes belonging to significantly enriched Gene Ontology (GO) terms. **(D)** Venn Diagram comparing the total 160 molecules obtained from the three lists described in **(C)**, with monensin as the only common molecule. Only the candidates selected for *in vitro* screening and validation are depicted.

groups and nasal wash specimens were collected within 2 h of the first visit and every 24 h until 96 h after treatment initiation. Nasal swabs were also performed on days 5 and 7. In voluntary patients, an optional supplementary nasal wash was performed at least 3 months after influenza infection (recovery phase). H1N1 subtype was further confirmed by PCR. For nine of these patients, transcriptomic data were obtained from paired samples collected during influenza infection without treatment and in the recovery phase.

### Sample Processing, RNA Preparation and Hybridization

Nasal wash samples were collected in RNAlater® Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific). Total RNA was extracted using RNeasy Micro kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed using a Bioanalyzer2100 (Agilent technologies, Inc, Palo Alto, CA, USA). To account for samples having low amount and/or partially degraded RNA (RNA Integrity Numbers between 1 and 8), we applied two types of corrections: (i) cRNA labeling was performed after a linear amplification protocol, as previously described (22) and (ii) raw signals obtained after hybridization of labeled cRNA on microarray and data acquisition were processed using the MAXRS algorithm (23). Labeled cRNA were hybridized on Affymetrix HG-U133plus2 microarrays according to manufacturer's instructions in a GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix) and microarrays were subsequently scanned in an Affymetrix 3000 7G scanner.

### Data Normalization and MAXRS Computational Analysis

The MAXRS algorithm (23) is particularly suited to gene expression analysis under low hybridization conditions. Briefly, this method takes advantage of the specific design of Affymetrix probe sets, which are composed of an average of 11 different probes that target the same locus, and is based on the observation that for most of the probe sets the same probe shows the highest fluorescence intensity in almost all arrays. For each microarray ( $m = 1..M$ ) and for each probeset ( $t = 1..T$ ), fluorescence intensity values on microarray  $m$  of all probes ( $p = 1..P_t$ ) belonging to the probeset  $t$  are sorted in increasing order. These ranks are denoted as  $r_{mtp}$ . Then, we calculated across all microarrays the rank sum ( $RS_{tp}$ ) for each probeset  $t$  for each probe  $p$  belonging to the probeset  $t$ . Finally, for each probeset  $t$ , we kept the three probes  $p$  with the highest  $RS_{tp}$ . The mean intensity of these three probes is attributed to the probeset  $t$ . As it is common practice with many modern pre-processing algorithms, and because of the low global fluorescence signal intensity, mismatched probes were excluded from MAXRS analysis.

After pre-processing the raw dataset with the MAXRS algorithm, a normalization step was performed using Tukey median-polish algorithm (24). Differential expression was assessed by applying a Student  $t$ -test for each probeset, and multiple testing was corrected using the Benjamini-Hochberg algorithm in the  $q$ value library (25). For further downstream

analysis, genes were selected according to two criteria: (i) absolute fold change  $>2$ , and (ii) corrected  $p$ -value  $< 0.05$ . Data were generated according to the Minimum Information About a Microarray Experiment guidelines and deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) (26) under accession number GSE93731.

### Functional Analysis

Functional enrichment analysis was performed on a selection of differentially-expressed genes with DAVID tools (27), using the Gene Ontology (GO) (28). To further select genes for the CMAP query, we selected 6 Biological Process (BP) terms (GO\_BP: GO:0009615-response to virus; GO:0006955-immune response; GO:0042981-regulation of apoptosis; GO:0006952-defense response; GO:0009611-response to wounding; GO:0042127-regulation of cell proliferation) that shared  $>90\%$  of genes with all significantly enriched GO\_BP terms, and 3 relevant Cellular Component terms (GO\_CC: GO:0031225-anchored to membrane; GO:0005829-cytosol; GO:0005654-nucleoplasm). To visualize and compare the different lists of compounds, Venn diagrams were obtained using the webtool developed by Dr. Van de Peer's Lab at Ghent University (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

### Cells and Viruses

Human lung epithelial A549 cells (ATCC CCL-185) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum and supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza), maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. MucilAir® human airway epithelia (HAE) were obtained from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase with specific MucilAir® Culture Medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

Influenza viruses A/Lyon/969/09 and A/Quebec/144147/09 were produced in MDCK (ATCC CCL-34) cells in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza) and 1  $\mu$ g/mL trypsin. Viral titers in plaque forming units (PFU/ml) and tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/mL) were determined in MDCK cells as previously described (29, 30).

### Viral Growth Assays

For viral growth assays in the presence of molecules, A549 cells were seeded 24 h in advance in multi-well 6 plates at  $1.8 \times 10^5$  cells/well. Three treatment protocols were evaluated. (1) In pre-treatment protocol, cells were washed with DMEM and then incubated with different concentrations of candidate molecules diluted in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Lonza) and 0.5  $\mu$ g/mL trypsin. Six hours after treatment, cells were washed and then infected with A/Lyon/969/09 (H1N1)pdm09 virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. (2) In pre-treatment plus post-treatment protocol, cells were initially treated and infected in the same conditions as explained

above. One hour after viral infection, a second identical dose of candidate molecules in supplemented DMEM was added. (3) In post-treatment protocol, cells without pre-treatment were infected in the conditions described and treatments with candidate molecules at the indicated concentrations were initiated 24 h p.i. In all cases, supernatants were collected at 48 h p.i. and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for TCID<sub>50</sub>/ml viral titration.

### Viability and Cytotoxicity Assays

Cell viability was measured using the CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega). A549 cells were seeded into 96-well plates and treated with different concentrations of molecules or solvents. Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  and then harvested at different time-points, following the same scheme as in viral growth assays. Results were presented as a ratio of control values obtained with solvents. Treatment-related toxicity in HAE was measured using the Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH, Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, duplicate 100  $\mu\text{L}$ -aliquots of basolateral medium from treated and control HAEs were incubated in the dark (room temperature, 30 min) with 100  $\mu\text{L}$  of lactate dehydrogenase (LDH) reagent in 96-well plates. After incubation, "stop solution" was added and the absorbance was measured in a conventional microplate ELISA reader. The photometer was set up for dual readings to determine non-specific background at 750 nm, and absorbance was measured at 490 nm. Percent cytotoxicity was calculated as indicated by the manufacturer, using mock-treated and 1% triton-treated epithelia as "low" and "high" controls, respectively. Percent viability is presented as 100-percent cytotoxicity.

### Mouse Model of Viral Infection

All protocols were carried out in seven to 9-weeks old female C57BL/6N mice (Charles River, QC, Canada). Animals were randomized in groups of 15 according to their weight to ensure comparable median values on each group, and then housed in micro-isolator cages (5 animals per cage) in a biosafety 2 controlled environment ( $22^{\circ}\text{C}$ , 40% humidity, 12:12 h photoperiods), with *ad libitum* access to food and water.

On day 0, mice were lightly anesthetized with inhaled 3% isoflurane/oxygen, and then infected by intranasal (i.n.) instillation of influenza A/Quebec/144147/09 (H1N1)pdm09 virus in 30  $\mu\text{l}$  of saline, as specified in each case. Control animals were mock-infected with 30  $\mu\text{l}$  of saline. Candidate molecules were evaluated in two different treatment protocols: (i) treatments were started on the same day of infection (day 0, 6 h prior to infection), or (ii) treatments were started 24 h after infection (day 1). Regardless of treatment initiation time, all treatments were performed *per os* (150- $\mu\text{l}$  gavage) once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total). Mortality, body weight and clinical signs such as lethargy and ruffled fur were daily monitored on 10 animals/group for a total of 14 days. Animals were euthanized if they reached the humane endpoint of  $>20\%$  weight loss. The remaining 5 animals/group were euthanized on day 5 p.i. to measure lung viral titers (LVTs).

Vehicle (saline) or oseltamivir were used as placebo and positive treatment control, respectively. The oseltamivir dose

(10 mg/kg/day) was adjusted to confer  $\sim 50\%$  protection in the selected experimental conditions and is considered a good correlate of half the normal dose of 150 mg/day given to humans (31). The doses of repurposed candidate molecules were selected to be in the non-toxic range for mouse studies, according to published preclinical data for their first therapeutic indication. To validate this choice in our specific model, potential drug toxicity was evaluated in mock-infected animals treated with the same regimens as virus-infected mice.

### Pulmonary Viral Titers

In order to evaluate the effect of different treatments on viral replication, 5 animals per group were euthanized on day 5 p.i. and lungs were removed aseptically. Mice were randomly selected from the 3 cages of each group to minimize cage-related bias. Lungs were homogenized in 1 ml of PBS using a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen) and debris was pelleted by centrifugation (2,000 g, 5 min). Triplicate 10-fold serial dilutions of each supernatant were plated on ST6GalIMDCK cells (kindly provided by Dr. Y. Kawaoka, University of Wisconsin, Madison, WI) and titrated by plaque assays (29). The investigator was blinded to group allocation.

### Viral Infection in Reconstituted Human Airway Epithelium (HAE)

For HAE infection experiments, apical poles were gently washed with warm PBS and then infected with a 100- $\mu\text{L}$  dilution of influenza A/Lyon/969/09 (H1N1)pdm09 virus in OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) at a MOI of 0.1. Basolateral pole sampling as well as 150- $\mu\text{L}$  OptiMEM apical washes were performed at the indicated time points, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for PFU/mL and TCID<sub>50</sub>/mL viral titration. Treatments with specific dilutions of candidate molecules alone or combined with oseltamivir in MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium were applied through basolateral poles. Control HAE were mock-treated in the same conditions with MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium without molecules. All treatments were initiated on day 0 (5 h after viral infection) and continued once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total). Variations in transepithelial electrical resistance ( $\Delta$  TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as  $\text{Ohm}/\text{cm}^2$ .

### High Throughput Sequencing and Bioinformatics Analysis

cDNA libraries were prepared from 200 ng of total RNA using the ScriptSeq<sup>TM</sup> complete Gold kit-Low Input (SCL6EP, Epicenter), according to manufacturer's instructions. Each cDNA library was amplified and indexed with primers provided in the ScriptSeq<sup>TM</sup> Index PCR Primers kit (RSBC10948, Epicenter) and then sequenced as 100 bp paired-end reads. Prior to sequencing, libraries were quantified with QuBit and Bioanalyzer2100, and indexed libraries were pooled in equimolar concentrations. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 system (Illumina, Carlsbad, CA), with a required minimum of 40 million reads sequenced per sample. Conversion and demultiplexing of reads was performed using bcl2fastq 1.8.4

(Illumina). The FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) was used for quality controls of the raw data. Reads were trimmed using the Trimmomatic (32) software, with a minimum quality threshold of Q30. Trimmed reads were pseudo-aligned to the *Homo sapiens* genome (GRCh38.p11) using the Kallisto software (33). Statistical analysis was performed in R3.3.1 with the package EdgeR 3.14.0 (34). Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Benjamini-Hochberg procedure was used to control the false discovery rate (FDR). Transcripts with an absolute fold change  $>2$  and a corrected  $p$ -value  $< 0.05$  were considered to be differentially expressed. Enriched pathways and GO terms were assessed with DAVID 6.8 (27). For visualization purposes, a heatmap and stacked barplots were constructed in R3.3.1 on mean-weighted fold changes and association between conditions were assessed by Spearman correlation analysis.

### Statistical Analysis

All experimental assays were performed in duplicate at a minimum, and representative results are shown unless indicated otherwise. No statistical methods were used to predetermine sample size in animal studies, which were estimated according to previous studies and the known variability of the assays. No mice were excluded from post-protocol analyses, the experimental unit was an individual animal and equal variance was assumed. Kaplan-Meier survival plots were compared by Log-Rank (Mantel-Cox) test and hazard ratios (HR) were computed by the Mantel-Haenszel method. Weight loss and viral titers of all groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison post-test. The testing level ( $\alpha$ ) was 0.05. Statistical analyses were performed on all available data, using GraphPad, Prism 7.

## RESULTS

### Generation of Clinical Virogenomic Profiles

We determined *in vivo* transcriptional signatures of infection from paired nasal wash samples of nine untreated patients, collected during acute A(H1N1)pdm09 pandemic influenza infection ("infected") and at least 3 months later to ensure a recovery non-infected state ("cured") (21). The nine patients from whom transcriptomic data could be obtained constitute a representative sample of the whole studied cohort, except for the male sex ratio (Table S1). We combined two strategies to tackle the characteristic low RNA amount/quality of this type of clinical samples. Firstly, cRNA labeling was performed after a linear amplification of initial RNA, as previously described (35). Secondly, raw signals obtained after hybridization of labeled cRNA on microarray and data acquisition were processed using the MAXRS algorithm (23) to overcome low hybridization conditions. This approach, initially developed for the analysis of heterologous hybridizations, takes advantage of the specific design of the Affymetrix<sup>®</sup> microarray used in our study, with several probes targeting the same locus (23).

After normalization, differentially expressed genes were selected based on two criteria: (i) an absolute fold change

$>2$ , and (ii) a Benjamini-Hochberg corrected  $p$ -value  $< 0.05$ . We therefore identified a total of 1,117 commonly deregulated probes, with almost equal proportion of up-regulated (48.4%;  $n = 541$ ) and down-regulated probes (51.7%;  $n = 576$ ). Remarkably, despite considerable inter-patient variability among recovery state samples, a substantial homogenization of transcriptional profiles was observed in the context of infection, as shown in the heatmap presented in Figure 1B and by the median Spearman's  $\rho$  correlation values for both groups (0.60 "cured" vs. 0.90 "infected"). These virogenomic signatures of infection constituted the input for the subsequent *in silico* query for the identification of candidate compounds.

### *In silico* Cross-Analysis of Chemogenomic vs. Virogenomic Clinical Profiles

We then performed an *in-silico* search for molecules that reverse the virogenomic signature of infection, using the CMAP database (Build 02) as previously described (18). CMAP is a collection of genome-wide transcriptional expression data from cultured human cells treated with bioactive small molecules. HG-U133plus2 probesets were mapped to the U133A probesets using the Ensembl BioMarts online tool (36, 37), and connectivity scores and  $p$ -values were obtained using the CMAP algorithm (19, 20). With the global set of 1,000 most differentially expressed genes as input (Figure 1C, Main List), we obtained a preliminary list of 60 candidate compounds. In parallel, we used two other subsets of genes belonging to significantly enriched Gene Ontology (GO) terms obtained from microarray analyses to introduce functional bias and add more biological significance to our first screening. Hence, by using 6 Biological Process terms (GO\_BP) that shared more than 90% of genes (Figure 1C, Functional cross-analysis #1), a second list of 109 compound candidates was obtained. A third list of 19 compounds was obtained using 3 relevant Cellular Component terms (GO\_CC) (Figure 1C, Functional cross-analysis #2). The comparison of the 160 compounds from the three distinct lists (12.2% of compounds of CMAP, Table S2) highlighted monensin as the only common compound (Figure 1D).

To rationally reduce the number of drug candidates, bioactive drugs were excluded if not compatible with a final use as antiviral, mostly for safety (e.g., teratogens, intercalating agents), and/or pharmacological (e.g., documented low bioavailability) reasons, based on clinical data and the PubMed/PubChem databases. Thus, the number of candidates was initially decreased to 139 and then to 110 (Figure S1). We subsequently determined a shortlist of 35 bioactive molecules ( $<3\%$  of CMAP, Table 1) for *in vitro* screening, based on two main criteria: (i) molecules representative of the different pharmacological classes identified, and (ii) molecules evenly distributed in the three lists obtained after *in silico* screening (Main List, List #1 and List #2, Figure 1D), which comprise a panoply of documented pharmacological classes, including anti-fungal agents (e.g., monensin, flucytosine), anti-inflammatory agents (e.g., felbinac, apigenin, prednisone) and adrenergic agonists/antagonists (timolol, methoxamine,



**TABLE 1** | Shortlist of the 35 selected molecules and their documented pharmacological classes.

Name	Pharmacological class
Adiphenine	Parasympatholytics/Anticholinergics/Antispasmodics
Alpha-estradiol*	5 alpha-reductase inhibitors/Androgenic alopecia treatment
Amiloride*#	Epithelial Sodium Channel Blockers/Diuretics/Acid Sensing Ion Channel Blockers
Apigenin*#	Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/?
Benzathine benzylpenicillin#	Anti-Bacterial Agents
Biperiden*	Antiparkinson Agents/Muscarinic Antagonists/Parasympatholytics
Carmustine	Antineoplastic Agents, Alkylating
Chloropyramine	Histamine H1 Antagonists
Clofilium tosylate	Anti-Arrhythmia Agents
Diltiazem	Antihypertensive Agents/Calcium Channel Blockers/Cardiovascular Agents/Vasodilator Agents
Diphenhydramine	Anesthetics, Local/Anti-Allergic Agents/Antiemetics/Histamine H1 Antagonists/Hypnotics and Sedatives
Etilefrine	Adrenergic beta-1 and alpha agonist/Cardiotonic/antihypotensive agent.
Felbinac#	Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal
Flucytosine*#	Antifungal Agents/Antimetabolites
Folic acid	Hematinics/Vitamin B Complex
Fusidic acid#	Anti-Bacterial Agents/Protein Synthesis Inhibitors
Genistein	Anticarcinogenic Agents/Phytoestrogens/Protein Kinase Inhibitors
Gentamicin#	Anti-Bacterial Agents/Protein Synthesis Inhibitors
Lanatoside C	Anti-Arrhythmia Agents
Levamisole*	Adjuvants, Immunologic/Antinematodal Agents/Antirheumatic Agents
Methoxamine	Adrenergic alpha-1 Receptor Agonists/Sympathomimetics/Vasoconstrictor Agents
Monensin*#	Antifungal Agents/Antiprotozoal Agents/Coccidiostats/Proton Ionophores/Sodium Ionophores
Nimesulide*#	Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/Cyclooxygenase Inhibitors
Pindolol	Adrenergic beta-Antagonists/Antihypertensive Agents/Serotonin Antagonists/Vasodilator Agents
Prednisone#	Anti-Inflammatory Agents/Antineoplastic Agents, Hormonal/Glucocorticoids
Prestwick-1103#	Anti-Inflammatory Agents, Non-steroidal/Cyclooxygenase Inhibitors
Ranitidine	Anti-Ulcer Agents/Histamine H2 Antagonists
Ribavirin*	Antimetabolites/Antiviral Agents
Riboflavin*	Photosensitizing Agents/Vitamin B Complex
Roxithromycin#	Anti-Bacterial Agents
Sulfadimethoxine#	Anti-Infective Agents
Sulfamonomethoxine#	Anti-Infective Agents
Timolol*	Adrenergic beta-Antagonists/Anti-Arrhythmia Agents/Antihypertensive Agents
Tolazoline	Adrenergic alpha-Antagonists/Antihypertensive Agents/Vasodilator Agents
Ursodeoxycholic acid	Cholagogues and Cholteretics

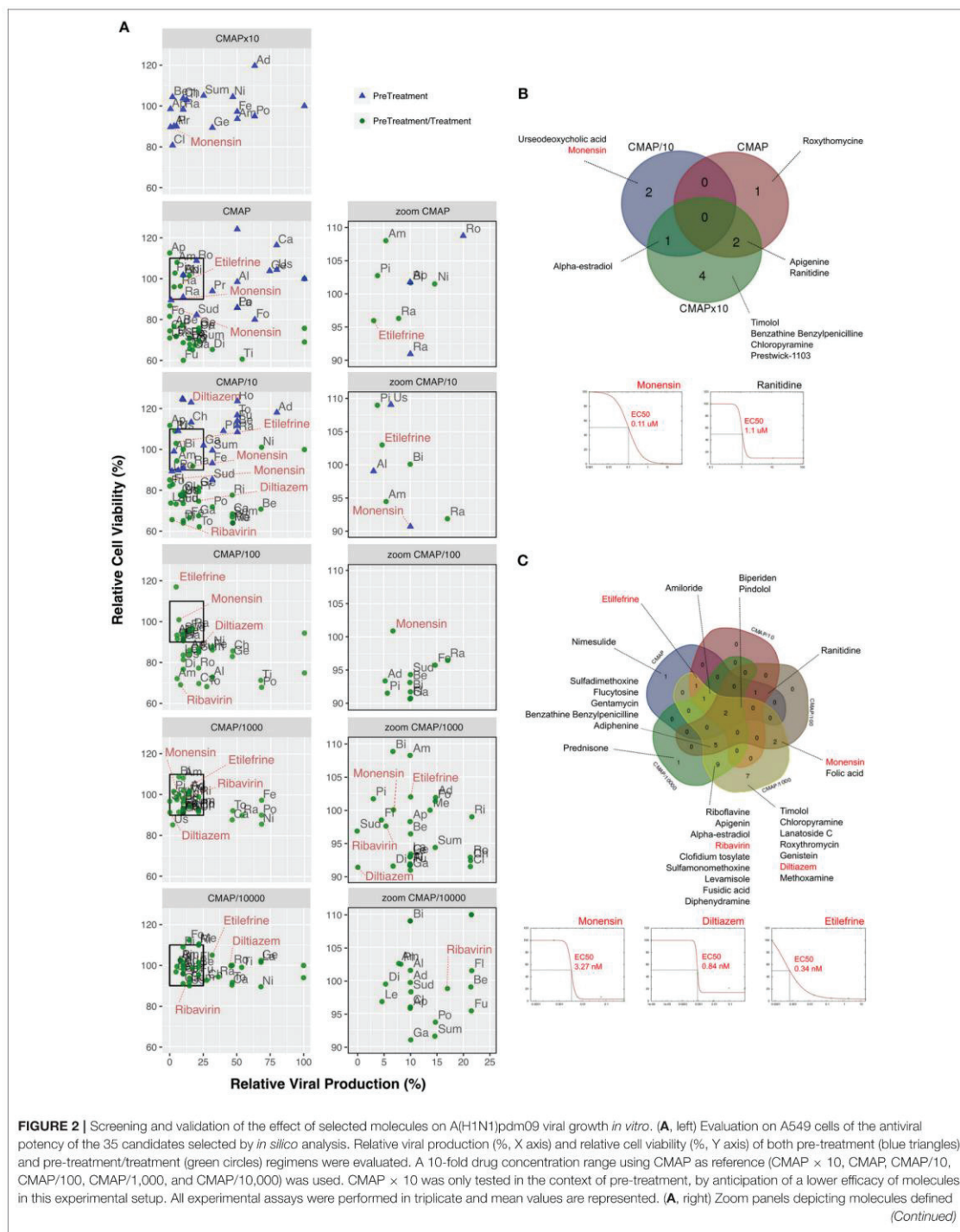
Shortlist of the 35 selected candidates representative of the 110 molecules obtained from the *in silico* screening (Figure 1 and Figure S1). Documented pharmacological classes were obtained from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). (\*) indicate molecules previously evaluated for their antiviral properties according to the literature, and numerals (#) those belonging to anti-microbial or anti-inflammatory related pharmacological classes.

tolazoline), as represented in the Venn diagram (Figure 1D, Table 1). Interestingly, at least 14 (40%) molecules from our short-list belong to a pharmacological class related with anti-microbial or anti-inflammatory activities (Table 1, #), and 11 (31.4%) have already been reported in the literature for their antiviral properties against influenza or other viruses (Table 1, \*), notably the nucleoside inhibitor ribavirin (38, 39) and the ionophore monensin (40).

### Inhibitory Effect of the Selected Molecules on A(H1N1)pdm09 Viral Growth *in vitro*

*In vitro* screening of the antiviral potency of the 35 selected molecules was performed in A549 human lung epithelial cells

seeded in 6-well plates. Firstly, we evaluated the impact of 6 h pre-treatment with a 10-fold drug concentration range, using the original CMAP concentration as reference. Six hours after treatment, cells were washed and infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus at a MOI of 0.1. Viral titers in supernatants collected from treated samples at 48 h post infection (p.i.) were normalized with those measured in mock-treated controls ( $>10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL). Potential treatment-induced cell toxicity was evaluated in the same experimental conditions using the MTS assay and expressed also as the percentage of cell viability compared to non-infected controls (Figure 2). Based on antiviral activity and cell viability profiles obtained (Figure 2A, blue triangles), we defined as “inhibitors”



**FIGURE 2** | as “inhibitors” according to the following two criteria: (i) induce a 75% or higher reduction on viral production, and (ii) have minor impact on cell viability, with relative values in the 90–110% range. For clarity purposes, with the exception of diltiazem, etilefrine, monensin, and ribavirin. Ad, Adiphenine; Al, Alpha-estradiol; Am, Amiloride; Ap, Apigenin; Be, Benzathine Benzylpenicilline; Bi, Biperiden; Ca, Carmustine; Ch, Chloropyramine; Cl, Clofidium tosylate; Di, Diphenhydramine; Fe, Felbinac; Fl, Flucytosine; Fo, Folic acid; Fu, Fusidic acid; Ge, Genistein; Ga, Gentamycin; La, Lanatoside C; Le, Levamisole; Me, Methoxamine; Ni, Nimesulide; Pi, Pindolol; Po, Prednisone; Pr, Prestwick-1103; Ra, Ranitidine; Ri, Riboflavine; Ro, Roxythromycin; Sud, Sulfadimethoxine; Sum, Sulfamonomethoxine; Ti, Timolol; To, Tolazoline; Us, Urseodeoxycholic acid. Dose-response curves for all the 35 molecules are presented in **Table S3**. **(B)** Venn diagram of the 10 molecules identified in pre-treatment (10/35; 28.57%) and matching the “inhibitor” criteria, mainly when used at 10-fold CMAP concentration. EC50 curves for monensin and ranitidine are represented. **(C)** Venn diagram of the 30 “inhibitor” molecules identified in pre-treatment/treatment (30/35; 85.7%). EC50 curves for monensin, diltiazem, and etilefrine are represented.

compounds that fulfilled the following two criteria: (i) induce >75% reduction on viral production, and (ii) have minor impact on cell viability, with relative values in the 90–110% range (**Figure 2A**, squares in left panels and zooms in right panels). A total of 10 compounds (28.6%) matched both criteria, mainly when used at a 10-fold CMAP concentration (**Figure 2B**), yet only a limited number of them exhibited classic dose-dependent inhibition. Whenever possible, as in the case of monensin or ranitidine for example, EC50 values were calculated, which were mostly in the micromolar range (**Figure 2B**).

In a second round of screening, we tested the same 6 h pre-treatment but with serial 10-fold dilutions from the initial CMAP concentration to CMAP/10,000, followed by one additional treatment immediately after infection (**Figure 2A**, green circles in left and right panels). In these conditions, 30 compounds (85.7%) met our criteria to be considered as inhibitors of viral production (**Figure 2C**), with half of them showing a classic dose-dependent inhibition effect. Calculated EC50 values were in the nanomolar range and hence significantly lower than those calculated in the context of pre-treatment only. Dose response curves and calculated EC50 for all the 35 compounds are presented in **Figure S2** and **Table S3**, respectively.

### Efficacy of Selected Molecules for the Treatment of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Infection in Mice

Based on EC50 and cytotoxicity data from the *in vitro* screening, we selected 8 molecules to investigate their potential as inhibitors of influenza A(H1N1)pdm09 in C57BL/6 mice. Oseltamivir, the standard antiviral for the treatment of influenza infections was used as control. All treatments were performed *per os*, starting 6 h before infection and being continued once daily for 5 consecutive days (5 drug administrations in total) (**Figure 3**). While animals treated with oseltamivir or monensin showed clinical improvement compared to the saline (placebo) group in terms of survival and weight loss (oseltamivir only), treatment with Lanatoside C, prednisolone, flucytosine, felbinac, and timolol showed no clinical benefit at the selected concentrations (**Figure S3A**). In contrast, diltiazem and etilefrine not only significantly improved survival and maximum mean weight losses (**Figures 3A,B**), but also showed at least 1-log reductions in LVTs on day 5 p.i. (**Figure 3C**). Importantly, no signs of toxicity were

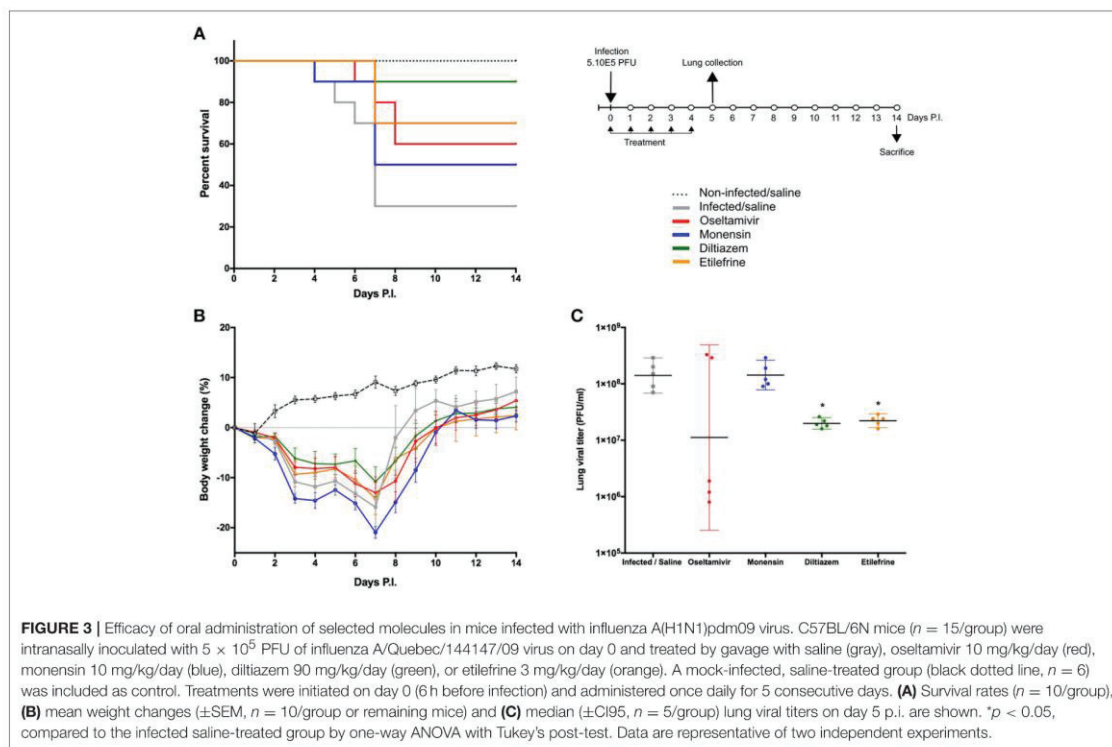
observed for any of the drugs at the regimens tested (**Figure S3B**).

### Diltiazem Retains Its *in vivo* Efficacy When Administered 24 h After Viral Infection

To best mimic the therapeutic setting, we next evaluated the efficacy of the same 5-day oral regimen with diltiazem or etilefrine but when initiated 24 h after viral infection (**Figure 4**). As with oseltamivir and monensin, diltiazem treatment completely prevented mortality and reduced weight loss in influenza A(H1N1)pdm09 infected mice, which otherwise showed only 50% (5/10) survival for the etilefrine and saline groups (**Figures 4A,B**). Interestingly, 1- to 1.5-log reductions in LVTs compared to the saline group were observed at day 5 in groups of mice treated with diltiazem or etilefrine (**Figure 4C**). We then used a more stringent approach by increasing the viral inoculum to evaluate the same delayed (24 h post infection) 5-day diltiazem regimen in the context of a 100% lethal A(H1N1)pdm09 infection (**Figures 4D–F**). Whereas, treatment with oseltamivir and diltiazem successfully rescued 40% (4/10) and 20% (2/10) of mice, respectively, half-dose treatment with diltiazem (45 mg/kg) rescued 30% (3/10) of mice from death, also showing significant improvement in mean weight loss (**Figures 4D,E**). Calculated hazard ratios (HR) for the saline group compared to these three treatment groups were 8.41 (CI95: 1.65–43.02), 2.85 (0.56–14.47), and 7.62 (1.49–38.96), respectively. Noteworthy, LVTs at day 5 p.i. were comparable among all treated and untreated groups (**Figure 4F**), suggesting mainly a protective effect of diltiazem toward severe influenza infection rather than a direct role in decreasing viral production.

### Diltiazem Significantly Reduces Viral Replication in Infected Reconstituted Human Airway Epithelia (HAE)

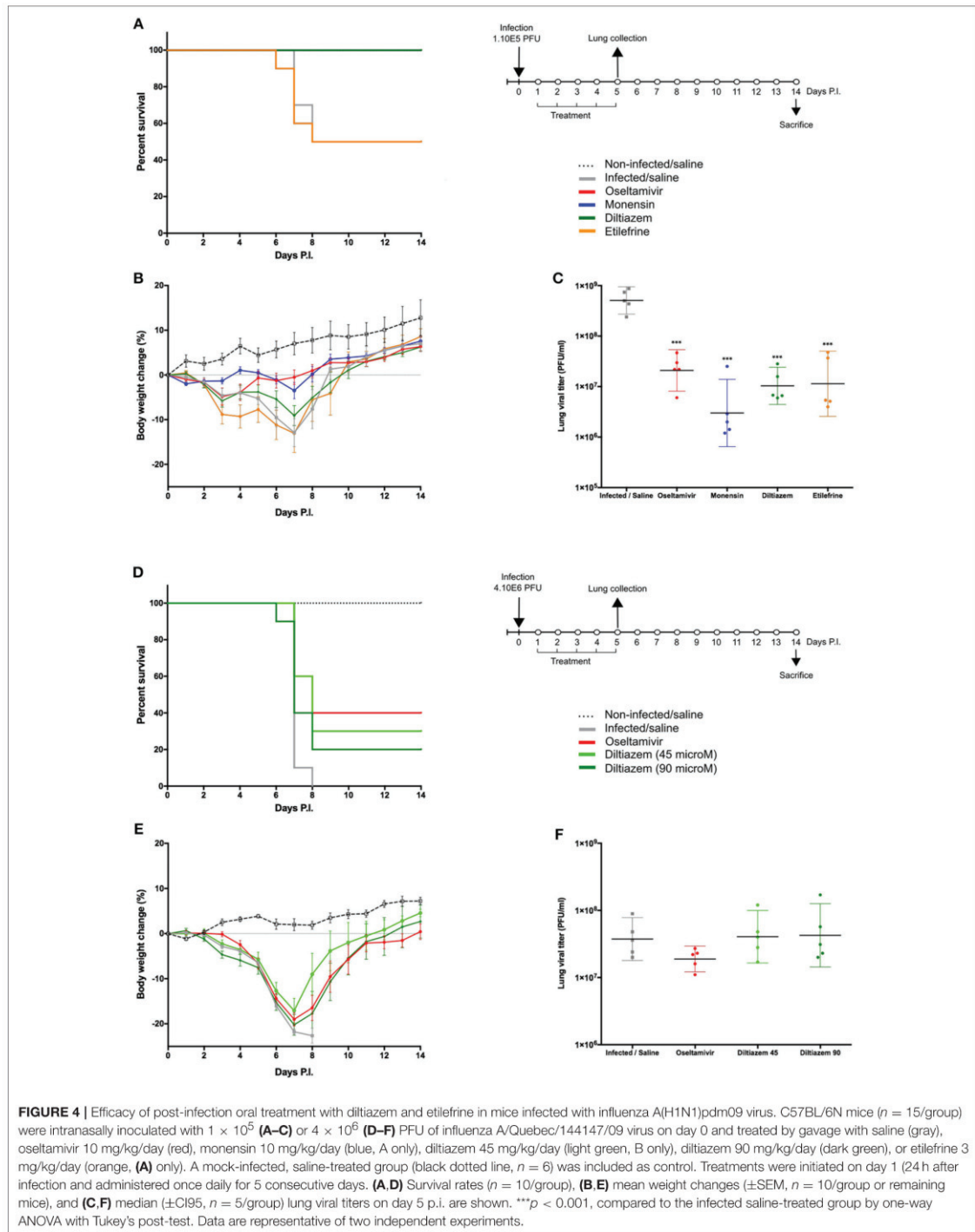
To further complement *in vivo* data, we characterized the inhibitory properties of diltiazem using a biologically relevant reconstituted airway epithelium model, derived from human primary bronchial cells (MucilAir<sup>®</sup>, Epithelix). HAE were infected with influenza A(H1N1)pdm09 at a MOI of 0.1, and treatments on the basolateral medium were initiated 5 h p.i. and continued once daily for 5 consecutive days. Viral replication at the apical surface of mock-treated (MucilAir<sup>®</sup> Culture Medium without molecules) HAE peaked at 48 h p.i. ( $\sim 1 \times 10^8$  PFU/ml) and was detectable at important levels for at least 7 days. As expected, trans-epithelial electrical resistance (TEER) values, measuring tight junction and cell

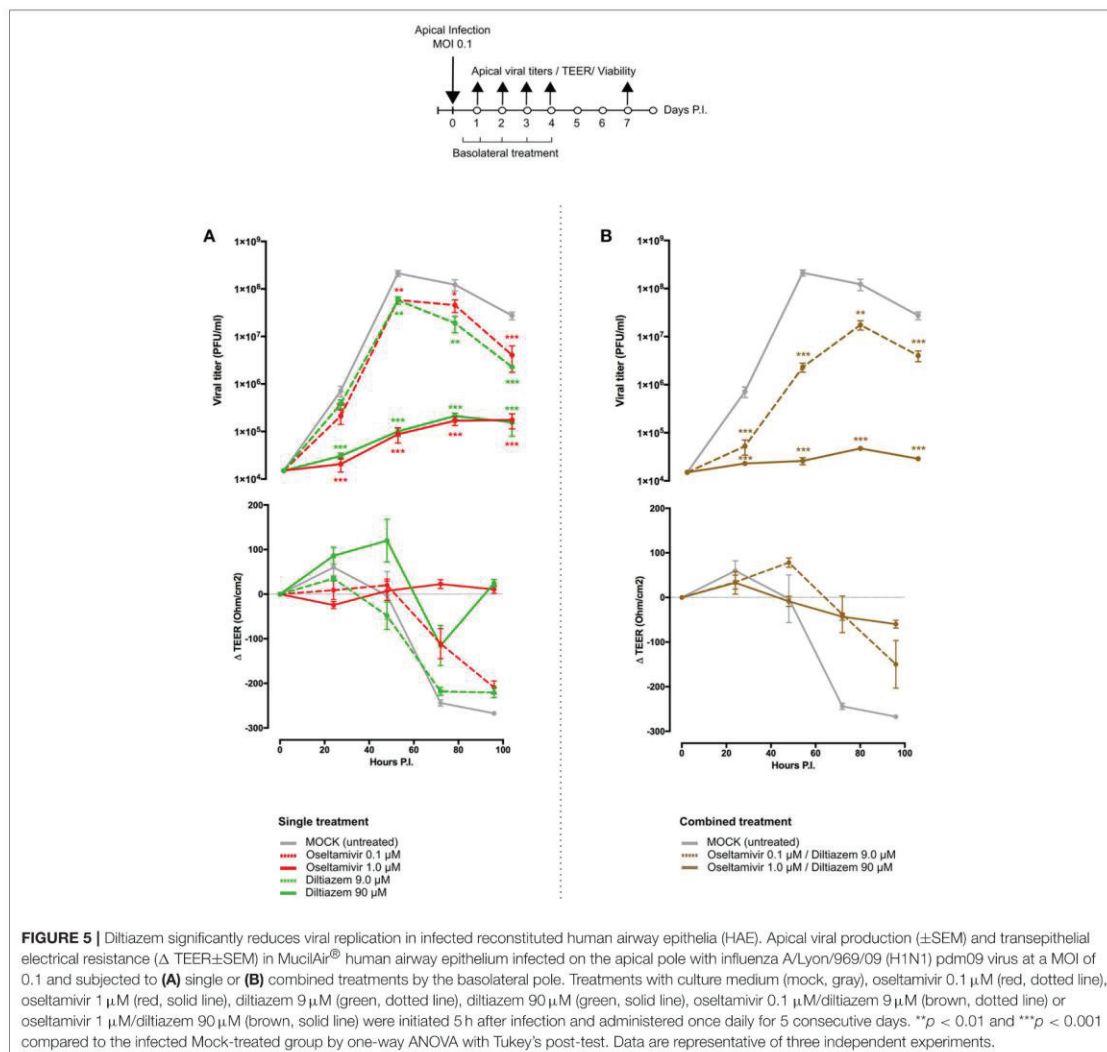


layer integrity, sharply decreased and bottomed out at 72 h p.i. in the untreated control, correlating with the first virus detection on the basolateral medium (Figure 5A and Table S6). A similar pattern was observed in infected HAE treated with oseltamivir 0.1  $\mu\text{M}$  or diltiazem 9  $\mu\text{M}$  (CMAP), which conferred no significant advantage over the untreated control. Conversely, oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  and diltiazem 90  $\mu\text{M}$  treatments (10-fold CMAP) strongly inhibited viral replication, delaying the peak of viral production by 24 h. Both treatments induced  $>3$ -log reductions in apical viral titers at 48 h p.i. compared to the untreated control, and  $>2$ -log reductions when comparing peak titers (48 h p.i. untreated vs. 72 h p.i. treated). Moreover, whereas oseltamivir treatment stabilized TEER during the time-course of infection, diltiazem treatment partially buffered the TEER decrease observed in the untreated control (Figure 5A and Table S6). No virus was detected on the basolateral medium for these two treated groups, and absence of treatment-induced toxicity was confirmed by measuring the release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH). Interestingly, we observed that inhibitory and protective properties demonstrated by diltiazem were progressively reversible when basolateral medium was replaced with fresh medium without drugs. Overall, these results are in accordance and strongly support the inhibitory and protective effects of diltiazem observed *in vitro* and in mice, respectively.

### Diltiazem-Oseltamivir Combination Confers Improved Efficacy When Compared to Monotherapy in Infected HAE

We anticipated that the combination of two antiviral compounds that target different viral/cellular determinants could induce better virological and physiological responses when compared to antiviral monotherapy. We therefore evaluated the diltiazem-oseltamivir combination in the same conditions described above, notably a 5-day treatment course with treatment initiation at 5 h p.i. The diltiazem 90  $\mu\text{M}$ /oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  combination conferred  $>3$ -log reduction in apical peak viral titers when compared to the untreated control, even greater than that observed with same dose monotherapy. TEER values remained stable during combined treatment, comparable to those observed with oseltamivir 1  $\mu\text{M}$  monotherapy (Figure 5B and Table S6). Remarkably, although not effective as monotherapy in the low concentrations tested above, the diltiazem 9  $\mu\text{M}$ /oseltamivir 0.1  $\mu\text{M}$  combination contrariwise delayed the peak of viral production, significantly reduced apical viral titers, and slightly buffered TEER values compared to the untreated control (Figure 5B and Table S6). Once again, no treatment-related toxicity was observed for any of the combinations tested. These results plead in favor of the potential of diltiazem for the improvement of current anti-influenza therapy with neuraminidase inhibitors.

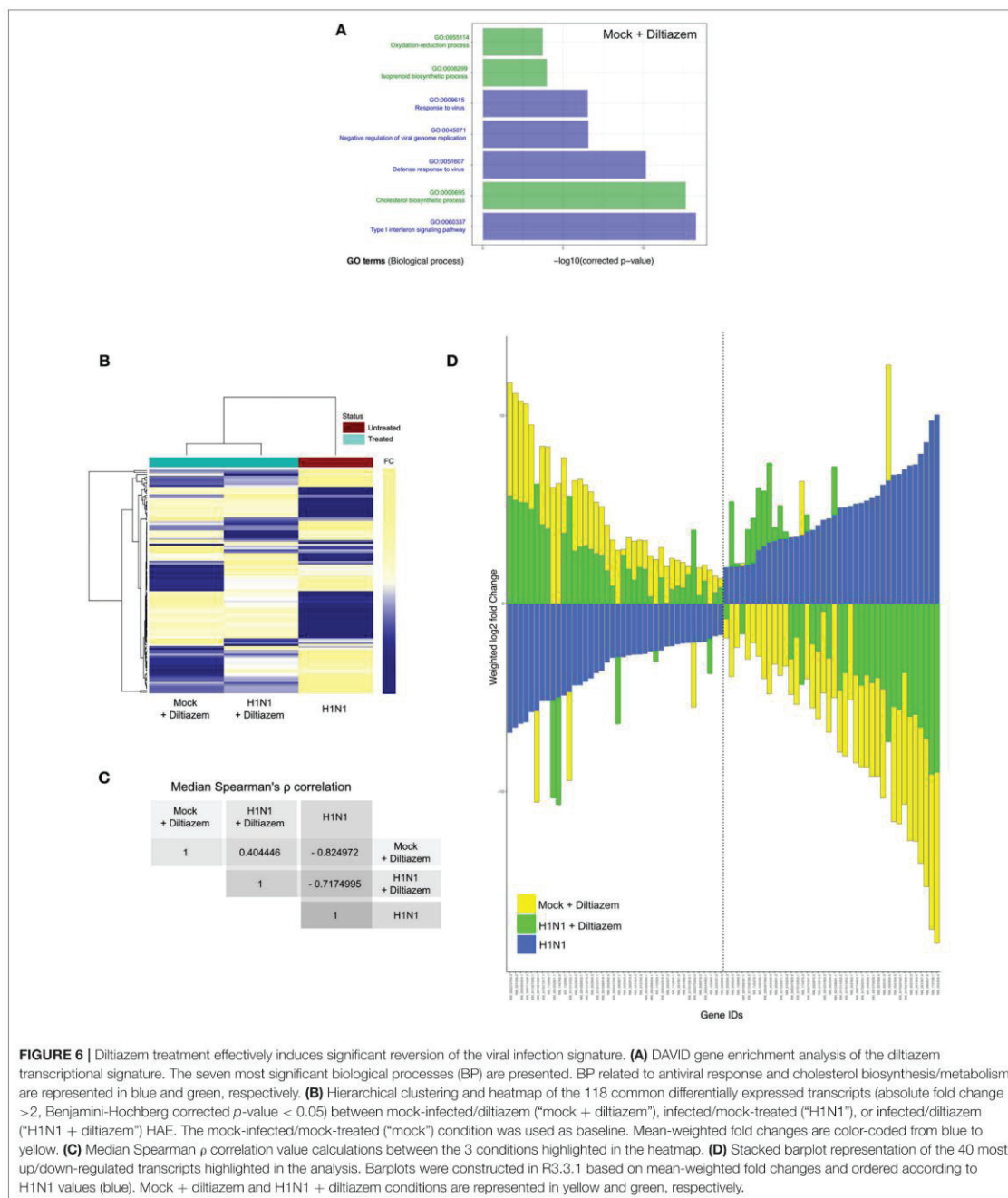




### Diltiazem Treatment Induces a Significant Reversion of the Viral Infection Signature

Since the rationale behind our approach relies on attaining antiviral activity through a drug-induced global and multi-level inversion of the infection signature, we advantageously used the MucilAir® HAE model coupled with high-throughput sequencing in order to characterize and compare the specific transcriptional signatures induced by infection and/or diltiazem treatment (Figure 6 and Figure S4). HAE were mock-infected or infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus and then mock-treated or treated in the same experimental conditions in which the antiviral effect of diltiazem has been previously validated (MOI of 0.1, 90 μM diltiazem). At 72 h p.i., cells

were lysed and total RNA was extracted. cDNA libraries were then produced, amplified, and subjected to high-throughput sequencing. Taking the mock-infected / mock-treated ("mock") as baseline, we initially performed DAVID functional gene enrichment (absolute fold change >2, Benjamini-Hochberg corrected *p* < 0.05) on the specific transcriptional signature of diltiazem with the objective of gaining insight on the putative host pathways involved in its antiviral effect. The lists of up-regulated (*n* = 194) and down-regulated (*n* = 110) transcripts in the mock-infected/diltiazem ("mock + diltiazem") condition were analyzed using DAVID 6.8 to highlight associations with specific GO terms. Although no enriched BP was identified among down-regulated transcripts, the list of up-regulated



transcripts associated with diltiazem treatment highlighted 7 particularly enriched BP. While 4 of these BP (GO:0009615; GO:0045071; GO:0051607; GO:0060337) are directly linked

to antiviral response/cellular response to virus, the remaining 3 (GO:0055114; GO:0008299; GO:0006955) are involved in cholesterol biosynthesis/metabolism (Figure 6A). We then

compared the common differentially expressed transcript levels between the three infection/treatment conditions. These transcriptional signatures revealed a marked anti-correlated profile between the “mock + diltiazem” and the infected / mock-treated (“H1N1”) conditions (Figure 6B), supported by a median Spearman’s  $\rho$  correlation value of  $-0.82$  (Figure 6C). Most important, the infected/diltiazem (“H1N1 + diltiazem”) condition yielded  $\rho$  correlation values of  $0.40$  and  $-0.72$  when compared to either “mock + diltiazem” or “H1N1,” respectively, therefore confirming a partial reversion of the infection virogenomic signature during effective antiviral treatment with diltiazem (Figure 6D and Figure S4), as expected.

## DISCUSSION

The existing urge for alternative strategies to cope with the limited efficacy of currently approved antivirals for the prevention and treatment of influenza infections (2, 41, 42), mostly in the case of patients with severe influenza and acute respiratory distress syndrome (ARDS) (43, 44), represented the central driving force of this study. Here, we developed and validated for the first time an innovative approach based on clinical genomic signatures of respiratory viral infections for the rapid discovery, *in vitro*, *in vivo*, and *ex-vivo* evaluation, as well as the repurposing of FDA-approved drugs for their newly identified host-targeted inhibitory and protective properties against influenza infections.

Targeting host components on which viral replication depends instead of viral determinants represents a real change of paradigm in antiviral development, with pioneering results mainly observed in the context of antiretroviral therapy (13, 45). Nevertheless, and despite strong putative advantages such as the achievement of broad-spectrum antiviral efficacy and the minimization of viral drug resistance, this approach usually fails to overcome two major limiting factors of classic compound screening. Firstly, it remains target-centered *per se*, therefore leading to the identification of drugs with limited efficacy due to the complex network and high redundancy of the host cellular pathways. Secondly, the need of high-throughput screenings often entails the measurement of a very limited number of viral parameters, usually in non-physiologically and hence poorly relevant conditions and/or cellular models.

Based on our initial proof-of-concept study on the *in silico* screening of the CMAP database (19, 20) with no initial *a priori* on specific host targets (18), we moved our approach up to the clinical trial setting, by determining exploitable and more relevant virogenomic profiles directly from standard clinical samples of influenza-infected patients. Since the low amount of often degraded RNA obtained from these samples represented a major challenge, we implemented an original combination of sample preparation techniques for low input but high quality samples with data processing initially designed for expression analysis of non-model species (22, 23).

Another substantial development was the integration of several lists of candidate molecules issued from different transcriptomic signatures with enriched relevant DAVID Gene

Ontology terms, and their final selection based on their pharmacological classes and potential compatibility as antivirals. Our refined strategy allowed the selection of a shortlist of 35 high potential candidates out of a rationalized computational screening of a total of 1,309 FDA-approved bioactive molecules. This drastic positive selection step constituted a major advantage, since it enabled the implementation of relevant and integrated *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* evaluations in a time- and cost-effective manner. Most important, the use of patient (*in vivo*) virogenomic profiles led to the identification of molecules with highly improved *in vitro* activity and significant *in vivo* antiviral efficacy as compared with compounds previously obtained from our initial study based on cell culture (*in vitro*) virogenomic profiles (18). These results truly highlight the added value of using relevant clinical virogenomic signatures to optimize the computational screening for active drugs.

Two of the molecules identified in this study with transcriptomic profiles that counteract clinical virogenomic signatures (e.g., ribavirin and monensin) have already been validated for their anti-influenza properties (38, 40), and then supported the relevance of our compound selection strategy. Nevertheless, although different modes of action have been postulated for the anti-influenza activity of the synthetic guanosine analog ribavirin (39), the exact mechanisms remain uncharacterized so far. Similarly, it has been postulated that monensin, an antibiotic isolated from *Streptomyces* spp, may have a role as an ionophore that interferes with intracellular transport of several enveloped viruses, including influenza (40). In that sense, even if we cannot rule out that some of the molecules identified *in silico* exert a direct effect on a specific pathway or cellular target, the fact that these molecules have been identified with a high anti-correlation rate in CMAP strongly supports a potential multi-target inhibitory effect, probably resulting in deep modifications of host gene expression. In fact, both monensin and ribavirin were previously reported to modulate the host cellular gene expression profile, notably through the up-regulation of the cholesterol and lipid biosynthesis genes (46) or the virus-induced ISRE signaling and antiviral ISGs genes (47), respectively.

The two most promising molecules highlighted in this study are etilefrine, an alpha and beta- adrenergic receptor agonist, currently indicated as a cardiostimulant and anti-hypotensive agent (48) and mainly diltiazem, a voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel antagonist that is currently used to control angina pectoris and cardiac arrhythmia (49). In addition to their strong inhibitory effect on the viral growth of circulating A(H1N1)pdm09 viruses, with *in vitro* EC50 values in the nanomolar range (Figure 2), both molecules also demonstrated antiviral properties against oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 and prototype H3N2 and B influenza strains (Table S4). Interestingly, virus pre-incubation with diltiazem or etilefrine before infection did not affect final viral titers compared to PBS-incubated controls, hence suggesting that the observed antiviral effect of these molecules is not mediated by direct drug-virus interactions at early stages of viral entry (Table S5). Our *in vivo* results (Figures 3, 4), obtained without previous treatment optimization in terms of dosage or administration



route, also suggest that these drugs harbor a protective role toward influenza infection, particularly in the case of diltiazem, which conferred increased survival in mice even in a model of severe influenza infection (Figures 4D–F). Moreover, the inhibitory and protective properties of diltiazem were validated in the reconstituted human airway epithelium model, also showing enhanced efficacy when combined with oseltamivir (Figure 5).

Finally, a very recent study by Fujioka and colleagues (50) confirmed the antiviral activity of diltiazem anticipated by our approach. In that study, based on the role of Ca<sup>2+</sup> channels on the attachment of influenza viruses to the host cell, the authors discuss whether the diltiazem induced modulation of Ca<sup>2+</sup> channel activity might not fully explain such observed antiviral activity, consistent with a multi-level (off-target) effect of diltiazem. In this context, in which not all Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors confer significant antiviral activity, the newly described capacity of diltiazem to partially reverse the global viro-genomic signature of infection and modulate specific genes related to the host antiviral response and cholesterol metabolism (Figures 6 and Figure S4) suggests a putative explanation for its inhibitory effect observed *in vitro*, *ex vivo* and in mice. Nevertheless, although RT-qPCR mRNA quantification performed on a set of genes representative of the two hubs further validated these observations (Figure S5), further investigations are underscored to shed light on the specific mechanisms underlying such potential multi-level mode of action of diltiazem.

Overall, the results presented here set a solid baseline for our drug repurposing strategy and for the use of diltiazem as a host-targeted antiviral in clinical practice. Moreover, the increased antiviral efficacy observed in reconstituted human airway epithelium (Figure 5B and Table S6) plead in favor of the combination of diltiazem with the virus-targeted antiviral oseltamivir for the improvement of current anti-influenza therapy, and possibly decreasing the risk of development of viral resistance. In that regard, our results prompted a French multicenter randomized clinical trial aimed at assessing the effect of diltiazem-oseltamivir bitherapy compared with standard oseltamivir monotherapy for the treatment of severe influenza infections in intensive care units, hence completing the bedside-to-bench and bench-to-bedside cycle of our innovative approach. Additionally, retrospective signature analysis of sequential respiratory samples from patients included in both study arms and stratified according to their clinical response to treatment will provide valuable data to pursue the investigations on the specific mediators of the diltiazem-related antiviral response.

## REFERENCES

1. *Influenza Facts Sheet n° 211* (2014) Available online at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (Accessed January 20, 2016).
2. Loregian A, Mercorelli B, Nannetti G, Compagnin C, Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2014) 71:3659–83. doi: 10.1007/s00018-014-1615-2
3. Booth B, Zimmel R. Prospects for productivity. *Nat Rev Drug Discov.* (2004) 3:451–6. doi: 10.1038/nrd1384
4. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* (2004) 3:673–83. doi: 10.1038/nrd1468
5. Law GL, Tisoncik-Go J, Korth MJ, Katze MG. Drug repurposing: a better approach for infectious disease drug discovery? *Curr Opin Immunol.* (2013) 25:588–92. doi: 10.1016/j.coi.2013.08.004

This trial (FLUNEXT TRIAL PHRC #15-0442, ClinicalTrials.gov identifier NCT03212716) is currently ongoing.

Finally, our study underscores the high value of clinical specimens and the advantages of exploiting viro-genomic and chemogenomic data for the successful systematic repurposing of drugs already available in our modern pharmacopeia as new effective antivirals. We propose that our approach targeting respiratory epithelial cells, the principal influenza infected cell type in the lung, could be extended to other respiratory viruses and eventually to other pathogens involved in acute infections. Importantly, drug repurposing presents several financial and regulatory advantages compared to the development of *de novo* molecules (5), which are of particular interest not only in the context of antimicrobial resistance but also against both emerging or recurrent pathogens for which we are still disarmed.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, OT, JT, GB, and MR-C designed and coordinated the study. VE, JP, and BL acquired clinical data from the cohort. AP, OT, TJ, BP, AT, MR, M-EH, CR, CN, SC, CL-L, and JT performed experiments and provided technical support. AP, OT, MR, JP, JT, GB, and MR-C interpreted data. AP, OT, and MR-C wrote the manuscript. JT, GB, and MR-C revised the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Jacques Corbeil and Frederic Raymond (Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec) for their help and useful advice. This work was funded by grants from the French Ministry of Social Affairs and Health (DGOS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Claude Bernard Lyon 1, the Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA N° 14007029 and AccueilPro COOPERA N° 15458 grants), and Canadian Institutes of Health Research (N° 229733 and 230187). GB is the holder of the Canada Research Chair on influenza and other respiratory viruses. Funding institutions had no participation in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, or in the writing of the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00060/full#supplementary-material>

6. Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med.* (2015) 7:290ra89. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5597
7. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang W-K, Qian X, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med.* (2016) 22:1101–7. doi: 10.1038/nm.4184
8. Naylor S, Schonfeld JM. Therapeutic drug repurposing, repositioning and rescue - Part I: Overview. *Drug Discov World* (2014) 16:49–62. Available online at: <https://www.ddw-online.com/drug-discovery/p274232-therapeutic-drug-repurposing-repositioning-and-rescue-winter-14.html>
9. Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, et al. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* (2009) 462:175–81. doi: 10.1038/nature08506
10. Haupt VJ, Schroeder M. Old friends in new guise: repositioning of known drugs with structural bioinformatics. *Brief Bioinform.* (2011) 12:312–26. doi: 10.1093/bib/bbr011
11. Li Y, Agarwal P. A pathway-based view of human diseases and disease relationships. *PLoS ONE* (2009) 4:e4346. doi: 10.1371/journal.pone.004346
12. Lussier YA, Chen JL. The emergence of genome-based drug repositioning. *Sci Transl Med.* (2011) 3:96ps35. doi: 10.1126/scitranslmed.3001512
13. Hütter G, Bodor J, Ledger S, Boyd M, Millington M, Tsie M, et al. CCR5 targeted cell therapy for HIV and prevention of viral escape. *Viruses* (2015) 7:4186–203. doi: 10.3390/v7082816
14. Ludwig S. Disruption of virus-host cell interactions and cell signaling pathways as an anti-viral approach against influenza virus infections. *Biol Chem.* (2011) 392:837–47. doi: 10.1515/BC.2011.121
15. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem.* (2009) 284:29798–808. doi: 10.1074/jbc.M109.029470
16. Belser JA, Lu X, Szretter KJ, Jin X, Aschenbrenner LM, Lee A, et al. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis.* (2007) 196:1493–9. doi: 10.1086/522609
17. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, et al. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol.* (2007) 9:1683–94. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00902.x
18. Josset L, Textoris J, Loriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, et al. Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS ONE* (2010) 5:e13169. doi: 10.1371/journal.pone.0013169
19. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* (2006) 313:1929–35. doi: 10.1126/science.1132939
20. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer* (2007) 7:54–60. doi: 10.1038/nrc2044
21. Escuret V, Cornu C, Boutitie F, Enouf V, Mosnier A, Bouscambert-Duchamp M, et al. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res.* (2012) 96:130–7. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.08.002
22. Khaznadar Z, Boissel N, Agaogué S, Henry G, Cheok M, Vignon M, et al. Defective NK cells in acute myeloid leukemia patients at diagnosis are associated with blast transcriptional signatures of immune evasion. *J Immunol.* (2015) 195:2580–90. doi: 10.4049/jimmunol.1500262
23. Degletagne C, Keime C, Rey B, de Dinechin M, Forcheron F, Chuchana P, et al. Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics* (2010) 11:344. doi: 10.1186/1471-2164-11-344
24. Tukey J, Wilder J. *Exploratory Data Analysis*. Reading, PA: Addison-Wesley (1977).
25. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* (1995) 57:289–300.
26. Barrett T, Edgar R. Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol.* (2006) 411:352–69. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11019-8
27. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* (2003) 4:P3.
28. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet.* (2000) 25:25–9. doi: 10.1038/75556
29. Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, et al. Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol.* (2005) 43:4139–46. doi: 10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005
30. Moules V, Ferraris O, Terrier O, Giudice E, Yver M, Rolland JP, et al. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA-viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* (2010) 404:215–24. doi: 10.1016/j.virol.2010.04.030
31. Tsai AW, McNeil CF, Leeman JR, Bennett HB, Nti-Addae K, Huang C, et al. Novel ranking system for identifying efficacious anti-influenza virus PB2 inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:6007–16. doi: 10.1128/AAC.00781-15
32. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinform Oxf Engl.* (2014) 30:2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
33. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* (2016) 34:525–7. doi: 10.1038/nbt.3519
34. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinform Oxf Engl.* (2010) 26:139–40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
35. Dupinay T, Nguyen A, Croze S, Barbet F, Rey C, Mavingui P, et al. Next-generation sequencing of ultra-low copy samples: from clinical FFPE samples to single-cell sequencing. *Curr Top Virol.* (2013) 10:63–83.
36. Kinsella RJ, Kahäri A, Haider S, Zamora J, Proctor G, Spudich G, et al. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database J Biol Databases Curation* (2011) 2011:bar030. doi: 10.1093/database/bar030
37. Flicek P, Amodè MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* (2014) 42:D749–755. doi: 10.1093/nar/gkt1196
38. Durr FE, Lindh HF. Efficacy of ribavirin against influenza virus in tissue culture and in mice. *Ann N Y Acad Sci.* (1975) 255:366–71.
39. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res.* (2008) 78:9–25. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.01.004
40. Alonso FV, Compans RW. Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J Cell Biol.* (1981) 89:700–5.
41. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* (2009) 48 (Suppl. 1):S3–13. doi: 10.1086/591851
42. Lee SM-Y, Yen H-L. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res.* (2012) 96:391–404. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.09.013
43. Koh Y. Update in acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care* (2014) 2:2. doi: 10.1186/2052-0492-2-2
44. Poissy J, Terrier O, Lina B, Textoris J, Rosa-Calatrava M. La modulation de la signature transcriptomique de l'hôte infecté : une nouvelle stratégie thérapeutique dans les viroses graves ? Exemple de la grippe. *Réanimation* (2016) 25:53–61. doi: 10.1007/s13546-016-1188-1
45. Lou Z, Sun Y, Rao Z. Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci.* (2014) 35:86–102. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.006
46. Dayekh K, Johnson-Obaseki S, Corsten M, Villeneuve PJ, Sekhon HS, Weberpals JI, et al. Monensin inhibits epidermal growth factor receptor trafficking and activation: synergistic cytotoxicity in

- combination with EGFR inhibitors. *Mol Cancer Ther.* (2014) 13:2559–71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1086
47. Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S, Tian B, Garofalo RP, Casola A, et al. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol.* (2003) 77:5933–47. doi: 10.1128/JVI.77.10.5933-5947.2003
48. Pubchem C10H15NO2. *Etilefrine*[C10H15NO2 - *PubChem*. Available online at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etilefrine> (Accessed February 3, 2017).
49. Pubchem C22H26N2O4S. *diltiazem*[C22H26N2O4S - *PubChem*. Available online at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diltiazem> (Accessed February 3, 2017).
50. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, et al. A sialylated voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel binds hemagglutinin and mediates influenza a virus entry into mammalian cells. *Cell Host Microbe* (2018) 23:809–18.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.04.015

**Conflict of Interest Statement:** AP, OT, JT, GB, and MR-C are co-inventors of a patent application filed by INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1, Laval University and Hospices Civils de Lyon for the repurposing of diltiazem and etilefrine as anti-influenza agents (FR15/52284 - PCT/ep2016/056036-WO2016146836).

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Pizzorno, Terrier, Nicolas de Lamballerie, Julien, Padey, Traversier, Roche, Hamelin, Rhéaume, Croze, Escuret, Poissy, Lina, Legras-Lachuer, Textoris, Boivin and Rosa-Calatrava. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 2.2. Présentation de l'article

L'optimisation du processus de sélection et d'identification de molécules pour leur repositionnement comme thérapeutique antivirale portée par le programme FLUNEXT a consisté en deux améliorations majeures dans la réalisation de la signature transcriptomique d'infection :

- (i) L'exploitation d'échantillons cliniques *in vivo*, plus pertinents du point de vue physiologique que des échantillons issus d'expérimentations *in vitro*
- (ii) L'utilisation d'une biopuce Human Genome U133 plus 2.0 (Affymetrix) pour la caractérisation des signatures, permettant l'analyse de l'expression d'un nombre de gènes supérieur à l'étude de 2010

Nous avons ainsi réalisé des signatures transcriptomiques d'infection *in vivo* à partir d'échantillons nasaux issus d'une cohorte de 9 patients en phase aiguë d'infection à influenza (A/H1N1/pdm09) puis guéris (échantillons issus de l'essai clinique NCT00830323<sup>291</sup>). Nous avons obtenu une signature composée de 1 117 sondes communes modulées, que nous avons utilisée pour réaliser un criblage *in silico* via la base de données CMap (1 309 molécules). Ainsi, 160 molécules ont été identifiées, pour leur signature transcriptomique globalement anticorrélée à celle de l'infection ou modulant fortement des processus biologiques (tels que « réponse aux virus » ou « mécanisme de défense ») ou des composantes cellulaires (telles que « membrane » ou « cytoplasme »).

Après une étape de sélection sur la faisabilité d'un repositionnement, nous avons constitué une liste de 35 molécules candidates à fort potentiel pour un criblage fonctionnel *in vitro* sur des cellules pulmonaires humaines A549, basé sur l'activité antivirale contre le virus influenza A/H1N1pdm09 (TCID50) et la cytotoxicité (MTS). Sur les 35 molécules testées, 31 ont montré une activité antivirale, dont certaines, comme le diltiazem, ont obtenu des IC50 de l'ordre du nanomolaire, bien inférieures à celles obtenues avec les molécules sélectionnées lors de l'étude initiale de preuve de concept *in vitro*. Nous avons sélectionné les 8 composés les plus efficaces et/ou associés avec le plus de données disponibles chez l'animal dans la littérature pour poursuivre l'évaluation en modèle murin C57BL/6 en comparaison avec le traitement de référence à l'oseltamivir :

- le lanatoside C, un agent anti-arythmique ;
- la prednisolone, un anti-inflammatoire, antinéoplasique, glucocorticoïde ;
- la flucytosine, un antifongique, antimétabolite ;
- le felbinac, un anti-inflammatoire non stéroïdien ;
- le timolol, un  $\beta$ -antagoniste adrénergique, anti-arythmie, anti-hypertenseur ;
- le diltiazem, un anti-hypertenseur, inhibiteur des canaux calciques, vasodilatateur ;
- l'étiléfrine, un  $\alpha$ -agoniste adrénergique, agoniste des récepteurs  $\beta$ -1 adrénergiques, cardiotonique, sympathomimétique, vasoconstricteur ;
- la monensine, un antifongique, antiprotozoaire, coccidiostatique, ionophore de protons, ionophore de sodium.

Deux composés ont démontré une activité antivirale significative : le diltiazem et l'étiléfrine. Un prétraitement *per os* (6h avant l'infection) a permis une réduction importante de la mortalité, une diminution de la perte de poids ainsi qu'un abattement d'un log10 des titres viraux pulmonaires des souris infectées par le virus influenza A/Quebec/144147/09 (H1N1)pdm09. Dans des conditions de traitement post-infection *per os* (premier traitement 24h après l'infection et poursuivi de manière journalière pendant 5 jours), le diltiazem a permis une protection totale et l'étiléfrine une protection de 50 % des souris infectées par rapport au groupe placebo. Enfin, dans des conditions d'infection 100 % létale, le diltiazem a démontré une efficacité proche de celle de l'oseltamivir, permettant la survie

de 20 à 30 % des souris traitées ainsi qu'une réduction de la perte de poids, mais sans impact significatif sur la charge virale pulmonaire. Ces résultats valident le potentiel antiviral de ces deux composés, tout en suggérant une action protectrice du diltiazem sur les cellules, plutôt qu'une inhibition directe des particules virales.

Nous avons enrichi ces résultats *in vivo* par des évaluations du diltiazem en monothérapie et en bithérapie avec l'oseltamivir en modèles physiologiques prédictifs d'épithéliums respiratoires humains MucilAir (HAE). Le diltiazem à 90  $\mu\text{M}$  a démontré une activité antivirale équivalente à celle de l'oseltamivir à 1  $\mu\text{M}$ , avec une réduction de 3 log<sub>10</sub> de la production virale à (TCID<sub>50</sub>/mL) 48 heures post infection (hpi) et 2 log<sub>10</sub> à 72hpi par rapport aux témoins non traités. La combinaison des deux composés a permis une réduction additionnelle de la charge virale de l'ordre de 1 log<sub>10</sub>. De plus, la bithérapie avec des doses sous-optimales (9  $\mu\text{M}$  et 0.1  $\mu\text{M}$ ), inefficaces en monothérapies, a montré une réduction significative du titre viral (1 à 2 log<sub>10</sub>), suggérant le fort potentiel synergique de cette combinaison.

Sur la base de ces résultats, le diltiazem s'est révélé être le meilleur candidat de notre sélection pour un repositionnement antiviral. Afin de déterminer le ou les mode(s) d'action antiviral potentiel(s) de cette molécule, nous avons établi par séquençage (RNAseq) les signatures d'HAE traités/non traités avec des doses efficaces de diltiazem et/ou infectés avec Influenza A(H1N1)pdm09. Une signature spécifique du diltiazem composée de 194 transcrits surexprimés et 110 transcrits gènes sous exprimés a été obtenue en comparant les épithéliums traités aux non traités. A partir de cette signature, nous avons identifié et validé expérimentalement par RT-PCR quantitative des propriétés du diltiazem jusqu'ici non décrites, telle que la capacité à moduler l'expression endogène de gènes spécifiquement liés à la réponse antivirale de l'hôte, en particulier la réponse liée aux interférons de type III, ainsi que de gènes associés au métabolisme du cholestérol. Parallèlement, la comparaison des signatures d'infections avec celles des épithéliums infectés et traités au diltiazem a permis de confirmer une réversion partielle de la signature transcriptomique de l'infection par le diltiazem.

### 2.3. Discussion et perspectives

Dans le contexte actuel, le développement de nouvelles stratégies antivirales pour lutter contre les virus circulants et émergents est une priorité sanitaire. L'émergence rapide de résistances aux antiviraux classiques dirigés contre les déterminants viraux renforce les arguments en faveur de notre stratégie, visant à repositionner des molécules déjà sur le marché et ciblant la cellule-hôte comme une alternative thérapeutique à fort potentiel et peu coûteuse. L'étude FLUNEXT a ainsi mis en lumière le potentiel de notre stratégie de repositionnement basée sur l'inversion de la signature transcriptomique d'infection pour la sélection de molécules et a constitué une preuve de concept supplémentaire légitimant la poursuite et l'optimisation de notre méthodologie dans le cadre de nouveaux projets collaboratifs entre le laboratoire VirPath et Signia Therapeutics.

En premier lieu, l'amélioration de notre méthodologie vers des conditions plus physiologiques en utilisant des échantillons biologiques de patients infectés, ainsi que l'amélioration de la technologie bio-informatique pour générer les signatures d'infection ont permis de sélectionner un plus grand nombre de candidats à fort potentiel par rapport à l'étude princeps FLUMED, basée sur des échantillons biologiques générés *in vitro*. En effet, sur les 35 candidats sélectionnés dans la base de données CMap, 31 molécules ont démontré une activité antivirale significative *in vitro*. Parmi elles, nous avons identifié la ribavirine et la monensine, déjà décrites pour leurs capacités antivirales contre les virus influenza<sup>687-690</sup>. Les étapes de validations complémentaires en modèle murin puis en HAE

MucilAir® ont permis d'identifier deux candidats au repositionnement, le diltiazem et dans une moindre mesure, l'étiléfrine. Ces résultats nous ont confortés dans la mise en œuvre de notre stratégie dont l'avantage est de sélectionner un nombre très restreint de molécules candidates à fort potentiel pour les évaluer fonctionnellement dans différents modèles complémentaires et pertinents d'infection, à la différence d'approches plus classiques de criblage à haut débit et dont le ratio de succès se situe aujourd'hui aux alentours de 0.01 %<sup>488,691</sup>.

De plus, l'introduction du modèle d'HAE dans notre processus de génération de signatures et d'évaluation préclinique a constitué une véritable avancée technologique et méthodologique. Différencié à partir de cellules primaires issues de biopsies nasales (ou pulmonaires), ce modèle permet de nous approcher au mieux des conditions physiologiques humaines tout en conservant les avantages pratiques d'un support d'étude *in vitro*. La confirmation de la réversion de la signature transcriptomique d'infection par le diltiazem dans ce modèle a ainsi confirmé la pertinence de notre stratégie.

Nos résultats précliniques ont démontré le potentiel du diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques utilisé comme principe actif dans plusieurs médicaments indiqués pour traiter l'hypertension, comme candidat au repositionnement contre la grippe sévère, ainsi que son potentiel synergique en combinaison avec des antiviraux comme l'oseltamivir. Ces données ont fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2016 licencié à la start-up Signia Therapeutics qui en détient l'exploitation exclusive, et d'une demande d'extension à l'international dans 10 pays (WO2016/146836 - PCT/FR2019/051186).

Ces données ont également légitimé la mise en œuvre d'un essai clinique de phase IIb (FLUNEXT TRIAL PHRC #15-0442 – ClinicalTrials.gov identifier NCT03212716), financé par le ministère des Solidarités et de la Santé et piloté par le Dr Julien Poissy (CHRU Lille) et le Dr Manuel Rosa-Calatrava (VirPath, co-fondateur de Signia Therapeutics). Cet essai national multicentrique en double aveugle s'est tenu sur trois hivers depuis 2018 et se poursuit cette saison hivernale (2021-2022). Il a pour but d'évaluer l'efficacité du diltiazem (Tildiem®) en association avec l'antiviral standard, l'oseltamivir (Tamiflu®), en comparaison de la monothérapie au Tamiflu®. 108 patients souffrant de gripes sévères ont déjà été inclus dans 25 services de réanimation. Les critères principaux d'évaluation de l'essai sont la survie des patients, la durée de leur résidence en service de réanimation et/ou sous ventilation mécanique, ainsi que la clairance virale. Des prélèvements respiratoires, réalisés à l'inclusion et au cours du traitement serviront à une analyse rétrospective sur l'évolution de la signature transcriptomique des patients. Les résultats sont attendus pour 2022, mais à ce stade, aucun effet indésirable n'a été signalé.

De manière concomitante à notre étude, l'équipe de Fujioka a également décrit l'activité antivirale du diltiazem contre les virus influenza<sup>692</sup>. La dynamique du calcium intracellulaire étant un facteur clé du cycle viral, les auteurs ont supposé que le diltiazem pourrait impacter l'attachement du virus à la cellule, tout en suggérant que d'autres sites d'action pourraient être identifiés. Nos essais préliminaires ont exclu un mécanisme d'action ciblant un déterminant viral. En revanche, la signature transcriptomique du diltiazem réalisée en HAE a ouvert la voie sur deux hypothèses concernant son mode d'action antiviral :

- (i) La modulation de l'expression des gènes liés à la voie des interférons, plus spécifiquement de type III (lambda), conduisant à la production des ISG
- (ii) La modulation de l'expression des gènes liés à la biosynthèse du cholestérol, les lipides étant des facteurs essentiels à plusieurs étapes du cycle viral (attachement, entrée, assemblage et bourgeonnement)<sup>693</sup>.

Ces deux pistes étant pertinentes et non mutuellement exclusives, nous avons initié la caractérisation biologique du mode d'action du diltiazem, en débutant par la première hypothèse. Ainsi, une partie de mon travail de thèse a porté sur la caractérisation du mécanisme d'activation de la voie interféron de type III par le diltiazem, dont les résultats sont présentés dans le **Manuscrit 4** : ***“Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses”***.

Les résultats apportés par le projet FLUNEXT et les outils développés au laboratoire (*in silico*, *in vitro* et *in vivo*) nous ont incités à étendre notre stratégie d'identification de candidats pour un repositionnement de molécules comme antiviraux à d'autres virus respiratoires, tels que les *Pneumovirus* et les *Coronavirus*, faisant l'objet d'un nouveau programme de recherche collaborative en cours au laboratoire RESPIROMIX. Le diltiazem induit un état de protection global dans les cellules de l'épithélium respiratoire, en particulier de l'épithélium nasal, la porte d'entrée des virus respiratoires, suggérant une potentielle action pan-antivirale de la molécule.

Nous avons ainsi validé son efficacité dans nos modèles d'études *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs virus respiratoires dont les virus hRSV et hMPV (WO2019224489 - PCT/FR2019/051186)<sup>694</sup>. En modèles HAE, nous avons mis en évidence l'efficacité d'un traitement de 4 jours avec du diltiazem sur la réplication virale de hRSV avec une réduction d'un log<sub>10</sub> de copies du gène F/μg d'ARN dans le surnageant au pôle apical des HAE et en intracellulaire, 6 jours post infection. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* en modèle murin. Un traitement de 5 jours de diltiazem en administration *per os* a permis une réduction plus importante de la charge virale pulmonaire 5 jours post infection que le traitement de référence comprenant 3 administrations intrapéritonéales de ribavirine. Des résultats tout aussi encourageants ont été obtenus contre le virus hMPV. En modèle HAE, une réduction significative des foyers infectieux a été observée en épifluorescence 4 jours post infection après 3 traitements avec du diltiazem. 5 jours post infection, une réduction de 2 log<sub>10</sub> copies du gène N/μL de surnageant a été mesurée, associée à une réduction de plus de 3 log<sub>10</sub> copies du gène N/μg d'ARN en intracellulaire.

Enfin, la flexibilité et la robustesse de notre stratégie nous a permis d'être réactifs dès l'émergence du virus SARS-CoV-2 à la fois dans la caractérisation de ce nouveau virus dans nos modèles cellulaires et HAE, mais aussi dans l'évaluation de candidats efficaces, dont le diltiazem. Ces résultats sont décrits dans l'**Article 3** : ***“Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia”*** publié en juillet 2020 dans *Cell Report Medicine*.

### 3. Combiner des antiviraux pour potentialiser leur efficacité et potentiellement limiter l'émergence de mutations de résistance

Malgré la disponibilité d'un vaccin contre la grippe qui constitue la première ligne de défense contre l'infection, les traitements antiviraux demeurent la seule option thérapeutique, particulièrement indiqués chez les personnes à risque. Parmi les médicaments disponibles, les inhibiteurs de neuraminidase (oseltamivir, zanamivir, peramivir et lanamivir) constituent la seule classe d'antiviraux encore recommandée par l'OMS aujourd'hui<sup>41</sup>, la circulation majoritaire de souches résistantes aux inhibiteurs de M2 ayant compromis leur utilisation après 2009. Cependant, leur efficacité reste modérée et l'apparition de mutations de résistance comme la substitution H275Y sur la NA est préoccupante. Bien qu'encore peu représentée parmi les souches circulantes (< 1 %), cette mutation semble fortement inductible chez les patients immunodéprimés<sup>233,241</sup>. Des inhibiteurs de polymérase sont également approuvés dans certains pays, comme le favipiravir (Japon, Chine) ou plus récemment le baloxavir marboxil (Japon, USA) mis sur le marché en 2018. De manière attendue, des souches porteuses de mutations de résistance ont été isolées rapidement chez les patients traités (K229R PB1 ; I38T/M/... PA)<sup>249,250,270</sup>.

Face à cette problématique, utiliser des combinaisons d'antiviraux pour potentialiser l'effet thérapeutique permet de diminuer les doses efficaces et pourrait également retarder voire limiter l'apparition de résistance, notamment par l'association de composés issus de différentes classes thérapeutiques ciblant des étapes différentes du cycle viral. La bithérapie baloxavir-oseltamivir a rapidement été proposée et validée en modèle murin et a fait l'objet d'un essai clinique entre 2018 et 2020<sup>297-300</sup>. En revanche, peu de données sont disponibles à ce jour concernant le potentiel synergique du baloxavir avec d'autres antiviraux.

Dans ce contexte, et en parallèle de nos travaux portant sur la combinaison du diltiazem avec l'oseltamivir, nous avons mené une étude en collaboration avec l'équipe du Dr Guy Boivin (Faculté de médecine, Université Laval, Québec) visant à déterminer le potentiel synergique du baloxavir avec des INA (oseltamivir, zanamivir et permamivir) ou avec d'autres inhibiteurs de polymérase (favipiravir et ribavirine) disponibles sur le marché. Ce travail, co-réalisé avec Liva Checkmahomed s'est déroulé en deux temps :

- (i) Des ratios de concentrations entre les différentes molécules ont été évalués en cellules MDCK pour en caractériser des effets potentiels additifs ou synergiques (Québec)
- (ii) Les ratios de concertations optimums en termes de synergie ont été évalués et validés en modèles d'HAE (Lyon)

Nos résultats ont permis de souligner le gain sur l'activité thérapeutique apporté par l'association du baloxavir et des INA et ont fait l'objet de la publication présentée ci-après, dont Liva Chekmahomed et moi sommes co-premières auteures, **Article 2 : "In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses"**, parue dans *Viruses* en 2020.



**3.1. Article 2: “In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses”**

**Auteurs**

Liva Chekmahomed et Blandine Padey, Andrés Pizzorno, Olivier Terrier, Manuel Rosa-Calatrava, Yacine Abed, Mariana Baz et Guy Boivin

**Journal**

*Viruses*

**Date de publication**

8 octobre 2020

**Références**




PMID: 33049959

PMCID: PMC7599940

DOI: 10.3390/v12101139

Article

# In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses

Liva Checkmahomed <sup>1,†</sup>, Blandine Padey <sup>2,3,†</sup> , Andrés Pizzorno <sup>2</sup> , Olivier Terrier <sup>2</sup> , Manuel Rosa-Calatrava <sup>2,4</sup>, Yacine Abed <sup>1</sup>, Mariana Baz <sup>1,\*</sup> and Guy Boivin <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre Hospitalier Universitaire de Québec—Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CHUL) and Laval University, Québec City, QC G1V 4G2, Canada;

liva.checkmahomed@crchudequebec.ulaval.ca (L.C.); yacine.abed@crchudequebec.ulaval.ca (Y.A.)

<sup>2</sup> CIRI—Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), University Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS—Centre National de la Recherche Scientifique UMR5308,

ENS de Lyon, F-69007 Lyon, France; blandine.padey@univ-lyon1.fr (B.P.);

mario-andres.pizzorno@univ-lyon1.fr (A.P.); olivier.terrier@univ-lyon1.fr (O.T.);

manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr (M.R.-C.)

<sup>3</sup> Signia Therapeutics SAS, 69100 Villeurbanne, France

<sup>4</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69008 Lyon, France

\* Correspondence: mariana.baz@crchul.ulaval.ca (M.B.); guy.boivin@crchul.ulaval.ca (G.B.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 21 September 2020; Accepted: 1 October 2020; Published: 8 October 2020



**Abstract:** Two antiviral classes, the neuraminidase inhibitors (NAIs) and polymerase inhibitors (baloxavir marboxil and favipiravir) can be used to prevent and treat influenza infections during seasonal epidemics and pandemics. However, prolonged treatment may lead to the emergence of drug resistance. Therapeutic combinations constitute an alternative to prevent resistance and reduce antiviral doses. Therefore, we evaluated in vitro combinations of baloxavir acid (BXA) and other approved drugs against influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) subtypes. The determination of an effective concentration inhibiting virus cytopathic effects by 50% (EC<sub>50</sub>) for each drug and combination indexes (CIs) were based on cell viability. CompuSyn software was used to determine synergism, additivity or antagonism between drugs. Combinations of BXA and NAIs or favipiravir had synergistic effects on cell viability against the two influenza A subtypes. Those effects were confirmed using a physiological and predictive ex vivo reconstructed human airway epithelium model. On the other hand, the combination of BXA and ribavirin showed mixed results. Overall, BXA stands as a good candidate for combination with several existing drugs, notably oseltamivir and favipiravir, to improve in vitro antiviral activity. These results should be considered for further animal and clinical evaluations.

**Keywords:** baloxavir; combination; influenza; A(H1N1) virus; A(H3N2) virus; polymerase inhibitors; neuraminidase inhibitors; human airway epithelium

## 1. Introduction

Since 1977, two subtypes of influenza A viruses, H1N1 and H3N2, along with influenza B viruses, have co-circulated in the human population. These viruses are responsible for seasonal epidemics and may cause global pandemics [1]. Influenza epidemics can lead to millions of cases of severe respiratory illnesses and to half a million deaths annually worldwide [2] representing a major public health challenge. Vaccination still remains the first line of prevention against seasonal influenza infections [3–5] but the protection conferred by actual vaccines varies from year to year due to the evolution of the circulating

strain and the vaccine match [6,7]. Antivirals are recommended for the treatment of seasonal influenza viruses, especially in high risk populations (elderly, immunocompromised patients and subjects with co-morbidities) [8]. Neuraminidase inhibitors (NAIs), such as oseltamivir, zanamivir, peramivir and lanamivir, constitute the main recommended drugs for the treatment of influenza viruses in many countries [9–11]. These drugs inhibit the neuraminidase (a glycoprotein that enables the virus to be released from host cell) which reduces clinical illness [9,12]. In addition to this major class of antivirals, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors are also approved in a few countries to treat influenza A and B viruses. Favipiravir (also known as T-705) is a purine nucleoside analog that is recognized as an alternative substrate by the viral polymerase and is incorporated into the nascent RNA, leading to RNA viral replication errors [13,14]. Recently, baloxavir marboxil (BXM; prodrug of baloxavir acid, BXA), a cap-dependent endonuclease inhibitor, has been licensed in a few countries including USA. This compound targets the endonuclease activity of the polymerase acidic (PA) subunit, resulting in the inhibition of RNA transcription and replication [14]. Not surprisingly, prolonged antiviral therapy may lead to the emergence of drug resistance. Indeed, H275Y, E119G, I427T or I223R (N1 numbering) substitutions, among others in the neuraminidase (NA) protein, induce single or multi-drug resistance [15–17]. Rapidly after licensure, the I38T PA substitution was shown to reduce sensitivity to BXM [18–21]. On the other hand, the K229R substitution in motif F of the PB1 subunit confers in vitro resistance to favipiravir [22]. Several in vitro and in vivo studies have shown that dual antiviral therapies may have a significant positive effect on the treatment of influenza infections [13,23–25] and could further delay the emergence of resistance. Indeed, combination therapy with BXM and oseltamivir was reported to produce synergistic responses against the influenza A/PR/8/34 strain and to reduce virus titers [26]. However, there is a lack of information about combination therapy between this new polymerase inhibitor and other approved drugs. Moreover, the impact of combining two polymerase inhibitors is still unknown. Therefore, we assessed the inhibitory effects of BXA with three NAIs (oseltamivir, zanamivir and peramivir) or two other polymerase inhibitors (favipiravir and ribavirin) in cell cultures and in human airway epithelia (HAE) infected with influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells, Viruses and Compounds

Madin–Darby canine kidney cells over expressing the  $\alpha$ 2,6 sialic acid receptor (ST6-GallI-MDCK cells) (kindly provided by Y. Kawaoka from the University of Wisconsin, Madison, WI, USA [27]) were maintained in Minimum Essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 7.5  $\mu$ g/mL of puromycin.

MucilAir™ reconstituted HAE, issued from primary cells obtained from pools of nasal biopsies, were provided by Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air–liquid interphase with specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA), according to the manufacturer’s instructions.

The A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) and A/Texas/50/2012 (H3N2) influenza viruses were obtained from NIBSC (code numbers 15/252 and 14/224, respectively) and from the Centre National de Référence des Virus des Infections Respiratoires, Lyon, France Sud.

Baloxavir acid was synthesized at Shionogi & Co., Ltd. (Osaka, Japan) and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a stock concentration of 10 mM. Favipiravir (T-705) was purchased from Adooq Bioscience (Irvine, CA, USA) and diluted in DMSO to a stock concentration of 100 mM. Oseltamivir carboxylate (the active form of oseltamivir) was synthesized by Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland) and diluted in sterile water to a stock concentration of 10 mM. Zanamivir and ribavirin were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA) and diluted in sterile water and phosphate-buffered saline (PBS), respectively, to stock concentrations of 10 mM and 100 mM, respectively. Peramivir was synthesized by Biocryst (Durham, NC, USA) and diluted in sterile water to a stock concentration of 10 mM.

## 2.2. In Vitro Studies of Antiviral Combinations

ST6-Gall-MDCK cells (5000 cells/well) were seeded in 96-well plates and inoculated with 200 Median Tissue Culture Infectious Dose per well (TCID<sub>50</sub>/well) of each of the influenza strains (A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 and A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)). Infected cells were incubated for 60 min at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, followed by the addition of BXA, each NAI, favipiravir and ribavirin in two-fold serial dilutions. For A(H1N1)pdm09 infections, concentrations of 0.0175–10 nmol/L were used for BXA; 2.34–1000 nmol/L for oseltamivir; 2.34–1000 nmol/L for zanamivir; 0.468–400 nmol/L for peramivir; 78.125–80,000 nmol/L for favipiravir; 78.125–40,000 nmol/L for ribavirin, diluted in MEM and TPCK (L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone) trypsin (1 mg/mL). For A(H3N2) infections, concentrations of 0.39–200 nmol/L were used for BXA; 7.8–4000 nmol/L for oseltamivir; 35.15–16,000 nmol/L for zanamivir; 1.56–800 nmol/L for peramivir; 312.5–160,000 nmol/L for favipiravir; 78.125–40,000 nmol/L for ribavirin, diluted in MEM and TPCK trypsin (1 mg/mL). These dilutions were based on Fukao et al. [26] and on our preliminary experiments. Forty-eight hours later, cell viability was assessed by adding 10 µL/well of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA) and absorbance was measured at 490 nm with a plate reader. The percentage of cell survival was calculated as described elsewhere [28,29]. Then, 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) values were calculated for each viral strain using Prism software (GraphPad, v7). For two-drug combination studies, the EC<sub>50</sub> value of each drug was used to determine an equipotent ratio between the two compounds. The synergism, additivity or antagonism were calculated using the combination index (CI) values, as reported by Chou [30].

Briefly, the weighted average CI (CI<sub>wt</sub>) was calculated for each combination as  $(CI_{50} + 2 \times CI_{75} + 3 \times CI_{90} + 4 \times CI_{95})/10$  to estimate drug combination effects at high levels of virus inhibition and to increase therapeutic relevance [31].

Drug combination effects were defined as CI<sub>wt</sub> < 0.7, synergism; CI<sub>wt</sub> > 0.7 and < 0.9, moderate synergism; CI<sub>wt</sub> > 0.9 and < 1.2, additivity; CI<sub>wt</sub> > 1.2 and < 1.45, moderate antagonism; CI<sub>wt</sub> > 1.45, antagonism.

## 2.3. Evaluation of Antiviral Combinations in HAE

The apical poles of HAE were gently washed twice with warm OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Gaithersburg, MD, USA) and then infected with a 150 µL dilution of A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 or A/Texas/50/2012 (H3N2) in OptiMEM, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 or 0.01, respectively. For mock infection, the same procedure was followed using OptiMEM as inoculum. After 1 h incubation at 37 °C, the viral inoculum was removed. At 5, 24 and 48 hpi, treatments with specific dilutions of antiviral molecules alone or in combination in MucilAir<sup>®</sup> culture medium (Epithelix SAS, Saint Julien-en-Genevois, France) were applied through basolateral poles. At 24, 48 (before treatment renewal) and 72 hpi, apical washes with 150 µL OptiMEM were performed and stored in two aliquots at –80 °C for TCID<sub>50</sub> viral titration. At 24, 48 and 72 hpi, transepithelial electrical resistance (TEER) between the apical and basal poles of the HAE, considered as a surrogate of epithelium integrity, was measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2) and compared to baselines values measured before infection ( $t = 0$ ).

## 2.4. Statistical Analysis

All experimental assays were performed in triplicate at a minimum, and representative results are shown. HAE viral titers in the drug combination groups were compared against those of both the untreated (\*) and most performant single-treated (#) groups using mixed model two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test. The testing level ( $\alpha$ ) was 0.05. Statistical analyses were performed on all available data, using GraphPad, Prism 7.

### 3. Results

#### 3.1. Antiviral Activity of Single Drugs against Two Influenza A Strains

As shown in Table 1, effective dose responses for influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) replication were determined for each drug. The EC50 values of the wild-type A(H1N1)pdm09 strain were  $3.87 \pm 0.36$  and  $4.05 \pm 0.88 \mu\text{M}$  for ribavirin and favipiravir, respectively. Oseltamivir ( $0.10 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ) and zanamivir ( $0.13 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ) had the same potency. Peramivir and BXA had the strongest inhibitory activity against A/California/7/2009 virus with EC50 values of  $15.00 \pm 5.77$  and  $0.48 \pm 0.22 \text{ nM}$ , respectively. The EC50 value of oseltamivir and favipiravir were  $0.42 \pm 0.29$  and  $10.32 \pm 1.89 \mu\text{M}$  against the A(H3N2) virus, respectively. Similar activities were observed for ribavirin and zanamivir with EC50 values of  $2.22 \pm 1.55$  and  $2.48 \pm 0.96 \mu\text{M}$ , respectively. Peramivir ( $48.43 \pm 21.83 \text{ nM}$ ) and BXA ( $19.55 \pm 5.66 \text{ nM}$ ) also had the most potent activity against the A(H3N2) strain.

**Table 1.** Antiviral activity of individual drugs against two influenza A strains.

Antiviral	Effective Concentration That Inhibits Virus Effect by 50% (nM)	
	A/California/7/2009 (H1N1)pdm09	A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)
Baloxavir acid	$0.48 \pm 0.22$	$19.55 \pm 5.66$
Ribavirin	$3872.65 \pm 356.54$	$2222.10 \pm 1556.82$
Oseltamivir	$101.67 \pm 54.19$	$420.00 \pm 287.17$
Zanamivir	$132.00 \pm 74.63$	$2475.00 \pm 962.27$
Favipiravir	$4050.00 \pm 880.83$	$10,323.33 \pm 1889.19$
Peramivir	$15.00 \pm 5.77$	$48.43 \pm 21.83$

Data are means EC50 (50% effective concentration)  $\pm$  standard deviation (SD) from at least three independent experiments.

#### 3.2. In Vitro Two-Drug Combination Activity against Two Influenza A Strains

Combination drug experiments against the A(H1N1) strain (Table 2A) showed that BXA exhibits synergistic effect when combined with each NAI. The combination index weights (CIwt) were 0.40, 0.48 and 0.48 for zanamivir, oseltamivir and peramivir, respectively. Additionally, BXA and favipiravir had synergistic effects against influenza A(H1N1) with a CIwt of 0.54. However, BXA in combination with ribavirin induced an antagonist effect with a CIwt of 1.91.

In the A(H3N2) background (Table 2B), BXA also demonstrated synergistic effect when combined with each NAI. The CIwt were 0.47, 0.49 and 0.42 for zanamivir, oseltamivir and peramivir, respectively. Furthermore, the combination of BXA and favipiravir also had a highly synergistic activity with a CIwt value of 0.16. Again, the combination of BXA and ribavirin led to an antagonist effect with a CIwt of 1.23.

#### 3.3. Two-Drug Combination Activity in Influenza A-Infected HAE

Based on the results obtained in ST6-Gall-MDCK cells, we further evaluated the efficacy of the selected two-drug combination ratios determined in Table 2A in the MucilAir™ reconstituted HAE infection model [32]. Note that different MOIs, 0.1 and 0.01, for A/California/7/2009 (H1N1) and A/Texas/50/2012 (H3N2) viruses, respectively, were based on previous characterization experiments and were used to reflect a comparable replication kinetics curve for both subtypes. As shown in Figure 1, A(H1N1) apical viral titers peaked at 48 hpi in the untreated group, reaching mean values of  $4.4 (\pm 3.6) \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ . As expected, treatment with 10 nM BXA was strongly effective by inducing a 3 log<sub>10</sub> reduction in mean peak viral titers, reaching  $5.6 (\pm 4.3) \times 10^5 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ . Treatment with 2.7  $\mu\text{M}$  zanamivir (ratio 1:270), 2.1  $\mu\text{M}$  oseltamivir (ratio 1:213) or 310 nM peramivir (ratio 1:31) induced 1.4 log<sub>10</sub> (Figure 1A), 3 log<sub>10</sub> (Figure 1B) or 2 log<sub>10</sub> (Figure 1C) reductions in mean peak viral titers, respectively. Conversely, treatment with 83  $\mu\text{M}$  favipiravir (ratio 1:8333) induced a 24 h delay on peak viral titers, which were comparable to those of the untreated group (Figure 1D). Most importantly, the antiviral effects of the four two-drug combinations tested were systematically higher than those of single-drug treatments, notably in the case of BXA + NAI (zanamivir or oseltamivir), which showed at least a 1 log<sub>10</sub> reduction in mean viral titers when compared to the most effective of the single-drug treatments at all time points. The antiviral effect of both single-drug and combination treatments was further supported

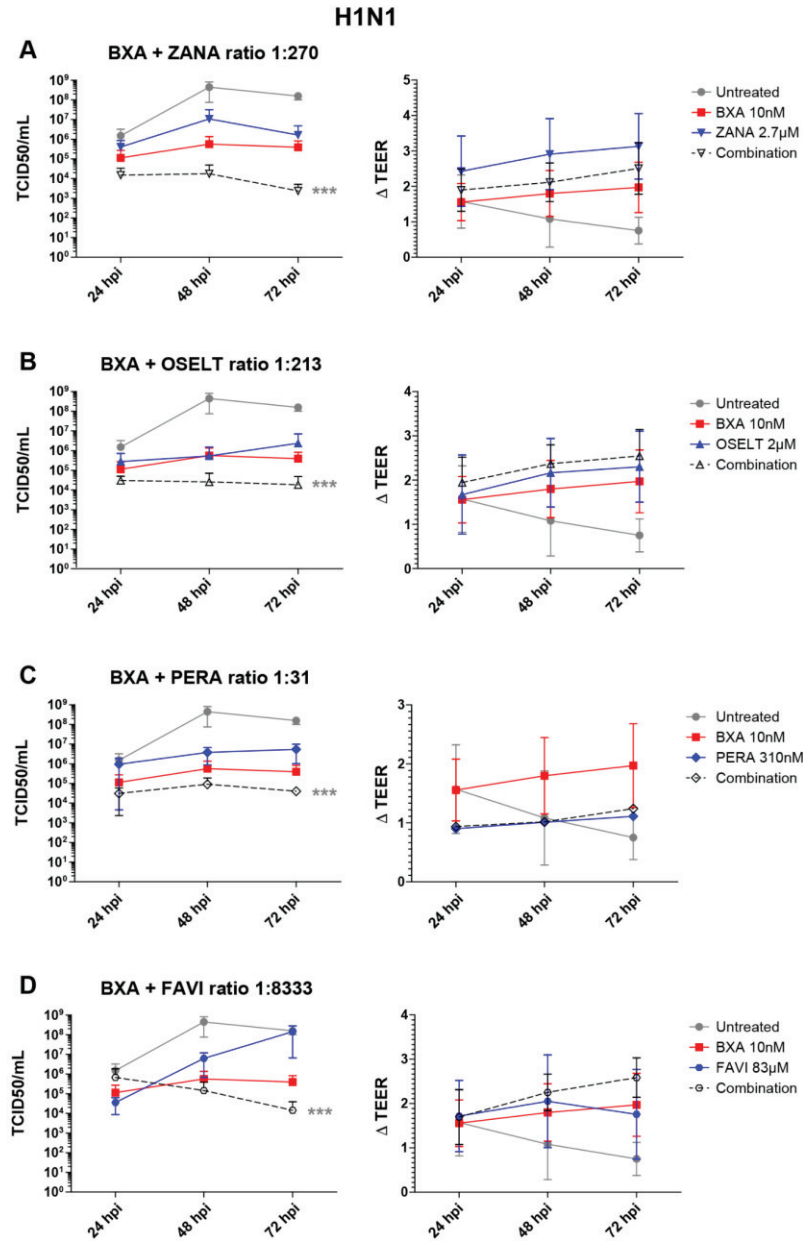
by TEER values, which remained stable all throughout the experiment, contrary to what was observed for the mock-treated controls. Of note, the extreme disparity of the EC<sub>50</sub> ratio obtained for the combination of BXA and ribavirin (1:10,000) hampered its evaluation under experimental conditions in which the ribavirin concentration was sufficiently low not to induce a very significant antiviral effect.

**Table 2.** In vitro two-drug combination activity against (A) A(H1N1) and (B) A(H3N2) strains.

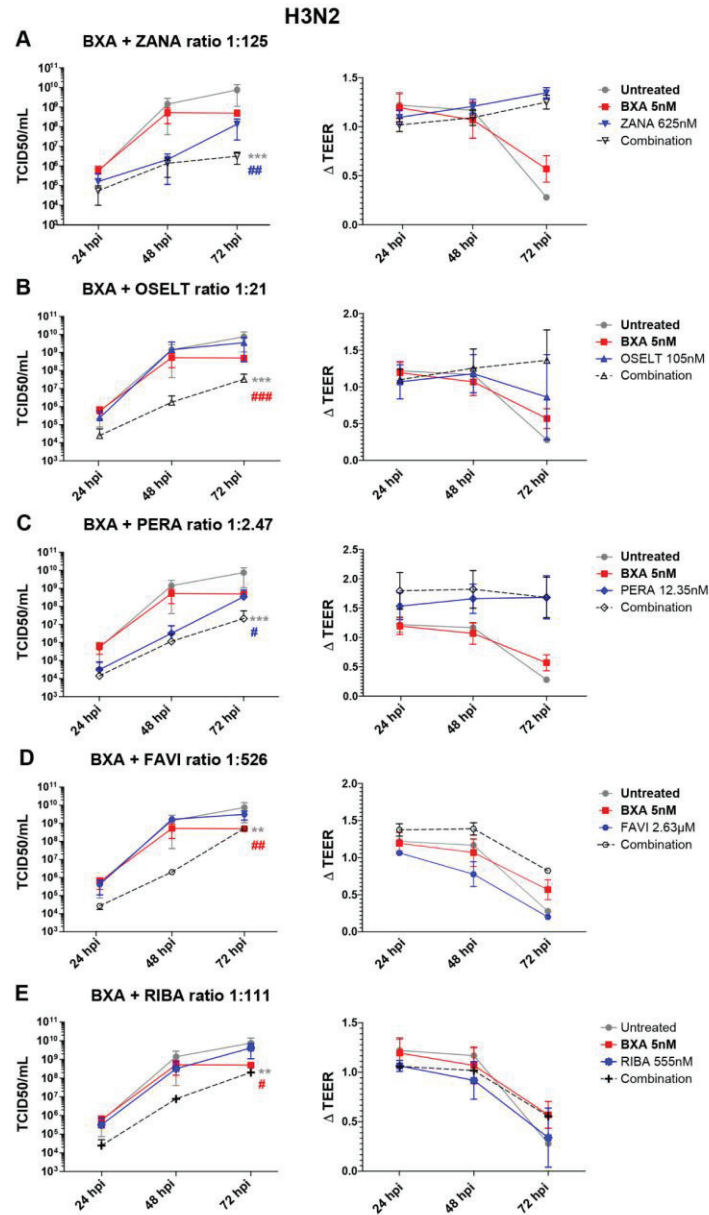
(A)		A/California/7/2009 (H1N1)pdm09					
Antiviral combination	EC <sub>50</sub> ratio <sup>a</sup>	CI values extrapolated at % of virus inhibition <sup>b</sup>				CIwt <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup>
		50	75	90	95		
BXA + ZANA	1:270.27	1.00 ± 0.52	0.49 ± 0.28	0.32 ± 0.16	0.26 ± 0.11	0.40	synergism
BXA + OSELT	1:212.7	0.80 ± 0.56	0.53 ± 0.37	0.43 ± 0.22	0.40 ± 0.17	0.48	synergism
BXA + PERA	1:31.06	0.86 ± 0.27	0.53 ± 0.35	0.43 ± 0.41	0.40 ± 0.43	0.48	synergism
BXA + RIBA	1:10,000	1.56 ± 0.39	1.63 ± 0.49	1.88 ± 0.89	2.16 ± 1.27	1.91	antagonism
BXA + FAVI	1:8333	0.34 ± 0.06	0.36 ± 0.23	0.51 ± 0.48	0.69 ± 0.79	0.54	synergism
(B)		A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)					
Antiviral combination	EC <sub>50</sub> ratio <sup>a</sup>	CI values extrapolated at % of virus inhibition <sup>b</sup>				CIwt <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup>
		50	75	90	95		
BXA + ZANA	1:125	0.65 ± 0.42	0.36 ± 0.32	0.41 ± 0.60	0.52 ± 0.84	0.47	synergism
BXA + OSELT	1:21.28	0.67 ± 0.48	0.53 ± 0.23	0.46 ± 0.01	0.45 ± 0.13	0.49	synergism
BXA + PERA	1:2.46	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.1	0.40 ± 0.27	0.51 ± 0.46	0.42	synergism
BXA + RIBA	1:111	4.11 ± 2.23	1.52 ± 0.50	0.84 ± 0.82	0.65 ± 0.78	1.23	moderate antagonism
BXA + FAVI	1:125	0.21 ± 0.07	0.16 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.07	0.16	synergism

<sup>a</sup> Ratio of EC<sub>50</sub> values (effective concentrations that inhibit cytopathic effects of each virus by 50%) of each drug alone (that is EC<sub>50</sub> drug<sub>1</sub>/EC<sub>50</sub> drug<sub>2</sub>). <sup>b</sup> Combination index (CI) values extrapolated at indicated % of virus inhibition by use of the Compusyn software. CI values represent the means ± standard deviation of two to three independent experiments done in duplicate. <sup>c</sup> CIwt weighted average CI values were calculated as (CI<sub>50</sub> + 2 × CI<sub>75</sub> + 3 × CI<sub>90</sub> + 4 × CI<sub>95</sub>)/10. <sup>d</sup> Drug combination effects were defined as CIwt < 0.7, synergism; CIwt > 0.7 and < 0.9, moderate synergism; CIwt > 0.9 and < 1.2, additivity; CIwt > 1.2 and < 1.45, moderate antagonism and CIwt > 1.45, antagonism. BXA, baloxavir acid; ZANA, zanamivir; OSELT, oseltamivir carboxylate; PERA, peramivir; RIBA, ribavirin; FAVI, favipiravir.

In the case of A(H3N2), apical viral titers peaked at 72 hpi, reaching mean values of  $7.5 (\pm 6.4) \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL, in the untreated group (Figure 2). Interestingly, treatment with 10 nM BXA almost completely inhibited viral replication, for which this dosage was too high to be compatible with the evaluation of drug combination in the A(H3N2) HAE model. We therefore used 5 nM BXA as the reference treatment, which induced a 1.5 log<sub>10</sub> reduction in mean peak viral titers, reaching  $4.9 (\pm 1.78) \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL at 72 hpi. Treatment with zanamivir 625 nM (ratio 1:125) and peramivir 12.35 nM (ratio 1:2.47) induced significant reductions in viral production, as evidenced by 1.7 log<sub>10</sub> (Figure 2A) and 1.3 log<sub>10</sub> (Figure 2C) lower mean peak viral titers compared to those of the mock-treated controls, respectively. On the other side, single-drug treatment with oseltamivir 105 nM (1:21), favipiravir 2.63 μM (ratio 1:526) and ribavirin 555 nM (ratio 1:111) (Figure 2B,D,E) demonstrated relatively mild antiviral effects, inducing less than 0.5 log<sub>10</sub> reductions in mean peak viral titers. Similar to what we observed for A(H1N1)pdm09, the antiviral effects of the different two-drug combinations tested against A(H3N2) were higher than those of single-drug treatments. Of note, the observed differences were statistically significant. The best synergy was obtained with the BXA + oseltamivir combo, which showed a 3 log<sub>10</sub> reduction at 48 hpi and a ≥ 2 log<sub>10</sub> reduction at 72 hpi in mean viral titers compared to the mock-treated but also the single-drug treatment conditions. Moreover, BXA + zanamivir and BXA + peramivir improved single-drug treatment at 72 hpi by almost 2 log<sub>10</sub> and 1 log<sub>10</sub>, respectively. TEER measurements further supported these observations, as they remained stable for BXA + oseltamivir, BXA + zanamivir and BXA + peramivir throughout the experiments, which was not the case for single-drug treatments other than BXA. Interestingly, despite the almost negligible antiviral effect of favipiravir and ribavirin single-drug treatments, both BXA + favipiravir and BXA + ribavirin showed 2.8 log<sub>10</sub> and 2.2 log<sub>10</sub> reductions in viral titers at 48 hpi, respectively. Nevertheless, such an effect was not observed at 72 hpi, which is in line with the reduction in TEER values observed at this time point.



**Figure 1.** Two-drug combination activity in influenza A(H1N1)-infected reconstituted human airway epithelia (HAE). Apical viral production (TCID<sub>50</sub>/mL ± standard deviation, SD) and transepithelial electrical resistance (ΔTEER (transepithelial electrical resistance) vs.  $t = 0 \pm$  SD) in MucilAir™ HAE infected on the apical pole with influenza A/California/7/2009 (H1N1) virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and treated with the indicated antiviral combinations and their corresponding single drug controls by the basolateral pole: (A) baloxavir acid + zanamivir; (B) baloxavir acid + oseltamivir; (C) baloxavir acid + peramivir; (D) baloxavir acid + favipiravir. \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the infected untreated group using mixed model two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test. Data are representative of at least four independent experiments.



**Figure 2.** Two-drug combination activity in influenza A(H3N2)-infected reconstituted human airway epithelia (HAE). Apical viral production (TCID<sub>50</sub>/mL ± SD) and transepithelial electrical resistance (ΔTEER vs. *t* = 0 ± SD) in MucilAir™ HAE infected on the apical pole with influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus at a MOI of 0.01 and treated by the basolateral pole with the indicated antiviral combinations and their corresponding single drug controls: (A) baloxavir acid + zanamivir; (B) baloxavir acid + oseltamivir; (C) baloxavir acid + peramivir; (D) baloxavir acid + favipiravir; (E) baloxavir acid + ribavirine. \*\* *p* < 0.01 and \*\*\* *p* < 0.001 and # *p* < 0.05, ## *p* < 0.01 and ### *p* < 0.001 compared to the infected untreated or the most performant single-treated groups (BXA (# in red) and ZANA, or PERA (# in blue)), respectively, using mixed model two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test. Data are representative of at least three independent experiments.



#### 4. Discussion

Antivirals play a crucial role in the treatment and control of influenza epidemics and pandemics [33]. The M2 ion-channel blockers (adamantanes including amantadine and rimantadine) [34], NAIs (oseltamivir, zanamivir, peramivir or laninamivir) [35] and the polymerase complex inhibitors (BXM or favipiravir) have demonstrated clinical benefits, but the emergence of viral resistance may limit the clinical efficacy of monotherapies [36,37]. Antiviral combinations have been suggested to prevent or delay the emergence of resistance by targeting various steps in the virus replicative process [38]. Multiple therapies may allow for dosage reduction [33], in addition to improving therapeutic effect [38]. Drug combinations already exist to treat cancer [39] and infectious diseases caused by HIV and hepatitis C [40–43]. In a clinical study, the triple combination of oseltamivir, amantadine and ribavirin has been reported to decrease influenza viral shedding compared to monotherapy [24].

In this study, we aimed at investigating the potential benefits of combining BXA to most approved antivirals against seasonal influenza A(H1N1) and A(H3N2) strains using both a classic cell line and a physiologically and predictively relevant HAE model.

Firstly, we observed that BXA had the lowest EC50 (Table 1) against A(H1N1) and A(H3N2) viruses. These effective concentrations of BXA were followed by those of NAIs and other polymerase inhibitors. Of note, EC50 values were higher for A(H3N2) than for A(H1N1). Depending on the antiviral, effective concentrations could differ by 2.5- to 39-fold between strains. Additionally, BXA susceptibilities of influenza viruses have been shown to vary depending on viral strain or subtype [20,44]. Therefore, determinations of EC50 value for each drug were the first step in the systematic evaluation of drug combinations by using an equipotent ratio between BXA and other antivirals.

Secondly, our results show that combinations of BXA with NAIs (oseltamivir, peramivir or zanamivir) have higher potency compared to individual drugs, against A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses. Such synergistic effects were confirmed in the HAE model, for which the physiological relevance and predictive value have been previously described by our group and others [33]. These findings are in agreement with those reported by Fukao et al., where *in vitro* combinations of BXA and approved NAIs also resulted in a synergistic effect against the A/PR/8/34 (H1N1) virus [26]. In that study, the authors further showed that the combination of suboptimal doses of BXM and oseltamivir enhanced therapeutic effects in mice, including reduced lung viral titers.

Combinations of other polymerase inhibitors with NAIs, as well as combinations of two polymerase inhibitors, have also been studied. Ormond and colleagues demonstrated that the combination of oseltamivir with favipiravir negatively impacted viral replication after several passages [45]. These results are in accordance with different animal studies where peramivir–favipiravir [46] or oseltamivir–favipiravir [13] combinations provided various benefits, including improving survival, controlling drug-resistant A(H1N1) strains or delaying mortality in immunocompromised animals.

In our study, we also assessed two polymerase inhibitors: favipiravir and ribavirin (a transcriptase inhibitor of Polymerase Basic 1—PB1) [47,48] in combination with BXA. We obtained synergistic effects for the BXA-favipiravir combination against the two influenza A strains in cell culture, which were further observed in HAE mainly in the case of A(H3N2). In contrast, the BXA-ribavirin combination showed mixed results compared to single-drug treatment, depending on the infection model and viral subtype used. In fact, considering that BXA and ribavirin compounds inhibit two polymerase subunits (PA and PB1, respectively), we suggest that these two agents targeting similar but non-identical functions can interfere or compete in their mechanism of action, resulting in antagonism. Indeed, the PA and PB1 subunits, which interact extensively [49], could be in close proximity during the transcription/replication process, which may limit their accessibility to the two inhibitors simultaneously. In a modeling drug action experiment, Yin et al. [50] demonstrated that, when used in combination, drugs interact in many unexpected ways and show a plethora of different outcomes, leading to drug synergy or antagonism. Biological functions involve many molecules that interact in a network manner. Thus, the final effects of drug combinations also depend on the interactions of their targets in a network manner [50], especially in physiological models, such as HAE, which is constituted by primary

differentiated human cells mimicking in vivo epithelia. Indeed, a household study showed that the combination of oseltamivir and zanamivir, administered within 24 h of onset of symptoms, was more effective in reducing the transmission of influenza compared to monotherapy [51], whereas we reported that the same combination was not more protective than zanamivir monotherapy against A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) infections in mice [52]. This difference could be explained by the severity of influenza infections (uncomplicated versus severe infections). Moreover, the optimal dose of each component greatly affects drug interactions [53]. Our combination experiments were based on a fixed ratio calculation. We hypothesize that this method could not apply to the combination of BXA and ribavirin and that a different ratio may lead to another type of drug response. Indeed, different dose combinations may lead to different effects [54]. Interestingly, in some cases, drugs with antagonist effects could also be beneficial against resistant viral strains [50,55].

Additional in vitro studies using resistant strains (I38T or H275Y variants) should be done to better understand drug activities and to evaluate the impact of combination therapy on mutant viral replication. Additionally, further animal studies should be conducted to evaluate the effectiveness of our synergistic combinations in a complete system.

In summary, our results suggest that BXM stands as a potential good candidate for combination therapy with several existing drugs to improve antiviral activity and eventually delay drug resistance of influenza type A viruses. Combination therapies with BXM should be further considered for animal studies and clinical investigations.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.C. and M.B.; methodology, L.C., M.B., B.P., A.P., O.T. and M.R.-C.; validation, M.B., M.R.-C. and G.B.; formal analysis, L.C., A.P. and M.R.-C.; writing—original draft preparation, L.C. and B.P.; writing—review and editing, Y.A., A.P., O.T., M.R.-C., M.B. and G.B.; supervision, M.B., A.P., M.R.-C. and G.B.; project administration, M.B. and G.B.; funding acquisition, M.B., M.R.-C. and G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) foundation grant to G.B. (grant No. 229733) for a research program on the pathogenesis, treatment, and prevention of respiratory and herpes viruses. G.B. and M.B. also received a research grant from Shionogi and Co., Ltd. (Osaka, Japan). B.P. is the holder of a CIFRE PhD thesis grant from the Agence Nationale de Recherche Technologique (ANRT).

**Conflicts of Interest:** G.B. received a grant from Shionogi and Co., Ltd. (Osaka, Japan) for baloxavir in vitro studies. All authors are independent and declare no conflict of interest.

## References

- Ziegler, T.; Mamahit, A.; Cox, N.J. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network. *Influenza Other Respir. Viruses* **2018**, *12*, 558–565. [CrossRef]
- Paget, J.; Spreeuwenberg, P.; Charu, V.; Taylor, R.J.; Iuliano, A.D.; Bresee, J.; Simonsen, L.; Viboud, C. Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network and GLaMOR Collaborating Teams Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J. Glob. Health* **2019**, *9*, 020421. [CrossRef]
- Bosaeed, M.; Kumar, D. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons. *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, 1311–1322. [CrossRef]
- Blanco-Lobo, P.; Nogales, A.; Rodríguez, L.; Martínez-Sobrido, L. Novel Approaches for the Development of Live Attenuated Influenza Vaccines. *Viruses* **2019**, *11*, 190. [CrossRef]
- CDC Flu Vaccines Benefits. Available online: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-benefits.htm> (accessed on 12 May 2020).
- Vemula, S.V.; Sayedahmed, E.E.; Sambhara, S.; Mittal, S.K. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses. *Expert Rev. Vaccines* **2017**, *16*, 1141–1154. [CrossRef]
- Grohskopf, L.A.; Alyanak, E.; Broder, K.R.; Walter, E.B.; Fry, A.M.; Jernigan, D.B. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2019–2020 Influenza Season. *MMWR Recomm. Rep.* **2019**, *68*, 1–21. [CrossRef]
- Hsu, J.; Santesso, N.; Mustafa, R.; Brozek, J.; Chen, Y.L.; Hopkins, J.P.; Cheung, A.; Hovhannisyanyan, G.; Ivanova, L.; Flottorp, S.A.; et al. Antivirals for Treatment of Influenza. *Ann. Intern. Med.* **2012**, *156*, 512–524. [CrossRef]

9. Beard, K.R.; Brendish, N.J.; Clark, T.W. Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2018**, *31*, 514–519. [[CrossRef](#)]
10. Samson, M.; Pizzorno, A.; Abed, Y.; Boivin, G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* **2013**, *98*, 174–185. [[CrossRef](#)]
11. Lackenby, A.; Besselaar, T.G.; Daniels, R.S.; Fry, A.; Gregory, V.; Gubareva, L.V.; Huang, W.; Hurt, A.C.; Leang, S.K.; Lee, R.T.C.; et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Res.* **2018**, *157*, 38–46. [[CrossRef](#)]
12. Laborda, P.; Wang, S.Y.; Voglmeir, J. Influenza Neuraminidase Inhibitors: Synthetic Approaches, Derivatives and Biological Activity. *Molecules* **2016**, *21*, 1513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Baz, M.; Carbonneau, J.; Rhéaume, C.; Cavanagh, M.H.; Boivin, G. Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus. *Viruses* **2018**, *10*, 610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mifsud, E.J.; Hayden, F.G.; Hurt, A.C. Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses. *Antiviral Res.* **2019**, *169*, 104545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Trebbien, R.; Pedersen, S.S.; Vorborg, K.; Franck, K.T.; Fischer, T.K. Development of oseltamivir and zanamivir resistance in influenza A(H1N1)pdm09 virus, Denmark, 2014. *Eurosurveillance* **2017**, *22*. [[CrossRef](#)]
16. Tu, V.; Abed, Y.; Barbeau, X.; Carbonneau, J.; Fage, C.; Lagüe, P.; Boivin, G. The I427T neuraminidase (NA) substitution, located outside the NA active site of an influenza A(H1N1)pdm09 variant with reduced susceptibility to NA inhibitors, alters NA properties and impairs viral fitness. *Antiviral Res.* **2017**, *137*, 6–13. [[CrossRef](#)]
17. Abed, Y.; Boivin, G. A Review of Clinical Influenza A and B Infections with Reduced Susceptibility to Both Oseltamivir and Zanamivir. *Open Forum Infect. Dis.* **2017**, *4*. [[CrossRef](#)]
18. Jones, J.C.; Kumar, G.; Barman, S.; Najera, I.; White, S.W.; Webby, R.J.; Govorkova, E.A. Identification of the I38T PA Substitution as a Resistance Marker for Next-Generation Influenza Virus Endonuclease Inhibitors. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
19. Koszalka, P.; Tilmanis, D.; Roe, M.; Vijaykrishna, D.; Hurt, A.C. Baloxavir marboxil susceptibility of influenza viruses from the Asia-Pacific, 2012–2018. *Antiviral Res.* **2019**, *164*, 91–96. [[CrossRef](#)]
20. Omoto, S.; Speranzini, V.; Hashimoto, T.; Noshi, T.; Yamaguchi, H.; Kawai, M.; Kawaguchi, K.; Uehara, T.; Shishido, T.; Naito, A.; et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
21. Hayden, F.G.; Sugaya, N.; Hirotsu, N.; Lee, N.; de Jong, M.D.; Hurt, A.C.; Ishida, T.; Sekino, H.; Yamada, K.; Portsmouth, S.; et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 913–923. [[CrossRef](#)]
22. Goldhill, D.H.; te Velthuis, A.J.W.; Fletcher, R.A.; Langat, P.; Zambon, M.; Lackenby, A.; Barclay, W.S. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 11613–11618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Smee, D.F.; Tarbet, E.B.; Furuta, Y.; Morrey, J.D.; Barnard, D.L. Synergistic combinations of favipiravir and oseltamivir against wild-type pandemic and oseltamivir-resistant influenza A virus infections in mice. *Future Virol.* **2013**, *8*, 1085–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Beigel, J.H.; Bao, Y.; Beeler, J.; Manosuthi, W.; Slandzicki, A.; Dar, S.M.; Panuto, J.; Beasley, R.L.; Perez-Patrigeon, S.; Suwanpimolkul, G.; et al. A Randomized Double-Blind Phase 2 Study of Combination Antivirals for the Treatment of Influenza. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1255–1265. [[CrossRef](#)]
25. Bi, Y.; Wong, G.; Liu, Y.; Liu, L.; Gao, G.F.; Shi, Y. Ribavirin is effective against drug-resistant H7N9 influenza virus infections. *Protein Cell* **2016**, *7*, 611–614. [[CrossRef](#)]
26. Fukao, K.; Noshi, T.; Yamamoto, A.; Kitano, M.; Ando, Y.; Noda, T.; Baba, K.; Matsumoto, K.; Higuchi, N.; Ikeda, M.; et al. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 654–662. [[CrossRef](#)]
27. Hatakeyama, S.; Sakai-Tagawa, Y.; Kiso, M.; Goto, H.; Kawakami, C.; Mitamura, K.; Sugaya, N.; Suzuki, Y.; Kawaoka, Y. Enhanced Expression of an  $\alpha$ 2,6-Linked Sialic Acid on MDCK Cells Improves Isolation of Human Influenza Viruses and Evaluation of Their Sensitivity to a Neuraminidase Inhibitor. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 4139–4146. [[CrossRef](#)]

28. Bantia, S.; Ghatge, A.A.; Ananth, S.L.; Babu, Y.S.; Air, G.M.; Walsh, G.M. Generation and Characterization of a Mutant of Influenza A Virus Selected with the Neuraminidase Inhibitor BCX-140. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 801–807. [[CrossRef](#)]
29. Abed, Y.; Bourgault, A.M.; Fenton, R.J.; Morley, P.J.; Gower, D.; Owens, I.J.; Tisdale, M.; Boivin, G. Characterization of 2 Influenza A(H3N2) Clinical Isolates with Reduced Susceptibility to Neuraminidase Inhibitors Due to Mutations in the Hemagglutinin Gene. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1074–1080. [[CrossRef](#)]
30. Chou, T.C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681. [[CrossRef](#)]
31. Drouot, E.; Piret, J.; Boivin, G. Artesunate demonstrates in vitro synergism with several antiviral agents against human cytomegalovirus. *Antivir. Ther.* **2016**, *21*, 535–539. [[CrossRef](#)]
32. Pizzorno, A.; Terrier, O.; Nicolas de Lamballerie, C.; Julien, T.; Padey, B.; Traversier, A.; Roche, M.; Hamelin, M.E.; Rhéaume, C.; Croze, S.; et al. Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pizzorno, A.; Padey, B.; Terrier, O.; Rosa-Calatrava, M. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight against a Long-Lived Enemy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Spilovska, K.; Zemek, F.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Windisch, M.; Kuca, K. Adamantane—A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 3245–3266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jefferson, T.; Jones, M.A.; Doshi, P.; Mar, C.B.D.; Hama, R.; Thompson, M.J.; Spencer, E.A.; Onakpoya, I.J.; Mahtani, K.R.; Nunan, D.; et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**. [[CrossRef](#)]
36. McKimm-Breschkin, J.L. Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir. Viruses* **2013**, *7*, 25–36. [[CrossRef](#)]
37. Hussain, M.; Galvin, H.D.; Haw, T.Y.; Nutsford, A.N.; Husain, M. Drug resistance in influenza a virus: The epidemiology and management. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, 121–134. [[CrossRef](#)]
38. Melville, K.; Rodriguez, T.; Dobrovolny, H.M. Investigating Different Mechanisms of Action in Combination Therapy for Influenza. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
39. Cokol-Cakmak, M.; Bakan, F.; Cetiner, S.; Cokol, M. Diagonal Method to Measure Synergy among Any Number of Drugs. *J. Vis. Exp. JoVE* **2018**. [[CrossRef](#)]
40. Johnson, S.C. Antiretroviral Therapy for HIV Infection: When to Initiate Therapy, Which Regimen to Use, and How to Monitor Patients on Therapy. *Top. Antivir. Med.* **2016**, *23*, 161–167.
41. Pau, A.K.; George, J.M. Antiretroviral Therapy: Current Drugs. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2014**, *28*, 371–402. [[CrossRef](#)]
42. Yang, P.L.; Gao, M.; Lin, K.; Liu, Q.; Villareal, V.A. Anti-HCV drugs in the pipeline. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1*, 607–616. [[CrossRef](#)]
43. Ferenci, P. New anti-HCV drug combinations: Who will benefit? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1008–1009. [[CrossRef](#)]
44. Noshi, T.; Kitano, M.; Taniguchi, K.; Yamamoto, A.; Omoto, S.; Baba, K.; Hashimoto, T.; Ishida, K.; Kushima, Y.; Hattori, K.; et al. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* **2018**, *160*, 109–117. [[CrossRef](#)]
45. Ormond, L.; Liu, P.; Matuszewski, S.; Renzette, N.; Bank, C.; Zeldovich, K.; Bolon, D.N.; Kowalik, T.F.; Finberg, R.W.; Jensen, J.D.; et al. The Combined Effect of Oseltamivir and Favipiravir on Influenza A Virus Evolution. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9*, 1913–1924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Park, S.; Kim, J.I.; Lee, I.; Lee, S.; Hwang, M.W.; Bae, J.Y.; Heo, J.; Kim, D.; Jang, S.I.; Kim, H.; et al. Combination Effects of Peramivir and Favipiravir against Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Infection in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
47. Stein, D.S.; Creticos, C.M.; Jackson, G.G.; Bernstein, J.M.; Hayden, F.G.; Schiff, G.M.; Bernstein, D.I. Oral ribavirin treatment of influenza A and B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1285–1287. [[CrossRef](#)]
48. Hayden, F.G.; Shindo, N. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2019**, *32*, 176–186. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, J.; Hu, Y.; Musharrafieh, R.; Yin, H.; Wang, J. Focusing on the Influenza Virus Polymerase Complex: Recent Progress in Drug Discovery and Assay Development. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 2243–2263. [[CrossRef](#)]

50. Yin, N.; Ma, W.; Pei, J.; Ouyang, Q.; Tang, C.; Lai, L. Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
51. Carrat, F.; Duval, X.; Tubach, F.; Mosnier, A.; Van der Werf, S.; Tibi, A.; Blanchon, T.; Leport, C.; Flahault, A.; Mentré, F.; et al. Effect of oseltamivir, zanamivir or oseltamivir-zanamivir combination treatments on transmission of influenza in households. *Antivir. Ther.* **2012**, *17*, 1085–1090. [[CrossRef](#)]
52. Pizzorno, A.; Abed, Y.; Rhéaume, C.; Boivin, G. Oseltamivir–zanamivir combination therapy is not superior to zanamivir monotherapy in mice infected with influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses. *Antiviral Res.* **2014**, *105*, 54–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yin, Z.; Deng, Z.; Zhao, W.; Cao, Z. Searching Synergistic Dose Combinations for Anticancer Drugs. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tallarida, R.J.; Raffa, R.B. The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *127*, 165–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pires de Mello, C.P.; Drusano, G.L.; Adams, J.R.; Shudt, M.; Kulawy, R.; Brown, A.N. Oseltamivir-zanamivir combination therapy suppresses drug-resistant H1N1 influenza A viruses in the hollow fiber infection model (HFIM) system. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2018**, *111*, 443–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.2. Présentation de l'article

Les IC50 des antiviraux candidats pour la combinaison ont été déterminées *in vitro* sur les cellules MDCK, contre les virus influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 et A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) afin d'évaluer le potentiel que pourrait apporter une bithérapie. Le baloxavir et le peramivir ont été les molécules les plus efficaces contre les deux souches, avec des IC50 faibles, de l'ordre du nanomolaire. L'oseltamivir et le zanamivir ont présenté le même potentiel contre H1N1 avec des IC50 proches de 100 nM, mais le zanamivir a été moins efficace contre H3N2, contrairement à l'oseltamivir. La ribavirine et le favipiravir ont montré des IC50 plutôt élevées, de l'ordre du micromolaire, contre les deux souches.

Ces données ont ensuite été utilisées pour déterminer :

- (i) Des ratios optimums basés sur les IC50 des 2 composés
- (ii) Des index de combinaisons (CI) calculés d'après la méthode mathématique de Chou et Talalay selon l'équation suivante<sup>695,696</sup> :  $CI = (CI_{50} + 2xCI_{75} + 3xCI_{90} + 4CI_{95})/10$   
Le potentiel combinatoire est exprimé par un résultat chiffré, interprétable comme suit dans le Tableau 11.

*Tableau 11 - Les index de combinaisons calculés à partir des valeurs d'IC50 obtenues in vitro, permettent de prédire un potentiel synergique des molécules en combinaison, d'après la méthode décrite par Chou et Talalay.*

Valeur calculée de CI	Potentiel de la combinaison
CI < 0.7	Synergie
0.7 < CI < 0.9	Synergie modérée
0.9 < CI < 1.2	Additivité
1.2 < CI < 1.45	Antagonisme modéré
1.45 < CI	Antagonisme

La combinaison du baloxavir avec tous les INA testés a présenté un potentiel synergique fort contre H1N1 et H3N2 (CI < 0.5). La combinaison avec le favipiravir nous a également semblé intéressante, en particulier avec un CI très faible contre H3N2 (0.54 contre H1N1 ; 0.16 contre H3N2). Seule la ribavirine n'a pas présenté de gain potentiel, avec des CI antagonistes contre les deux souches. Cela peut s'expliquer par la grande disparité de ses IC50 élevées, comparées aux IC50 faibles obtenues avec le baloxavir.

Sur la base des résultats encourageants obtenus en lignées cellulaires, nous avons vérifié le potentiel synergique de ces ratios sur nos modèles HAE d'infection physiologiques contre A/California/7/2009 (H1N1) et A/Texas/50/2012 (H3N2).

En prenant en compte le traitement de référence au baloxavir validé au laboratoire contre chacune des 2 souches (10 nM contre H1N1 et 5 nM contre H3N2), les concentrations à évaluer ont été déterminées comme suit (Tableau 12).

Tableau 12 - Les concentrations des antiviraux ont été calculées selon les ratios optimums déterminés sur la base du traitement de référence au baloxavir (BLX) validé en HAE à 10 nM contre H1N1 et 5 nM contre H3N2.

Antiviral candidat à la combinaison (Molécule 2 = M2)	Ratio (BLX : M2) H1N1	Concentration M2 (H1N1)	Ratio H3N2	Concentration M2 (H3N2)
Zanamivir	1 : 270	2,7 µM	1 : 125	625 nM
Oseltamivir	1 : 213	2,1 µM	1 : 21	105 nM
Peramivir	1 : 31	310 nM	1 : 2,47	12,35 nM
Ribavirine	1 : 10000	100 µM	1 : 111	555 nM
Favipiravir	1 : 8333	83 µM	1 : 526	2,63 µM

La combinaison baloxavir-ribavirine n'a pas pu être évaluée contre H1N1 en raison du déséquilibre important du ratio préconisé entre les deux molécules contre H1N1 (1 : 10 000) qui nous aurait contraints à utiliser des concentrations cytotoxiques de ribavirine.

Comme attendu, le traitement avec 10 nM de baloxavir utilisé dans nos expérimentations contre le virus H1N1 a permis une réduction du titre viral de 3 log<sub>10</sub> TCDI50/mL dès 48 hpi par rapport à la condition témoin sans traitement à 4.4 (± 3.6).10<sup>8</sup> TCID50/mL. Les monothérapies avec les INA ont permis une réduction du titre viral au pic d'infection comprise entre 1.4 et 3 log<sub>10</sub>. Le favipiravir a retardé l'apparition du pic viral à 24 et 48 hpi, mais a rejoint la condition témoin à 72 hpi. Ces résultats ont validé la relevance des ratios déterminés, en démontrant l'efficacité antivirale des molécules, tout en laissant une fenêtre importante d'amélioration potentielle pour la combinaison. D'ailleurs, les résultats obtenus en bithérapie ont validé le potentiel de toutes les combinaisons testées, apportant des améliorations thérapeutiques significatives sur la production virale et le maintien de l'intégrité de l'épithélium mesuré en TEER. Le meilleur gain a été obtenu avec les combinaisons baloxavir-(zanamivir/oseltamivir) avec un abattement supplémentaire de plus d'1 log<sub>10</sub> par rapport aux monothérapies.

Des résultats tout aussi intéressants ont été obtenus contre la souche H3N2, avec une réduction de 1.5 log<sub>10</sub> au pic de la production virale à 72 hpi par rapport à la condition témoin non traitée à 7.5 (± 6.4).10<sup>9</sup> TCDI50/ml avec le traitement de référence à 5 nM de baloxavir. Les monothérapies avec le zanamivir et le peramivir ont permis une réduction du titre viral supérieure à 1 log<sub>10</sub>, tandis que l'oseltamivir, le favipiravir et la ribavirine ont montré une efficacité modérée, inférieure à 0.5 log<sub>10</sub>. Ces résultats étaient attendus, puisque les IC50 contre H3N2 étaient supérieures à celles contre H1N1. Dans ces conditions, le gain obtenu avec les combinaisons est d'autant plus pertinent. La meilleure synergie a été obtenue pour la combinaison baloxavir-oseltamivir, permettant une réduction du titre viral de 3 log<sub>10</sub> à 48 hpi et supérieure à 2 log<sub>10</sub> à 72 hpi. Le zanamivir et le peramivir ont également apporté un bénéfice important avec un gain de 2 et 1 log<sub>10</sub> respectivement par rapport à la monothérapie. Il est à noter que les combinaisons du baloxavir avec les INA ont apporté une protection de l'intégrité de l'épithélium, non assurée par le baloxavir seul. Enfin, malgré la faible activité antivirale des monothérapies avec le favipiravir et la ribavirine, les combinaisons avec le baloxavir ont apporté un gain supérieur à 2 log<sub>10</sub> à 48hpi.

### 3.3. Discussion et perspectives

Malgré la disponibilité sur le marché de plusieurs familles de médicaments ciblant des déterminants viraux différents (M2, NA ou complexe polymérase), l'arsenal thérapeutique contre influenza demeure faible, en raison de l'apparition rapide de mutations de résistance, particulièrement observée chez les immunodéprimés, dont la survie dépend de la réussite d'un traitement. La mise sur le marché en 2018 du baloxavir marboxil (Xofluza®), un inhibiteur de l'endonucléase virale, a fait figure d'évènement. Malheureusement, des mutations de résistance, en particulier sur la position 38 de la PA (I38T), ont été très rapidement observées chez les patients traités<sup>270</sup>. Pour pallier ce phénomène, la combinaison d'antiviraux fait partie des options pertinentes pour potentialiser l'effet thérapeutique et ainsi minimiser les risques d'émergence de mutations de résistance. Dans notre article, nous avons étudié *in vitro* le potentiel d'une combinaison du baloxavir avec les inhibiteurs de neuraminidase les plus couramment utilisés, l'oseltamivir, le zanamivir et le peramivir, et avec d'autres inhibiteurs de polymérase, le favipiravir<sup>263</sup> (analogue de pyrazine) et la ribavirine<sup>697</sup> (analogue de guanosine), d'abord en modèles cellulaires puis dans nos modèles physiologiques d'infection HAE.

Nous avons comparé initialement l'efficacité des molécules en monothérapies contre H1N1 et H3N2. Le baloxavir s'est avéré le plus efficace, avec une IC50 de l'ordre du nanomolaire, bien inférieure (20 à 200 fois) à celles des INA. Ces informations concordent avec les données *in vitro* mais aussi cliniques rapportées dans la littérature. En comparaison d'un groupe témoin traité à l'oseltamivir, le traitement au baloxavir a permis d'apporter un bénéfice à la fois sur la réduction des symptômes et sur la charge virale, y compris chez les sujets à risque<sup>250,270,271</sup>. En revanche, nous avons noté une augmentation importante de l'IC50 du baloxavir contre H3N2, par rapport à H1N1 (x40). En effet, le baloxavir présente des profils d'inhibition variables en fonction des sous-types des souches, tel que documenté dans l'étude d'Omoto et al.<sup>252</sup>. En outre, les mutations de résistances à l'image d'I38T peuvent augmenter ces IC50 jusqu'à 50 fois. Ces données soulignent le fort potentiel thérapeutique du baloxavir et confortent l'idée de limiter l'émergence des résistances en combinant de manière synergique les antiviraux issus de différentes familles.

Les résultats obtenus dans nos modèles d'HAE infectés par H1N1 et H3N2, en combinant des doses sous-optimales de baloxavir avec des INA (oseltamivir, zanamivir et peramivir) ont démontré un potentiel synergique fort contre les deux souches, avec un gain sur la réduction du titre viral pouvant aller jusqu'à 3 log<sub>10</sub> par rapport à la monothérapie avec le baloxavir seul. La bithérapie associant le baloxavir et l'oseltamivir a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs études en modèles murins où une réduction du titre viral pulmonaire a été observée chez les souris traitées<sup>297-299</sup>. Également, Hoffmann-Laroche a mené un essai clinique entre 2018 et 2020 sur des patients sévères hospitalisés dans 170 centres (Amérique, Asie, Europe, Australie) visant à démontrer le bénéfice de cette association en comparaison d'un traitement en monothérapie avec un INA (oseltamivir, zanamivir ou peramivir, relatif aux pratiques locales de prescription)<sup>300</sup>. Si le temps d'amélioration clinique n'a pas été diminué significativement, une réduction marquée de la charge et de l'excrétion virale a été rapportée. L'optimisation de ces associations nécessite donc d'être poursuivie afin d'obtenir de meilleures perspectives cliniques. Des trithérapies peuvent également être envisagées à l'image de l'essai clinique mené par le *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, visant à évaluer l'association de l'amantadine, la ribavirine et l'oseltamivir en comparaison d'une monothérapie à l'oseltamivir en 2017<sup>698</sup>.

Enfin, nous avons évalué le potentiel de la combinaison du baloxavir avec d'autres inhibiteurs polymérase, aux mécanismes d'interactions différents. La bithérapie avec le favipiravir a montré un potentiel synergique notable, en particulier contre H3N2, même si l'écart important des



concentrations utilisées est difficilement transposable en clinique. En revanche, la combinaison avec la ribavirine nous est apparue comme antagoniste lors de la détermination de nos ratios d'intérêt. Pourtant, les résultats en HAE montrent un potentiel synergique entre les deux composés. Nous avons émis l'hypothèse que, étant donné leurs mécanismes d'actions ciblant PA et PB1, qui interagissent ensemble dans la fonction polymérase virale, les deux composés pourraient rencontrer des difficultés à accéder simultanément à leurs sites d'action, résultant d'un antagonisme. A ce sujet, l'étude de Yin et al. suggère d'utiliser des systèmes prédictifs prenant en compte l'ensemble des interactions fonctionnelles (génétiques et enzymatiques) des supports d'études<sup>699</sup>. En fonction des situations biologiques, des composés peuvent apparaître comme synergiques ou antagonistes. De même, la dose optimale calculée impacte de manière importante la prédiction de la synergie<sup>700</sup>. L'utilisation de ratios fixes ne constitue pas la stratégie optimale pour évaluer le potentiel d'une combinaison dans un cas similaire à celui-ci.

Néanmoins, les résultats très positifs de cette étude valident la mise en place d'outils prédictifs au laboratoire pour l'étude des combinaisons des antiviraux. L'analyse des interactions et des synergies entre les composés est utile à de nombreux projets au laboratoire, en particulier au moyen des logiciels Compusyn, Combeneft et Synergy Finder<sup>701,702</sup>, proposant plusieurs méthodes de calcul permettant ainsi d'augmenter la robustesse de nos résultats<sup>703</sup> :

- (i) « *Loewe additivity model* » comparant le changement de potentiel sur la dose-réponse de la combinaison à celui de leur combinaison individuelle théorique,
- (ii) « *Bliss independence model* » permettant de modéliser les effets individuels des deux médicaments dans la combinaison, en tant qu'évènements indépendants et concurrentiels
- (iii) « *zero interaction potency* » (ZIP) prenant en compte les relations d'interactions médicamenteuses, ainsi deux médicaments sans interaction entraînent des changements minimes dans leurs courbes dose-réponse.

Ainsi, le potentiel des combinaisons du baloxavir avec d'autres antiviraux nécessite encore de nouvelles évaluations, en particulier contre les souches résistantes H275Y et I38T, sur lesquelles il serait important de maintenir un contrôle ; à l'image de l'étude de Park et al. qui décrit un bénéfice sur la survie des souris infectées avec une souche résistante à l'oseltamivir grâce à une combinaison du favipiravir et du peramivir<sup>704</sup>. Cependant, la pandémie actuelle et l'absence de circulation des virus influenza portent à repousser ces évaluations cliniques.

Par ailleurs, l'impact des combinaisons sur les mutations de résistance nécessite d'être caractérisé *in vitro* comme le soulignent les études d'Ormond et al. et Baz et al. qui démontrent le potentiel de bithérapies du favipiravir avec l'oseltamivir<sup>705,706</sup>. *In vitro*, la combinaison permet une réduction du titre viral sur plusieurs passages mais l'auteur attire notre attention sur le risque d'émergence de mutations de multi-résistances<sup>705</sup> ; tandis qu'en modèle murin, la combinaison améliore la survie des souris immunodéprimées et permet la réduction des titres viraux pulmonaires mais n'a pas d'impact sur l'apparition de la mutation H275Y<sup>706</sup>.

Dans certains scénarii, combiner des antiviraux peut donc apporter des bénéfices cliniques importants mais sans l'assurance d'un contrôle sur l'émergence de souches résistantes. C'est pourquoi cette stratégie s'inscrit de manière complémentaire à notre démarche visant à identifier et repositionner des composés efficaces ciblant la cellule-hôte.

#### 4. Les premiers mois de la pandémie de COVID-19 : caractérisation du SARS-CoV-2 et perspectives de traitements

En Janvier 2020, l'identification d'un nouveau Coronavirus responsable d'une flambée épidémique en Chine a poussé l'OMS à convoquer un comité d'urgence du Règlement Sanitaire International<sup>108</sup>. Alors que des cas ont été identifiés dans 18 pays, l'état d'urgence de santé publique de portée internationale a été déclaré.

Hébergeant le Centre National de Référence sur les virus respiratoires (Sud de la France) et disposant d'un laboratoire de sécurité BSL-3, le laboratoire VirPath a été parmi les premiers à isoler le virus SARS-CoV-2 à partir de prélèvements nasopharyngés issus des premiers patients hospitalisés en France. Dès février 2020, l'ensemble de notre équipe s'est mobilisée et nous avons exploité tous les moyens dont nous disposons pour caractériser ce nouveau virus et évaluer de potentiels traitements.

Notre modèle physiologique HAE nous a permis de caractériser les étapes précoces d'infection en termes de cinétique et de physiopathologie, tant sur les épithéliums d'origine nasale que pulmonaire. Ainsi, nous avons généré les premières images françaises en microscopie électronique du virus SARS-CoV-2 et observé les atteintes morphologiques viro-induites marquées des cellules ciliées et productrices de mucus. Également, en lien avec la tempête cytokinique décrite chez les patients entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour suivant l'infection, nous avons étudié le déclenchement de la réponse immunitaire innée et confirmé son activation en deux temps et sa variabilité relative au compartiment respiratoire. Enfin, nous avons évalué le potentiel (i) du remdesivir, un analogue nucléosidique d'adénosine déjà décrit comme efficace contre le MERS-CoV et le SARS-CoV-2<sup>580,618,707</sup>, faisant alors l'objet de plusieurs essais cliniques principalement en Chine et aux Etats-Unis<sup>708</sup>; (ii) ainsi que du diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques identifié via notre stratégie de repositionnement contre la grippe<sup>709</sup>, son action sur l'induction de la voie de l'interféron de type III dans les cellules de l'hôte pouvant mener à une activité pan-antivirale. Nous avons pu confirmer la forte activité antivirale *in vitro* du remdesivir et avons proposé d'en potentialiser l'effet par une combinaison avec du diltiazem, apportant une meilleure protection de l'intégrité de l'épithélium respiratoire.

**L'Article 3 : “Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia”**, publié dans *Cell Report in Medicine* en juillet 2020, est le fruit du travail considérable réalisé au cours des trois premiers mois de 2020, mené par toute notre équipe mobilisée et la collaboration précieuse du Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE).

#### **4.1. Article 3: “Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia”**

##### **Auteurs**

Andrés Pizzorno, Blandine Padey, Thomas Julien, Sophie Trouillet-Assant, Aurélien Traversier, Elisabeth Errazuriz-Cerda, Julien Fouret, Julia Dubois, Alexandre Gaymard, François-Xavier Lescure, Victoria Dulière, Pauline Brun, Samuel Constant, Julien Poissy, Bruno Lina, Yazdan Yazdanpanah, Olivier Terrier et Manuel Rosa-Calatrava

##### **Journal**

*Cell Report in Medicine*

##### **Date de publication**

21 juillet 2020

##### **Références**

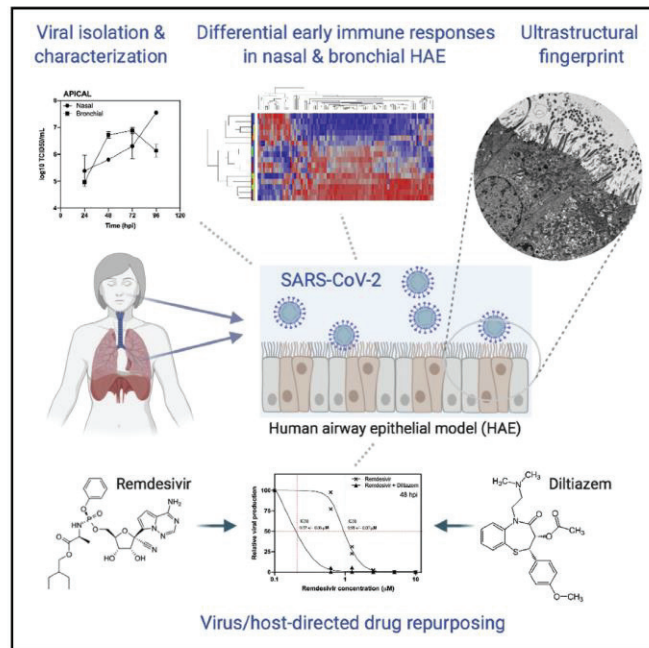
PMID: 32835306

PMCID: PMC7373044

DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100059

# Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia

## Graphical Abstract



## Authors

Andrés Pizzorno, Blandine Padey, Thomas Julien, ..., Yazdan Yazdanpanah, Olivier Terrier, Manuel Rosa-Calatrava

## Correspondence

olivier.terrier@univ-lyon1.fr (O.T.), manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr (M.R.-C.)

## In Brief

Pizzorno et al. report the characterization of SARS-CoV-2 infection, tissue-level remodeling of cellular ultrastructure, and transcriptional immune signatures using a model of reconstituted human airway epithelia. This model was advantageously used to evaluate the antiviral activity of remdesivir or a combination of remdesivir-diltiazem against SARS-CoV-2.

## Highlights

- We use reconstituted human airway epithelia to characterize SARS-CoV-2 infection kinetics
- SARS-CoV-2 induces characteristic remodeling of the respiratory epithelium cellular ultrastructure
- SARS-CoV-2 induces differential early immune responses in nasal and bronchial HAE
- We evaluate the antiviral activity of remdesivir and remdesivir-diltiazem in both Vero E6 and HAE models



Pizzorno et al., 2020, Cell Reports Medicine 1, 100059  
July 21, 2020 © 2020 The Author(s).  
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>



## Report

**Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia**

Andrés Pizzorno,<sup>1</sup> Blandine Padey,<sup>1,2</sup> Thomas Julien,<sup>1,3</sup> Sophie Trouillet-Assant,<sup>1,4</sup> Aurélien Traversier,<sup>1</sup> Elisabeth Errazuriz-Cerda,<sup>5</sup> Julien Fouret,<sup>2</sup> Julia Dubois,<sup>1</sup> Alexandre Gaymard,<sup>1,6</sup> François-Xavier Lescure,<sup>7,8</sup> Victoria Dulière,<sup>1,3</sup> Pauline Brun,<sup>1,3</sup> Samuel Constant,<sup>9</sup> Julien Poissy,<sup>10</sup> Bruno Lina,<sup>1,6</sup> Yazdan Yazdanpanah,<sup>7,8</sup> Olivier Terrier,<sup>1,11,12,\*</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,3,11,\*</sup>

<sup>1</sup>CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France

<sup>2</sup>Signia Therapeutics SAS, Lyon, France

<sup>3</sup>VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>Laboratoire Commun de Recherche HCL-bioMérieux, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

<sup>5</sup>Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE), Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

<sup>6</sup>Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des Virus Influenza Sud, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>7</sup>AP-HP, Infectious and Tropical Diseases Department, Bichat-Claude Bernard University Hospital, Paris, France

<sup>8</sup>University of Paris, French Institute for Health and Medical Research (INSERM), IAME U1137, Team DesCID, Paris, France

<sup>9</sup>Epithelix Sàrl, Geneva, Switzerland

<sup>10</sup>Pôle de Réanimation, Hôpital Roger Salengro, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, Lille, France

<sup>11</sup>These authors contributed equally

<sup>12</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr) (O.T.), [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr) (M.R.-C.)

<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>

**SUMMARY**

In the current COVID-19 pandemic context, proposing and validating effective treatments represents a major challenge. However, the scarcity of biologically relevant pre-clinical models of SARS-CoV-2 infection imposes a significant barrier for scientific and medical progress, including the rapid transition of potentially effective treatments to the clinical setting. We use reconstituted human airway epithelia to isolate and then characterize the viral infection kinetics, tissue-level remodeling of the cellular ultrastructure, and transcriptional early immune signatures induced by SARS-CoV-2 in a physiologically relevant model. Our results emphasize distinctive transcriptional immune signatures between nasal and bronchial HAE, both in terms of kinetics and intensity, hence suggesting putative intrinsic differences in the early response to SARS-CoV-2 infection. Most important, we provide evidence in human-derived tissues on the antiviral efficacy of remdesivir monotherapy and explore the potential of the remdesivir-diltiazem combination as an option worthy of further investigation to respond to the still-unmet COVID-19 medical need.

**INTRODUCTION**

On December 31, 2019, a cluster of cases of pneumonia of unknown etiology was reported in Wuhan, China. On January 10, 2020, a novel coronavirus, called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and classified into the *Beta-coronavirus* genus, was identified as the causative agent.<sup>1</sup> As of April 20, 2020, 5 weeks after the World Health Organization (WHO) declared the COVID-19 a pandemic,<sup>2</sup> novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) had caused >166,000 deaths among ~2.5 million confirmed cases reported in at least 185 countries or territories worldwide.<sup>3</sup> Compared to the 2 other coronaviruses responsible for epidemic outbreaks in the past, SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV), the novel SARS-CoV-2 strain shares ≈79% and ≈50% genome sequence identity, respectively.<sup>4</sup> It is not surprising

that important differences in terms of the epidemiology and physiopathology between these 3 viruses have also been observed.<sup>5–7</sup>

As with most emerging viral diseases, no specific antiviral treatment nor vaccine against any of these three coronaviruses are available, with standard patient management relying mainly on symptom treatment and respiratory support when needed. In that regard, and considering that key features of the biology of SARS-CoV-2 and its induced COVID-19 still require further characterization, the scarce readiness of biologically relevant pre-clinical experimental models of SARS-CoV-2 infection as a complement of the African green monkey Vero E6 cell line represents a major barrier for scientific and medical progress in this area. We and others have previously reported the advantage of using more physiological models such as in-house or commercially available reconstituted human airway epithelia (HAE) to





isolate, culture, and study a wide range of respiratory viruses.<sup>8,9</sup> Developed from biopsies of nasal or bronchial cells differentiated in the air-liquid interphase, these models reproduce with high fidelity most of the main structural, functional, and innate immune features of the human respiratory epithelium that play a central role in the early stages of infection and constitute robust surrogates to study airway disease mechanisms and for drug discovery.<sup>10</sup> In this study, we initially isolated and amplified in Vero E6 cells a SARS-CoV-2 virus directly from a nasal swab from one of the first hospitalized patients with confirmed COVID-19 in France.<sup>11</sup> We then advantageously used human reconstituted airway epithelial models of nasal or bronchial origin to characterize viral infection kinetics, tissue-level remodeling of the cellular ultrastructure, and transcriptional immune signatures induced by SARS-CoV-2, and finally evaluated the therapeutic potential of a combined therapy against COVID-19.

## RESULTS

### SARS-CoV-2 Isolation and Characterization in Vero E6 Cells and HAE

The complete genome sequence of the isolated SARS-CoV-2 virus was deposited in the GISAID EpiCoV database under the reference BetaCoV/France/IDF0571/2020 (accession ID EPI\_ISL\_411218). Phylogenetic analysis confirmed that the isolated virus is representative of the currently circulating strains.<sup>12</sup> We characterized the replicative capacities of this viral strain in Vero E6 cells at different multiplicities of infection (MOIs) (Figure 1A) using both classic infectious titer determination in cell culture (TCID50) and molecular semiquantitative methods, the latter based on ORF1b-nsp14-specific primers and probes designed by the School of Public Health at the University of Hong Kong. This double approach was facilitated by the appearance of a clearly observable characteristic cytopathic effect from 48 hpi (Figure 1B) and enabled the validation of a large interval (range 1–8 log<sub>10</sub>(TCID50)) with high correlation ( $R^2$  0.94) between molecular and infectious viral titers (Figure 1C).

In parallel, we successfully inoculated nasal MucilAir HAE on the apical surface directly with nasal swab samples, as confirmed by transmission electron microscopy observations (Figure S1). Characteristic features of coronavirus-induced cell ultrastructure remodeling were easily distinguishable in both the apical and basal sides of the HAE at 48 hpi, notably the high accumulation of progeny virions in mucus-producer goblet cells. Then, we advantageously exploited the MucilAir HAE model and in-house adapted protocols previously optimized for different respiratory viruses<sup>13</sup> to perform experimental infections with SARS-CoV-2. Viral replication was monitored through repeated sampling and TCID50 titration at the apical surface of HAE (Figure 1D). Trans-epithelial electrical resistance (TEER), considered a surrogate of epithelium integrity, was also measured during the time course of infection (Figure 1E). In parallel, comparative molecular viral genome quantification was performed at the three levels of the air-liquid HAE interphase: in apical washes (Figure 1F, Apical), total cellular RNA (Figure 1G, Intracellular), and basal medium (Figure 1H, Basal). SARS-CoV-2 viral production at the epithelial apical surface increased sharply at 48 hpi, with the highest virus titers (>7 log<sub>10</sub> TCID50/mL) being

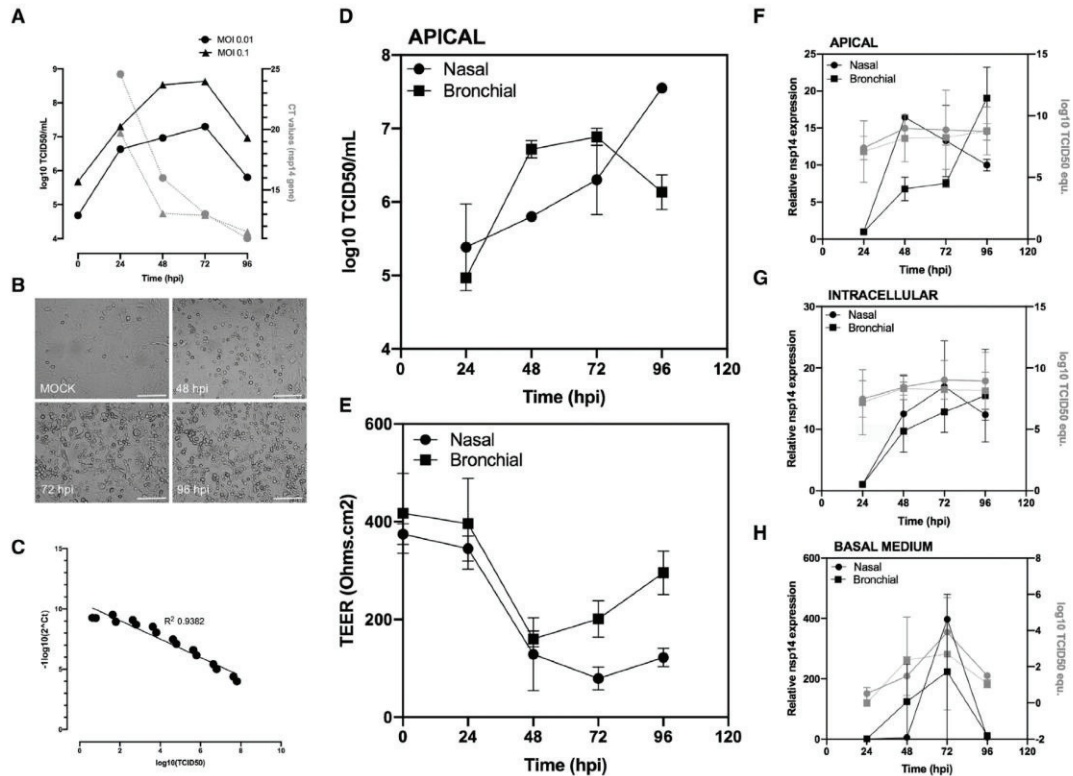
observed by 72–96 hpi (Figures 1D and 1F). The sharp increase in viral replication correlated with a reduction in epithelium integrity at 48 hpi, reflected by >2.8- and 4-fold decreases in bronchial and nasal HAE TEER values, respectively, followed by a partial recovery in the case of bronchial HAE (Figure 1E). Moreover, viral production at the apical pole was well correlated with intracellular viral genome detection during infection, except for the nasal HAE at 48 hpi, in which a strong relative increase in nsp14 RNA was observed (Figure 1F). Viral genome was detected in the basal medium at 48 hpi and onward (Figure 1H), which indirectly confirms the breach of epithelial integrity caused by the infection at 48 hpi and previously highlighted through TEER measurements.

### SARS-CoV-2 Induces Characteristic Remodeling of the Respiratory Epithelium Cellular Ultrastructure

To further characterize the biology of SARS-CoV-2, we inoculated both nasal (Figures 2A and 2B) and bronchial (Figures 2C and 2D) HAE and analyzed the infection-induced remodeling of the cellular ultrastructure using transmission electron microscopy. At 48 hpi, both HAE exhibited a well-established infection, with ciliated, goblet, and to a lesser extent basal cells showing the active production of viral progeny. This observation is in accordance with the viral replication results described in Figure 1 and with a recent study reporting high expression levels of the SARS-CoV-2 cell receptor angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) in both ciliated and goblet respiratory cells.<sup>14</sup> As previously observed in structural studies of other coronaviruses, notably SARS-CoV and MERS-CoV,<sup>15–18</sup> we distinguished characteristic clusters in the perinuclear region of infected HAE cells. These clusters are mainly composed of numerous viral single- and double-membrane vesicles (DMVs) and mitochondria (Figures 2A, 2A1, 2B, 2C, and 2D). Large electron-dense structures corresponding to the accumulation of viral material in active virus replication zones as well as typical double-membrane spherules containing pieces of membranes interspaced among virions being formed were also observed at 48 hpi (Figures 2B and 2D). Moreover, double-membraned spherules containing numerous virions are noticeable near the plasmatic membranes (Figures 2B1 and 2D2). These spherules as well as several clusters of virions were observed mostly at the surface of ciliated cells (Figure 2A2). These features are characteristic of the late stages of the viral cycle, hence confirming the capacity of the HAE to reproduce the asynchronous nature of infection.

### SARS-CoV-2 Induces Differential Early Immune Responses in Nasal and Bronchial HAE

Recent reports associate COVID-19 with high plasma levels of certain immunostimulant and proinflammatory cytokines (e.g., IL6), notably in patients with severe disease,<sup>6</sup> suggesting a potential link with a poor prognosis.<sup>19</sup> However, such an inflammatory state has been much less characterized in the respiratory microenvironment thus far. To investigate the effect of SARS-CoV-2 infection on gene expression, we used Nanostring hybridization-based technology on both nasal and bronchial HAE for multiplex mRNA detection and the relative quantification of two complementary panels of genes<sup>20</sup> involved in the immune response (Data S1). Heatmap and hierarchical analyses

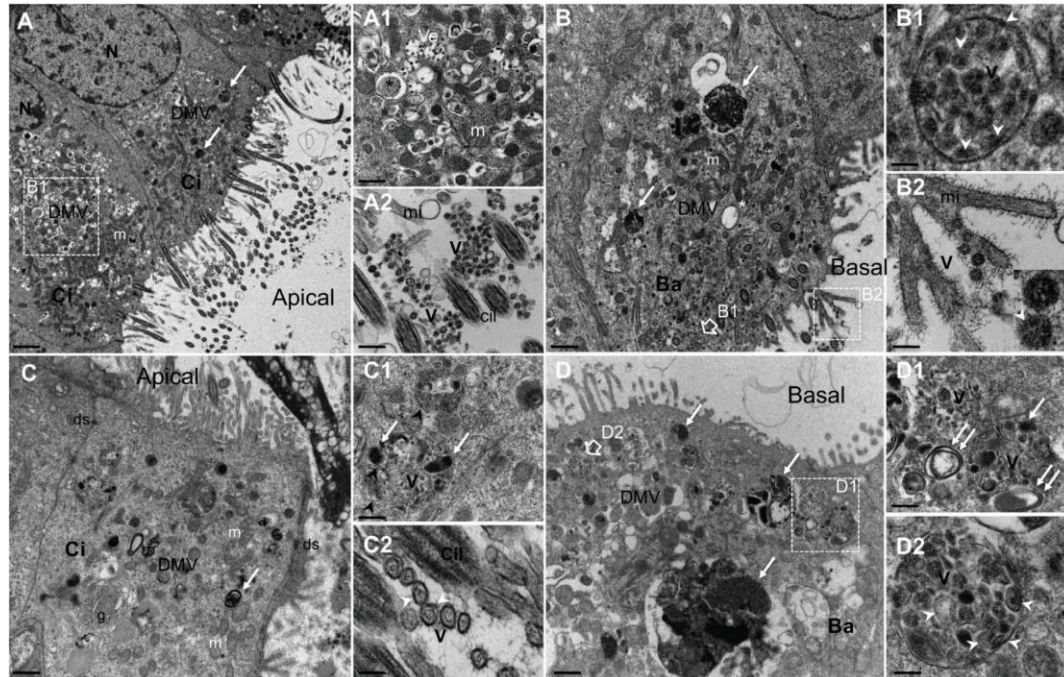


**Figure 1. Characterization of a SARS-CoV-2 Infection Model in Vero E6 Cells and in Nasal and Bronchial Reconstituted Human Airway Epithelia (HAE)**

(A) SARS-CoV-2 replication kinetics in Vero E6 cells.  
 (B) Virus-induced cytopathic effects in Vero E6 cells (scale bar, 150  $\mu$ M).  
 (C) Correlation between viral quantification methods.  
 (D) Apical viral production was assessed in washes of the apical pole at 24, 48, 72, and 96 hpi. Vero E6 cells were incubated with serial dilutions of the collected sample for the determination of viral titers ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) at the indicated time points.  
 (E) Trans-epithelial resistance (TEER in  $\Omega/\text{cm}^2$ ) between the apical and basal poles was measured at each time point.  
 (F–H) Relative viral genome quantification at the apical, intracellular, and basal compartments of the HAE was performed after viral or total RNA extraction and qRT-PCR. Results are expressed in fold change of nsp14 expression compared to 24 hpi and also as  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub> equivalent values. Presented data (means and SDs) from 3 independent experiments are shown.

identified two distinct levels of clustering. Regardless of the nasal or bronchial nature of the HAE model, the gene expression profile at 24 hpi highlights a marked upregulation of a subset of  $\sim 14\%$  of the studied genes, which are subsequently downregulated at 48, 72, and 96 hpi (Figure 3A). This observation was substantiated by unsupervised analysis of the data using the full gene panel. The first component of the principal-component analysis (PCA) that accounts for 63% of the variance is mainly driven by the time of infection, with a clear discrimination between 24 hpi and the other time points (Figure 3B, red triangles/dots). The immune transcriptomic signatures seem at least partially driven by the nature of the HAE beyond 24 hpi (Figure 3A). This is in agreement with the second component analysis, gathering 12.6% of total variance, which allowed a clear dif-

ferentiation between the nasal and bronchial compartments (Figure 3B, green/purple triangles versus dots). In line with a recent report by Blanco-Melo and collaborators,<sup>21</sup> specific interferon (IFN) and interferon-stimulated gene (ISG) responses were almost undetectable in the first 24 hpi. Nevertheless, the innate immune expression signature after 24 hpi (peak at 72–96 hpi) is driven by a strong upregulation of type I and type III IFNs (IFNB1, IFNL1, and IFNL2, -3, and -4), as well as other immunity-related genes, notably in the nasal HAE. Whereas only a subset of these genes (CXCL10/IP10, CXCL2/MIP2A, IL1A, IL1B, Mx1, and ZBP1) follow the same pattern in the bronchial HAE, although at overall lower expression levels, the initial modulation of IFNB1, IFNL1, CCL2/MCP1, and IL-6 in this tissue seems to fade at 96 hpi. Moreover, the relative expression of a



**Figure 2. Ultrastructure of SARS-CoV-2-Infected Nasal and Bronchial Reconstituted HAE**

MucilAir HAE were infected on the apical surface with SARS-CoV-2 (MOI 0.1). Forty-eight hours post-inoculation, HAE were fixed and processed for transmission electron microscopy analysis, as described in [Method Details](#).

(A and B) Section of apical ciliated (Ci) and basal (Ba) cells from nasal HAE showing numerous viral vesicles (DMVs) clustered in the perinuclear region in areas with mitochondria (m) and electron-dense accumulation of viral material (white arrow). Scale bars, 2  $\mu$ m (A) and 1  $\mu$ m (B).

(A1) Enlargement of cytoplasmic area with smooth-walled secretory vesicles containing virions (Ve) and virus-induced DMVs (asterisk). Scale bar, 1  $\mu$ m.

(A2) Enlargement of ciliated cell surface showing virion clusters (V). Microvilli (mi) and transverse sections of cilia (Cil) are also observed. Scale bar, 0.05  $\mu$ m.

(B1) Enlargement of double-membraned spherules containing electron-dense material and pieces of double membranes interspaced among virions (V). Scale bar, 0.1  $\mu$ m.

(B2) Enlargement of and virions (V). The white arrows point to viral double membranes seen at high magnification (inset). Scale bar, 0.2  $\mu$ m.

(C and D) Section of Ci and Ba cells from bronchial HAE showing numerous viral vesicles (DMVs) clustered in the perinuclear region in areas with m and electron-dense accumulation of viral materials (white arrow). Scale bar, 1  $\mu$ m.

(C1) Enlargement of cytoplasmic area with spherules containing virions being formed (V), electron-dense accumulation of viral material (white arrow), and pieces of membranes (black arrowhead). Scale bar, 0.5  $\mu$ m.

(C2) High magnification of transverse section of virions (V) at the cell surface with Ci and mi. Their double membrane (white arrowhead) and spikes at their outer edge are visible. Scale bar, 0.1  $\mu$ m.

(D1) Section of Ba showing virus-induced DMVs, large electron-dense accumulation of viral materials (white arrow), and double-membrane vesicles containing virions near the plasmatic membrane. Scale bar, 1  $\mu$ m.

(E) Enlargements of the cytoplasmic area containing viral replication sites (double white arrows) and virions being formed (V). Scale bar, 0.1  $\mu$ m.

(D2) Enlargement of a double-membraned spherule containing virions (V), double-membrane vesicles, and electron-dense viral materials. Scale bar, 0.1  $\mu$ m. N, Nucleus; DMV, cytoplasmic double-membrane vesicles; m, mitochondria; and ds, desmosome.

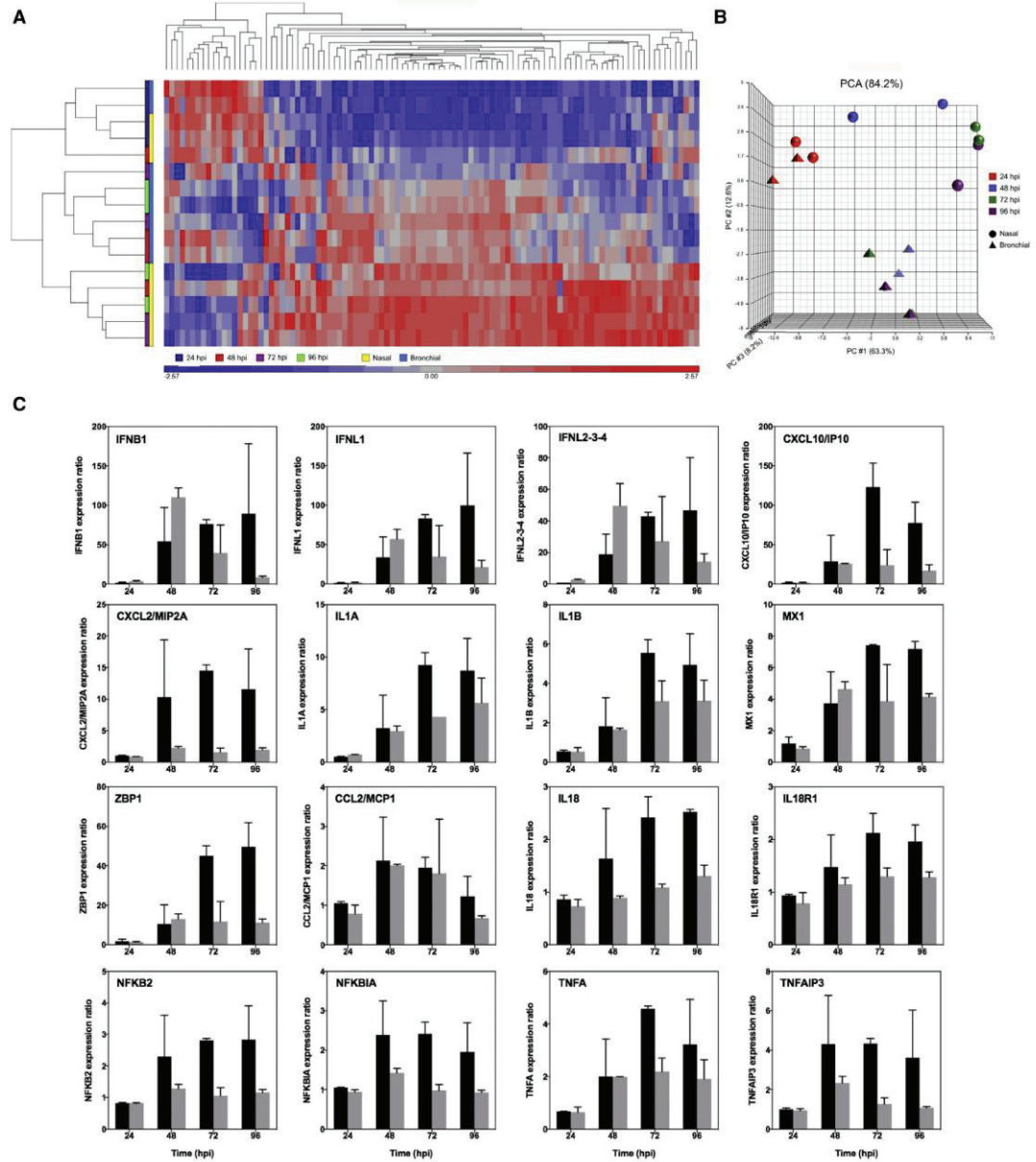
Representative micrographs are shown from 2 independent experiments.

See also [Figure S1](#).

subset of genes associated with the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pathways (e.g., IL-18, IL-18R1, NFKB2, NFKBIA, TNFA, and TNFAIP3) is mostly unchanged all throughout the infection in bronchial HAE, but it is highly upregulated in nasal HAE at 48 hpi and onward ([Figure 3C](#); [Data S1](#)). Our results highlight distinctive transcriptional immune signatures between nasal and bronchial HAE, both in terms of ki-

netics and intensity, hence suggesting potential intrinsic differences in the early response to SARS-CoV-2 infection between the upper and lower respiratory tracts. These results are in accordance with the first clinical reports describing in some patients a rapid worsening of the respiratory condition and overall clinical state by days 7–10 after symptom onset,<sup>22</sup> most probably related to a cytokine storm syndrome.<sup>23</sup>





**Figure 3. Nasal and Bronchial Innate Immune Transcriptional Signature during the Time Course of SARS-CoV-2 Infection**  
Differential expression of both immune response (96 genes) and type III IFNs (12 genes) panels was evaluated in infected nasal and bronchial HAE using the Nanostring technology at the indicated time points. Data processing and normalization were performed with nSolver analysis software (version 4.0, NanoString Technologies), and the results are expressed in fold change induction compared to the mock condition.  
(A) Heatmap and hierarchical clustering of differentially expressed genes compared to the mock-infected condition.  
(B) Principal-component analysis (PCA).  
(C) mRNA expression ratio of selected genes compared to the mock infected condition.  
Data from 2 independent experiments are shown.



### Remdesivir-Diltiazem Combined Treatment Potentiates the Efficacy of Remdesivir Monotherapy

The current absence of specific treatments against COVID-19 results in the empirical repurposing of approved or experimental drugs designed for other diseases. These treatments are usually based on limited clinical or preclinical data. Remdesivir (GS-5734) is a prodrug of an adenosine nucleotide analog with demonstrated broad antiviral activity against several RNA viruses in different preclinical models.<sup>24</sup> Remdesivir has recently shown very promising results in animal models for the treatment of different coronaviruses, including MERS-CoV,<sup>25</sup> as well as one *in vitro* study against SARS-CoV-2.<sup>26</sup> Various clinical trials on the use of remdesivir for the treatment of patients with COVID-19 have already started in China and the United States. Diltiazem is a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel antagonist commonly used as an antihypertensive for the control of angina pectoris and cardiac arrhythmia.<sup>27</sup> In a recent study, we repurposed diltiazem as an effective host-directed influenza inhibitor due to its thus far undescribed capacity of inducing the IFN antiviral response, particularly IFN-1 $\beta$  and type III IFNs (Figure S2),<sup>8</sup> henceforth prompting an ongoing Phase IIb clinical trial to assess the efficacy of diltiazem-oseltamivir bitherapy in patients with severe influenza (FLUNEXT TRIAL PHRC #15-0442, NCT03212716). The rationale behind testing this kind of virus-directed plus host-directed drug combination is consistent with the evaluation of the potential benefits of a remdesivir-diltiazem combined treatment against COVID-19. In that regard, a recent study describing hypertension as a potential risk factor observed among a cohort of inpatients with COVID-19,<sup>19</sup> as well as two reports not anticipating potential adverse effects of diltiazem<sup>28</sup> or negative pharmacological interactions between remdesivir and diltiazem for the treatment of COVID-19,<sup>29</sup> further support our strategy.

We therefore explored the antiviral potential against SARS-CoV-2 of remdesivir monotherapy, but also in combination with diltiazem in both Vero E6 and HAE. Figures 4A–4C shows a very strong antiviral effect of post-infection treatment with remdesivir in Vero E6 cells, with 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of  $0.98 \pm 0.07$   $\mu$ M at 48 hpi and  $0.72 \pm 0.03$   $\mu$ M at 72 hpi and a selectivity index (SI) of 281 and 347, respectively. Although the IFN- $\lambda$ 1 response in Vero E6 cells has been proved functional, this cell line cannot produce type I IFNs.<sup>30,31</sup> This incomplete IFN response most likely accounts for the lack of significant antiviral effect observed with diltiazem monotherapy in our experimental conditions. Nonetheless, the addition of 11.5  $\mu$ M diltiazem significantly potentiated the antiviral effect of remdesivir, as evidenced by the shift on dose-response curves toward IC<sub>50</sub> values at least 3- and 2-fold lower than those observed for remdesivir monotherapy at 48 and 72 hpi, respectively (Figures 4A–4C).

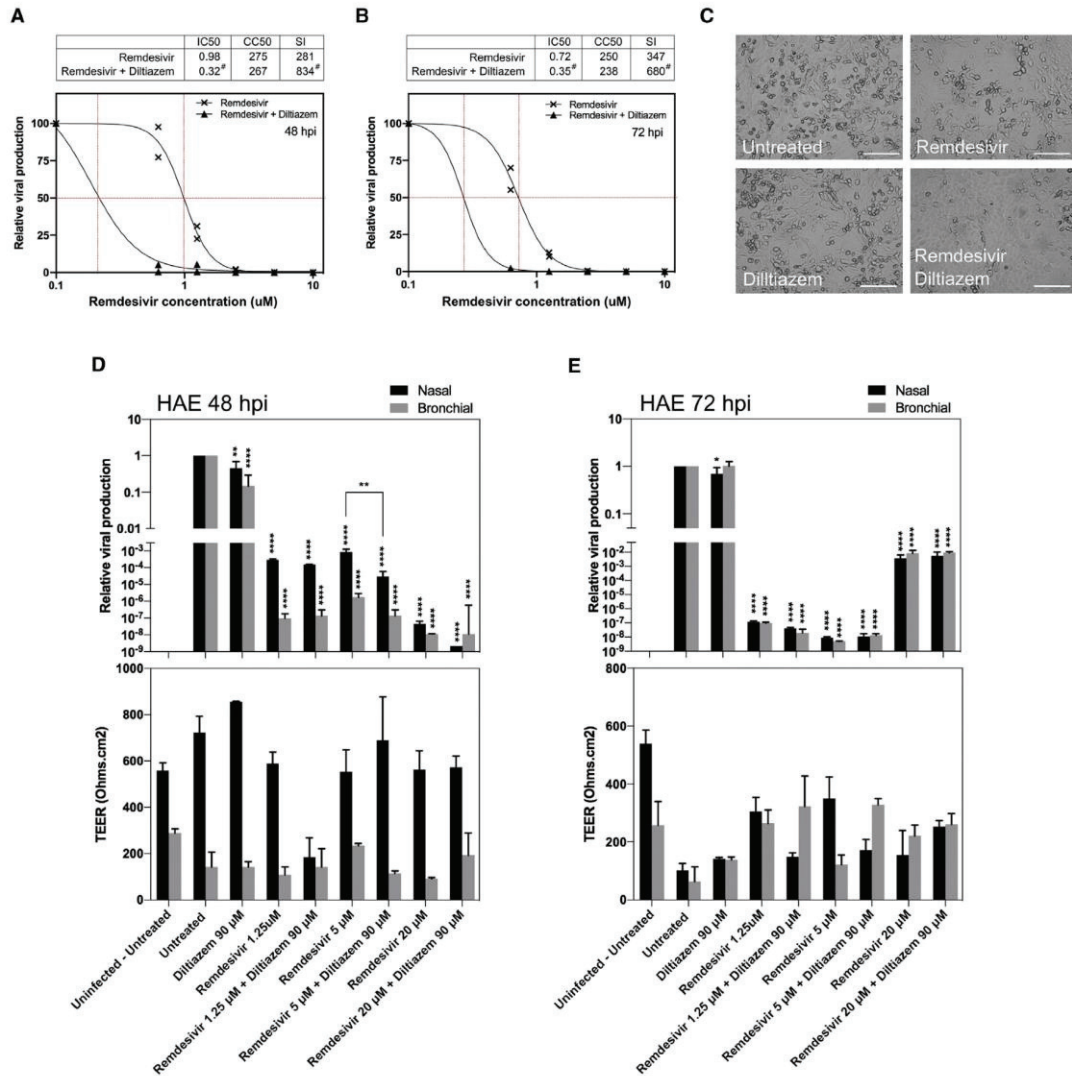
Daily basolateral treatment of HAE with 1.25, 5, and 20  $\mu$ M remdesivir resulted in 3.5, 3.1, and 7.3 log<sub>10</sub> reductions of intracellular SARS-CoV-2 nasal HAE viral titers at 48 hpi, respectively. Comparably, 7.0, 5.8, and 7.9 log<sub>10</sub> reductions of bronchial HAE viral titers were observed at the same time point (Figure 4D, upper panel). Nasal and bronchial HAE viral titers were also reduced at 72 hpi following treatment with 1.25  $\mu$ M (6.9 and 7.0 log<sub>10</sub>), 5  $\mu$ M (8.0 and 8.3 log<sub>10</sub>), and 20  $\mu$ M (2.4 and 2.0

log<sub>10</sub>) remdesivir, respectively (Figure 4E, upper panel). It is not surprising for a model with a completely functional IFN response that daily treatment with 90  $\mu$ M diltiazem resulted in moderate reductions of intracellular viral titers in nasal (40% and 69%) and bronchial (80% and 24%) HAE at 48 and 72 hpi, respectively (Figures 4D and 4E, upper panel). We observed additional 1.45 and 1.3 log<sub>10</sub> reductions in nasal HAE viral titers at 48 hpi for the remdesivir-diltiazem combination when compared with 5 and 20  $\mu$ M remdesivir monotherapies, respectively, although only the former was statistically significant ( $p = 0.0066$ ). Moreover, TEER analysis revealed that the antiviral effects induced by remdesivir, diltiazem, or the remdesivir-diltiazem combination mostly translated into a protection of the nasal HAE barrier integrity at 48 and 72 hpi (Figures 4D and 4E, lower panels). Regardless of their effect on viral reduction, the 3 remdesivir-diltiazem combinations tested were particularly effective in protecting the integrity of bronchial HAE at 72 hpi, as evidenced by TEER values comparable to those of non-infected controls (Figure 4E, lower panel).

### DISCUSSION

Here, we report the relevance of reconstituted HAE as an efficient model for the study of respiratory viral infections and virus-host interactions in highly biologically relevant experimental conditions. The results we obtained in this complex model provide meaningful contributions to the characterization of the kinetics of viral infection and on the tissue-level remodeling of the cellular ultrastructure and local innate immune responses induced by SARS-CoV-2. Nanostring results highlight a differential effect of SARS-CoV-2 infection on the early innate immune response of nasal and bronchial HAE. These responses are in line with viral replication kinetics, and in some cases,<sup>6</sup> but not in others,<sup>32</sup> follow trends similar to what has been described in blood samples from patient cohorts. We expect that our results will provide a benchmark for future studies aimed at further characterizing the local pathophysiology and immune response to SARS-CoV-2 infection, particularly in the lower respiratory tract, with the ultimate objective of providing insight in terms of putative prognostic biomarkers and/or patient management.

Finally, the HAE model of SARS-CoV-2 infection described in this study also constitutes an advantageous physiologic model to evaluate candidate therapeutic approaches, provided that in many cases the inhibitory effects observed in classic reductionist models of immortalized cell lines do not necessarily translate into a real clinical setting.<sup>33</sup> Most important, we provide valuable evidence on the antiviral efficacy of remdesivir in both the upper and lower human respiratory tracts and on the potential of the remdesivir-diltiazem combination as an option worthy of further investigation to respond to the current medical unmet need imposed by COVID-19. The combination of a virus-directed plus a host-directed drug could result in enhanced antiviral and/or immunomodulatory effects, including during the immunopathologic phase frequently observed during the second week of infection. This association could also reduce the therapeutic doses of chemotherapeutic agents targeting nucleic acid synthesis and therefore minimize putative adverse side effects. This two-pronged approach would be of special interest



**Figure 4. Evaluation of Antiviral Activity of Remdesivir-Diltiazem in Vero E6 Cells and in HAE**

(A and B) Dose-response curves of remdesivir and remdesivir-diltiazem combination (11.5  $\mu$ M fixed diltiazem concentration) at 48 hpi (A) and 72 hpi (B) in Vero E6 cells. <sup>#</sup>Estimated IC<sub>50</sub> and SI values.

(C) Effect of antiviral treatment on virally induced cytopathic effects in Vero E6 cells (scale bar, 150  $\mu$ M).

(D and E) Relative intracellular viral genome quantification and trans-epithelial resistance (TEER in  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>) between the apical and basal poles in nasal and bronchial HAE at (D) 48 and (E) 72 hpi. Results are expressed in relative viral production compared to the infected untreated control and relative TEER compared to t = 0 (before infection).

Data (means  $\pm$  SDs) from 3 independent experiments are shown. Statistical significance was calculated by 1-way ANOVA; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*\*p < 0.0001 versus untreated group.

See also [Figure S2](#).

for the treatment of at-risk patients within the first 10 days from symptom onset, when the effective clearance of viral load still plays a major role in the clinical outcome.<sup>34</sup>

#### Limitations of Study

Besides the above-mentioned physiological advantages of the HAE model, the absence of white blood cells (e.g., neutrophils,



monocytes, dendritic cells) may partially bias the analysis of the innate immune response induced by infection. Moreover, although this study suggests the potential of the remdesivir-diltiazem combination in the treatment of certain SARS-CoV-2 infections, its validation and implementation in the clinic need to be explored further.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **RESOURCE AVAILABILITY**
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
  - Cells
  - HAE
  - Virus
- **METHOD DETAILS**
  - Clinical samples, viral isolation, and sequencing
  - Viral quantification
  - Viral replication kinetics and antiviral treatment in Vero E6 cells
  - Viral infection and treatment in reconstituted human airway epithelia (HAE)
  - NanoString gene expression analysis
  - Transmission electron microscopy
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge Denis Ressenkoff and the CIQLE team (Université Claude Bernard Lyon 1) for their technical assistance with electron microscopy image acquisition and analysis, as well as Dr. Guy Boivin for his critical reading of the manuscript. This study was funded by INSERM REACTING (REsearch & ACTION emergINg infectious diseases), CNRS, and Mérieux research grants. The sponsors had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data, manuscript writing, or in the decision to submit the article for publication.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, A.P., O.T., and M.R.-C. Formal Analysis, A.P., S.T.-A., J.F., and O.T. Funding Acquisition, B.L., O.T., and M.R.-C. Investigation, A.P., B.P., T.J., S.T.-A., A.T., E.E.-C., V.D., J.D., and O.T. Methodology, S.C. (MucilAir HAE). Project Administration, O.T. and M.R.-C. Resources, A.G., S.C., B.L., and Y.Y. Supervision, A.P., O.T., and M.R.-C. Validation, B.L., O.T., and M.R.-C. Visualization, A.P., S.T.-A., O.T., and M.R.-C. Writing – Original Draft, A.P., O.T., and M.R.-C. Writing – Review & Editing, S.C., J.P., B.L., Y.Y., and M.R.-C.

## DECLARATION OF INTERESTS

A.P., B.P., T.J., A.T., O.T., and M.R.-C. are co-inventors of a patent application filed by INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, and Signia Ther-

apeutics for the repurposing of diltiazem for the treatment of SARS-CoV-2 infections (FR 20/02351). A.P., O.T., and M.R.-C. are co-founders of Signia Therapeutics SAS. S.C. is the founder of Epithelix, the developer and provider of MucilAir HAE. F.-X.L. has received funding for lectures from Gilead Sciences and Merck Sharp & Dohme France, and funding for travel to meetings from Merck Sharp & Dohme France, Astellas, and Eumedica. B.L. is the co-chair of the Global Influenza and RSV Initiative and the chair of the scientific committee of the Global Influenza Hospital Surveillance Network. B.L. received no personal remuneration for these activities. B.L. received travel grants to attend meetings by Abbott, Seegene, Sanofi, and bioMérieux. All of the other authors declare no competing interests.

Received: April 22, 2020

Revised: June 1, 2020

Accepted: June 26, 2020

Published: July 21, 2020

## REFERENCES

1. Hui, D.S., I Azhar, E., Madani, T.A., Ntoumi, F., Kock, R., Dar, O., Ippolito, G., Mchugh, T.D., Memish, Z.A., Drosten, C., et al. (2020). The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int. J. Infect. Dis.* *91*, 264–266.
2. World Health Organization (2020). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>.
3. World Health Organization (2020). Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 3, 23 January 2020. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200123-sitrep-3-2019-ncov.pdf?sfvrsn=d6d23643\\_8](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200123-sitrep-3-2019-ncov.pdf?sfvrsn=d6d23643_8).
4. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* *395*, 565–574.
5. Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S.C., and Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
6. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* *395*, 497–506.
7. Wang, Y., Wang, Y., Chen, Y., and Qin, Q. (2020). Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J. Med. Virol.* *92*, 568–576.
8. Pizzorno, A., Terrier, O., Nicolas de Lamballerie, C., Julien, T., Padey, B., Traversier, A., Roche, M., Hamelin, M.-E., Rhéaume, C., Croze, S., et al. (2019). Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* *10*, 60.
9. Farsani, S.M., Deijs, M., Dijkman, R., Molenkamp, R., Jeeninga, R.E., Ieven, M., Goossens, H., and van der Hoek, L. (2015). Culturing of respiratory viruses in well-differentiated pseudostratified human airway epithelium as a tool to detect unknown viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* *9*, 51–57.
10. Boda, B., Benaoudia, S., Huang, S., Bonfante, R., Wiszniewski, L., Tseligka, E.D., Tapparel, C., and Constant, S. (2018). Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res.* *156*, 72–79.
11. Lescure, F.-X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.-H., Behilil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., et al. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect. Dis.* *20*, 697–706.

12. GISAID (2020). Genomic epidemiology of hCoV-19. <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>.
13. Nicolas de Lamballerie, C., Pizzorno, A., Dubois, J., Julien, T., Padey, B., Bouveret, M., Traversier, A., Legras-Lachuer, C., Lina, B., Boivin, G., et al. (2019). Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia. *Sci. Rep.* **9**, 11493.
14. Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., and HCA Lung Biological Network. SARS-CoV-2 Entry Genes Are Most Highly Expressed in Nasal Goblet and Ciliated Cells within Human Airways. arXiv 10.1038/s41591-020-0868-6, arXiv:2003.0612.
15. Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., and Snijder, E.J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLOS Biol.* **6**, e226.
16. Goldsmith, C.S., Tatti, K.M., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Comer, J.A., Lee, W.W., Rota, P.A., Bankamp, B., Bellini, W.J., and Zaki, S.R. (2004). Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 320–326.
17. Afzelius, B.A. (1994). Ultrastructure of human nasal epithelium during an episode of coronavirus infection. *Virchows Arch.* **424**, 295–300.
18. de Wilde, A.H., Raj, V.S., Oudshoorn, D., Bestebroer, T.M., van Nieuwkoop, S., Limpens, R.W.A.L., Posthuma, C.C., van der Meer, Y., Bârcena, M., Haagmans, B.L., et al. (2013). MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- $\alpha$  treatment. *J. Gen. Virol.* **94**, 1749–1760.
19. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., et al. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062.
20. Mouton, W., Albert-Vega, C., Boccard, M., Bartolo, F., Oriol, G., Lopez, J., Pachot, A., Textoris, J., Mallet, F., Brengel-Pesce, K., and Trouillet-Assant, S. (2020). Towards standardization of immune functional assays. *Clin. Immunol.* **210**, 108312.
21. Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B.E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., et al. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036–1045.e9.
22. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., et al.; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733.
23. Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., and Manson, J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **395**, 1033–1034.
24. Sheahan, T.P., Sims, A.C., Graham, R.L., Menachery, V.D., Gralinski, L.E., Case, J.B., Leist, S.R., Pyrc, K., Feng, J.Y., Trantcheva, I., et al. (2017). Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal3653.
25. Sheahan, T.P., Sims, A.C., Leist, S.R., Schäfer, A., Won, J., Brown, A.J., Montgomery, S.A., Hogg, A., Babuis, D., Clarke, M.O., et al. (2020). Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat. Commun.* **11**, 222.
26. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., and Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **30**, 269–271.
27. PubChem (2019). Compound Summary: Diltiazem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/39186>.
28. Fang, L., Karakiulakis, G., and Roth, M. (2020). Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir. Med.* **8**, e21.
29. University of Liverpool (2020). COVID-19 Interactions. <https://www.covid19-druginteractions.org/>.
30. Emeny, J.M., and Morgan, M.J. (1979). Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* **43**, 247–252.
31. Prescott, J., Hall, P., Acuna-Retamar, M., Ye, C., Wathelet, M.G., Ebihara, H., Feldmann, H., and Hjelle, B. (2010). New World hantaviruses activate IFN $\lambda$  production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLOS ONE* **5**, e11159.
32. Thevarajan, I., Nguyen, T.H.O., Koutsakos, M., Druce, J., Caly, L., van de Sandt, C.E., Jia, X., Nicholson, S., Catton, M., Cowie, B., et al. (2020). Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 453–455.
33. Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., Ruan, L., Song, B., Cai, Y., Wei, M., et al. (2020). A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1787–1799.
34. Liu, Y., Yan, L.-M., Wan, L., Xiang, T.-X., Le, A., Liu, J.-M., Peiris, M., Poon, L.L.M., and Zhang, W. (2020). Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 656–657.



## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
SARS-CoV-2 BetaCoV/France/DF0571/2020	This paper	EPI_ISL_411218
<b>Biological Samples</b>		
SARS-CoV-2-positive human nasal swab sample	Bichat Claude Bernard Hospital, Paris	Lescure et al. <sup>11</sup>
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Remdesivir	Med Chem Tronica	Ref: HY-104077, CAS: 1809249-37-3
(+)-cis-Diltiazem hydrochloride	Sigma-Aldrich	Ref: D2521, CAS: 33286-22-5
<b>Critical Commercial Assays</b>		
NanoString nCounter® Custom Gene Expression panels	NanoString Technologies	MAN-10083-01
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega	Ref: G3580
<b>Deposited Data</b>		
NanoString source data	This paper	<a href="#">Data S1</a>
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
VeroE6 cells	ATCC	CRL-1586
MucilAir Nasal HAE	Epithelix SARL	Ref: EP02MP
MucilAir Bronchial HAE	Epithelix SARL	Ref: EP01MD
<b>Oligonucleotides</b>		
Forward primer HKU-ORF1b-nsp14F: 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3'	Eurogentec	N/A
Reverse primer HKU-ORF1b-nsp14R: 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3'	Eurogentec	N/A
Probe HKU-ORF1b-nsp141P: 5'-FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-TAMRA-3'	Eurogentec	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
nSolver	NanoString Technologies	<a href="https://www.nanostring.com/products/analysis-software/nsolver">https://www.nanostring.com/products/analysis-software/nsolver</a>
Genomics Suite 7	Partek	<a href="https://documentation.partek.com/">https://documentation.partek.com/</a>
DigitalMicrograph	Gatan	<a href="https://www.gatan.com/products/tem-analysis/gatan-microscopy-suite-software">https://www.gatan.com/products/tem-analysis/gatan-microscopy-suite-software</a>
Quest Graph IC <sub>50</sub> calculator	AAT Bioquest	<a href="https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator">https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator</a>
Prism 8	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>

### RESOURCE AVAILABILITY

#### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Olivier Terrier ([olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr)).

#### Materials availability

The SARS-CoV-2 isolate generated in is study will be made available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

#### Data and code availability

The complete genome sequence of the isolated SARS-CoV-2 is available at the GISAID EpiCoV database under the reference BetaCoV/France/IDF0571/2020 (accession ID EPI\_ISL\_411218). Original data have been deposited to Mendeley Data: <http://dx.doi.org/10.17632/cxs7xwjpj.1>. Source data for Figures 1 and 4 are available from the corresponding author upon request.

### EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

#### Cells

Vero E6 cells (ATCC CRL-1586) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, MD, USA) with 4.5 g/L glucose, 10% Fetal Calf Serum (FCS), 1 mM L-Glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### HAE

MucilAir™ HAE reconstituted from human primary cells obtained from nasal or bronchial biopsies were provided by Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase with specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. The nasal HAE used in this study were derived from a pool of 14 donors (gender not specified) whereas the bronchial HEA were derived from a single donor (56 y-o Caucasian female). In both cases, no existing pathologies were identified. All samples provided by Epithelix SARL have been obtained with informed consent as part of studies or other processes that have had ethical review and approval. These studies were conducted according to the declaration of Helsinki on biomedical research (Hong Kong amendment, 1989), and received approval from local ethics commission.

#### Virus

The SARS-CoV-2 strain used in this study was isolated from a 47 y-o female patient enrolled in a French clinical cohort assessing patients with COVID-19 (NCT04262921). This study was conducted according to the declaration of Helsinki and received approval from local ethics commission. The viral strain was sequenced with Illumina MiSeq and deposited in the GISAID EpiCoV database under the reference BetaCoV/France/IDF0571/2020 (accession ID EPI\_ISL\_411218).

### METHOD DETAILS

#### Clinical samples, viral isolation, and sequencing

All experiments involving clinical samples and the manipulation of infectious SARS-CoV-2 were performed in biosafety level 3 (BSL-3) facilities, using appropriate protocols. The SARS-CoV-2 strain used in this study was isolated by directly inoculating Vero E6 cell monolayers with a nasal swab sample collected from a one of the first COVID-19 cases confirmed in France: a 47 y-o female patient hospitalized in January 2020 in the Department of Infectious and Tropical Diseases, Bichat Claude Bernard Hospital, Paris<sup>11</sup>. Once characteristic CPE was observable in more than 50% of the cell monolayer, supernatants were collected and immediately stored at -80°C for subsequent viral RNA extraction using the QiAmp viral RNA Kit (QIAGEN). The complete viral genome sequence was obtained using Illumina MiSeq sequencing technology, was then deposited after assembly on the GISAID EpiCoV platform (Accession ID EPI\_ISL\_411218) under the name BetaCoV/France/IDF0571/2020.

#### Viral quantification

Viral stocks and collected samples were titrated by classic tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/ml) in Vero E6 cells, using the Reed & Muench statistical method. In parallel, relative quantification of viral genome was performed by one-step real-time quantitative reverse transcriptase and polymerase chain reaction (RT-qPCR) from viral or total RNA extracted using QiAmp viral RNA or RNeasy Mini Kit (QIAGEN) in the case of supernatants/apical washings or cell lysates, respectively. Primer and probe sequences targeting the ORF1b-nsp14 (forward primer HKU-ORF1b-nsp14F: 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3'; reverse primer HKU-ORF1b-nsp14R: 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3'; probe HKU-ORF1b-nsp14P: 5'-FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGAC TAG-TAMRA-3') were selected from those designed by the School of Public Health/University of Hong Kong (Leo Poon, Daniel Chu and Malik Peiris) and synthesized by Eurogentec. Real-time one-step RT-qPCR was performed using the EXPRESS One-Step Superscript qRT-PCR Kit (Invitrogen, reference 1178101K), in a 20 µl reaction volume containing 10 µl of Express qPCR supermix at 2X, 1 µl of forward primer at 10 µM, 1 µl of reverse primer at 10 µM, 0.5 µl of probe at 10 µM, 3.1 µl of PCR-water (QIAGEN, reference 17000-10), 0.4 µl of Rox dye at 25 µM, and 2 µl of vRNA template. Thermal cycling was performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems, reference 4346907). Cycling conditions were as follows: reverse transcription at 50°C during 15 min, followed by initial polymerase activation at 95°C for 2 min, and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 minute. The investigator in charge of TCID<sub>50</sub> or RT-qPCR titration was blinded to group allocation.

#### Viral replication kinetics and antiviral treatment in Vero E6 cells

Vero E6 cells were seeded 24 h in advance in multi-well 6 plates, washed twice with PBS and then infected with a 1 mL suspension of SARS-CoV-2 in infection medium (DMEM 4.5 g/L glucose) at the indicated MOIs. For replication kinetics studies, supernatant sam-



ples were collected at different time-points and separated into 2 tubes: one for TCID<sub>50</sub> viral titration and one RT-qPCR. For treatment studies, the inoculum of infected Vero E6 was removed 1 hpi and cells were immediately treated with 2 mL of serial dilutions of a solution in treatment medium (DMEM 4.5 g/L glucose, 2% FCS) of candidate molecules alone or in combination, and then incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Treatment medium alone (for diltiazem) or containing a DMSO concentration equivalent to that of the highest remdesivir dose tested was used as mock-treatment control. Supernatants were collected at 48 and 72 hpi and stored at –80°C for RNA extraction and viral titration. Cell toxicity induced by remdesivir and diltiazem was evaluated using the colorimetric CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) following the manufacturer instructions. Drug 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>), 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) and selectivity index (SI) values were calculated using the Quest Graph IC<sub>50</sub> calculator (AAT Bioquest).

#### **Viral infection and treatment in reconstituted human airway epithelia (HAE)**

For infection experiments, the apical poles of HAE were gently washed twice with warm OptiMEM medium (GIBCO, ThermoFisher Scientific) and then infected directly with patient nasal swab samples or a 150 μL dilution of virus in OptiMEM medium, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. For mock infection, the same procedure was followed using OptiMEM as inoculum. Samples collected from apical washes or basolateral medium at different time-points after incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> were separated into 2 tubes: one for TCID<sub>50</sub> viral titration and one RT-qPCR. HAE cells were harvested in RLT buffer (QIAGEN) and total ARN was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) for subsequent RT-qPCR and Nanostring assays. Treatments with specific dilutions of candidate molecules alone or in combination in 700 μL of MucilAir® culture medium were applied through basolateral poles. All treatments were initiated on day 0 (1h after viral infection) and continued by replacing the basal medium once daily at 24 and 48 hpi (2 and 3 treatments in total for samples collected at 48 and 72 hpi, respectively). Variations in transepithelial electrical resistance ( $\Delta$  TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as Ohm.cm<sup>2</sup>.

#### **NanoString gene expression analysis**

After on-column mRNA extraction, gene expression levels were evaluated using two customized NanoString nCounter Gene Expression Panels: “immune response” (96 genes) and “type III IFNs” (12 genes). Data processing and normalization were performed with nSolver analysis software (version 4.0, NanoString technologies) and results are expressed in fold change induction compared to the mock condition. Heatmap and Principal Component Analysis (PCA) were produced using Genomics Suite 7 (Partek, St Louis, MO, USA).

#### **Transmission electron microscopy**

Infected nasal and bronchial HAE were fixed with 2% glutaraldehyde (EMS) in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) buffer at room temperature for 30 min. After washing three times in 0.2 M sodium cacodylate buffer, cell cultures were post-fixed with 2% osmium tetroxide (EMS) at room temperature for 1 h and dehydrated in a graded series of ethanol at room temperature and embedded in Epon. After polymerization, ultrathin sections (100 nm) were cut on a UCT (Leica) ultramicrotome and collected on 200 mesh grids. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before observations on a Jeol 1400JEM (Tokyo, Japan) transmission electron microscope, equipped with an Orius 600 camera and Digital Micrograph Software (Gatan).

#### **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

No statistical methods were used to predetermine sample size. All experimental assays were performed in triplicate at a minimum, except for NanoString analyses that were performed in duplicate. Statistical details of experiments can be found in the figure legends. The testing level ( $\alpha$ ) was 0.05. Statistical analyses were performed on all available data using GraphPad Prism 8.



## 4.2. Présentation de l'article

Après avoir isolé le virus SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0571/2020) par l'inoculation de cellules Vero-E6, en parallèle d'HAE, à partir des prélèvements nasopharyngés des premiers patients hospitalisés en France (Département des infections et maladies tropicales, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris), nous avons étudié ses capacités répliquatives dans ces deux supports *in vitro*.

Dans les cellules Vero E6, nous avons suivi des cinétiques d'infections sur 96 heures par deux approches complémentaires : la titration des particules infectieuses en TCID<sub>50</sub>/mL et la quantification génomique par RTqPCR basée sur des amorces spécifiques d'ORF1-nsp14. Nous avons ainsi établi une corrélation mathématique fiable pour évaluer la production virale par quantification du génome sans posséder de gamme. Les effets cytopathiques ont été notés dès 48 hpi et le pic de réplication virale a été atteint entre 48 et 72 hpi, dépendamment de la nature du support utilisé.

Pour nous rapprocher des conditions physiologiques, nous avons infecté en parallèle des HAE issus de cellules primaires d'origine nasale ou bronchique afin de comparer la réplication virale dans les différents compartiments du tractus respiratoire. L'infection des HAE a été confirmée en microscopie électronique à transmission. Dès 48 hpi, des modifications de l'ultrastructure des tissus ont été observées aux deux pôles et une accumulation de matériel viral a été constatée en particulier dans les cellules ciliées et à mucus. En effet, la production virale augmente drastiquement jusqu'à atteindre 7 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL entre 72 et 96 hpi, corrélée avec un effondrement de la résistance transépithéliale dès 48 hpi traduisant une rupture d'intégrité de l'épithélium, confirmée par la détection de particules virales au pôle basal. L'amélioration de la résistance à partir de 72 hpi évoque un début de rétablissement dans les tissus bronchiques uniquement.

En lien avec les rapports cliniques décrivant un haut niveau plasmatique de cytokines, en particulier pro-inflammatoires, dans les étapes précoces d'infection chez des patients évoluant sur des formes sévères de COVID-19, nous avons ensuite étudié l'impact de l'infection sur le déclenchement de la réponse immunitaire innée dans nos modèles d'HAE. Nous avons utilisé la technologie *Nanostring* pour étudier l'expression de deux panels de gènes : (i) 96 gènes de l'immunité (facteurs de transcription, cytokines pro-inflammatoires et médiateurs) (ii) 12 gènes spécifiques à la voie des interférons de type III (IFN et ISG) et ainsi établir une signature transcriptomique de l'immunité innée dans les tissus épithéliaux au cours des 96 premières heures de l'infection. Nos résultats indiquent des profils similaires entre les deux types de tissus dans les 24 premières heures d'infection. Les différents gènes codant pour les interférons de types I et III ainsi que les ISG ne sont pas différentiellement exprimés, indiquant une réponse immunitaire encore non établie à ce temps post infection. Une évolution radicale est observée dès 48 hpi. En effet, l'analyse des composantes principales (ACP), permettant une représentation visuelle des principaux gènes différentiellement exprimés, indique une variance de 63 % au cours de la cinétique d'infection avec une claire discrimination du point 24 hpi par rapport aux autres points de cinétiques. Environ 14 % des gènes *up* régulés à 24 hpi sont *down* régulés par la suite. Une variance de 12 % permet également de discriminer les signatures des 2 types tissulaires.

A partir de 48 hpi, la réponse immunitaire est dirigée par une forte expression des gènes codants pour les interférons de type I (IFNB) et de type III (IFNL1, IFNL2-3-4) associée à une expression des ISG tels que MX1 ou ZPB1. Cette réponse est particulièrement marquée dans les tissus d'origine nasale et persistante à 72 et 96 hpi alors qu'une réponse aiguë mais non durable est observée dans les cellules bronchiques. Également, les cytokines IP-10 ou MIP2A impliquées dans le recrutement des effecteurs de l'immunité innée comme les macrophages ainsi que le facteur de transcription NFκB sont

fortement surexprimés dans les cellules nasales mais restent inchangés dans les cellules bronchiques.

Enfin, certains médiateurs majeurs de l'inflammation comme IL1A, IL1B ou TNF alpha sont majoritairement surexprimés à partir de 72 hpi dans les deux types cellulaires avec une intensité plus forte dans les cellules nasales. Ainsi, ces résultats traduisent l'activation plus précoce de l'immunité innée dans le tractus respiratoire supérieur.

Enfin, face à l'urgence de valider une thérapeutique efficace, nous avons évalué les capacités antivirales du remdesivir, qui présentait les meilleures perspectives à cette date, et appliqué notre stratégie de combinaison avec un médicament ciblant la cellule-hôte, le diltiazem. En modèle cellulaire, le remdesivir a démontré une activité antivirale significative avec des IC50 en VeroE6 de 0.98 ( $\pm$  0.07)  $\mu$ M à 48 hpi et 0.72 ( $\pm$  0.03)  $\mu$ M 72 hpi, permettant des index de sélectivité de 281 et 347 respectivement. L'association de 11.25  $\mu$ M de diltiazem a potentialisé l'effet du traitement, divisant l'IC50 du remdesivir par 3 à 48 hpi et par 2 à 72 hpi.

En modèles d'HAE, les 3 concentrations testées de remdesivir (1.25 – 5 – 20  $\mu$ M) ont permis une réduction importante de la réplication virale intracellulaire, respectivement de 3.5, 3.1 et 7.3 log<sub>10</sub> à 48 hpi et 6.9, 8 et 2.4 log<sub>10</sub> à 72 hpi dans les HAE d'origine nasale ; et de 7, 5.8 et 7.9 log<sub>10</sub> à 48 hpi et 7, 8.3 et 2 log<sub>10</sub> à 72 hpi dans les HAE bronchiques. Le traitement de référence avec 90  $\mu$ M de diltiazem a permis une réduction modérée de la réplication virale de 40 et 69 % dans les cellules nasales et 80 et 24 % dans les cellules bronchiques à 48 et 72 hpi respectivement. L'association du diltiazem a permis d'améliorer l'effet thérapeutique du remdesivir dans les épithéliums d'origine nasale, avec un gain de 1.45 (5  $\mu$ M) et 1.3 log<sub>10</sub> (20  $\mu$ M) à 48hpi. De plus, nous avons observé un bénéfice sur l'intégrité des épithéliums à 72 hpi, évalué par les mesures de TEER, en particulier sur les épithéliums bronchiques.

### 4.3. Discussion et perspectives

Mobilisée depuis janvier 2020 contre le virus SARS-CoV-2, notre équipe de recherche du Laboratoire VirPath a su mettre à profit ses compétences et son savoir-faire sur les virus respiratoires pour enrichir rapidement les connaissances sur ce virus émergent. Grâce à nos modèles d'études précliniques, nous avons mis en évidence la réplication rapide du SARS-CoV-2 dans les voies respiratoires supérieures et inférieures. L'abondance de récepteurs ACE2 dans le tractus respiratoire, protéine d'ancrage pour la protéine S du virus, permet en effet l'infection de tous les compartiments respiratoires, y compris des Pneumocytes alvéolaires<sup>90,134</sup>.

Dès 48hpi, la physiopathologie induite montre un tropisme majeur pour les cellules cillées, avec une accumulation des structures répliquatives à proximité de la membrane plasmique. En effet, l'étude de Robinot et al., basée sur une caractérisation similaire à la nôtre en épithéliums bronchiques, a récemment confirmé ces éléments en démontrant que la réplication virale dans les cellules ciliées entraîne une destruction rapide des cils et une désorientation des corps basaux restants, induisant ainsi une baisse importante de la motilité des cils<sup>391</sup>. Pour expliquer ce phénomène, l'étude met en évidence la régulation négative du gène FOXJ1, régulateur majeur de la genèse des cils. L'atteinte des cils joue un rôle important dans la pathogénèse, entraînant une moindre élimination des virions et un accès facilité à l'arbre respiratoire. Ces dommages peuvent en partie expliquer l'évolution pulmonaire de la maladie. Par ailleurs, une atteinte de l'intégrité des épithéliums est démontrée par la destruction des jonctions serrées. Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans un modèle de hamster et correspondent aux descriptions cliniques. *In vitro*, le pic du déclin est observé au quatrième jour mais,

comme nous avons pu l'observer, l'épithélium bronchique semble entamer un processus de reconstruction les jours suivants. Contrairement à d'autres virus respiratoires, tel qu'influenza, le SARS-CoV-2 paraît ainsi avoir des capacités lytiques modérées, se limitant à l'atteinte des couches supérieures de l'épithélium. Nos observations ont également mis en évidence l'infection des cellules productrices de mucus. La libération de sacs remplis de virions dans le mucus peut ainsi faciliter la migration de l'infection à d'autres parties du tractus respiratoire. Par ailleurs, la destruction de ces cellules peut engendrer un déficit en surfactant pulmonaire et la formation de membranes hyalines limitant les échanges gazeux, observées en clinique chez les patients souffrant d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë<sup>391</sup>.

Notre analyse de la signature de l'infection sur le déclenchement de l'immunité innée a mis en évidence son activation différée, à partir du 2<sup>ème</sup> jour suivant l'infection. L'étude de Bordallo et al. fait également ce constat, décrivant la capacité du SARS-CoV-2 à contourner l'activation du système interféron dans les premières heures d'infection et ainsi atteindre un haut niveau de réplication avant le déclenchement des mécanismes de défense<sup>134</sup>. La réplication rapide du virus dans les cellules nasales constitue un facteur facilitant la contagion et la propagation de l'infection vers le tractus respiratoire inférieur. Ainsi, les symptômes peuvent rapidement évoluer vers une forme sévère de la maladie, en particulier chez les sujets présentant des dysfonctionnements immunitaires.

Nous avons observé l'activation durable des interférons de type III dans les épithéliums d'origine nasale à partir du 2<sup>ème</sup> jour suivant l'infection, déclenchant la production des ISG antiviraux 24h plus tard ainsi que l'expression des gènes impliqués dans le recrutement des monocytes et des macrophages. Ces résultats traduisent la capacité du tractus respiratoire supérieur, porte d'entrée de l'infection, à activer le système de défense de l'hôte et ainsi limiter la propagation de l'infection. Les tissus bronchiques, en revanche, ont présenté une réponse moins efficace à des temps précoces, majoritairement inflammatoire à partir du troisième jour suivant l'infection. Le recul accumulé en clinique a permis de comprendre qu'une réponse interféron moins efficace peut conduire à une réponse inflammatoire démesurée pouvant être à l'origine de la « tempête cytokinique » et conduire à une accumulation pulmonaire excessive de macrophages et de cellules T<sup>134,391</sup>. Ces cellules constituent les infiltrats inflammatoires observés dans les espaces alvéolaires des patients, endommageant la fonction pulmonaire et pouvant contribuer à la détérioration des patients sévères, chez qui on retrouve notamment un niveau élevé de neutrophiles<sup>115</sup>. De fait, les voies respiratoires basses semblent naturellement moins préparées à combattre le virus et si l'infection pulmonaire parvient à un haut niveau de réplication, le phénomène inflammatoire peut s'aggraver, amplifié par une monopolisation anormale du récepteur ACE2, pouvant également provoquer la vasoconstriction et la fibrose pulmonaire<sup>100</sup>.

La concordance de nos résultats avec les observations cliniques nous conforte sur la relevance de nos modèles d'HAE pour la caractérisation précoce des virus émergents et constitue une ouverture sur l'identification de biomarqueurs précoces pouvant prédire une évolution vers des formes sévères de COVID-19. Des méta-analyses réalisées sur les prélèvements sanguins de patients ont mis en évidence plusieurs facteurs de dégradation, parmi lesquels (i) des facteurs de coagulation : D-Dimère, facteur VIII et produit de dégradation de la fibrine, (ii) des marqueurs cardiaques : troponine et peptide natriurétique cérébral (PNC), (iii) la dérégulation des leucocytes : une faible activation des lymphocytes (cellules T, B et NK) associée à une surreprésentation des polynucléaires basophiles et neutrophiles, et majoritairement (iv) des marqueurs d'inflammation<sup>710</sup>. La protéine C réactive doit alerter sur une flambée de l'infection, tandis que plusieurs cytokines apparaissent comme des facteurs de complications. L'IL-6 est la plus fréquemment documentée, mais une détection précoce de CCL5 et d'IL1-RA sont également décrites<sup>711</sup>. L'étude de Yang et al. préconise la surveillance combinée des

niveaux plasmatiques persistants d'IP-10 et de MCP-3 et celle Bordallo propose CXCL10 comme piste de marqueur pour prédire la détresse respiratoire<sup>134,712</sup>.

Cependant, considérant le rôle majeur des leucocytes dans l'immunité pulmonaire, nous sommes conscients que l'absence de ces cellules dans nos modèles précliniques constitue la limite de notre étude. Pour pallier cette problématique majeure, nous travaillons actuellement au développement d'un modèle de co-culture épithélium-macrophages qui nous permettra de mieux caractériser les interactions entre ces deux types cellulaires et ainsi de mieux appréhender le rôle des macrophages résidents à la fois comme effecteurs de la réponse immunitaire innée mais aussi dans l'hyper-inflammation induite par l'infection avec le virus SARS-CoV-2<sup>713</sup>.

Nos modèles HAE sont également pertinents pour évaluer l'efficacité de traitements candidats. Ils constituent un support plus physiologique par rapport aux cellules monocouches et sont donc plus prédictifs, limitant ainsi les échecs cliniques. Dans les premiers mois de 2020, nous ne disposons en effet que de quelques perspectives thérapeutiques, validées uniquement en modèles précliniques<sup>707,714-716</sup>. Les résultats obtenus illustrant la forte activité antivirale du remdesivir dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur ont permis de conforter les perspectives cliniques de ce composé. De plus, la combinaison avec le diltiazem a permis une réduction supplémentaire de la charge virale et une meilleure protection de l'intégrité des tissus.

En parallèle des évaluations en HAE, nous avons mené une étude détaillée du potentiel synergique de la combinaison diltiazem-remdesivir, publiée dans *Antiviral Research* en juillet 2020 "***In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2***", présentée en Annexe. Nous avons ainsi validé la combinaison du diltiazem avec un large panel de concentrations de remdesivir, permettant une possible réduction de la dose plasmatique efficace en clinique et ainsi des effets secondaires induits par ce médicament.

Néanmoins, les études cliniques de phase III évaluant l'efficacité du remdesivir contre le SARS-CoV-2 n'ont pas permis de démontrer un bénéfice significatif sur le temps d'amélioration clinique ou la mortalité chez les patients sévères<sup>586,708,717</sup>. Ce résultat s'explique en premier lieu par les objectifs compassionnels des essais cliniques dans lesquels le remdesivir a été initialement inclus, tel que *Solidarity*<sup>582</sup>. Le traitement a été administré chez des patients graves avec des formes sévères de COVID-19, en moyenne 12 jours après le début des symptômes<sup>588</sup>. Or, l'état des connaissances actuel sur le déroulement de la maladie en deux phases (virale puis inflammatoire) nous permet de comprendre que l'administration du médicament, actif dans les phases précoces d'infection, était trop tardive.

Par ailleurs, son mode d'administration par voie intraveineuse nécessite un contrôle médical et n'est pas compatible avec une utilisation par le grand public dès la survenue des symptômes, qui aurait probablement un meilleur impact sur l'évolution clinique. En effet, la susceptibilité enzymatique importante du remdesivir lors du premier passage hépatique, conduit à sa faible biodisponibilité orale<sup>718</sup>. Par voie intraveineuse, le remdesivir est une prodrogue rapidement métabolisée dans le plasma avec une demi-vie très courte, qui n'excède pas une heure chez l'Homme<sup>586,588</sup>. Le principe actif, métabolisé en intra-cellulaire, possède une demi-vie allongée (environ 40h) susceptible de provoquer une accumulation plasmatique qui engendre des effets délétères, majoritairement par l'augmentation des transaminases. Des effets secondaires ont ainsi été observés chez 60 % des patients. Enfin, l'article de Yan relève une mauvaise extrapolation des doses efficaces et toxiques entre les modèles *in vitro* et *in vivo* impactant également le manque de significativité des résultats cliniques<sup>586</sup>.

Finalement, le remdesivir (Veklury®) a été approuvé par la FDA en octobre 2020<sup>589</sup>, sur la base des résultats de trois essais cliniques menés sur des patients hospitalisés souffrant de COVID-19 moyennes à sévères. Toutefois, les données ne sont que peu significatives et l’OMS a exprimé un avis contre son utilisation dans la prise en charge de la COVID-19<sup>311</sup>. Ainsi, nous ne sommes pas allés plus loin dans le développement de l’association diltiazem-remdesivir.

Malgré cela, les résultats encourageants obtenus avec le diltiazem ont conforté la poursuite de nos expérimentations. Son mode d’action basé sur la stimulation de la voie interférons constitue un atout majeur pour induire une réponse immune plus précoce dans les voies respiratoires hautes et pourrait limiter la propagation de l’infection au tractus respiratoire inférieur. Nous avons ainsi validé l’efficacité antivirale du diltiazem contre les variants de SARS-CoV-2 classés comme préoccupants entre 2020 et 2021, d’abord *in vitro* sur des cellules alvéolaires A549 exprimant le récepteur ACE2 puis en HAE d’origine nasale. Sur la même base que précédemment, nous avons démontré l’intérêt de combiner le diltiazem avec le molnupiravir, un analogue ribonucleosidique, récemment autorisé par la FDA<sup>309,601</sup>. Ces résultats font l’objet du **Manuscrit 4 : “Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses”**, présenté ci-après.

## 5. Le mode d'action pan-antiviral du diltiazem par la stimulation de l'expression des interférons lambda dans l'épithélium respiratoire permet de potentialiser l'efficacité des antiviraux ciblant des déterminants viraux

Nos précédentes études ont permis de mettre en évidence les capacités antivirales du diltiazem contre les virus influenza A (H1N1) et SARS-CoV-2 (B) en monothérapie, ainsi que le potentiel synergique de l'association de cette molécule ciblant la cellule-hôte avec des antiviraux classiques, dirigés contre les déterminants viraux, comme l'oseltamivir ou le remdesivir, dans divers modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*<sup>116,709,719</sup>. Avec l'hypothèse d'un mécanisme d'action basé sur l'activation de la voie des IFN de type III, nous avons caractérisé la modulation des effecteurs de l'immunité innée *in vitro* dans nos modèles d'HAE après traitement avec du diltiazem. Nous avons mis en évidence l'activation de facteurs de transcription et des gènes IFNL conduisant à l'induction des ISG antiviraux, comme Mx1 et OAS1 particulièrement impliqués dans la défense contre influenza et la protection contre le SARS-CoV-2<sup>460,465</sup>.

Sur la base de ces résultats, nous avons démontré le potentiel antiviral à large spectre du diltiazem, d'abord contre influenza A/PA I38T (H1N1), responsable d'une augmentation de 50 fois l'IC50 du baloxavir<sup>720</sup>, puis contre cinq variants du SARS-CoV-2 classés comme préoccupants (B.1.160, B.1.1.7, B.1.351, P.1 et B.1.617.2) en modèles cellulaires et HAE.

Enfin, nous avons appliqué notre stratégie de combinaisons « *double target* » pour potentialiser l'effet :

- (i) du baloxavir, l'inhibiteur de polymérase dernièrement mis sur le marché contre influenza
- (ii) du molnupiravir, un analogue ribonucléosidique récemment approuvé par la FDA<sup>309,601,602</sup>

Ces résultats constituent une part significative de mes travaux de thèse et sont présentés ci-après dans le **Manuscrit 4 : "Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses"**. Il sera prochainement soumis pour publication dans un journal international à comité de lecture.

## 5.1. Manuscrit 4: “Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses”

Research Article: confidential

### Host-directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of classic antivirals against respiratory viruses

**Authors:** Blandine Padey<sup>1,2</sup>, Victoria Dulière<sup>1,3</sup>, Julien Fouret<sup>2</sup>, Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,2</sup>, Cédrine Milesi<sup>1,3</sup>,  
Emilie Laurent<sup>1,3</sup>, Pauline Brun<sup>1,3</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Thomas Julien<sup>1,3</sup>, Bruno Lina<sup>1,4</sup>, Olivier Terrier<sup>1</sup>, Manuel  
5 Rosa-Calatrava<sup>1,3\*\*</sup>, Andrés Pizzorno<sup>1\*\*</sup>.

#### Affiliations :

<sup>1</sup>CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie (INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université  
Claude Bernard Lyon 1) - Team VirPath, Lyon, France.

<sup>2</sup>Signia Therapeutics SAS, Lyon, France.

10 <sup>3</sup>VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France.

<sup>4</sup>Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza Sud, Institut des Agents Infectieux,  
Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

\*Correspondence to: [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr) (MRC) and [mario-andres.pizzorno@univ-lyon1.fr](mailto:mario-andres.pizzorno@univ-lyon1.fr) (AP).

15 †These authors contributed equally.

**Keywords:** diltiazem, host-directed antivirals, drug combination, respiratory viruses, interferon, antiviral resistance

**Abstract**

Viral respiratory infections remain a major and recurrent public health threat. Among them, influenza viruses are responsible for approximately 500,000 deaths worldwide and a high economic burden. The recurrent threat of emerging zoonotic or pandemic viruses worsens this scenario, being SARS-CoV-2 and the millions of COVID-19 deaths the most recent example. The rapid evolution of circulating influenza and SARS-CoV-2 viruses allows the emergence and dissemination of variant strains carrying mutations resulting in suboptimal vaccine protection and/or reduced efficacy of our limited therapeutic arsenal. In this context, host-targeted approaches constitute a promising antiviral strategy aiming to achieve broad-spectrum activity and mitigate the emergence of viral resistance against classic virus-directed antivirals. Here, we demonstrated that diltiazem, a calcium channel blocker currently used to treat hypertension, induces an ISG expression profile characteristic of an antiviral state mainly driven by IFN- $\lambda$ . We then evaluated the potential of the diltiazem-baloxavir combination against influenza A wild-type and the PA I38T resistant strain in cell culture and human airway epithelia (HAE). We analogously evaluated the diltiazem-molnupiravir combination against SARS-CoV-2, including the main variants of concern. Our results demonstrate the broad-spectrum antiviral activity of diltiazem against influenza A viruses, including resistant strains, as well as the capacity to potentiate the antiviral effect of baloxavir. The diltiazem-molnupiravir combination also reduced viral production and protected the integrity of HAE infected with SARS-CoV-2. This study highlights the enhanced antiviral effect of combining virus-directed and host-directed agents as a promising strategy against circulating and emerging viruses.



## Introduction

Viral respiratory infections remain a major and recurrent public health threat. For example, seasonal flu caused by influenza viruses is responsible for up to 500,000 deaths worldwide with a high economic burden. Emerging viruses with epidemic or pandemic potential usually worsen this scenario, being SARS-CoV-2 the most recent example that almost paralysed the entire world over months and caused more than 6 million deaths.

Aside from vaccines, antiviral drugs are the other major intervention for the management of respiratory viral infections. Neuraminidase inhibitors (NAIs) are the only antivirals recommended worldwide for the treatment of influenza infections in high-risk populations. However, during the last decades, their use has resulted in the emergence of several viral strains harbouring specific NA mutations (H275Y, E119G) that confer reduced susceptibility to these drugs, hence threatening their utility<sup>1-3</sup>.

Baloxavir marboxil is a cap-dependent endonuclease inhibitor and constitutes the first anti-influenza agent approved by the FDA since NAI, more than 20 years earlier. Although baloxavir is still not widely used, the first reports on virus-resistant strains harbouring specific mutations in the PA protein (mainly I38T) did not take much time to occur<sup>4-7</sup>. In the case of SARS-CoV-2, the first antiviral drugs were approved in 2021. Among them, the oral ribonucleoside analogue molnupiravir received an emergency use authorization last December for the treatment of mild-to-moderate COVID-19 in adults at high risk for progression to severe disease for whom no alternative option was available<sup>8,9</sup>. Contrary to recent reports on polymerase inhibitor remdesivir<sup>10,11</sup> and Mpro inhibitor nirmatrelvir<sup>12,13</sup>, no specific molnupiravir-resistance mutations have been reported yet. However, the possibility remains realistic notably in the context of high virus circulation and the recurrent emergence of variants of concern (VOCs).

One approach to mitigate the emergence of drug resistance and at the same time potentially enhance antiviral effects is drug combination<sup>14-16</sup>. Another emerging non-exclusive approach consists of targeting infected host cells and their responses instead of viral determinants<sup>17</sup>. The goal is to interfere with host-cell factors/pathways required for viral replication and pathogenesis, but also to modulate suboptimal or excessive immune responses. Targeting the host should also minimize the impact of viral mutability on drug resistance and/or escape variants, and concomitantly favour broad-spectrum efficacy by the inhibition of cellular pathways commonly exploited by more than one pathogen. In that regard, we previously demonstrated that diltiazem, a calcium channel blocker currently used in the treatment

of hypertension, also had antiviral activity, and could further enhance the effect of virus-directed drugs in combination<sup>18-20</sup>.

In this study, we sought to further characterise the mechanisms underlying the alternative mode of action of diltiazem responsible for its antiviral activity. We then performed software-assisted combination scenarios in both cell lines and reconstituted human airway epithelia (HAE) to explore the interest and therapeutic potential of combining diltiazem with polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir for the treatment of wild-type and PA I38T influenza or SARS-CoV-2, including variants of concern B (Wuhan-like), B.1.160 (Europe), B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), and B.1.617.2 (Delta).

## Methods

### Cells and viruses

Human lung epithelial A549 (ATCC, CCL-185) and A549-ACE2+ stable cell lines (Creative Biogene Biotechnology, CSC-RO0642) were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Lonza). African green monkey kidney epithelial cell line VeroE6 (ATCC, CRL-1586) was maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM with 4.5 g/L glucose (Lonza) supplemented with 5% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line (ATCC, CCL-34) was maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in serum-free UltraMDCK™ Medium (Lonza) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. MucilAir® human airway epithelia (HAE), reconstituted *in vitro* with cells isolated from two pools of 14 donors, were obtained from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> with specific MucilAir® Culture Medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

Influenza viruses A/Lyon/969/2009 (H1N1) and A/Texas/50/2012 (H3N2) were produced in MDCK cells in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 1 µg/mL trypsin. Influenza A/Lyon/969/2009 carrying the PA I38T mutation (H1N1 PA I38T) was rescued by reverse genetics in 293T cells and then produced in MDCK cells.

**Research Article: confidential**

SARS-CoV-2 strain BetaCoV/France/IDF0571/2020 was isolated by directly inoculating VeroE6 cell monolayers with a nasal swab sample provided by the department of tropical disease of Bichat Claude Bernard Hospital, (Paris, France). The clinical samples from which strains hCoV-19/Europe/France/ARA-CHUST-GIMAP-5/2020 and hCoV-19/Europe/France/ARA-CHUST-GIMAP-10/2020 were isolated have been kindly provided by Pr. 95 S. Paul and his team (GIMAP, CIRI/ CHU Saint-Etienne). The clinical sample from which strain hCoV-19/French Guiana/IPP03772i/2021 was isolated has been provided by Dr. D. Rousset (Institut Pasteur, Cayenne, Guyana). The clinical sample from which strain hCoV-19/France/PDL-IPP01065i/2021 was isolated has been provided by Dr. J. Besson (Bioliance Laboratory, Saint-Herblain France). GISAID accession numbers are as follows: EPI\_ISL\_411218, EPI\_ISL\_1785075, EPI\_ISL\_1785073, EPI\_ISL\_1138745, EPI\_ISL\_1096262, EPI\_ISL\_7360393. SARS-Cov-2 100 stocks were then produced in Vero E6 cells, as we described before<sup>20</sup>.

All experiments involving infectious influenza or SARS-CoV-2 viruses were performed in biosafety level 2 (BSL-2) and 3 (BSL-3) facilities, respectively, using appropriate validated protocols.

**Gene expression differential analysis of diltiazem treatment signature in HAE**

105 Diltiazem (D2521, Sigma Aldrich) was prepared at 90  $\mu$ M in MucilAir® Medium for basolateral HAE administration. Treatment was performed in three doses 24 h-apart. Apical and basolateral sampling were performed at 24, 48 and 72 h post-treatment (hpt) initiation (t=0 h). Cells were collected in RLT lysis buffer (Qiagen) at 72 hpt and total RNA was then extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) with a DNase treatment step. 500  $\mu$ g of total RNA was used to prepare polyA-enriched RNA-seq libraries using the KAPA mRNA Hyper Prep Kit (Roche, ref. 110 KK8581/KK8581). Paired end sequencing (2x50 bp) was performed with Illumina NovaSeq 6000. Adapters and low-quality ends (phred quality score below 30) were trimmed from raw reads and cleaned with Cutadapt 2.8<sup>21</sup>. Only reads longer than 75 bp and with less than 20% of N (undetermined base) after trimming were kept for further analysis. The Kallisto 0.46.1 software with default options was used for reference-indexing and transcript abundance estimation<sup>22</sup>. The host transcriptome based on NCBI RefSeq annotation release 109.20191205 and genome assembly build 115 GRCh37.p13 were used<sup>23,24</sup>.

Differential expression analysis was performed with R 3.6.3. First, abundances at transcript-level were imported using tximport 1.14<sup>25</sup>. Only coding mRNA transcripts were considered. Gene-level effective lengths were

obtained by weighted mean with their expression values in FPKM (Fragment Per Kilobase Million) weights. Raw counts were also computed at gene-level by sum and used as input for DESeq2 1.26.0<sup>26</sup>. Normalization within DESeq2 used first gene-level effective length, and then the size factor was estimated using the function ‘estimateSizeFactors.’ Differential expression testing was performed using default parameters. P-values were adjusted using the Benjamini–Hochberg method<sup>27</sup> after the independent filtering was implemented by default in DESeq2. A gene was considered differentially expressed if both its adjusted p-value was below 0.01 and its induced change in expression was at least a 2-fold increase (for upregulated genes) or a 2-fold decrease (for down-regulated genes) compared to the control condition.

The NCBI gene IDs were mapped to Uniprot IDs using Uniprot cross-references (<https://www.uniprot.org/database/DB-0118>)<sup>23,28</sup>. Based on mapped Uniprot IDs, gene set enrichment was performed using the parent-child union method as previously described<sup>29</sup>. In this method each functional term, called child, was considered relatively to its parents to compute the probability of enrichment (p-value). We considered 3 functional databases with parent-child relations: Reactome, Uniprot Keyword (restricted to “Biological process” and “Disease”), and Gene ontology (Restricted to “Biological process”). Different files (available online: URLs were all accessed the 04/02/2020) were parsed to define Uniprot ID associations with terms and identify a child to parent relations within each functional database; URLs are specified in Table S1. A minimum adjusted p-value of 0.05 was set for a significant enrichment. Terms clustering was done using a binary distance between terms based on gene occurrences in each term (0 if absent, 1 if present) and the ward algorithms (method=“ward.D2” of hclust function within R stats package)<sup>30</sup>.

#### IC50 determination and combination assays in cellular models

Cells were seeded 24 h in advance ( $2 \times 10^5$  cells/well in multi-well 12 plates for A549;  $3 \times 10^5$  cells/well in multi-well 6 plates for A549-ACE2). Influenza (H1N1wt, H3N2 and H1N1 I38T) and SARS-CoV-2 (B, B.1.160, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2) infections were made at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza), supplemented with 0.5 µg/mL trypsin for influenza assays. 1 hour post infection then treated with single drugs (diltiazem, baloxavir acid (HY-109025A, MedChemTronica) or molnupiravir (HY-125033, MedChemTronica) or crossed combination therapy, in media supplemented with 1% FBS final for SARS-CoV-2 assays. Viral supernatants

145 were collected 48 and 72 hpi and quantified in TCID<sub>50</sub>/mL in MDCK (influenza) or Vero E6 (SARS-CoV-2) cells.  
Combination plots were generated by Combenefit software computational analysis.

#### Single drug and combination evaluations in infected HAE MucilAir®

150 Apical poles of HAE were gently washed twice with warm OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) and then infected with a 150 µL suspension of the influenza or SARS-CoV-2 viruses in OptiMEM, at MOI 0.1 (H1N1wt; H1N1 I38T) or 0.01 (SARS-CoV-2). Drugs for basolateral administration were prepared to specific adapted concentrations in MucilAir Medium. Treatment was performed by three daily doses (at 5, 24 and 48 hpi (influenza) or 1, 24 and 48hpi (SARS-CoV-2)). Control HAE were mock-treated in the same conditions with medium without molecules. Apical washes sampling was performed 24 (influenza only), 48 and 72 hpi and then viral  
155 production was quantified in TCID<sub>50</sub>/mL viral titration (influenza) or genome quantification method (SARS-CoV-2). Variations in trans-epithelial electrical resistance ( $\Delta$ TEER) were measured using a volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as Ohm/cm<sup>2</sup>.

#### Viral quantification

160 Viral stocks and collected samples were titrated by classic tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/ml) in MDCK (influenza) or Vero E6 cells (SARS-CoV-2), using the Reed & Muench statistical method.

In parallel, quantification of SARS-CoV-2 viral genome was performed by one-step real-time quantitative reverse transcriptase and polymerase chain reaction (RT-qPCR) from viral or total RNA extracted using QiAmp viral RNA or RNeasy Mini Kit (Qiagen) in the case of supernatants/apical washings or cell lysates, respectively. RT-qPCR  
165 were performed using the EXPRESS One-Step Superscript™ qRT-PCR Kit (Invitrogen, reference 1178101K), with QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in MicroAmp™ Fast Optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems, reference 4346907), as described before. Primers and probe set specific to the nonstructural protein 14 (ORF1b-nsp14) gene of SARS-CoV-2 (forward primer HKU-ORF1b-nsp14F: 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3'; reverse primer HKU-ORF1b-nsp14R: 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-  
170 3'; probe HKU-ORF1b-nsp14IP: 5'-FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-TAMRA-3') were selected from

those designed by the School of Public Health/University of Hong Kong and synthesized by Eurogentec. Numbers of copies were calculated by mathematical extrapolation based on genomic amplification method, as we validated before.

#### Enzyme-linked immunosorbent assay

175 IL-29 quantification in HAE apical and basolateral samples was performed using Human IL-29 (IFN- $\lambda$ 1) enzyme-linked immunosorbent assay ELISA BASIC kit (HRP) (#3570-1H-6, Mabtech, Stockholm, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

#### 180 Results

##### **Diltiazem treatment induces an ISG expression profile characteristic of an antiviral state in reconstituted human airway epithelia (HAE)**

Our previous study on the repurposing of potential antiviral candidates based on their chemogenomic signatures showed an association between diltiazem treatment and the induction of IFN responses. To further explore this alternative mode of action, we characterized by RNASeq the transcriptional modulation induced by a 3-dose diltiazem treatment in nasal HAE grown in the air-liquid interphase. **Figure 1A** shows a first level of analysis with the most significantly enriched biological processes (BP) in metagroups, notably highlighting “antiviral defense”, “immune system”, “cytokine-mediated signaling pathway”, and “interferon signaling” among the most significantly up-regulated. Focused analysis on a panel of genes implicated in IFN signalling (**Figure 1B**) revealed that diltiazem treatment significantly up-regulated IFNL1, 2 and 3 ( $\log_2(\text{FC}) \sim 9$ ) but also key antiviral ISG such as RSAD2 (Viperin), ISG15, OAS1, MX1, BST2 (Tetherin), IFITM1, and IFITM3 ( $\log_2(\text{FC})$  between 2 and 5). These results are in line with our previous observations using the Nanostring hybridization technology<sup>20</sup>. Interestingly, we also observed a significant up-regulation of the IFN regulatory transcription factor IRF7 ( $\log_2(\text{FC})=2.5$ ) due to diltiazem treatment. Finally, we used an ELISA assay to assess whether the observed up-regulation of the IFNL genes efficiently translated into the secretion of IL-29 (**Figure 1C**). Our results confirm the functional induction of IL-29 by diltiazem on both the apical (733 pg/mL) and basolateral sides (149 pg/mL) of HAE, representing respectively 16.4- and 3.4-fold

increases compared to the mock-treated condition. Taken together, these results support the induction by diltiazem of a functional IFN- $\lambda$ -driven characteristic antiviral state in HAE.

200 **Host-directed diltiazem displays synergistic antiviral activity in combination with viral polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir *in vitro***

The novel IFN- $\lambda$ -driven inhibitory effect of diltiazem supports its potential evaluation as broad-spectrum antiviral and its combination with more “classic” virus-directed drugs, as previously shown with oseltamivir<sup>18</sup>. We therefore investigated whether the combination of diltiazem with FDA-approved oral polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir showed antiviral synergy, defined as a superior to additive effect, against influenza and SARS-CoV-2 infection, respectively. We first treated influenza H1N1-infected A549 alveolar cells with serial dilutions of diltiazem (90 to 1.25  $\mu$ M) or baloxavir (2.5 to 0.125 nM) and antiviral activity was assessed 72 h post-infection (hpi) by TCID50 infectious viral titration (**Figure 2A**). Calculated 50% and 90% inhibitory concentration (IC50/90) were 4.39 and 24.3  $\mu$ M for diltiazem and 0.2 and 0.75 nM for baloxavir, respectively. IC50 values were used as a reference for subsequent testing of a matrix of 24 diltiazem-baloxavir combination pairs, and drug interaction maps based on the Loewe additivity model<sup>31</sup> were calculated using SynergyFinder software. As shown by both the dose-response matrix and the three-dimensional interaction map (**Figure 2B**), Loewe’s analysis revealed a synergistic inhibitory effect of the combination, with overall synergy scores of 16 and peak values above 99. Best results were observed for diltiazem doses between 1.25 and 2.5  $\mu$ M combined with baloxavir doses of 0.125 nM or higher. Importantly, no antagonistic effects were detected for any of the drug combinations tested. Finally, to add further biological significance to our data, we evaluated the diltiazem-baloxavir combination in HAE throughout a 72h viral replication kinetics experiment. As shown in **Figure 2C**, infection with influenza H1N1 resulted in a peak of viral replication 48 hpi, with mean maximum apical titres of  $5(\pm 3)\times 10^8$  TCID50/mL. Post-infection basolateral treatment with 90  $\mu$ M diltiazem induced a 1.5 log<sub>10</sub> reduction in viral titres at 48 hpi ( $1.56 (\pm 1.8)\times 10^7$  TCID50/mL). Post-infection basolateral treatment with 10 nM baloxavir induced a 3.5 log<sub>10</sub> reduction in viral titres at 48 hpi ( $1.45 (\pm 1.8)\times 10^5$  TCID50/mL). The DMSO vehicle control solvent showed no effect on viral replication. In line with previous results, the diltiazem-baloxavir advantageously inhibited viral replication, as shown by mean maximum apical viral titres of  $2.3(\pm 1.7)\times 10^3$  TCID50/mL, hence implying a 5.3 and 1.8 log<sub>10</sub> reduction compared to the untreated or the baloxavir monotherapy conditions, respectively. The observed antiviral effect of both single and combined treatments was

225 further supported by the monitoring of epithelial barrier integrity through trans-epithelial electric resistance (TEER) measurements, which plummeted for the mock-treated controls but remained stable for the treated groups. Similar results were obtained for the diltiazem-baloxavir combination against an influenza H3N2 virus (**Figure S1**).

We followed an analogous approach to evaluate the antiviral effect of the diltiazem-molnupiravir combination against SARS-CoV-2. A549-ACE2 cells were infected with a Wuhan-like strain of SARS-CoV-2 and then treated with serial dilutions of diltiazem or molnupiravir to determine IC<sub>50</sub>/IC<sub>90</sub> values, resulting in 9.9/75.3  $\mu$ M for the former and 0.13/0.21  $\mu$ M for the latter (**Figure 3A**). We then performed Loewe additivity model<sup>31</sup> analysis on a matrix of 25 diltiazem-molnupiravir combination pairs and found a synergistic inhibitory effect of the combination, with overall synergy scores of 33 and peak values of 88 (**Figure 3B**). Best results were observed for diltiazem doses around 5  $\mu$ M combined with molnupiravir doses between 125 and 250 nM. Importantly, the synergistic effect of both drug combinations was also confirmed using the Bliss independence model<sup>32</sup> (**Figure S2**) and, once again, no zone of antagonistic effects was detected. In HAE (**Figure 3C**), mean SARS-CoV-2 peak viral titres at 48 hpi reached  $6.4(\pm 2.5)\times 10^9$  nsp14 copies/mL in the mock-treated group and plateaued until 72 hpi. Post-infection treatment with 90  $\mu$ M of diltiazem induced a 1 log<sub>10</sub> reduction in viral titres ( $5.2(\pm 1.8)\times 10^8$  nsp14 copies/mL) at 48 hpi but this antiviral effect was not sustained at 72 hpi. Treatment with 5  $\mu$ M molnupiravir resulted in an almost 2 log<sub>10</sub> reduction in viral production 48 hpi ( $8.13(\pm 4.3)\times 10^7$  nsp14 copies/mL) and >1 log<sub>10</sub> reduction at 72 hpi. However, the diltiazem-molnupiravir combination showed no advantage to molnupiravir monotherapy in terms of viral production at the doses tested, yet it better preserved the epithelial barrier integrity as shown by higher TEER values.

Taken together, our results highlight the antiviral activity of host-directed diltiazem against two major respiratory viruses in both cell lines and HAE cultures as well as its potential to enhance such inhibitory effect when combined with polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir.

#### **Diltiazem maintains its antiviral activity against baloxavir-resistant influenza H1N1 PA I38T variant and the diltiazem-baloxavir combination improves treatment efficacy *in vitro***

Baloxavir has proved highly effective in reducing viral titres in influenza-infected individuals. However, the very rapid emergence of baloxavir-resistant virus variants is a major threat to the utility and longevity of this drug<sup>5</sup>. As mentioned before, a two-strike drug combination approach, particularly using host-directed drugs, is a strategy of



choice to minimise the risk of emergence and potential deleterious effects of drug resistance. We therefore explored the antiviral effect of diltiazem in combination or not with baloxavir against an influenza H1N1 virus carrying the hallmark baloxavir resistance PA I38T mutation. We first determined the IC<sub>50</sub>/IC<sub>90</sub> for diltiazem and baloxavir in A549 cells infected with the PA I38T influenza variant and found that whereas the I38T mutation conferred 21-fold (4.17 nM) and 8-fold (6.25 nM) increases in baloxavir IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> values, respectively, susceptibility to diltiazem remained mostly unchanged, with values (2.45 and 21.1 µM, respectively) comparable to those obtained for the wild-type virus (**Figure 4A**). In HAE, treatment with 90 µM diltiazem reduced peak viral titres at 48 hpi by 1.3 log<sub>10</sub> (2.3(± 2.8)×10<sup>6</sup> vs 5.2(± 3.5)×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) compared to the mock-treated control (**Figure 4B**). Conversely, the I38T mutation completely abrogated the antiviral effect of treatment with 10 nM baloxavir, which also resulted in no added benefit of the diltiazem-baloxavir combination when compared to diltiazem monotherapy. As shown in **Figure 4C**, even a 10-fold increase in the baloxavir concentration to 100 nM was not sufficient to observe an antiviral effect in monotherapy. However, the combination of diltiazem with 100 nM baloxavir resulted in an almost 2 log<sub>10</sub> reduction in maximum apical viral titres at 48 hpi compared to the mock-treated control (9.6(± 1.5)×10<sup>5</sup> vs 6.5(± 2.7)×10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), representing an additional 0.7 log<sub>10</sub> reduction compared to diltiazem monotherapy (4.2(± 4.0)×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL). Most important, this antiviral effect of the diltiazem-baloxavir combination was sustained at least until 72 hpi, which was not the case of diltiazem monotherapy. Once again, the antiviral effects the different monotherapies or drug combinations observed by viral titration results were supported by TEER measurements.

Altogether, our results demonstrate that diltiazem maintains its antiviral activity against the influenza PA I38T variant and that dose optimisation of the diltiazem-baloxavir combination can improve the therapeutic effect against this baloxavir-resistant strain.

#### **The diltiazem-molnupiravir combination potentiates the antiviral activity of molnupiravir against SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs) *in vitro***

The case of SARS-CoV-2 is slightly different from that of influenza in the sense that, fortunately, no circulating viruses harbouring molnupiravir resistance mutations have yet been reported. However, the emergence and dissemination of different VOCs throughout 2020 and 2021 are of major concern for the efficacy of both vaccination and therapeutic approaches. We therefore evaluated the potential benefit of combining diltiazem and molnupiravir

280 against the different pre-omicron VOCs. A549-ACE2 cells were infected with five different VOCs (B.1.160, B.1.1.7, B.1.351, P.1, and B.1.617.2) and IC50/IC90 values were determined for diltiazem and molnupiravir (**Table 1 and Figure S3**). Although IC50/IC90 values were in some cases rather higher than those calculated for the Wuhan-like reference strain (~3-fold maximal increase), both drugs retained their antiviral activity against the five VOCs tested. In HAE, SARS-CoV-2 viral replication peaked around 48 hpi for all variants. Peak viral titres for B.1.160 (Europe), B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), and P.1 (Gamma) reached  $5.8(\pm 3.5)$ ,  $2.3(\pm 2.4)$ ,  $4.4(\pm 2.2)$ , and  $9.5(\pm 1.6)\times 10^9$  nsp14 copies/mL, respectively, being 0.5-1 log<sub>10</sub> lower than the  $4.4(\pm 2.7)\times 10^{10}$  nsp14 copies/mL of the B.1.617.2 (Delta) variant in mock-treated conditions (**Figure 5A**). While post-infection treatment with 90  $\mu$ M diltiazem resulted in a mean 1 log<sub>10</sub> reduction in viral genome copy numbers for the Europe, Beta and Gamma variants, its efficacy against Alpha and Delta was halved. As expected for a virus-directed drug, the antiviral activity of 5  $\mu$ M molnupiravir was more variable among VOCs. Whereas the activity against Alpha and Beta (1.3 and 1.8 log<sub>10</sub> reduction in copy numbers) was comparable to that against the Wuhan-like virus, higher efficacy of molnupiravir was observed against Europe and Gamma variants, with ~2.8 log<sub>10</sub> reductions in viral titres. As with diltiazem, reduced efficacy was observed for molnupiravir against the Delta variant, reaching peak values of  $5.2(\pm 5.3)\times 10^9$  nsp14 copies/mL, corresponding to a <1 log<sub>10</sub> viral reduction compared to the mock-treated control. Interestingly, the diltiazem-molnupiravir combination resulted in an additional 1 log<sub>10</sub> reduction in peak viral copy numbers compared to molnupiravir monotherapy against the Alpha, Beta and Delta variants, and a 0.5 log<sub>10</sub> reduction for the Europe variant. 295 No additional benefit of the diltiazem-molnupiravir combination was observed for the Gamma variant in the conditions tested.

To add robustness to our analysis, we finally evaluated the effect of diltiazem treatment combined or not with molnupiravir on the production of infectious viruses at 48 hpi. As shown in **Figure 5B**, diltiazem retains its overall 1 300 log<sub>10</sub> reduction on viral titres for most variants and its reduced potency against Alpha. However, the observed decrease in nsp14 copies/mL obtained for the Delta variant did not translate into a reduction of infectious viral titres. The apparent faster higher replication levels of the Delta variant might account for this reduced antiviral effect and probably underscores the need to adjust diltiazem dosage and/or the timing of treatment initiation. Treatment with 5  $\mu$ M molnupiravir induced an overall 2 log<sub>10</sub> reduction on infectious viral titres against Alpha, Beta and Gamma 305 VOCs. This antiviral effect was almost doubled (3.7 log<sub>10</sub> reduction) or halved (1 log<sub>10</sub> reduction) in the case of the Europe and Delta variants, respectively. Most important, the diltiazem-molnupiravir combination strongly reduced

infectious virus production of all VOCs tested, improving the antiviral effect of molnupiravir monotherapy in the case of Alpha, Beta and notably Delta variants. Collectively, our results demonstrate that the antiviral efficacy of the diltiazem-molnupiravir combination is at least comparable but mostly superior to that of the best of the two monotherapies against five different SARS-CoV-2 VOCs, providing a particular benefit in the case of the Delta variant, for which both monotherapies seem to have reduced potency. Moreover, despite the differential impact on viral production, the diltiazem-molnupiravir combination was systematically associated with a protective effect on the epithelial barrier integrity regardless of the VOCs, as shown by deltaTEER values above 1 (Figure 5C).

310

315

### Discussion

The evident burden of viral respiratory infections as an urgent unmet public health need is further reinforced by the absent or suboptimal arsenal of vaccines or therapeutics options, the latter (when available) being constantly threatened by the rapid emergence of antiviral resistance mutations that seriously compromise their efficacy and utility<sup>5</sup>. One promising approach to mitigate the impact of viral mutability on the emergence of drug resistance and/or escape variants and provide broad-spectrum inhibition consists of targeting infected host cells and their responses instead of viral determinants<sup>33</sup>. The goal is to interfere with host-cell factors/pathways required for viral replication and pathogenesis, but also to modulate suboptimal or excessive innate and adaptive protective immune responses. Targeting the host should also minimize the impact of viral mutability on the emergence of drug resistance and/or escape variants. Moreover, the identification and development of host-directed inhibitors pave the way for their combination with classic virus-directed antivirals, in a “two-strike” strategy to achieve enhanced antiviral efficacy even against drug-resistant variants.

320

325

This proof-of-concept study sought to investigate the feasibility and therapeutic potential of combining diltiazem, an FDA-approved anti-hypertensive drug recently repurposed for its newly identified host-directed antiviral activity<sup>18</sup>, with baloxavir and molnupiravir, two viral polymerase inhibitors with central roles in the treatment of the current two major respiratory viruses, namely influenza and SARS-CoV-2. Polymerase inhibitors constitute the most versatile virus-directed antivirals available, being among the first chosen for viral repurposing approaches in the event of an emerging virus when no validated antiviral exists. Moreover, the three drugs used in this study are administered orally, facilitating patient compliance and the rapid deployment of large-scale treatment regimens in the case of

330

epidemic and pandemic outbreaks. Using a combination of specific respiratory cell lines and the highly biologically  
335 relevant and predictive HAE model of viral infection, we demonstrate that diltiazem treatment exerts its inhibitory  
function through the induction of an IFN- $\lambda$ -driven ISG expression profile characteristic of a host antiviral state<sup>34</sup>. As  
expected from a host-directed antiviral, the inhibitory activity of diltiazem is maintained even against baloxavir-  
resistant influenza variants and SARS-CoV-2 VOCs. The only exception to this rule is exemplified by the Delta VOC,  
340 for which we hypothesize that the tested dose and/or treatment timing was not adapted to the apparent faster *in vitro*  
replication kinetics of this variant. Most important, both diltiazem-baloxavir and diltiazem-molnupiravir combinations  
resulted in at least comparable but mostly superior and synergistic antiviral efficacy compared to the best of the two  
monotherapies, including the protection of the epithelial barrier integrity in all the conditions tested.

The concept of harnessing host IFN responses to treat viral infections is not novel *per se*. Recombinant alpha  
and beta IFNs have been approved since the 80's by the FDA for the treatment of hepatitis B and C viruses, and their  
345 potential utility as broad-spectrum antivirals against respiratory viruses such as influenza and respiratory syncytial  
virus (RSV) has been widely explored<sup>35,36</sup>. Interestingly, the rapid induction of robust IFN responses in the upper  
respiratory tract has been associated with a limited level of infection in the respiratory mucosa, both improving the  
overall clinical prognosis and limiting viral transmission<sup>34,37</sup>. Not surprisingly, subcutaneous IFN- $\beta$  was included as  
one of the therapeutic arms of the international SOLIDARITY trial against SARS-CoV-2 though it failed to reduce  
350 mortality in hospitalized patients with COVID-19<sup>38</sup>. Another trial evaluated the efficacy of treatment with IFN- $\beta$  by  
the inhalation route. Even if treatment was associated with clinical improvement of hospitalized COVID-19 patients,  
the authors discussed the critical barriers for generalizing its clinical use because of the treatment associated  
inflammation and other adverse events<sup>39</sup>. On the other hand, IFN- $\lambda$ s are major players of the early antiviral defence in  
the respiratory mucosa, notably given their restricted yet inducible receptor localization<sup>40-42</sup>. Most important, their  
355 capacity to rapidly induce an antiviral state without the characteristic local and systemic inflammation induced by  
other IFNs makes of them very attractive for a potential use as therapeutic mediators<sup>43</sup>. Although no antiviral  
approaches based on IFN- $\lambda$  are currently approved, interesting results were reported in the context of COVID-19, in  
which the subcutaneous administration of 180  $\mu$ g pegIFN- $\lambda$  within 7 days of symptom onset or first positive swab if  
asymptomatic accelerated viral decline in outpatients with COVID-19<sup>44,45</sup>.

360 Collectively, our results demonstrate in two different major respiratory viruses that the combination of host-  
directed repurposed diltiazem enhances the antiviral activity of polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir.

Moreover, software-assisted drug combination analyses with different models highlight the overall synergistic effect of both combinations and the absence of zones of drug antagonism, of major importance in terms of safety for further characterization of optimal therapeutic conditions. It is important to note that drug combination has been widely explored in the context of influenza infections (reviewed in<sup>46</sup>), in particular as an alternative strategy to minimize the emergence of antiviral resistance and also to manage already existing drug-resistant strains, of particular interest for immunocompromised patients. Until the arrival to the market of baloxavir in 2018, the absence of effective anti-influenza agents with different mechanisms of action -neuraminidase inhibitors (NAIs) were the sole antivirals recommended for the treatment of influenza- represented the major limitation to this approach. The enhanced *in vitro* antiviral activity showed by the combination of baloxavir with different NAIs inhibitors seemed promising<sup>14</sup>, however, the recently published FLAGSTONE trial did not find superior clinical outcomes of the combination of baloxavir with NAIs when compared to NAI monotherapy in patients hospitalised with severe influenza<sup>47</sup>. In this context, the first-in-class antiviral mode of action of repurposed diltiazem as a modulator of the endogenous IFN- $\lambda$  response in the respiratory mucosa paves the way for further development of this therapeutic axis. This might represent a promising cost-effective option to palliate the limitations associated with the combination of virus-directed antivirals as well as with the exogenous administration of recombinant IFNs. Moreover, the present study reinforces and extends our previous data on the added value of combining diltiazem with NAI oseltamivir for the treatment of influenza infections, which prompted the currently ongoing Phase IIb FLUNEXT trial (NCT03212716). Importantly, the results of our study are not intended to guide clinical practice but to contribute to the gathering of robust preclinical evidence on the therapeutic potential of host-directed antivirals and particularly their combination with classic virus-directed inhibitors as an option worth of prioritization to address antiviral resistance and the emergence of novel respiratory viral strains with pandemic potential. Further validation and optimization in clinical trials is necessary before these innovative approaches become part of our limited therapeutic arsenal.

385

References

1. Pan, P., Li, L., Li, Y., Li, D. & Hou, T. Insights into susceptibility of antiviral drugs against the E119G mutant of 2009 influenza A (H1N1) neuraminidase by molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Antiviral Res.* **100**, 356–364 (2013).
- 390 2. Abed, Y. & Boivin, G. A Review of Clinical Influenza A and B Infections With Reduced Susceptibility to Both Oseltamivir and Zanamivir. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, (2017).
3. Casalegno, J.-S. *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res.* **87**, 242–248 (2010).
4. Noshi, T. *et al.* In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor 395 of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* **160**, 109–117 (2018).
5. Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* (2018) doi:10.1056/NEJMoa1716197.
6. Omoto, S. *et al.* Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci. Rep.* **8**, 9633 (2018).
- 400 7. Govorkova, E. A. *et al.* Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018-2020. *Antiviral Res.* **200**, 105281 (2022).
8. Commissioner, O. of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Drug for Treatment of COVID-19. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-drug-treatment-covid-19> (2021).
- 405 9. Jayk Bernal, A. *et al.* Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N. Engl. J. Med.* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2116044.
10. Gandhi, S. *et al.* De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nat. Commun.* **13**, 1547 (2022).
- 410 11. Focosi, D., Maggi, F., McConnell, S. & Casadevall, A. Very low levels of remdesivir resistance in SARS-COV-2 genomes after 18 months of massive usage during the COVID19 pandemic: A GISAID exploratory analysis. *Antiviral Res.* **198**, 105247 (2022).

Research Article: confidential

12. Hu, Y. *et al.* Naturally occurring mutations of SARS-CoV-2 main protease confer drug resistance to nirmatrelvir. 2022.06.28.497978 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.06.28.497978> (2022).
- 415 13. Yang, K. S., Leeuwon, S. Z., Xu, S. & Liu, W. R. Evolutionary and Structural Insights about Potential SARS-CoV-2 Evasion of Nirmatrelvir. *J. Med. Chem.* *acs.jmedchem.2c00404* (2022)  
doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00404.
14. Checkmahomed, L. *et al.* In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses. *Viruses* **12**, 1139 (2020).
- 420 15. Ormond, L. *et al.* The Combined Effect of Oseltamivir and Favipiravir on Influenza A Virus Evolution. *Genome Biol. Evol.* **9**, 1913–1924 (2017).
16. Baz, M., Carbonneau, J., Rhéaume, C., Cavanagh, M.-H. & Boivin, G. Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus. *Viruses* **10**, E610 (2018).
- 425 17. Zumla, A. *et al.* Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect. Dis.* **16**, e47-63 (2016).
18. Pizzorno, A. *et al.* Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
19. Pizzorno, A. *et al.* In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2. *Antiviral Res.* **181**, 104878 (2020).
- 430 20. Pizzorno, A. *et al.* Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep. Med.* **1**, 100059 (2020).
21. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12 (2011).
- 435 22. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527 (2016).
23. Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D. & Tatusova, T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* **33**, D54–D58 (2005).
24. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **45**, D12–D17  
440 (2017).

25. Sonesson, C., Love, M. I. & Robinson, M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research* **4**, 1521 (2015).
26. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
- 445 27. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **57**, 289–300 (1995).
28. Breuza, L. *et al.* The UniProtKB guide to the human proteome. *Database J. Biol. Databases Curation* **2016**, bav120 (2016).
29. Grossmann, S., Bauer, S., Robinson, P. N. & Vingron, M. Improved detection of overrepresentation of Gene-  
450 Ontology annotations with parent child analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **23**, 3024–3031 (2007).
30. Murtagh, F. & Legendre, P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *J. Classif.* **31**, 274–295 (2014).
31. Loewe, S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung.* **3**, 285–290 (1953).
- 455 32. Zhao, W. *et al.* A New Bliss Independence Model to Analyze Drug Combination Data. *J. Biomol. Screen.* **19**, 817–821 (2014).
33. Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2016) doi:10.1038/nrd.2015.37.
34. Klinkhammer, J. *et al.* IFN- $\lambda$  prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus  
460 transmission. *eLife* **7**, (2018).
35. Wang, H.-Q. *et al.* [Recombinant human interferon alpha 2b broad-spectrum anti-respiratory viruses pharmacodynamics study in vitro]. *Yao Xue Xue Bao* **49**, 1547–1553 (2014).
36. Matzinger, S. R., Carroll, T. D., Fritts, L., McChesney, M. B. & Miller, C. J. Exogenous IFN-alpha Administration Reduces Influenza A Virus Replication in the Lower Respiratory Tract of Rhesus Macaques.  
465 *PLOS ONE* **6**, e29255 (2011).
37. Lopez, J. *et al.* Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *J. Exp. Med.* **218**, e20211211 (2021).



Research Article: confidential

38. WHO Solidarity Trial Consortium *et al.* Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N. Engl. J. Med.* **384**, 497–511 (2021).
- 470 39. Monk, P. D. *et al.* Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 196–206 (2021).
40. Okabayashi, T. *et al.* Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res.* **160**, 360–366 (2011).
- 475 41. Jewell, N. A. *et al.* Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J. Virol.* **84**, 11515–11522 (2010).
42. Jafarzadeh, A., Nemati, M., Saha, B., Bansode, Y. D. & Jafarzadeh, S. Protective Potentials of Type III Interferons in COVID-19 Patients: Lessons from Differential Properties of Type I- and III Interferons. *Viral Immunol.* **34**, 307–320 (2021).
- 480 43. Ye, L., Schnepf, D. & Staeheli, P. Interferon- $\lambda$  orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* (2019) doi:10.1038/s41577-019-0182-z.
44. University Health Network, Toronto. *Interferon Lambda for Immediate Antiviral Therapy at Diagnosis (ILLAD): A Phase II Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Trial to Evaluate the Effect of Peginterferon Lambda for the Treatment of COVID-19.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04354259> (2021).
- 485 45. Feld, J. J. *et al.* Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 498–510 (2021).
46. Pizzorno, A., Padey, B., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
- 490 47. Kumar, D. *et al.* Combining baloxavir marboxil with standard-of-care neuraminidase inhibitor in patients hospitalised with severe influenza (FLAGSTONE): a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, superiority trial. *Lancet Infect. Dis.* (2022) doi:10.1016/S1473-3099(21)00469-2.

495 **Figure legends**

**Fig. 1. Diltiazem treatment induces an ISG expression in reconstituted HAE.** (A) Characterization of transcriptional modulations elicited by 3 doses of diltiazem treatment over 72 h in nasal HAE. Statistical analyses were performed for each term and for each list of down-regulated genes (blue) and up-regulated genes (red) as detailed in material and methods. Each enrichment is represented by a plain circle which size depends on the adjusted p-value (points over 0.05 are not drawn). Terms are clustered in 7 metagroups and the 4 largest terms (in number of genes) within each metagroup are indicated. The number of genes in the term (child) or corresponding parent(s) terms are represented on the right. (B) Vulcano-plot highlighting IFN and ISGs as genes of interest (goi) according to the differential gene expression analysis. Log<sub>2</sub>(FC) is represented on the x-axis and -log<sub>10</sub>(adjusted p-value) on the y-axis. The shape and colour of each point are determined by the status within the differential gene analysis. (C) Mean (± SD) IFN Lambda1 (IFN-λ1/IL29) secretion at the apical and basolateral sides of HAE was quantified by ELISA (n=3). \*\*\*P<0.001 and \*\*\*\*P<0.0001 compared to the mock condition by unpaired t-test.

**Fig. 2. Synergistic potential of diltiazem in combination with polymerase inhibitor baloxavir against influenza H1N1 *in vitro*.** (A) Diltiazem and baloxavir dose-response curves against influenza H1N1 (A549 cells, MOI 0.1, TCID<sub>50</sub>/mL 72 hpi). (B) Dose-response percent inhibition matrix of single and combined diltiazem and baloxavir treatments against influenza H1N1. Interaction landscapes were calculated with SynergyFinder (version 2.0) using the Loewe additive model (n=3). Areas with high synergy potential are represented in red. (C) Apical viral production kinetics (TCID<sub>50</sub> ± SD) and trans-epithelial electrical resistance (Δ TEER vs t=0 ± SD) in HAE infected with influenza H1N1 (MOI 0.1) and treated with diltiazem, baloxavir, or a diltiazem-baloxavir combination (n=4).

**Fig. 3. Synergistic potential of diltiazem in combination with polymerase inhibitor molnupiravir SARS-CoV-2 *in vitro*.** (A) Diltiazem and molnupiravir dose-response against SARS-CoV-2 Wuhan-like strain (A549-ACE2 cells, MOI 0.1, TCID<sub>50</sub>/mL 48 hpi). (B) Dose-response percent inhibition matrix of single and combined diltiazem and molnupiravir treatments against SARS-CoV-2. Interaction landscapes were calculated with SynergyFinder (version 2.0) using the Loewe additive model (n=2). Areas with high synergy potential are represented in red. (C) Apical viral production kinetics (TCID<sub>50</sub> ± SD) and trans-epithelial electrical resistance (Δ TEER vs t=0 ± SD) in HAE infected

with SARS-CoV-2 (MOI 0.1) and treated with diltiazem, molnupiravir, or a diltiazem-molnupiravir combination (n=3).

525 **Fig. 4. Diltiazem maintains its antiviral activity against baloxavir-resistant PA I38T (H1N1) strain and the diltiazem-baloxavir combination improves treatment efficacy *in vitro*.** (A) Diltiazem and baloxavir dose-response curves against influenza PA I38T H1N1 (A549 cells, MOI 0.1, TCID<sub>50</sub>/mL 72 hpi). (B-C) Apical viral production kinetics (TCID<sub>50</sub> ± SD) and trans-epithelial electrical resistance (Δ TEER vs t=0 ± SD) in HAE infected with influenza H1N1 (MOI 0.1) and treated with diltiazem, baloxavir, or a diltiazem-baloxavir combination at two different baloxavir  
530 doses (10 nM, n=4 (B) and 100 nM, n=7 (C)).

**Fig. 5. Enhanced antiviral activity of the diltiazem-molnupiravir combination against SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs).** (A) Diltiazem and molnupiravir dose-response curves against SARS-CoV-2 VOCs (B.1.160, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2), at MOI 0.01 on A549-ACE2 cells, 48hpi (TCID<sub>50</sub>/mL). (B-F) HAE were infected  
535 with SARS-CoV-2 VOCs at MOI of 0.01: Europe (B), Alpha (C), Beta (D) Gamma (E), and Delta (F). Basolateral single drugs or combination treatments were initiated 1h after infection and administered once daily for two consecutive days. Viral kinetics were determined from apical genome viral quantification (nsp14 copies/mL ± SD) at 48 and 72hpi (n=2/n=6). Transepithelial electrical resistance was measured every day before sampling (Δ TEER vs t=0 ± SD). (G) SARS-CoV-2 viral titer from apical samples in TCID<sub>50</sub>/mL 48hpi.

540

**Fig. S1. Synergistic potential of diltiazem in combination with baloxavir against H3N2 *in vitro*.** HAE were infected with H3N2 at MOI of 0.01. Basolateral single drugs or combination treatments were initiated 5h after infection and administered once daily for two consecutive days. Viral kinetics were determined from apical viral production (TCID<sub>50</sub> ± SD) from 24 to 72hpi (n=4). Transepithelial electrical resistance was measured every day  
545 before sampling (Δ TEER vs t=0 ± SD).

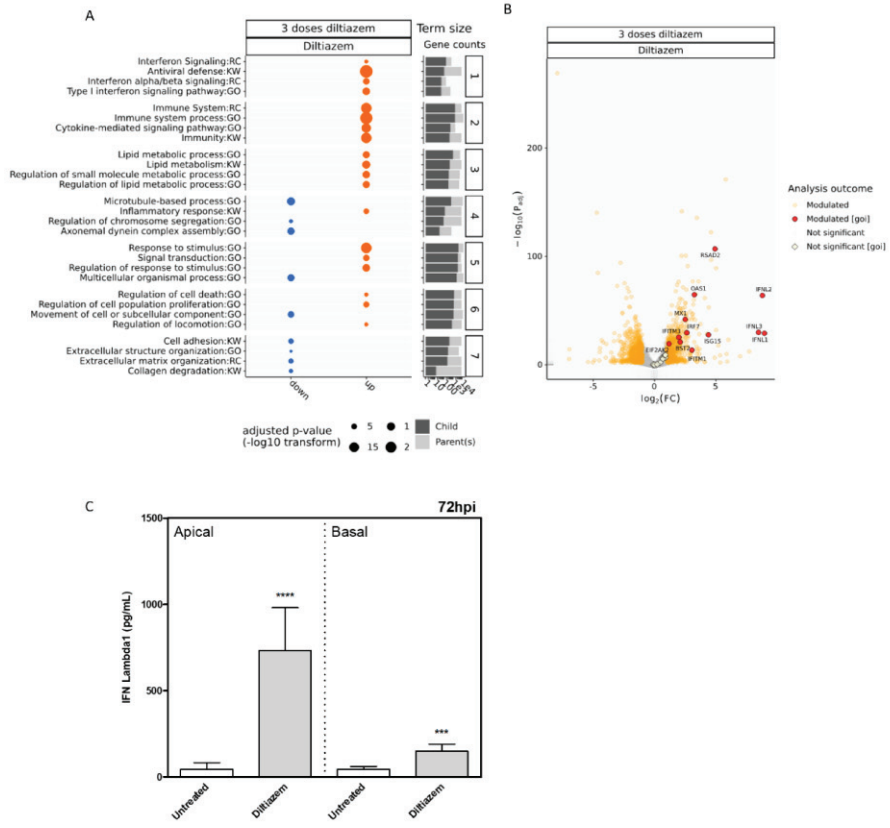
**Fig. S2. Synergistic potential of diltiazem in combination with polymerase inhibitors baloxavir and molnupiravir against H1N1 and SARS-CoV-2 *in vitro* using Bliss independence model.**

550 Dose-response percent inhibition matrix of single and combined (A) baloxavir-diltiazem treatments against influenza H1N1 (MOI 0.1) on A549 cells, 72hpi and (B) molnupiravir-diltiazem treatments against SARS-CoV-2 on A549-ACE2 cells, 48hpi. Interaction landscape as calculated using the Bliss independence model on Synergy finder ((A) n=3, (B) (n=2)). Areas with high synergy potential are represented in red.

Research Article : confidential

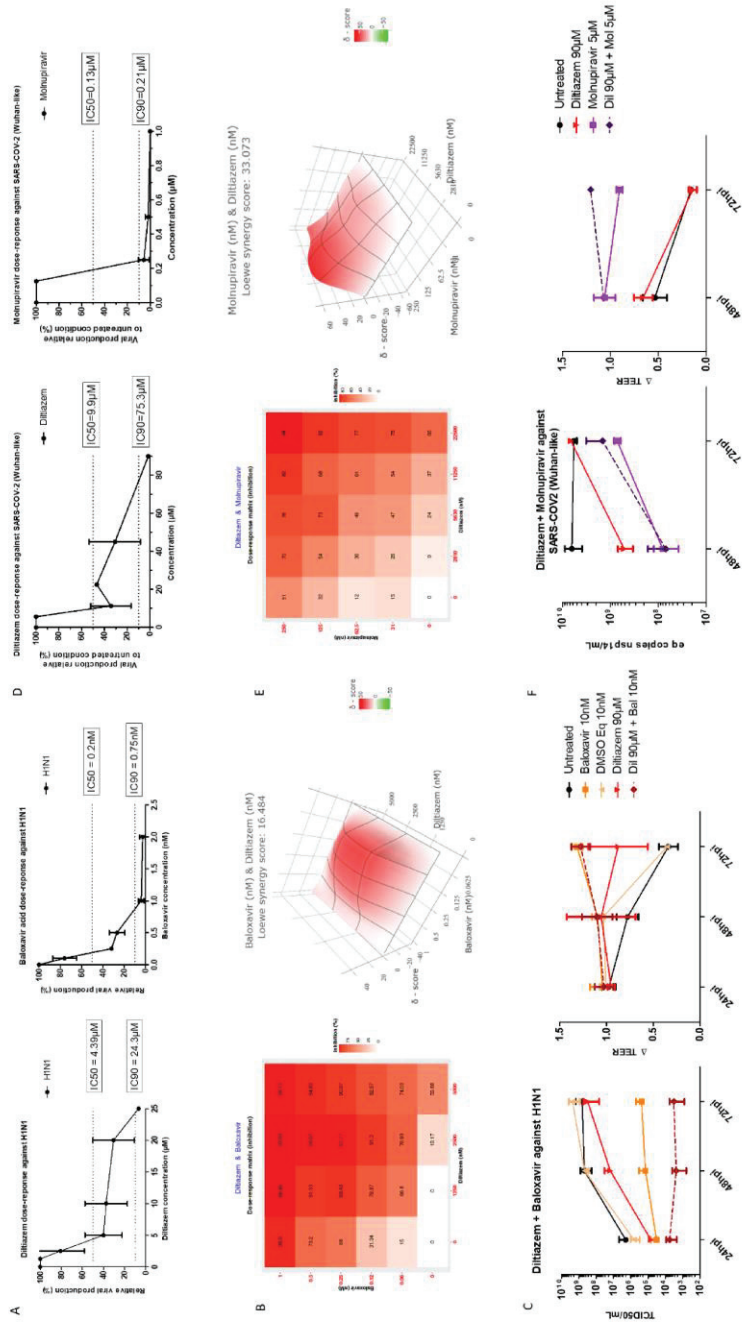
Figure 1.

555



23

Figure 2.



560

Figure 3.

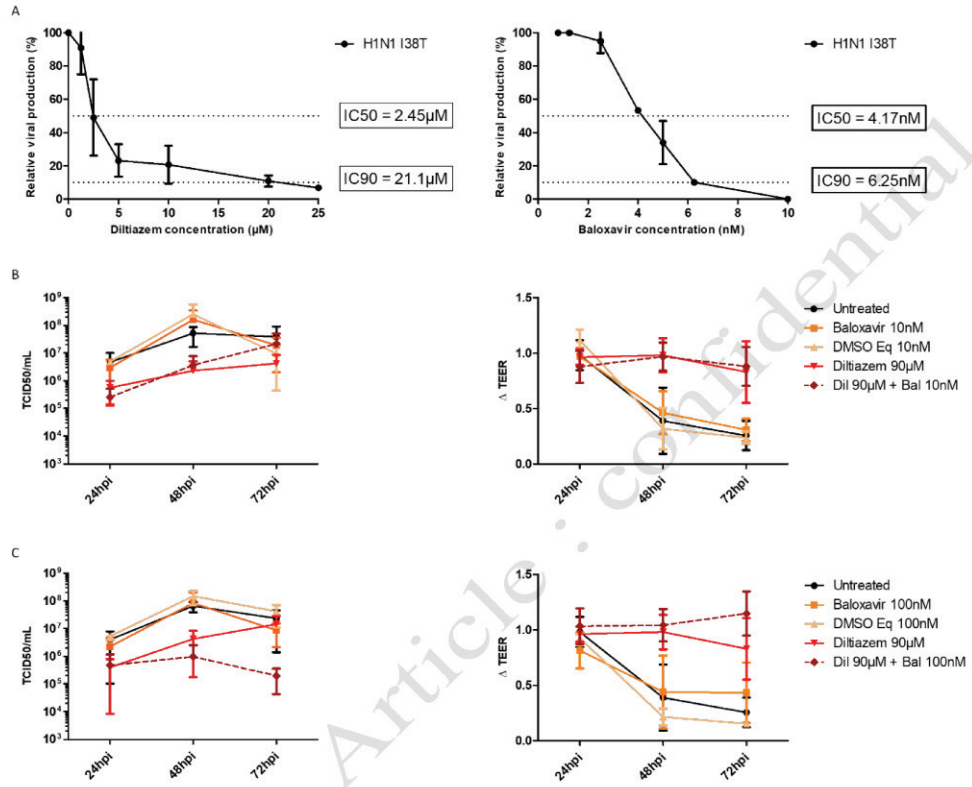
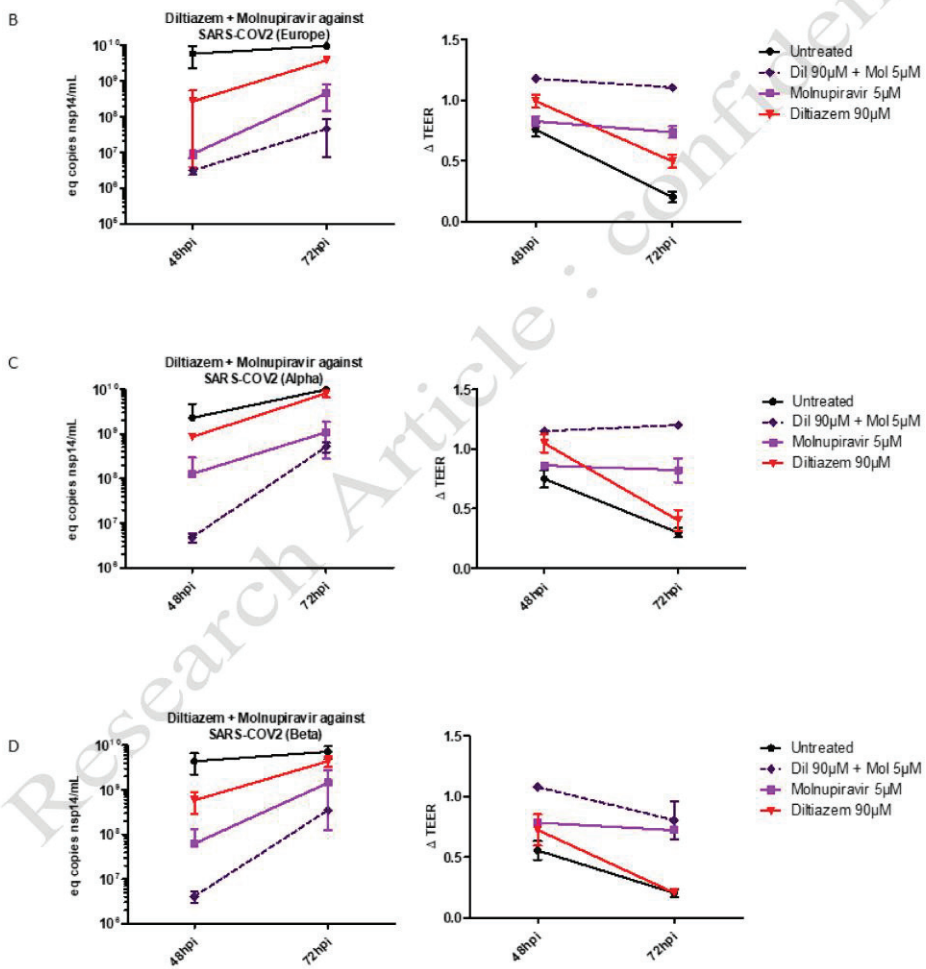


Figure 4 (1/2).

Drug	Virus	First reported in	VOC	Diltiazem ( $\mu\text{M}$ )		Molnupiravir ( $\mu\text{M}$ )	
				IC50	IC90	IC50	IC90
B.1.160 (Europe)	Europe	July 2020	July 2020	27,4	71,7	0,33	0,73
B.1.1.7 (Alpha)	UK	Sept. 2020	Dec. 2020	14,8	44,5	0,09	0,24
B.1.351 (Beta)	South Africa	May 2020	Dec. 2020	28,9	45,4	0,08	0,37
P.1 (Gamma)	Brazil	Nov. 2020	Jan. 2021	11,2	79,7	0,39	0,62
B.1.617.2 (Delta)	India	Oct. 2020	May 2021	32,9	66,0	0,09	0,68

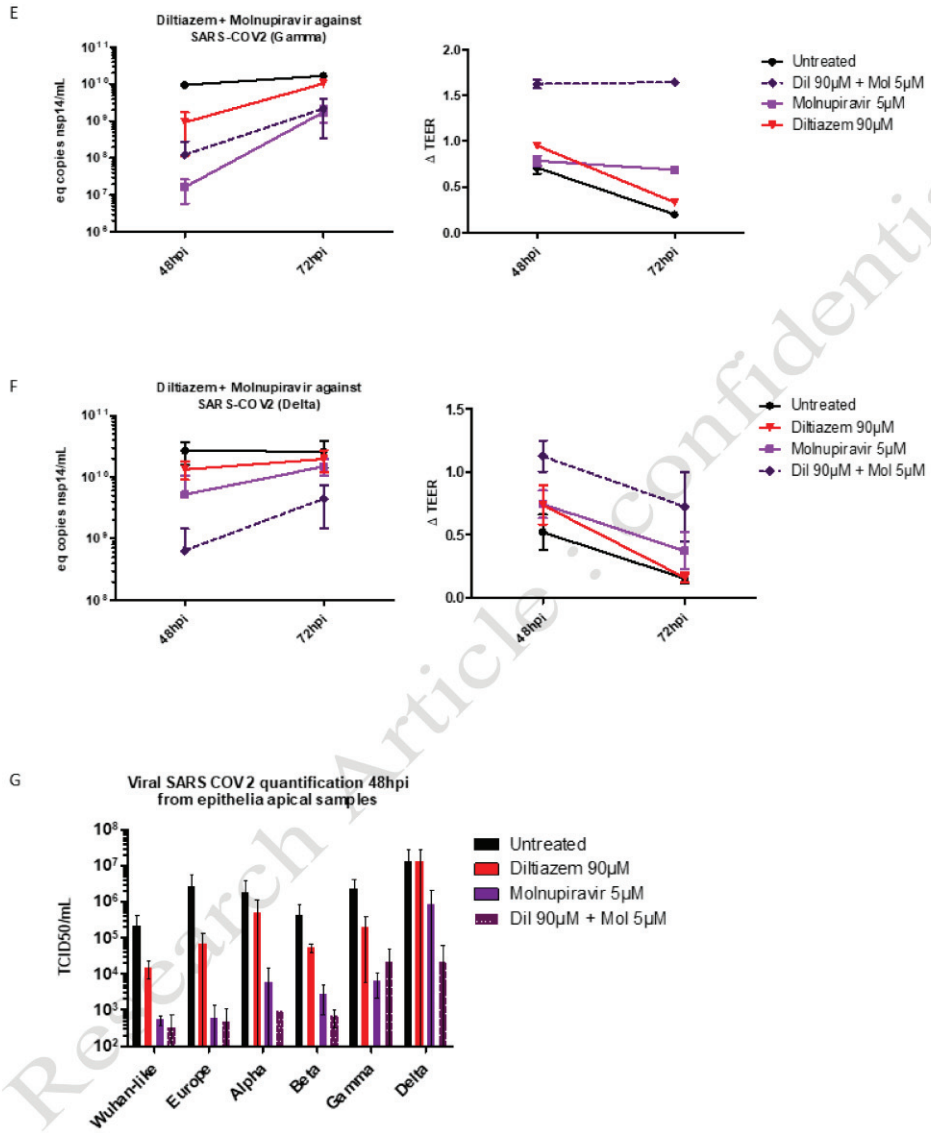
565



26



Figure 4 (2/2)



570

27

Figure S1.

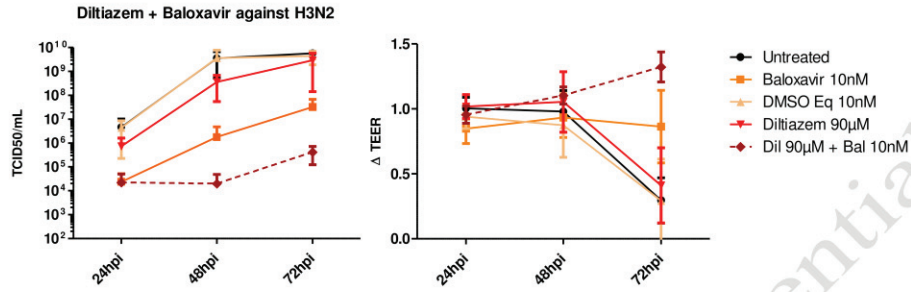
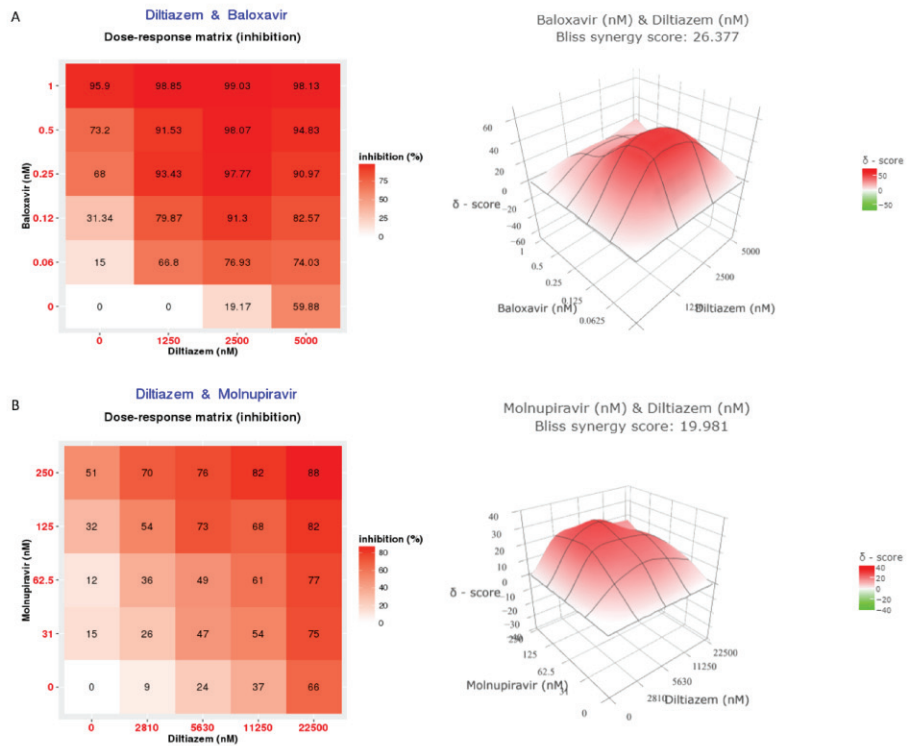


Figure S2.



## 5.2. Présentation de l'article

En premier lieu, nous avons caractérisé du point de vue fonctionnel le mécanisme d'action antiviral du diltiazem sur la modulation de l'immunité innée. Pour cela, nous avons reproduit les conditions expérimentales d'un traitement antiviral efficace en HAE d'origine nasale contre influenza, constitué de 3 administrations journalières de 90  $\mu\text{M}$  de diltiazem en administration basolatérale. A la suite d'un séquençage profond (RNAseq), nous avons réalisé une analyse d'enrichissement pour mettre en évidence les voies biologiques les plus représentées à partir de trois bases de données (*Reactome*, *Uniprot Keyword* et *Gene Ontology*). Les termes « *antiviral defense* », « *immune system* », « *cytokine-mediated signaling pathway* » et « *interferon signaling* » sont apparus comme hautement représentés, confirmant que le diltiazem place la cellule dans un état globalement défensif. Puis, nous avons analysé l'expression différentielle des gènes spécifiquement impliqués dans la voie des IFN. Nous avons ainsi constaté une induction significative de l'expression des gènes (i) des interférons lambda IFNL1, IFNL2 et IFNL3 (*fold change* de 9), (ii) de plusieurs ISG tels que RSAD2, OAS1, MX1, IFITM1 et IFITM3 (*fold changes* entre 2 et 5), ainsi que (iii) du facteur de transcription IFR7 (*fold change* de 2.5) avec le traitement diltiazem par rapport à la condition non traitée. Enfin, nous avons vérifié la sécrétion des effecteurs antiviraux par une quantification en ELISA de l'IL-29. Après le traitement au diltiazem, la cytokine a été majoritairement sécrétée au pôle apical des épithéliums (733 pg/mL) et dans une moindre mesure dans le milieu basal (149 pg/mL) ce qui représente des *fold changes* de 16.4 et 3.4 respectivement par rapport à la condition non traitée.

Ainsi, ces résultats illustrent l'état antiviral cellulaire global induit par le traitement au diltiazem dans le tractus respiratoire supérieur. La modulation de l'expression des effecteurs de l'immunité innée (IFN et ISG) constitue un atout majeur pour appuyer l'efficacité des antiviraux, comme nous avons pu le souligner dans nos travaux précédents avec les associations diltiazem-oseltamivir contre H1N1 ou diltiazem-remdesivir contre le SARS-CoV-2<sup>709,719</sup>.

Sur la base de ces travaux, nous avons déployé notre stratégie « *double-target* » en évaluant le potentiel synergique des combinaisons diltiazem-baloxavir et diltiazem-molnupiravir contre les virus H1N1pdm09 et SARS-COV-2 (B) (*Wuhan-like*) respectivement.

Nous avons utilisé le logiciel *Synergy finder* pour construire des cartes de synergie et calculer les scores d'additivité associés (méthode de Loewe) des combinaisons évaluées en modèles cellulaires A549 et A549-ACE2. La combinaison diltiazem-baloxavir a montré une synergie pour toutes les concentrations testées avec un score d'additivité de 16.5. Le meilleur potentiel a été obtenu avec des concentrations comprises entre 1.25 et 2.5  $\mu\text{M}$  de diltiazem et autour de 0.1 nM de baloxavir, soit des valeurs correspondant à la moitié des IC50 calculées pour les 2 molécules (4.39  $\mu\text{M}$  et 0.2 nM respectivement). Nous avons obtenu des résultats similaires avec la combinaison diltiazem-molnupiravir, avec un score d'additivité de 33 et un meilleur potentiel avec 5  $\mu\text{M}$  de diltiazem et un range compris entre 0.1 et 0.25  $\mu\text{M}$  de molnupiravir, correspondant à la moitié de l'IC50 du diltiazem et à l'IC50 du molnupiravir (calculées respectivement à 9.9  $\mu\text{M}$  et 130 nM).

Puis, nous avons validé l'efficacité de ces combinaisons sur nos modèles physiologies d'HAE d'origine nasale. Les monothérapies contre H1N1 ont permis de confirmer l'efficacité des traitements de référence avec 90  $\mu\text{M}$  de diltiazem et 10 nM de baloxavir, permettant une réduction de la production virale de 1.5 et 3.5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL à 48hpi, respectivement, par rapport à la condition non traitée. Comme attendu, le traitement en combinaison a permis de potentialiser ces résultats avec une réduction de 5.3 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL, représentant un gain de 1.8 log<sub>10</sub> par rapport au traitement

avec le baloxavir. L'efficacité antivirale des trois thérapeutiques testées a été également confirmée par le maintien de l'intégrité des épithéliums pendant l'expérience.

La monothérapie avec 90  $\mu\text{M}$  de diltiazem a démontré la même efficacité contre SARS-CoV-2 avec une réduction de 1  $\log_{10}$  de la production virale (copies/mL) par rapport à la condition sans traitement à 48hpi. De même, le traitement de référence avec 5  $\mu\text{M}$  de molnupiravir a permis une réduction de 2  $\log_{10}$  de la production virale (copies/mL). Bien que très efficace, la combinaison des deux composés n'a en revanche pas apporté de gain sur la réduction de la production virale par rapport aux monothérapies. Nous avons cependant noté un meilleur maintien de l'intégrité des épithéliums avec la bithérapie.

Considérant l'activité antivirale significative de la combinaison diltiazem-baloxavir, nous avons évalué son efficacité contre une souche d'influenza résistante au baloxavir : I38T PA (H1N1). Le diltiazem a maintenu son efficacité *in vitro*, avec une réduction de la production virale de 1.3  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL à 48hpi apportée par le traitement de référence en HAE de 90  $\mu\text{M}$  par rapport à la condition sans traitement. En revanche, la présence de la mutation de résistance sur la polymérase virale a fortement réduit l'efficacité du traitement avec le baloxavir, puisque la dose de 100 nM, correspondant à 10 fois le traitement de référence, n'a pas eu d'impact sur la production virale. Dans ces conditions défavorables, la combinaison diltiazem-baloxavir a permis d'améliorer durablement l'effet antiviral du diltiazem en monothérapie, avec un gain de 0.7 et 2  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL à 48 et 72 hpi, respectivement et de maintenir l'intégrité des épithéliums infectés tout au long de l'expérience.

À la suite de ces résultats encourageants, nous avons étendu notre démarche en évaluant l'efficacité de la combinaison diltiazem-molnupiravir contre 5 VOC du SARS-CoV-2 précédant le variant Omicron et préalablement caractérisés par notre équipe (article en préparation) :

- B.1.160 (Europe), porteur de la mutation D614G, premier variant isolé en France en juillet 2020, circulant au niveau européen, il sera rapidement remplacé par le variant Alpha
- B.1.1.7 (Alpha), isolé au Royaume-Uni en septembre 2020, considéré comme préoccupant en décembre 2020
- P.1 (Gamma), isolé au Brésil en décembre 2020, déclaré préoccupant en janvier 2021
- B.1.351 (Bêta), isolé en Afrique du Sud en décembre 2020 et considéré comme préoccupant
- B.1.617.2 (Delta), isolé en Inde en octobre 2020, déclaré comme préoccupant en avril 2021. Les sous-lignées B.1.617.1 et B.1.617.2 sont nommées respectivement Kappa et Delta en mai 2021

Les VOC ont montré des cinétiques comparables en HAE avec un pic de production virale entre 48 et 72 hpi, à l'exception du variant Delta dont le pic a été atteint avant 48 hpi. Le traitement de référence avec 90  $\mu\text{M}$  de diltiazem a maintenu son efficacité contre les variants Européen, Bêta et Gamma avec une réduction de la production virale autour de 1  $\log_{10}$  copies/mL. Une activité plus modérée, correspondant à une réduction de 0.4 et 0.3  $\log_{10}$  de la production virale (copies/mL) a été obtenue contre les variants Alpha et Delta respectivement. De même, le traitement de référence avec 5  $\mu\text{M}$  de molnupiravir a présenté une activité antivirale importante contre les variants Européen et Gamma avec 2.8  $\log_{10}$  de réduction de la production virale (copies/mL), et une réduction de la production virale similaire à celle de la souche *Wuhan-like* a été obtenue contre Alpha et Bêta, correspondant à 1.25 et 1.84  $\log_{10}$  copies/mL. En revanche, le traitement molnupiravir a présenté une moindre efficacité contre le variant Delta, avec seulement 1  $\log_{10}$  de réduction de la production virale (copies/mL). Le traitement a permis de maintenir l'intégrité des épithéliums infectés avec tous les variants à l'exception du Delta.

Dans ces conditions, la combinaison diltazem-molnupiravir pouvait apporter des bénéfices intéressants, en particulier contre le variant Delta, où une synergie avait la capacité de potentialiser l'effet modéré des monothérapies. En effet, l'association des deux molécules a présenté une efficacité antivirale significative contre tous les variants testés, en permettant un abattement de la production virale à 48 hpi, de 3.27, 3 et 2.7 log<sub>10</sub> copies/mL contre les variants Européen, Alpha et Bêta respectivement et de 1.89 et 1.62 log<sub>10</sub> copies/mL contre les variants Gamma et Delta. L'efficacité antivirale observée était supérieure à celles de monothérapies contre chaque virus, à l'exception du variant Gamma. Le traitement en association des deux composés a permis de maintenir l'intégrité des épithéliums, particulièrement dans le cas des variants Européen, Alpha et Gamma où ils ont été maintenus tout au long de l'expérience.

Enfin, nous avons complété ces données par des titrages des virus infectieux 48hpi. L'activité antivirale du diltiazem a été confirmée contre tous les variants, à l'exception du variant Delta. Nous avons émis l'hypothèse que la cinétique accélérée de ce virus pourrait nécessiter une adaptation de la posologie du traitement par le diltiazem (ajustement de la concentration et/ou modification des temps d'administration) afin de conserver son activité antivirale. Concernant la monothérapie avec le molnupiravir, une réduction moyenne de 2 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL de la production antivirale a été obtenue pour tous les variants. Finalement, la synergie obtenue avec la combinaison diltazem-molnupiravir a été confirmée contre tous les variants, apportant dans chaque cas un bénéfice sur l'activité antivirale des traitements en monothérapies.

### 5.3. Discussion et perspectives

Les interférons lambda constituent la première ligne de défense de l'immunité innée face à l'entrée des pathogènes viraux dans les muqueuses respiratoires. Nos résultats ont mis en évidence l'induction par le diltiazem de l'expression des gènes des IFN de type III dans les épithéliums nasaux, conduisant à l'expression des ISG associés et à la sécrétion au pôle apical d'effecteurs antiviraux comme l'IL-29. La stimulation précoce de cette voie par le diltiazem constitue un atout majeur de notre stratégie antivirale, autant contre influenza que contre SARS-CoV-2, en permettant :

- (i) Une activation plus rapide de la réponse innée

Les IFN de type III présentent une efficacité antivirale locale significative et indépendante des IFN de type I, sans induction d'une réponse inflammatoire. Leur activation plus rapide, à la porte d'entrée des virus, permettrait de contenir l'infection à un faible niveau de réplication dans le tractus respiratoire supérieur. En plus de diminuer le risque de transmission, cela limiterait la propagation de l'infection vers les voies aériennes inférieures, qui constitue un facteur de gravité avec un risque de surinfection<sup>451</sup>. Lorsque l'infection progresse, l'intervention antivirale systémique des interférons de type I est requise mais celle-ci peut s'avérer délétère si elle n'est pas correctement modulée<sup>427,450,452</sup>. En particulier, une réponse exacerbée d'IFN- $\alpha$  a été décrite comme facteur de sévérité chez les patients COVID-19, associée à l'emballement de la réponse inflammatoire<sup>721</sup>. Le diltiazem pourrait ainsi diminuer la latence d'activation de la réponse innée induite par le SARS-CoV-2 sans toutefois stimuler les cytokines pro-inflammatoires<sup>116,134</sup>. Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence l'induction d'ISG tels qu'MX1 ou RSAD2, particulièrement décrits dans l'activité antivirale contre influenza et OAS1, dont le haut niveau plasmatique est associé à un meilleur niveau de résistance contre le SARS-CoV-2<sup>451,460,466</sup>.

(ii) Le recrutement plus précoce des effecteurs de l'immunité adaptative

Dans le contexte d'une infection par influenza, les interférons lambda sont essentiels à la maturation des cellules dendritiques, médiatrices de l'activation des lymphocytes T CD8+ et occupent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse humorale des muqueuses<sup>722,723</sup>. Le diltiazem présente donc des perspectives favorables pour améliorer la clairance virale *in vivo* en stimulant la production de l'interféron endogène.

L'utilisation clinique des interférons exogènes (recombinants) de type I  $\alpha$ 2a et  $\alpha$ 2b est approuvée depuis de nombreuses années dans la prise en charge de certains cancers et des hépatites B et C<sup>724</sup>. Leur effet antiviral à large spectre a fait l'objet de plusieurs études contre influenza, RSV et plus récemment SARS-CoV-2<sup>725,726</sup>. L'IFN- $\beta$ -1a a d'ailleurs été inclus dans l'essai clinique *Solidarity* mais n'a malheureusement pas fait preuve d'une activité significative dans la réduction de la mortalité des patients sévères<sup>582</sup>. Plus récemment, un essai clinique de phase II a évalué l'efficacité d'un traitement de 14 jours par inhalation d'interféron  $\beta$ -1a chez des patients COVID-19 hospitalisés<sup>727</sup>. Des signes d'amélioration des symptômes et de récupération trois fois supérieurs aux non traités ont été observés au 28<sup>ème</sup> jour mais l'utilisation clinique de ces interférons reste délicate en raison de la mobilisation des effecteurs de l'inflammation, particulièrement impliqués dans la dégradation des patients sévères et des effets secondaires associés<sup>405,721,728</sup>.

Bien qu'ils n'aient jamais fait l'objet d'une AMM, les IFN de type III semblent mieux adaptés à une clairance virale dans le tractus respiratoire par leur activité spécifique des muqueuses et la répartition non ubiquitaire de leurs récepteurs, permettant une diminution des effets secondaires associés, sans activation de l'inflammation<sup>435,436,729</sup>. *In vitro*, les deux types d'interférons montrent une efficacité en modèles cellulaires et HAE contre le SARS-CoV-2<sup>349,730</sup>. Un essai clinique a évalué l'efficacité du peginterféron lambda (180  $\mu$ g) en injection sous-cutanée pendant 7 jours sur la clairance virale des patients diagnostiqués en ambulatoire<sup>731,732</sup>. Une différence de 2 log<sub>10</sub> copies/mL a été mesurée dans les écouvillonnages nasaux mais une augmentation anormale des transaminases a été mesurée chez 3 % des patients, suggérant de possibles effets secondaires associés.

Ainsi, malgré ces résultats encourageants, les thérapeutiques à base d'interférons recombinants semblent difficilement déployables au grand public en raison de la surveillance accrue nécessaire à la réussite du traitement, des modes d'administration par injections ou nanoparticules et des coûts de production élevés<sup>733</sup>. Dans ce contexte, la stimulation endogène des interférons de type III par le diltiazem, apparaît comme une alternative peu coûteuse et plus sûre, pour la prise en charge des infections respiratoires d'origine virale comme la grippe ou la COVID-19.

L'activité antivirale du diltiazem contre les souches H1N1 (pdm09) et SARS-CoV-2 (B) en modèles cellulaires et HAE a été démontrée dans nos études précédentes<sup>116,709,719</sup>. Avec l'hypothèse qu'une action antivirale ciblant l'hôte serait plus robuste face à des virus mutés et/ou variants, nous avons évalué dans cet article son efficacité contre la souche I38T PA (H1N1), porteuse d'une mutation de résistance au baloxavir et contre les 5 VOC du SARS-CoV-2 classés comme préoccupants entre 2020 et 2021 (B.1.160, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2). Les IC<sub>50</sub> obtenues en cellules A549 et A549-ACE2 dans le même ordre de grandeur démontrent que l'activité du diltiazem n'est pas modifiée par la présence de ces mutations et ont renforcé notre intérêt à poursuivre les évaluations.

Sur la base de nos travaux publiés en 2019 et 2020 illustrant le potentiel synergique des combinaisons diltiazem-oseltamivir et diltiazem-remdesivir, nous avons évalué la combinaison du diltiazem avec des inhibiteurs de polymérase. Avec des perspectives d'activité à large spectre, cibler la

polymérase constitue le mécanisme d'action de choix pour une part importante des molécules antivirales développées ces dernières années ou en développement<sup>262,734</sup>.

Dans une précédente étude, nous avons caractérisé l'activité antivirale significative du baloxavir, le dernier antiviral inhibiteur de polymérase, mis sur le marché contre influenza, et démontré le haut potentiel synergique de ce composé avec des inhibiteurs de neuraminidase<sup>735</sup>. Aussi, nous avons orienté notre choix vers cette molécule pour l'étude en combinaison avec le diltiazem. Nos résultats montrent un fort potentiel synergique de la combinaison diltiazem-baloxavir contre la souche H1N1, permettant de diviser par 4 l'IC50 du baloxavir en modèle cellulaire et une réduction très significative de la charge virale en modèle HAE. De plus, le diltiazem conserve son efficacité contre la souche PA I38T (H1N1). Ainsi, l'utilisation clinique de cette bithérapie permettrait une réduction des doses efficaces de baloxavir administrées chez les patients et pourrait limiter les échecs thérapeutiques, en particulier chez les patients immunodéprimés. Ces perspectives d'amélioration du traitement antiviral peuvent à terme limiter l'émergence de mutations de résistances.

Cette combinaison *double-target* nécessite désormais d'être évaluée *in vivo* et constitue une perspective clinique sérieuse, qui pourrait s'inscrire dans la continuité de l'essai clinique FLUNEXT, dont les résultats sont attendus en 2022. Une association similaire récemment publiée, appuie nos arguments, en démontrant l'intérêt de combiner *in vitro* le baloxavir avec le composé ATR-002 ciblant spécifiquement MEK intervenant dans la voie MAP kinase de l'hôte, permettant le blocage des vRNP<sup>736,737</sup>.

Après les résultats modérés obtenus avec le remdesivir, les perspectives thérapeutiques contre le SARS-CoV-2 se sont orientées vers le molnupiravir, un analogue ribonucléosidique, récemment approuvé par la FDA<sup>309,601,602</sup>. Aussi, nous avons choisi d'évaluer son potentiel en combinaison avec le diltiazem dans nos modèles *in vitro*.

Nos résultats en cellules A549-ACE2 ont démontré un fort potentiel synergique de la combinaison diltiazem-molnupiravir contre la souche SARS-CoV-2 (B), permettant une réduction par 4 de l'IC50 du molnupiravir. Les évaluations menées en HAE ont confirmé l'efficacité antivirale de la combinaison contre les 5 VOC isolés entre 2020 et 2021. En particulier, une réduction très significative de la production virale du variant Delta a été obtenue avec le traitement par bithérapie. Avec son affinité marquée pour les récepteurs ACE2, ce variant suit une cinétique accélérée avec un niveau de réplication plus important que les autres variants (article en préparation), réduisant ainsi les possibilités d'action du molnupiravir et du diltiazem en monothérapies.

Ainsi, notre étude met en évidence l'activité antivirale à large spectre du diltiazem apportée par son mécanisme d'action inducteur de la voie des interférons lambda dans le tractus respiratoire, offrant des perspectives de traitement prometteuses à l'encontre des virus influenza et des variants préoccupants de SARS-CoV-2. Par ailleurs, cette molécule ciblant la cellule-hôte peut potentialiser l'activité antivirale des inhibiteurs de polymérases virales et ainsi contribuer à réduire le risque d'émergence des mutations de résistance.

Les perspectives thérapeutiques antivirales du diltiazem soulignées par l'ensemble de nos travaux ont fait l'objet de deux demandes internationales de dépôt de brevet : « COMPOSITION COMPRISING DILTIAZEM FOR TREATING A VIRAL INFECTION CAUSED BY SARS-COV-2 VIRUSES » (WO2021FR50406 20210310<sup>738</sup>) et « COMBINATION OF DILTIAZEM AND VIRAL POLYMERASE INHIBITORS » (WO2021FR50049 20210112<sup>739</sup>).

Également, dans la perspective d'une évaluation clinique du diltiazem contre le SARS-CoV-2, nous avons mené trois études chez le primate (2 études de pharmacocinétiques et une évaluation

d'efficacité ; données non publiées), en collaboration avec l'équipe du Dr Roger Le Grand, directeur du laboratoire *Infectious Diseases Models for Innovative Therapies* (IDMIT) à l'Institut de biologie François Jacob (CEA/INSERM/Paris Sud), avec pour objectifs de :

- (i) Vérifier l'absence de toxicité du diltiazem et valider l'induction des IFN III dans le tractus respiratoire

Le diltiazem a été administré aux animaux selon un protocole de 3 jours de traitement avec 10 ou 50 mg/kg (correspondant à des doses supérieures au dosage autorisé chez l'Homme) *per os* (deux singes par groupe). Le suivi des constantes vitales, hématologiques et biochimiques n'a pas indiqué de perturbation majeure induite par le diltiazem. Les quantifications du principe actif ont mis en évidence le maintien de la concentration plasmatique du diltiazem autour de 1 µg/mL, ainsi qu'une concentration tissulaire équivalente à 10 µg/g dans les poumons, et située entre 1 et 10 µg/g dans le cœur, le foie, la rate, les reins et les intestins, avec le traitement à 50 mg/kg. La dose à 10 mg/kg a induit un déclin rapide de la concentration plasmatique et a uniquement permis une détection intestinale du principe actif. Une induction des ISG représentatifs (IFI27, IFI44L, Mx1, OAS1) a été mesurée dans les tissus pulmonaires avec les deux protocoles de traitement, de l'ordre de 5 à 10 fois plus à la dose de 10 mg/kg et 20 à 100 fois plus à la dose de 50 mg/kg par rapport aux animaux non traités.

- (ii) Evaluer l'efficacité antivirale du diltiazem

L'efficacité du traitement avec le diltiazem a été évaluée selon un protocole de prétraitement + traitement. Les animaux ont été traités deux fois par jour avec 50 mg/kg de diltiazem *per os*, face à un groupe témoin traité au NaCl (5 singes/ groupe). La durée du traitement prévue était initialement de 10 jours (3 jours avant infection et 7 jours suivant l'infection), mais il a cependant été interrompu 4 jours post infection en raison du décès de 3 animaux ; l'administration du diltiazem à 50 mg/kg associée à des anesthésies répétées (2 fois par jour pour l'administration des traitements) ayant provoqué un effet toxique. Malgré cela, une réduction significative ( $\geq 2-3 \log_{10}$ ) de la charge virale a été mesurée 10 jours post infection dans les écouvillonnages nasaux et trachéaux des singes traités en comparaison du groupe témoin. Par ailleurs, le virus n'a pas été détecté au niveau intestinal dans le groupe traité. Ainsi, ces résultats sont très encourageants mais les conditions de l'étude impliquant des anesthésies répétées ne permettent pas de conclure complètement sur l'efficacité du diltiazem.

- (iii) Vérifier l'absence de toxicité du diltiazem dans des dispositions de dosage et de formulation adaptées à l'administration humaine

Les animaux (4 singes) ont été traités par administration *per os* d'une gélule par jour de Mono Tildiem contenant 200mg de diltiazem chlorhydrate en libération prolongée<sup>740</sup> (soit environ 20mg/kg), pendant 10 jours. Le suivi des constantes vitales, hématologiques et biochimiques n'a pas indiqué de perturbation majeure induite par le diltiazem. La concentration moyenne plasmatique journalière a été maintenue à 1,8 ng/mL et une induction des ISG (OAS1, IFI44L et Mx1) de l'ordre de 2 à 6 fois plus a été mesurée dans les tissus pulmonaires après les 10 jours de traitement.

Ainsi, les études *in vivo* réalisées sur des primates non humains avec des doses équivalentes à celles administrées chez l'Homme n'ont pas révélé de contre-indication à l'utilisation clinique du diltiazem et ont fourni des résultats très encourageants dans la perspective de son usage thérapeutique contre la COVID-19.

C'est pourquoi, nous avons rédigé un protocole d'essai clinique multicentrique de phase IIb DICOV, récemment autorisé par l'ANSM (28.02.22), visant à évaluer le bénéfice apporté par un



traitement par diltiazem en complément de la prise en charge habituelle (standard de soins) pour une pneumopathie hypoxémiante à COVID-19. En partenariat avec les Hospices Civils de Lyon (promoteur de l'essai ; investigateur et coordonnateur : Pr Gilles Devouassoux, chef de service de pneumologie), le laboratoire VirPath (investigateur, responsable scientifique : Dr Manuel Rosa-Calatrava) et Signia Therapeutics, cet essai a pour objectif d'inclure 250 patients hospitalisés (hors réanimation lors de l'inclusion), soit 122 patients/groupe (standard de soins + diltiazem vs standard de soins + placebo) sur une durée de 18 mois. Le traitement sera administré *per os* à raison de 60 mg, 3 fois/jour pendant 7 jours. La cinétique de décroissance de la charge virale sur des prélèvements nasopharyngés à J1 et J7 constituera le critère de jugement principal, accompagné, entre autres, du temps d'amélioration clinique, de l'évolution des conditions d'hospitalisation (nécessité d'oxygénation, réanimation), du degré d'inflammation systémique et de la mortalité à J28. Les résultats, attendus pour 2023, viendront compléter les données obtenues dans le cadre de l'essai FLUNEXT contre influenza et constitueront une valorisation de la stratégie de repositionnement de médicaments anti-infectieux menée par le Laboratoire VirPath au cours des dix dernières années.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES**

Les infections aiguës respiratoires d'origine virale demeurent une préoccupation majeure de santé publique, impactant très significativement nos sociétés d'un point de vue sanitaire mais également d'un point de vue économique et sociétal. La pandémie actuelle de COVID-19 ne peut que renforcer ce constat et souligner l'importance de disposer d'un arsenal prophylactique et thérapeutique efficace pour lutter contre les virus respiratoires émergents et ré-émergents. L'émergence récurrente de mutations de résistance virale constitue la limite majeure des médicaments antiviraux classiques, dont le nombre est très limité à ce jour, légitimant ainsi le développement de nouvelles approches thérapeutiques, telles que le repositionnement de médicaments, les thérapies ciblant l'hôte ou encore les associations de molécules antivirales et/ou immunomodulatrices.

Dans ce contexte, le laboratoire VirPath travaille depuis plusieurs années à la caractérisation des interactions hôte-pathogène et au développement d'une stratégie innovante permettant l'identification, par un criblage basé sur la comparaison de signatures virogénomiques et chemogénomiques, de molécules à fort potentiel ciblant la cellule-hôte pour leur repositionnement comme antiviraux contre les virus respiratoires, et leur(s) combinaison(s) avec des antiviraux classiques ciblant les déterminants viraux.

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans cette dynamique et ont débuté par ma contribution au projet de recherche translationnelle FLUNEXT. A partir d'échantillons respiratoires issus de patients infectés par influenza, nous avons généré la signature transcriptomique de l'infection et sélectionné des composés à fort potentiel antiviral pour leur repositionnement contre la grippe via la plateforme *Connectivity Map*. Les étapes de criblages précliniques réalisés dans nos modèles pertinents d'infection nous ont permis d'identifier le diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques indiqué dans le traitement de l'hypertension pulmonaire, comme candidat à un repositionnement contre la grippe. L'analyse de sa signature chemogénomique a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant à son mode d'action antiviral, notamment sur la modulation de la réponse interféron dans le tissu épithélial respiratoire. Enfin, nous avons démontré le potentiel synergique de la combinaison du diltiazem avec l'oseltamivir, permettant de potentialiser l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du médicament. La combinaison diltiazem-oseltamivir fait aujourd'hui l'objet d'un essai clinique de phase IIb chez des patients hospitalisés pour une grippe sévère, dont les résultats sont attendus pour fin 2022.

En parallèle de notre approche ciblée sur la cellule-hôte, j'ai également pris part à la détermination du potentiel synergique des antiviraux classiques en combinaison, dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Dr Guy Boivin (CHU Laval, Québec). Ce travail a consisté en la mise en place et la validation d'outils pertinents *in vitro* pour l'évaluation de combinaisons d'antiviraux approuvés contre les virus influenza. Nous avons ainsi mis en évidence le fort potentiel synergique des combinaisons des inhibiteurs de neuraminidase avec le baloxavir. La réflexion portée par ce travail nous a mené vers l'utilisation de logiciels pertinents pour l'étude des interactions entre les molécules, bénéfiques ou délétères en fonction des modes d'action des principes actifs et des conditions expérimentales. Ceci a soulevé la question de l'impact de tels traitements en multithérapie sur l'émergence de mutations de résistance. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de médicaments ciblant la cellule-hôte avec des antiviraux classiques, l'effet « *double target* », pourrait limiter le risque d'émergence de ces mutations.

Ces travaux princeps nous ont permis de faire preuve de réactivité face à l'émergence du SARS-CoV-2 dès janvier 2020. Grâce au modèle d'HAE, particulièrement adapté à la caractérisation et à l'évaluation de potentielles molécules candidates antivirales, nous avons rapidement pu contribuer à enrichir les connaissances sur la physiopathologie de ce nouveau virus, en mettant en évidence son tropisme préférentiel pour les cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires supérieures et la

dérégulation de la réponse innée de l'hôte. Puis, nous avons confirmé l'activité antivirale *in vitro* du remdesivir, alors en évaluations cliniques et proposé de potentialiser son efficacité par une association avec le diltiazem.

Enfin, mes travaux se sont intéressés à la caractérisation du mécanisme d'action du diltiazem sur l'induction des interférons de type III, conférant au médicament un potentiel pan-antiviral. Nos travaux ont ensuite mis en évidence le potentiel synergique du diltiazem en combinaison avec le baloxavir ou le monlupiravir contre plusieurs virus influenza sauvages et porteurs de mutations de résistances aux antiviraux classiques, ainsi que contre plusieurs variants préoccupants du SARS-CoV-2. La démonstration de notre stratégie « *double-target* » soutient ainsi la mise en œuvre de l'essai clinique FLUNEXT en cours et légitime la mise en place d'une nouvelle étude multicentrique de phase IIb DICOV visant à évaluer le bénéfice apporté par un traitement avec du diltiazem en complément du standard de soins pour une pneumopathie hypoxémiante chez les patients COVID-19 hospitalisés, dont le dossier a été récemment autorisé par l'ANSM (28/02/22).

### **L'ouverture de notre stratégie pertinente de repositionnement à d'autres pathogènes respiratoires**

Les résultats précliniques et les perspectives cliniques apportés par ces projets ont renforcé notre intérêt à décliner notre stratégie à d'autres virus respiratoires. Dans cette dynamique, notre équipe a initié un programme de recherche collaboratif international RESPIROMIX visant à étendre la stratégie de criblage transcriptomique à différents virus respiratoires pathogènes, dont hRSV et hMPV.

Afin de perfectionner la prédictivité de la sélection des composés à fort potentiel, des améliorations technologiques ont été apportées à notre processus de génération des signatures transcriptomiques d'infection, notamment par l'utilisation du séquençage NGS et le développement de méthodes plus performantes d'analyse bio-informatique des données Omics. Cette thématique a fait l'objet des travaux de thèse de Claire Nicolas de Lamballerie (Thèse CIFRE n°2015/1354, soutenue en juillet 2020), avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer étroitement<sup>532</sup>.

L'analyse des signatures d'infection par les *Pneumovirus* (hRSV, hMPV A et hMPV B) a été réalisée selon deux méthodes différentes, incluant un paramètre variable sur l'intégration des gènes de l'immunité. La synthèse des résultats d'anti-corrélation et la revue de la littérature ont donné lieu à la génération de trois *short list* de composés candidats comprenant respectivement 75, 49 et 76 molécules, dont 4 communes aux trois souches virales et 11 communes à au moins deux des trois virus. A l'issue d'un premier criblage de 28 molécules prioritaires réalisé en modèle cellulaire à l'aide d'un virus hRSV rapporteur, 5 composés ont été sélectionnés pour la caractérisation de leur efficacité antivirale contre un virus hRSV sauvage en modèle cellulaire puis en modèles d'HAE alvéolaires *SmallAir*<sup>®</sup>. Parmi ces candidats, une molécule particulièrement intéressante est toujours à l'étude au laboratoire pour un potentiel dépôt de brevet relatif à son activité antivirale contre les *Pneumovirus* et avec l'objectif d'une publication.

Plus récemment, nous avons adapté notre stratégie à l'identification de potentiels traitements contre le SARS-CoV-2. 33 molécules candidates ont été évaluées *in vitro* en cellules A549-ACE2 et en HAE MucilAir<sup>®</sup>, en partenariat avec l'équipe du Dr Guy Boivin du CHU de Québec. Les médicaments les plus intéressants font toujours l'objet d'expérimentations.

## L'amélioration de la prédictivité de notre approche

La prédictivité de notre approche est dépendante de la pertinence biologique de nos modèles et supports biologiques, à la fois pour la génération des signatures transcriptomiques d'infection, mais aussi des signatures chemogénomiques.

L'exploitation d'échantillons cliniques en remplacement des lignées cellulaires a constitué un pas dans ce sens. Toutefois, les difficultés d'obtention des prélèvements, ainsi que la qualité et la quantité variables des acides nucléiques issus des échantillons cliniques, nous ont conduit à développer et valider une stratégie complémentaire pour la génération des signatures d'infection à partir d'HAE infectés<sup>741</sup>. La disponibilité, la pertinence biologique et la facilité d'utilisation de ces modèles standardisés et reproductibles en font des supports particulièrement appropriés à l'étude des virus respiratoires, permettant l'analyse de la modulation de l'expression des gènes à la fois au pic de l'infection mais aussi par un suivi en termes de cinétiques virales. C'est d'ailleurs grâce à ces modèles que nous avons pu caractériser très rapidement la modulation de la réponse innée induite par l'infection avec le SARS-CoV-2 dans les tissus respiratoires nasaux et bronchiques, concordante avec les observations cliniques relevées chez les patients infectés<sup>116</sup>.

Concernant les signatures chemogénomiques, notre processus est aujourd'hui dépendant de *Connectivity Map*, qui constitue une limite de notre approche. En effet, les signatures répertoriées dans cette base de données sont générées sur des lignées cellulaires immortalisées, parfois peu pertinentes pour l'étude des pathogènes respiratoires (cellules prostatiques PC3, cellules mammaires MCF7 ou encore des promyéloblastes HL-60) et à des concentrations de traitement standardisées, éloignées des posologies usuelles, et/ou efficaces dans la nouvelle indication antivirale que nous visons.

C'est à partir de ces constatations que la start-up Signia Therapeutics a été créée afin de développer la plateforme de *drug discovery* « SIGNATURA », intégrant (i) une base de données de signatures chemogénomiques issues de modèles HAE, (ii) des méthodologies optimisées d'analyses transcriptomiques et statistiques faisant appel à l'intelligence artificielle et (iii) des modèles physiologiques prédictifs pour le criblage *in silico* et la validation préclinique rapide et pertinente de candidats-médicaments. Sa construction est divisée en plusieurs étapes clés, qui nous permettront au fur et à mesure de gagner en robustesse sur la prédictivité de notre approche. La plateforme a pour vocation d'être enrichie de profils variés de signatures transcriptomiques d'infections, de co-infections et/ou d'autres pathologies (asthme, BPCO, etc.), issues de prélèvements cliniques et d'HAE, en phase aiguë et en suivi longitudinal, ainsi que de multiples signatures chemogénomiques réalisées sur nos modèles d'HAE, plus pertinents du point de vue biologique.

Dans le contexte pandémique, nous avons récemment analysé les signatures transcriptomiques longitudinales de 5 VOC du SARS-CoV-2 en HAE. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence la divergence du variant Delta par rapport à ses prédécesseurs, en particulier par sa cinétique accélérée et sa pathogénicité marquée sur les mécanismes ciliaires. Une étude similaire sur le variant Omicron est en cours (article en préparation).

En parallèle, nous avons initié la caractérisation de la réponse transcriptomique induite par ces variants à partir de prélèvements cliniques issus de la cohorte « *French Covid* » dans le cadre d'un financement obtenu auprès de REACTing et du projet Européen IMI2 CARE coordonné par l'INSERM. La signature transcriptomique de 30 patients inclus dans la cohorte, infectés par différents variants du SARS-CoV-2 avec une grande diversité de profils cliniques (âge, sexe, sévérité, réanimation), a été déterminée au moyen de deux prélèvements nasopharyngés de bonne qualité, réalisés pendant la

phase symptomatique (entre 3 et 7 jours après le diagnostic) et la phase de convalescence (au moins 2 semaines après la fin des symptômes).

L'analyse de ces données transcriptomiques permet des avancées majeures pour la compréhension des mécanismes de l'infection et des conséquences des mutations spécifiques à chaque variant sur la modulation des gènes, pouvant impacter la transmissibilité, la sévérité de la maladie ou encore la sensibilité aux médicaments antiviraux et/ou vaccins. Enfin, l'intégration de ces signatures dans SIGNATURA pourrait faciliter et améliorer l'identification de nouvelles molécules candidates à repositionner contre le SARS-CoV-2.

### **La caractérisation de l'induction des interférons de type III par le diltiazem**

L'analyse des signatures chemogénomiques permet de formuler des hypothèses quant au(x) mode(s) d'action des médicaments. Celle du diltiazem, réalisée en HAE, a mis en évidence son activité immunomodulatrice, avec la stimulation des effecteurs intervenant dans l'induction de interférons et des ISG. Les interférons de types I et III utilisant des effecteurs redondants pour leur induction, il est difficile de discriminer l'activation spécifique des interférons lambda du point de vue mécanistique. Dans cette optique, nous avons développé plusieurs outils pour la mettre en évidence, en modèles cellulaires et HAE.

En premier lieu, nous avons travaillé en modèles cellulaires avec la caractérisation de l'expression des gènes spécifiques impliqués dans la voie des IFN : les IRF 1, 5, 7 et 9, IFNL1 et IFNL2/3 ainsi que leurs ISG cibles Mx1, IFITM1/3 et OAS1 par RT-qPCR, dans des cellules d'origine alvéolaire (A549) ou pulmonaire (Calu-3). Ces travaux ont permis de souligner des différences importantes sur la modulation de l'expression des gènes dans les deux compartiments respiratoires en conditions d'infection, en particulier la cinétique d'induction de l'IFNL1, plus précoce dans les cellules A549 par rapport aux Calu-3, ainsi que des différences d'intensité d'induction des ISG et des IRF, notamment de Mx1 et IRF9, plus importante dans les A549. Par ailleurs, nous avons observé une induction de Mx1, peu intense (*fold change* de 2) mais durable dans le temps, ainsi que d'IRF5 dans les cellules A549 traitées par le diltiazem. En aval de l'expression des gènes, nous avons mis en place des *western blots* permettant de visualiser et quantifier différentes protéines d'intérêt comme IRF7, IRF1, la phosphorylation de p65 et de STAT1. Malheureusement, l'immunomodulation induite par le diltiazem n'a pas pu être détectée par cette méthode.

Ces résultats ne sont donc pas suffisamment robustes pour mettre en évidence les facteurs impliqués dans la modulation des interférons par le diltiazem et soulignent les limites de la pertinence physiologique des modèles de lignées cellulaires. Toutefois, l'induction durable de Mx1 dans les cellules A549 a constitué un élément encourageant. Quant à IRF5, il n'est pas impliqué dans l'induction des interférons. La littérature lui décrit en revanche un rôle important dans le recrutement des macrophages<sup>742,743</sup>. Cette hypothèse ne manquera pas d'être explorée dans le cadre du développement des modèles de co-culture HAE-macrophages en cours au laboratoire.

Face aux limites constatées avec les modèles de lignées cellulaires et au rôle majeur des interférons de type III dans les voies aériennes supérieures, nous avons ensuite focalisé nos essais sur les modèles HAE d'origine nasale. Afin de faciliter et d'améliorer les analyses d'expression des gènes dans ces modèles physiologiques, nous avons fait réaliser une cartouche spécifique pour l'analyse en *nanostripping* (expression des gènes sans étape d'amplification) de 9 gènes impliqués dans la voie des interférons (IFNB1, IFNG, IFNL1, IFNL2-3-4, Mx1, OAS1, IFITM1, IFI44L et IFI27). Par cette méthode, nous avons pu mettre en évidence une induction préférentielle des gènes des IFN-λ par rapport aux

IFN- $\beta$  et  $\gamma$ , ainsi qu'une induction significative des ISG (Mx1, OAS1, IFITM1 et IFI44L), après trois traitements journaliers avec du diltiazem. Ces données ont été confirmées par la sécrétion d'IL-29 au pôle apical des tissus traités par ELISA. Une modulation similaire a été observée avec des HAE d'origine bronchique mais avec une amplitude nettement inférieure, soulignant la prédominance de cette activité dans les voies respiratoires supérieures.

D'autres expérimentations sont nécessaires pour valider la spécificité de ce mécanisme et déterminer si le diltiazem intervient en amont ou en aval de la sécrétion des interférons. En ce sens, nous avons fait l'acquisition d'un modèle murin dépourvu des récepteurs IFNLR1. Le développement d'un modèle similaire HAE a également été envisagé pour étudier ces aspects mécanistiques *in vitro*. Si le diltiazem perd son activité antivirale mais qu'une induction des IFN- $\lambda$  est constatée, nous pourrions valider le mode d'action spécifique du diltiazem sur l'induction d'un effecteur en amont de la sécrétion des IFN. Dans le cas contraire, le médicament pourrait agir en aval de la sécrétion des interférons, sur l'induction des ISG par exemple. L'induction d'IFN serait dans ce cas attribuée à la mise en place d'une boucle de régulation. Une activité antivirale maintenue pourrait également suggérer un autre mode d'action.

### **Les autres modes d'action potentiels du diltiazem**

Les modifications globales sur la cellule apportées par le traitement avec du diltiazem pourraient être portées par plusieurs mécanismes d'action simultanés impliqués dans la réplication virale et potentiellement liés les uns aux autres.

En particulier, la modulation de plusieurs gènes intervenant dans la biosynthèse du cholestérol a été soulignée lors de notre analyse. Les structures lipidiques cellulaires sont impliquées dans plusieurs étapes clés du cycle répliatif de nombreux virus respiratoires et pourraient effectivement constituer une cible thérapeutique d'importance<sup>672,693</sup>. Cette hypothèse a été encouragée par l'observation d'une accumulation du cholestérol dans les membranes cellulaires des cellules A549 traitées avec du diltiazem (marquage florescent à la filipin). Des travaux complémentaires sont envisagés pour approfondir cette piste.

Également, du fait de son indication princeps, il est établi que le diltiazem exerce une activité contre l'hypertension pulmonaire par l'inhibition des canaux calciques des myocytes cardiaques et des cellules des muscles lisses vasculaires<sup>744,745</sup>. La dynamique du calcium étant déterminante pour la pénétration des virus respiratoires utilisant la voie endosomale, plusieurs études décrivent ainsi le potentiel antiviral à large spectre d'inhibiteurs des canaux ioniques de type « *two-pore channels* » (TPC) ou les Mucoïpines (TRPML)<sup>746,747</sup>. A ce jour, l'activité du diltiazem n'a pas été caractérisée sur d'autres dynamiques calciques que celle des muscles cardiaques, aussi la littérature ne permet pas de conclure sur l'impact du médicament sur les endosomes des cellules épithéliales du tractus respiratoire. En revanche, deux études démontrent l'activité antivirale du diltiazem liée à l'inhibition de la sous-unité du canal calcique Cav1.2. En effet l'article de Fujioka et al. attribue l'activité antivirale du diltiazem à la monopolisation de cet effecteur, décrit comme récepteur d'entrée de la HA des virus influenza<sup>692</sup>. Ces propos ont été très récemment enrichis par l'étude de Wang et al. démontrant que l'inhibition de Cav1.2 par le diltiazem altérerait l'ancrage et l'internalisation du SARS Cov-2 en perturbant TMPRSS2 et diminuant l'expression d'ACE2<sup>748</sup>.

Ainsi, l'activité princeps du diltiazem contre l'hypertension semble liée à une activité antivirale dans les étapes très précoces en amont de la réplication virale. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons évalué l'effet antiviral du vérapamil, un médicament exerçant la même activité que le diltiazem

sur l'hypertension, dans les conditions expérimentales validées au laboratoire avec le diltiazem en traitement post infection. Nos résultats n'ont pas indiqué d'activité antivirale significative pour le vérapamil, laissant suggérer d'autres modes d'actions complémentaires pour le diltiazem.

Par exemple, des modifications de la dynamique calcique pourraient impacter l'activité des mitochondries et des peroxysomes en lien avec le phénomène de stress oxydatif. L'activité des interférons lambda étant dépendante de l'abondance des peroxysomes dans les muqueuses respiratoires<sup>442</sup>, le diltiazem pourrait ainsi moduler leur expression via ce mécanisme. Pour explorer cette piste, il serait intéressant de mesurer l'incidence du diltiazem sur l'abondance des peroxysomes dans les différents compartiments respiratoires par des quantifications du gène Pex11B dans les HAE d'origines nasale, pulmonaire et alvéolaire.

### **La légitimité d'un repositionnement du diltiazem contre les virus respiratoires**

Bien que son mécanisme antiviral n'ait pas encore été complètement caractérisé, le diltiazem présente des perspectives pertinentes pour son repositionnement contre les infections respiratoires. Ce médicament est utilisé en cardiologie depuis plus de 25 ans, ainsi ses caractéristiques ADMET et son profil de tolérance sont parfaitement connus.

Son activité immunomodulatrice pourrait permettre une induction plus précoce et abondante des interférons de type III dans les voies aériennes, facilitant la clairance virale et le recrutement des cellules immunitaires, sans activation supplémentaire des effecteurs de l'inflammation. Cette activité est d'autant plus intéressante dans le cas du SARS-CoV-2, dont nous avons démontré les capacités à retarder l'activation de l'immunité innée de l'hôte.

Par ailleurs, l'indication princeps du médicament contre l'hypertension pourrait constituer un atout supplémentaire pour le traitement des cas graves des syndromes de détresse respiratoire, pour lesquels l'emballement de la réponse inflammatoire et la monopolisation d'ACE2 peuvent dérégler la balance de l'angiotensine. Ainsi, de la même manière que les statines ou les inhibiteurs d'ACE, le traitement au diltiazem pourrait réduire la gravité des cas sévères par ses effets immunomodulateur et anti-hypertenseur. Il serait donc intéressant de mener des études observationnelles ou rétrospectives afin de déterminer si les patients sous traitement prescrit au long cours présentent un facteur de risque moins élevé de développer des symptômes sévères liés à une grippe ou une COVID-19.

A ce sujet, un poster présenté par Wang et son équipe au congrès « *Chest annual meeting* » en octobre 2020 fait référence à une étude rétrospective menée sur près de 43 000 patients inclus en soins intensifs dans un centre hospitalier de Boston (Etats-Unis)<sup>749</sup>. D'après la base de données, 302 patients ont reçu un traitement à l'oseltamivir à leur inclusion en soins intensifs pour grippe grave et parmi eux, 36 ont également été traités au diltiazem. Les résultats, bien que non significatifs du point de vue statistique lié au faible échantillon de patients traités, soulignent une légère diminution de la mortalité au sein du service dans le groupe traité par le diltiazem en comparaison du groupe traité à l'oseltamivir seul (11.11 % contre 12.78 %), et ce, bien que les patients traités au diltiazem présentaient des facteurs de comorbidités plus importants. Ainsi, en plus de conforter les perspectives bénéfiques de l'usage du diltiazem comme traitement antiviral, ces données encouragent d'autant plus la poursuite de notre stratégie « *double target* » en combinaison avec les antiviraux classiques dans la lignée de l'essai clinique FLUNEXT en cours.



## **L'utilisation du diltiazem en combinaison pourrait limiter l'apparition d'un phénotype de résistance**

Nos travaux ont démontré les capacités du diltiazem à potentialiser l'activité antivirale des antiviraux classiques. Nous avons émis l'hypothèse que cet effet « *double target* », pourrait également limiter le risque d'émergence de mutations de résistances.

Afin d'explorer ce paramètre, nous avons réalisé une étude *in vitro* sur 10 passages de virus H1N1pdm09 dans différentes conditions de traitements (données non publiées) : (i) sans traitement, (ii) concentration fixe de 25 µM de diltiazem, (iii) concentrations croissantes de 1 à 128 nM de baloxavir et (iv) l'association de 25 µM de diltiazem avec les mêmes concentrations croissantes de baloxavir. A chaque passage, l'inoculum viral a été dilué en cascade selon un facteur de 10 avant l'infection des cellules. La dilution limite, c'est-à-dire la dilution la plus forte pour laquelle une production virale est visible, a été récoltée 48h post infection pour réaliser le passage suivant.

Les bras (i) et (ii) ont subsisté sur les 10 passages et peu de changements ont été observés sur les dilutions récoltées. Le bras (iii) a subsisté jusqu'au 9<sup>ème</sup> passage, avec un gap dans les dilutions récoltées noté entre le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> passage, correspondant au passage de 8 à 16 nM de baloxavir. Le dernier bras (iv) a subsisté jusqu'au 7<sup>ème</sup> passage avec un gap dans les dilutions récoltées entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> passage, correspondant au passage de 4 à 8 nM de baloxavir. De manière observationnelle, le traitement avec la combinaison a démontré une meilleure activité antivirale que les monothérapies et l'association du diltiazem a permis de potentialiser l'efficacité du baloxavir à des concentrations sous-optimales.

Les virus issus du dernier passage réplcatif de chaque bras ont ensuite été caractérisés, par la réalisation des IC50 du baloxavir et une analyse en séquençage. Seul le bras (iii) a vu son IC50 du baloxavir augmentée (x 35), passant de 0.2 à 7 nM sur 8 passages, mettant en évidence l'émergence d'un phénotype de résistance. L'analyse en séquençage a permis d'identifier deux mutations d'intérêt pouvant avoir un lien avec le phénotype de résistance au baloxavir. Ces deux mutations ont été étudiées par la génération de virus H1N1 recombinants par génétique inverse, que nous avons caractérisés par des cinétiques d'infection, des IC50 du baloxavir et la mesure de l'activité de leur polymérase. Cependant, les résultats obtenus n'ont à ce jour pas permis d'établir un lien entre ces mutations et le phénotype de résistance.

Ainsi, bien que la caractérisation des mutations identifiées n'ait pas aboutie, l'utilisation du diltiazem en combinaison a permis de potentialiser l'activité antivirale du baloxavir *in vitro* et n'a été associée ni à l'apparition d'un phénotype de résistance, ni à l'apparition de mutations délétères pour l'efficacité thérapeutique, tels qu'observés avec la monothérapie au baloxavir. Ces résultats confortent l'intérêt de notre stratégie « *double target* » et pourront être enrichis de données *in vivo*.

## **Le développement d'une nouvelle formulation du diltiazem permettant son administration par aérosol**

Au-delà de son action thérapeutique, le repositionnement du diltiazem apparaît toutefois comme peu rémunérateur pour une société pharmaceutique, du fait de son statut de générique et de son faible cout (environ 0,17€/comprimé). Aussi, pour éviter un usage *off label*, l'exploitation de sa nouvelle indication par Signia Therapeutics ne peut être envisagée que par le développement d'un nouveau produit pharmaceutique, sous forme d'une combinaison avec une autre molécule médicamenteuse ou d'une nouvelle formulation adaptée à un autre mode d'administration, par exemple.

Ces éléments nous ont mené vers un nouveau projet de recherche exploratoire visant à déterminer les capacités du diltiazem à induire l'expression des interférons lambda, via une administration locale, par les voies respiratoires. Ce mode de délivrance présente plusieurs avantages, en particulier une activité ciblée et plus rapide, associée à une diminution du risque d'effets secondaires.

Dans cette optique, nous avons mené plusieurs expériences préliminaires. D'abord en modèle HAE, nous avons confirmé qu'un traitement avec du diltiazem en formulation liquide, administré au pôle apical en volume minimal induisait bien une modulation du gène IFNL1. Puis, nous avons validé cette induction *in vivo* par l'administration du traitement par instillation nasale chez la souris. Ces premiers résultats ont ouvert de nouvelles perspectives de repositionnement pour le diltiazem, en proposant son administration par les voies respiratoires pour un traitement à visée prophylactique et/ou thérapeutique sous forme d'aérosol, par nébulisation.

Dans la littérature, quelques études menées entre 1988 et 1993 ont décrit la faisabilité d'administration du diltiazem par aérosol en complément de thérapies contre l'asthme<sup>750-752</sup>. Plusieurs informations importantes en ont été extraites, telles que l'absence d'effets secondaires importants, des concentrations d'usage et la concentration du principe actif dans les tissus pulmonaires.

La nébulisation consiste en la transformation d'une préparation médicamenteuse liquide sous forme d'aérosol, c'est-à-dire une suspension stable de particules liquides dont le diamètre est suffisamment petit pour qu'elles restent en suspension dans un gaz<sup>4</sup>. Plusieurs paramètres physiques sont déterminants pour la délivrance de l'aérosol dans les voies aériennes, notamment la granulométrie des microgouttelettes. Les plus grosses (diamètre > 5 µm) subissent généralement un phénomène d'impaction dans les voies aériennes supérieures, tandis que les gouttelettes d'un diamètre inférieur peuvent sédimenter jusque dans les bronches et bronchioles, mais seules les plus fines (< 3 µm) ont la possibilité d'atteindre les alvéoles<sup>4</sup>. Ces paramètres sont spécifiques de chaque couple dispositif/formulation. Ainsi, le développement clinique d'un médicament par aérosolthérapie doit être mené avec une seule formulation, nébulisée par un dispositif précis, non substituable. Deux types de dispositifs sont couramment utilisés pour la délivrance médicamenteuse. Les nébuliseurs pneumatiques, reposant sur la propulsion d'un gaz (air comprimé ou air mural hospitalier) à travers le liquide sont majoritairement réservés à un usage hospitalier, tandis que les dispositifs portatifs à tamis (ou membrane), fonctionnant grâce à la vibration d'un élément piézo-électrique provoquant le passage de la solution médicamenteuse à travers une membrane poreuse, sont privilégiés pour un usage en médecine de ville.

A partir de ces informations et des données précliniques préliminaires, nous avons travaillé à la faisabilité de l'aérosolisation du diltiazem selon deux axes : (i) l'évaluation de plusieurs dispositifs de nébulisation et (ii) l'activité *in vitro* du diltiazem nébulisé.

Nous avons ainsi initié un programme de développement en collaboration avec le Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR) de Tours, afin d'évaluer la faisabilité d'aérosolisation du diltiazem par différents dispositifs de nébulisation. Dans le cadre de notre étude, nous avons sélectionné un panel de 5 dispositifs à évaluer dont 2 pneumatiques, 3 à tamis et 4 adaptables à la ventilation mécanique. Une formulation du diltiazem à 20 mg/mL en tampon salin a été utilisée pour réaliser les premiers essais de nébulisation. L'analyse des paramètres granulométriques (temps de nébulisation, débit, diamètre des microgouttelettes, volume résiduel), associée à une quantification du diltiazem dans les nébulisats (HPCL en phase inverse réalisée par le LAGEPP – Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique, Université Lyon 1) a conclu à la compatibilité d'une nébulisation du diltiazem avec une administration pulmonaire. L'aérosolisation du

médicament a été validée avec plusieurs dispositifs avec des temps de nébulisation reproductibles et des quantités homogènes de principes actifs mesurées dans les différentes fractions des nébulisats.

Par ailleurs, nous avons investi dans un dispositif Vitrocell Cloud®, permettant la nébulisation calibrée de solutions *in vitro*, afin de caractériser l'effet biologique du diltiazem nébulisé sur les épithéliums respiratoires. Ce système est composé d'une chambre de nébulisation, d'un dispositif de nébulisation à tamis vibrant (Aeroneb pro®) utilisé en clinique, et d'une platine permettant d'accueillir des modèles biologiques. Une microbalance intégrée permet de monitorer et de calibrer la masse de principe actif déposée par cm<sup>2</sup>. Grâce à ce système, nous avons évalué la faisabilité de nébulisation du diltiazem en solution et démontré qu'un traitement de 3 jours par nébulisation journalière du diltiazem permet une induction significative de l'expression endogène d'IFNL1 dans les HAE d'origine nasale.

Ces données très préliminaires nécessitent d'être reproduites et complétées. Cependant, la faisabilité clinique d'aérosolisation du diltiazem par plusieurs dispositifs de nébulisation commercialisés et la démonstration de l'effet modulateur du médicament ouvrent plusieurs possibilités de repositionnement de cette molécule. D'une part, dans la lignée de l'essai clinique FLUNEXT, et avec la perspective du lancement de l'essai DICOV, nous pourrions proposer une délivrance pulmonaire du diltiazem par aérosol comme thérapie antivirale complémentaire au standard de soins. La stimulation directe des interférons lambda dans les muqueuses pulmonaires pourrait permettre d'accélérer la clairance virale, sans accroître un éventuel phénomène inflammatoire. D'autre part, face à l'émergence de variants du SARS-CoV-2 avec une transmissibilité accrue, une stimulation des interférons lambda dans les muqueuses nasales pourrait constituer un atout prophylactique pour limiter le risque d'infection et de transmission, à la suite d'un contact à risque par exemple. Dans cette optique, le repositionnement du diltiazem pourrait évoluer vers une administration au moyen d'un spray nasal.

## **Conclusion**

Le repositionnement de médicaments fait partie des options efficaces pour mettre sur le marché rapidement des médicaments efficaces contre les virus respiratoires. Comme nous avons pu le constater avec les exemples du remdesivir et du molnupiravir, il paraît judicieux de développer des médicaments à large spectre, ciblant par exemple des structures communes et conservées entre les virus respiratoires. Le développement des technologies *in silico* permettant d'améliorer la connaissance des cibles thérapeutiques et de prédire les interactions entre les protéines fournissent une aide précieuse, de plus en plus documentée dans la littérature. Cependant, ces antiviraux classiques restent sujets à l'émergence de mutations de résistances, mettant en péril leur efficacité.

Face à ce constat, cibler la cellule-hôte peut s'avérer être une stratégie payante si elle est correctement maîtrisée. En effet, à la différence des déterminants viraux, les facteurs cellulaires sont hautement conservés et interviennent dans de nombreuses étapes des cycles viraux. Ainsi, cibler l'hôte, par l'induction de l'expression des gènes de l'immunité par exemple, peut conduire à une activité antivirale à large spectre avec un risque limité d'apparition de résistance. En revanche, il est nécessaire de caractériser les différents mécanismes d'action des médicaments pour limiter la survenue des effets secondaires. Dans le cas de repositionnements comme celui du diltiazem, l'usage fréquent et ancien du médicament en cardiologie a permis une parfaite connaissance de son profil pharmacologique, permettant de s'affranchir des essais cliniques de phase I.

En complément de ces stratégies, l'efficacité des antiviraux peut être améliorée par la combinaison synergique de plusieurs médicaments, dirigés contre les déterminants viraux et/ou la

cellule-hôte. Nos travaux à ce sujet et les exemples rapportés dans la littérature donnent des arguments en faveur de l'utilisation de familles de médicaments différentes, ciblant différentes étapes du cycle viral, pour limiter les effets antagonistes et l'émergence de mutations de résistances croisées. Cependant, l'usage clinique de ces combinaisons nécessite une étude détaillée de la compatibilité *in vivo* des médicaments en termes de pharmacocinétique et de toxicité.

Notre approche globale de repositionnement basée sur les signatures transcriptomiques d'infection et de molécules, portée par le développement de la plateforme SIGNATURA permet, dans un processus d'amélioration continue, d'affiner la prédictivité de la sélection des composés candidats antiviraux et d'appréhender les modes d'actions potentiels des médicaments, notamment par l'apport d'outils d'intelligence artificielle et la mise en synergie de modèles précliniques diversifiés et pertinents physiologiquement.

L'innovation *in silico* et la démocratisation des techniques de séquençages ont permis une montée en échelle des technologies de *drug discovery*, mesurable par le nombre d'essais cliniques en cours pour l'évaluation des traitements contre la COVID-19. La puissance des outils informatiques dédiés à la biologie permet la gestion et l'analyse intégrée d'une quantité très importante de données (génomiques, cliniques, environnementales, etc.), favorisant ainsi la découverte de biomarqueurs clés, l'identification de valeurs aberrantes ou encore la création de bras de contrôle synthétiques.

Ces approches technologiques appliquées à l'intégration des données transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques, permettront d'augmenter significativement la pertinence et la puissance statistique des données générées en recherche pré-clinique et clinique, notamment par l'amélioration de nos connaissances des cibles thérapeutiques et donc de la conception des traitements envisagés (ancrage *in silico*, combinaisons de molécules, traitement de cibles multiples, etc.), y compris dans une démarche de traitements personnalisés, et conduiront ainsi à accélérer le transfert en clinique de molécules candidates validées en pré-clinique.

# **ANNEXES**

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de contribuer à d'autres travaux de recherche, en lien avec les thématiques de mon projet, qui se sont également traduits par des publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture.

En premier lieu, j'ai activement contribué à l'écriture de la revue sur les stratégies de repositionnement de médicaments contre les virus influenza **"Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection : Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy"** publiée en 2019 dans *Frontiers in Immunology* dont les auteurs sont Andrés Pizzorno, Blandine Padey, Olivier Terrier et Manuel Rosa-Calatrava.

Cette revue fait état des options thérapeutiques disponibles sur le marché pour le traitement des infections virales à influenza. Elle illustre un arsenal thérapeutique faible, dont l'efficacité est menacée par l'émergence de mutations de résistance et souligne les avantages du repositionnement de médicaments, du point de vue médical, sanitaire et économique. Les différentes approches d'identification et de sélection des candidats-médicaments au repositionnement sont ensuite décrites et classées en fonction de l'état initial des connaissances sur les cibles thérapeutiques associées, mettant en avant les avancées technologiques apportées par les outils *in silico*. Les stratégies présentées s'appuient sur des exemples concrets de repositionnement proposés contre les virus influenza, dont certains sont arrivés en phases avancées d'essais cliniques. Enfin, sur la base des projets menés par notre équipe, la revue met en avant les approches de repositionnement ciblant la cellule-hôte et propose de potentialiser l'efficacité antivirale des traitements par des combinaisons synergiques associant des antiviraux classiques dirigés contre des déterminants viraux et des thérapies ciblant l'hôte, à l'image de la combinaison oseltamivir-diltiazem.

Puis, dans le cadre la thèse de Claire Nicolas de Lamballerie s'inscrivant dans le projet RESPIROMIX, j'ai participé à l'étude **"Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia"**, publiée en 2019 dans *Scientific Reports*, dont les auteurs sont Claire Nicolas de Lamballerie, Andrés Pizzorno, Julia Dubois, Thomas Julien, Blandine Padey, Mendy Bouveret, Aurélien Traversier, Catherine Legras-Lachuer, Bruno Lina, Guy Boivin, Olivier Terrier et Manuel Rosa-Calatrava.

Les difficultés d'exploitation des échantillons cliniques pour la génération des signatures transcriptomiques d'infection, du fait de leur hétérogénéité en termes de quantité et de qualité des acides nucléiques, nous ont amené à étoffer notre stratégie en nous appuyant de manière complémentaire sur le modèle *in vitro* physiologique d'HAE MucilAir®. Cet article décrit la caractérisation des signatures transcriptomiques de plusieurs infections virales (influenza A/B, hRSV, hMPV) dans ce modèle, jumelée à la mesure de paramètres physiologiques tels que la résistance transmembranaire, la dynamique des mouvements ciliaires et le profil de sécrétion de cytokines et chimiokines associées à ces infections *in vitro*. J'ai notamment contribué à la mise au point de ces modèles d'infection et à la détermination des conditions optimales pour la génération des signatures transcriptomiques d'infection. L'étude rapporte des impacts significatifs, communs aux différentes infections, sur la dynamique et la morphogénèse des cils, ainsi que sur l'expression et la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires de l'hôte, biomarqueurs des réponses immunitaires. En parallèle, des modulations plus spécifiques à chaque virus ont pu être identifiées, par la sécrétion de cytokines spécifiques et des profils transcriptomiques distincts. Notre équipe souligne ainsi l'excellente corrélation entre les profils d'expression des gènes et l'induction des cytokines, en lien avec les paramètres décrits dans la littérature, confirmant la pertinence biologique du modèle HAE pour l'étude des virus respiratoires et la génération des signatures transcriptomiques d'infection.

Plus récemment et dans la continuité de nos travaux sur la caractérisation du SARS-CoV-2 en modèles précliniques, notre équipe a réalisé une étude détaillée du potentiel synergique de l'association diltiazem-remdesivir, publiée dans *Antiviral Research* en juillet 2020 ***"In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2"***, dont les auteurs sont Andrés Pizzorno, Blandine Padey, Julia Dubois, Thomas Julien, Aurélien Traversier, Victoria Dulière, Pauline Brun, Bruno Lina, Manuel Rosa-Calatrava et Olivier Terrier.

Nous avons évalué *in vitro* plusieurs candidats à un repositionnement contre le SARS-CoV-2 avec des propriétés antivirales *in vitro* et/ou *in vivo* déjà décrites : le favipiravir, la ribavirine, l'umifenovir, le remdesivir, le lopinavir, la chloroquine, la berberine, la cyclosporine A et le diltiazem. Certaines de ces molécules faisaient l'objet d'études cliniques. Après avoir déterminé leurs IC50 et index de sélectivité en cellules Vero E6, mettant ainsi en évidence le potentiel antiviral du remdesivir et de la chloroquine en monothérapies, nous avons évalué l'association du remdesivir avec deux médicaments ciblant la cellule-hôte, la berberine et le diltiazem. Bien que les deux bithérapies aient présenté un bénéfice thérapeutique dans des conditions déterminées, les cartes de synergies réalisées via le logiciel *Synergy finder* ont démontré deux profils opposés. En effet, un antagonisme fort a été calculé pour la combinaison du remdesivir et de la berbérine tandis qu'une synergie a été observée entre le diltiazem et le remdesivir, permettant d'augmenter l'index de sélectivité de ce dernier. Ces résultats ont notamment permis de démontrer la pertinence de notre approche *double target* contre le SARS-CoV-2 et d'initier nos travaux sur les combinaisons du diltiazem avec le molnupiravir.

Enfin, en lien avec nos travaux sur la modulation des voies des interférons dans les muqueuses respiratoires dans le contexte d'une infection par le SARS-CoV-2, j'ai pu contribuer à l'étude ***"Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs"***, publiée en 2021 dans *Journal of Experimental Medicine*, dont les auteurs sont Jonathan Lopez, Marine Mommert, William Mouton, Andrés Pizzorno, Karen Brengel-Pesce, Mehdi Mezidi, Marine Villard, Bruno Lina, Jean-Christophe Richard, Jean-Baptiste Fassier, Valérie Cheynet, Blandine Padey, Victoria Dulière, Thomas Julien, Stéphane Paul, Paul Bastard, Alexandre Belot, Antonin Bal, Jean-Laurent Casanova, Manuel Rosa-Calatrava, Florence Morfin, Thierry Walzer et Sophie Trouillet-Assant.

Cette étude s'appuie sur des constatations cliniques décrivant un taux plasmatique anormalement bas d'interféron alpha chez certains patients atteints de COVID-19 sévère. Un défaut d'expression génétique peut être à l'origine de ce phénomène mais des auto-anticorps peuvent également être mis en cause. L'article présente une étude comparative de la signature transcriptomique des réponses interférons de types I et III dans les muqueuses nasales, associée à la charge virale et au dosage sérique des auto-anticorps anti-IFN- $\alpha$  chez des patients présentant des symptômes modérés ou sévères. La présence d'auto-anticorps chez des patients sévères a ainsi été associée à une faible modulation des signatures interférons, notamment une expression anormalement basse d'IFI44L et à une charge virale plus élevée. Afin de vérifier la spécificité de ces auto-anticorps sur les interférons de type I, j'ai participé à la mise au point d'un modèle fonctionnel d'HAE permettant la démonstration de ce phénomène *in vitro*. Nous avons ainsi observé que les interférons alpha étaient associés à une induction significative d'IFI44L dans les épithéliums respiratoires et que les auto-anticorps plasmatiques de ces patients inhibaient spécifiquement l'activité antivirale des interférons recombinants alpha et oméga dans des conditions d'infection par le SARS-CoV-2. L'activité des interférons lambda n'étant pas impactée, l'étude souligne également le rôle majeur des interférons de type I dans la protection des voies aériennes.

# 1. “Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection : Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy”



## Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy

Andrés Pizzorno, Blandine Padey, Olivier Terrier<sup>\*\*</sup> and Manuel Rosa-Calatrava<sup>\*\*</sup>

Virologie et Pathologie Humaine–VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Cynthia Calzas,  
Institut National de la Recherche  
Agronomique (INRA), France

#### Reviewed by:

Michael Schotsaert,  
Icahn School of Medicine at Mount  
Sinai, United States  
Randy A. Albrecht,  
Icahn School of Medicine at Mount  
Sinai, United States

#### \*Correspondence:

Olivier Terrier  
olivier.terrier@univ-lyon1.fr  
Manuel Rosa-Calatrava  
manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr

<sup>†</sup>These authors share co-last  
authorship

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 07 November 2018

Accepted: 27 February 2019

Published: 19 March 2019

#### Citation:

Pizzorno A, Padey B, Terrier O and  
Rosa-Calatrava M (2019) Drug  
Repurposing Approaches for the  
Treatment of Influenza Viral Infection:  
Reviving Old Drugs to Fight Against a  
Long-Lived Enemy.  
Front. Immunol. 10:531.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00531

Influenza viruses still constitute a real public health problem today. To cope with the emergence of new circulating strains, but also the emergence of resistant strains to classic antivirals, it is necessary to develop new antiviral approaches. This review summarizes the state-of-the-art of current antiviral options against influenza infection, with a particular focus on the recent advances of anti-influenza drug repurposing strategies and their potential therapeutic, regulatory and economic benefits. The review will illustrate the multiple ways to reposition molecules for the treatment of influenza, from adventitious discovery to *in silico*-based screening. These novel antiviral molecules, many of which targeting the host cell, in combination with conventional antiviral agents targeting the virus, will ideally enter the clinics and reinforce the therapeutic arsenal to combat influenza virus infections.

**Keywords:** influenza virus, antivirals, antiviral resistance, drug repurposing, drug repositioning, drug discovery, drug combination, transcriptional profiling

### INFLUENZA VIRUSES, A LONG-LIVED THREAT FOR POPULATIONS

“A piece of bad news wrapped up in a protein,” definition of a virus by Sir Peter Medawar.

Despite its apparent blandness for the collective mindset of an important portion of the society, the intrinsic morbidity and mortality as well as the related deaths because of bacterial superinfections or exacerbation of chronic illnesses, make of influenza infections a major and recurrent global public health concern. Indeed, human influenza type A and B viruses are responsible for annual flu epidemics marked by up to 1 billion infections, 3–5 million severe cases and 300,000–650,000 deaths worldwide, with an huge economic burden in terms of medical visits, hospitalizations, work/school absenteeism. and productivity loss (1–3). As members of the *Orthomyxoviridae* family, influenza viruses (type A, B, C, or D) are enveloped viruses harboring a negative-sense single-stranded RNA segmented genome. In such segmented nature of the viral genome resides the capacity of influenza viruses to form new reassortant strains following the concomitant infection of a host with more than one strain of human, and/or animal origin, a phenomenon so far observed only among type A influenza viruses [reviewed in (4)]. Owing to viral reassortment, the genetic baggage of progeny viruses does not exactly match that of one of the “parental” strains but a combination of both. Depending on the specific combination of genetic segments, and notably in the case of a human influenza strain acquiring the Hemagglutinin (HA) and/or Neuraminidase



(NA) major surface antigens from animal origin, reassortment events can result in an *antigenic shift*, defined as the generation of a new virus with antigenic properties drastically different from those of the circulating strains. Should this new variant be sufficiently antigenically different to escape the repertoire of pre-existing immunity in the population, it might rapidly disseminate and replace the circulating strains, hence triggering a global influenza pandemic. Although relatively rare—three veritable pandemics occurred during the 20th Century and one so far in the twenty-first century—the outbreak of pandemics is a quite unpredictable event that might entail potentially devastating effects [reviewed in (5)], particularly considering the contemporary state of affairs regarding global transportation and trade, migration, and the narrowing interface between rural and overcrowded urban areas.

Influenza vaccination constitutes the most effective strategy to prevent seasonal flu and its clinical complications, mainly among high-risk populations such as very young children, the elderly, pregnant women, immunocompromised patients as well as people with obesity, diabetes, or cardiorespiratory comorbidities (6, 7). Nevertheless, current flu vaccination still presents several limitations that make it fall short of expectations in terms of effectiveness. The short duration of vaccine-induced immunity coupled with the intrinsic *antigenic drift* of influenza viruses resulting from the gradual accumulation of point mutations in the antigenic sites of the HA (and to a lesser extent the NA) surface protein underscore the need of the annual reformulation of vaccine composition. Moreover, the length of the current vaccine manufacturing process (at least 6 months to produce sufficiently large vaccine quantities) demands continual strain selection to be done approximately 8 months before the next flu season (6, 8). Should an antigenic drift occur during this time window, the possibility of a mismatch between the vaccine composition and circulating strains might negatively affect protection. Even in the absence of seasonal mismatches or the emergence of pandemic strains, insufficient vaccine coverage and suboptimal uptake in specific target groups (i.e., the elderly or the immunocompromised) also compromise vaccine effectiveness. Furthermore, despite the recent progress made in the pursue of the “Holy Grail” of a universal influenza vaccine that can provide broader, long-lasting protection against both matching, and antigenically diverse influenza strains (9, 10), their clinical effectiveness remains to be evaluated, hence highlighting the need of complementary therapeutic approaches to manage influenza infections.

Besides vaccination, antiviral drugs represent the other pillar for the control of seasonal influenza epidemics and play a central role as major prophylactic and therapeutic agents in the event of a pandemic outbreak. In that regard, this review summarizes the state-of-the-art of current antiviral options against influenza infection, with a particular focus on the recent advances of anti-influenza drug repurposing strategies and their potential therapeutic, regulatory and economic benefits. This review presents examples of the multiple ways to reposition molecules for the treatment of influenza, from adventitious discovery to *in silico*-based screening. These novel antiviral candidates, many of which target the host cell, could also be used in combination

with conventional virus-targeted antiviral agents in order to reinforce our very limited therapeutic arsenal against influenza virus infections.

## CURRENT ANTIVIRAL OPTIONS FOR TREATING INFLUENZA INFECTIONS

As mentioned above, antivirals are key players in pandemic preparedness programs, being the first choice for the treatment of infected patients as well as for preventive post-exposure prophylaxis of those potentially exposed to the new virus, especially during the initial pandemic period in which no vaccine is available. Antivirals are as well important in the normal seasonal setting. Although their use is mostly focused on the treatment of severely ill patients and the immunocompromised, some countries, including the USA and Japan, regularly resort to antivirals for the management of uncomplicated influenza in otherwise healthy patients (11, 12). To date, only two classes of antiviral agents are globally approved and available for the treatment of influenza infections: M2 ion-channel blockers and neuraminidase (NA) inhibitors. The first class includes adamantane derivatives, amantadine and rimantadine, which inhibit proton conductivity of the M2 ion channel of influenza A viruses hence preventing the viral uncoating step of the viral replication cycle. Nevertheless, although quite efficient in their early days, widespread dissemination of the S31N (and to a much lesser extent V27A) M2 resistance mutation in post-2006 H3N2 and post-2009 H1N1 circulating strains prompted the WHO to remove both amantadine and rimantadine from the list of recommended anti-influenza agents for clinical use, in 2009 (6). As a result, NA inhibitors stand as the only influenza antivirals currently recommended by the WHO (13).

NA inhibitors are competitive analogs of sialic acid, the preferred influenza receptor on the host cell's surface. By binding to the broadly conserved active site of the NA, NA inhibitors interfere with the sialidase enzymatic activity of the viral protein, which is essential for the release of newly formed progeny viruses from the infected cell, hence preventing the spread of infection to the rest of the respiratory tissue (14). Three NA inhibitors are currently licensed worldwide for the treatment of influenza A and B infections: oseltamivir, zanamivir, and peramivir. Oral oseltamivir (administered as its prodrug oseltamivir phosphate) is the most largely used of the three, whereas inhaled zanamivir is not recommended for very young children nor for individuals with underlying respiratory conditions, and intravenous peramivir is prioritized in hospitalized patients that cannot receive oral treatment (15). Additionally, inhaled laninamivir, a single-dose long lasting NA inhibitor, is approved in Japan for the prevention and treatment of influenza A and B in both adult and pediatric patients (16). It is important to note that some degree of skepticism is still present regarding the real efficacy of NA inhibitors, notably following the 2014's Cochrane clinical meta-analysis that reported only a minimal shortening of influenza symptoms in children and adults with uncomplicated influenza but not in hospitalized patients (17). Nevertheless, actual evidence-based consensus points to

a moderate efficacy of NA inhibitor treatment in reducing symptom duration, pneumonia, hospitalization and mortality, especially when administered within 48 h from symptom onset (18, 19). Conversely, delayed treatment initiation is associated with compromised efficacy but may yet be beneficial in at-risk patients. Moreover, the emergence of NA inhibitor-resistant virus variants is a matter of concern, with particularly higher frequencies among children and the immunocompromised (20). The H275Y NA substitution is the main mutation responsible for both oseltamivir and peramivir resistance in H1N1 viruses while R292K and E119V are the most commonly reported in H3N2 viruses, these latter two also conferring reduced susceptibility to zanamivir and laninamivir (17, 21). Even if nowadays the prevalence of drug-resistance in circulating strains is quite low ( $\leq 1\%$ ), evidence from pre-2009 seasonal strains has proved that, given the appropriate conditions, resistance could rapidly disseminate to attain a prevalence of 90–100% (17, 21). In that regard, the relatively recent detection of localized clusters of NA inhibitor-resistant H1N1pdm09 viruses harboring the H274Y mutation combined or not with I222R/V NA substitutions (22, 23) strengthens the importance of continuous surveillance.

In addition to M2 ion channel blockers and NA inhibitors, two small molecules that target the viral RNA-dependent RNA polymerase, favipiravir and baloxavir marboxil, are undergoing clinical evaluation in the US and Europe but already obtained approval by Japanese Health authorities. Favipiravir is a nucleoside analog that acts as a competitive inhibitor of viral polymerase substrate, approved since 2014 for the treatment of influenza infections with newly emerging strains and/or resistant to other antiviral agents. However, despite the apparent high threshold for drug resistance (24) and broad-spectrum antiviral potential notably validated in the context of recent Ebola virus outbreaks (25), recent results of Phase II/III randomized trials on its therapeutic efficacy against uncomplicated influenza were not completely conclusive (26). Baloxavir marboxil is a selective inhibitor of the cap-dependent endonuclease activity of the influenza viral PA polymerase subunit (27), therefore interfering with the cap-snatching activity of the viral polymerase complex. In that regard, a very recent report disclosed for the first time the results of two randomized (Phases II and III) clinical trials evaluating the efficacy of a single-dose oral treatment with baloxavir marboxil in otherwise healthy outpatients with acute uncomplicated influenza, compared with placebo and a regular 5-day treatment with oseltamivir (28). Overall, baloxavir marboxil and oseltamivir moderately reduced the time to symptom alleviation compared to placebo, while the former outperformed the two others in reducing viral loads. These results prompted the US Food and Drug Administration (FDA) to approve Xofluza<sup>®</sup> (baloxavir marboxil) for the treatment of acute uncomplicated influenza in patients 12 years of age and older who have been symptomatic for no more than 48 h (29). Nevertheless, this first antiviral flu treatment with a novel mechanism of action approved by the FDA in nearly 20 years does not seem to escape the problem of all other virus-targeted anti-influenza agents. The emergence of virus variants (mostly due to the I38T/M PA amino acid substitutions) conferring significant levels of reduced susceptibility to baloxavir marboxil

was observed in up to 9.7% of the patients receiving the drug (28, 30).

Overall, **Table 1** summarizes the main characteristics of the abovementioned currently available antiviral options for influenza. Such limited therapeutic arsenal coupled with the recurrent risk of emerging drug-resistance highlights the obvious unmet need of novel approaches to complement existing therapies with new anti-influenza drugs.

## WHAT IS DRUG REPURPOSING?

*“The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug,”* famously stated the 1998 Nobel Prize in Physiology and Medicine Laureate, Sir James Black.

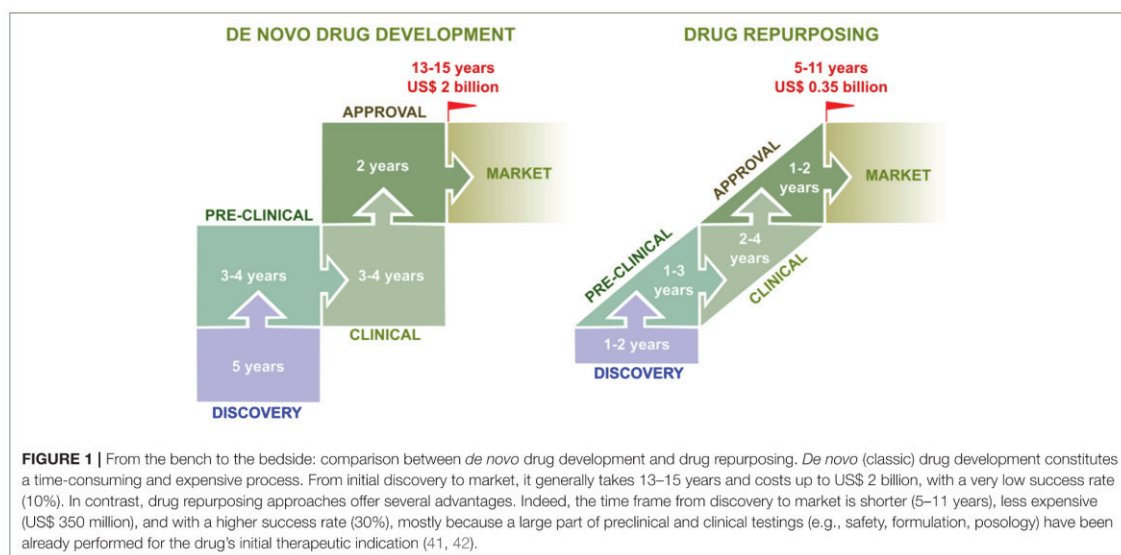
Despite the enormous scientific and technological advances that the field of biomedical research has witnessed in the last 20–30 years, this scenario failed to efficiently translate into significant improvement on the success rate of the classic “from the bench to the bedside” target-centered, mechanistically biased *de novo* drug discovery process (38). Indeed, with an almost unchanged total number of 25–30 novel molecules out of the approximately 50 new drugs yearly approved by the FDA (39), biopharmaceutical experts estimate that only 12% of drug candidates that make it into Phase I clinical trials receive the final green light (40). In other words, of 5,000–10,000 compounds that come from classic drug discovery, only one is likely to be approved. The causes of this phenomenon are multifactorial, including the targeting of more intricate diseases, limitations of reductionist experimental models to reproduce biological complexity, increased regulatory stringency, tolerability issues, and unexpected side effects. Altogether, the total R&D process leading to the introduction of a new drug in the market demands on average 13–15 years and between US\$ 1.5 and 2.6 billion (40–42).

In this context, drug repurposing stands as a worthwhile attractive alternative to fill part of this so-called innovation gap. Drug repurposing, also termed drug repositioning, defines the process of identifying and validating a new therapeutic indication for an existing or developmental drug (38, 42, 43). The basis of drug repurposing relies on bypassing long, risky and expensive preclinical and early clinical evaluation stages by focusing on available extensive human clinical, pharmacokinetics and safety data as the starting point for further development (**Figure 1**). An extended definition could also include not only already marketed drugs but also “sleeping” candidates that have seen their development abandoned in advanced phases of clinical evaluation (e.g., Phase II/III trials) due to non-satisfactory efficacy for their first intended medical use, which might find a second life in a novel therapeutic indication. Noteworthy, repurposing arguably accounts for 30% of the new drug products approved by the FDA (44).

In practice, the concept of drug repurposing represents a broad term encompassing many different, though not mutually exclusive, experimental approaches to recognize potential new applications outside the scope of the original medical indication (42), including:

**TABLE 1** | Currently approved drugs for the treatment of influenza viral infections.

International non-proprietary name	Pharmaceutical brand names (examples)	Antiviral class	Antiviral activity	Clinical indication	Resistance reported	Discovery/Reference
Amantadine hydrochloride	Mantadix Symmetrel Symadine Osmolex ER	M2 ion-channel blockers	Blocks influenza virus uncoating and entry into host cell	High risk old adults and children Prophylaxis Or treatment 24/48 post symptoms appearance	YES	1963 (31)
Rimantadine hydrochloride	Roflual Flumandine					1969 (32)
Oseltamivir phosphate	Tamiflu	NA inhibitors	Sialic acid structural analog, competitive inhibitor of the influenza viral neuraminidase substrate	Children, adolescent and adults 48 h from symptom onset	YES	1998 (33)
Zanamivir	Relenza			Children and adults ≥5 years (prophylaxis) ≥7 years (treatment) 48 h from symptom onset		1993 (34)
Peramivir	Rapivab Peramiflu Rapiacta			Children, adolescent and adults intravenous peramivir is prioritized in hospitalized patients that cannot receive oral treatment 48 h from symptom onset		2000 (35)
Laninamivir octanoate	Inavir			Children and adults inhaled laninamivir Prevention adults and pediatric patients		2000 (36)
Favipiravir	Avigan	Polymerase inhibitor	Nucleoside analog, competitive inhibitor of viral RNA-dependent RNA polymerase substrate	Limited to cases in which other influenza antiviral drugs are ineffective or not sufficiently effective	YES	2002 (37)
Baloxavir marboxil	Xofluza		Selective inhibitor of the cap-dependent endonuclease activity of the influenza viral PA polymerase subunit	Treatment of acute uncomplicated influenza in patients 12 years of age and older who have been symptomatic for no more than 48 h		2018 (27)



## Serendipitous Observations

Some of the best-known success stories of drug repurposing have their starting point on serendipitous observations recorded in the context of either preclinical models of disease or pre-/post-approval clinical trials, leading to a subsequent rationalized evaluation and validation of the new treatment potential (41). Thalidomide and sildenafil are two examples of such key observations. The first one was initially introduced as an anti-nausea for pregnant women but had to be rapidly removed from the market due to its teratogenicity. Further research enabled this molecule as well as some derivatives to be repurposed for the treatment of leprosy and multiple myeloma (45). Sildenafil, on the other hand, never reached the market for its originally intended use in the treatment of hypertension but the observed side-effects on erectile dysfunction ended in its approval in under the commercial name of Viagra®. More recently, sildenafil found a third life under the commercial brand of Revatio® for the treatment of pulmonary hypertension (46).

## Target-Based Repurposing

Although serendipitous observation has historically proved its usefulness, the intrinsic necessity of the casual observation of an unintended and usually infrequent second benefit poses a significant hurdle for exploiting the full potential of drug repurposing, for which more controlled, systematic methodologies are needed. Target-based repurposing relies on having previous knowledge of the specific molecular or cellular determinant/function target recognized by the drug intended to be repurposed. If new research finds out that target is plays an important role in a condition or disease other than the original indication, there is a potential for repurposing. Of note, the target might but not necessarily has to play the same role in both conditions. For example, in the case of the previously mentioned favipiravir, the drug plays the same role as viral RNA polymerase inhibitor against both influenza and Ebola viruses. On the other hand, the Abelson tyrosine-protein kinase 2 (Abl2), target of the anticancer drug imatinib, has been found to be required for efficient fusion and release of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) pseudovirions into the cytoplasm of the infected cell, a key step for viral replication (47).

An alternative scenario of target-based repurposing can happen when a particular drug of known mechanism of action is found to have a new molecular/cellular target, and this previously unrecognized second target is associated with a different disease. The molecule is therefore said to present *polypharmacology*-related features, meaning the capacity to act on multiple targets (48, 49). Polypharmacological phenomena includes both a single drug acting on multiple targets of a unique disease pathway, or a single drug acting on multiple targets pertaining to multiple disease pathways (50). In fact, polypharmacology is usually responsible for treatment toxicity or other undesirable adverse events, but some of these “side-effects” might also lead to drug repurposing, as further exemplified in the next sections. During the last decade, an increasing number of studies converged on proposing that many drugs, initially designed for a unique

therapeutics target, are in fact expected to hit on average between 6 and 13 different targets (51, 52).

## Phenotypic Screening

One major limitation of the target-based drug repurposing model relies on its dependence on the existing scientific knowledge of the drug/disease mechanism(s) of action/pathology as well as on potential alternative targets, which is usually incomplete. In other words, we cannot fully anticipate the repurposing potential of a drug unless we have characterized its molecular/cellular target(s), or if we do not know that a given drug target plays an important role on a particular disease. Phenotypic screening of bioactive molecule libraries in different experimental cell-based or *in vivo* disease models without the need of *a priori* knowledge or consideration of the target and/or mechanism of action the candidate was designed to modulate can provide valuable contribution to overcome this constraint (53). Indeed, despite this approach has been questioned due to the fact that the expected altered phenotype readout as a surrogate of an exploitable biological effect induced by the drug candidate might account for an important number of false positive “hits,” it is nonetheless true that the contribution of high-throughput phenotypic screening to first-in-class small molecule drug discovery exceeded that of target-based approaches (54, 55). In that regard, many well-annotated collections of small-molecule libraries could be readily made available through different collaborative and/or commercial partnerships in order to accelerate drug repurposing through hypothesis biased or unbiased phenotypic screening [reviewed in (54–57)].

## *In silico*-Assisted Repurposing

With the advent of big data and systems biology, computer-based approaches are gaining increasing acceptance in the field of drug discovery, and drug repurposing is not an exception. Besides the inclusion of constantly emerging “omics” (e.g., transcriptomic, proteomic, metabolomic) data to expand our current knowledge of drug/disease-associated mechanisms, *in silico* data mining and modeling tools have pushed our capacity to analyze data to the next level (58–60). These *in silico* methods include the screening of chemical, biological, and text databases, analysis of quantitative structure-activity relationships, pharmacophores, homology models, and other molecular modeling approaches as well as network analysis of biological functions, machine learning and almost any other analysis tools that include using a computer (61–64). In that regard, proper mining of biological, chemical and clinical datasets, has proved effective in unveiling novel relationships (65, 66). Moreover, another level of complexity can be added by combining, for example, epidemiologic information obtained in-house and/or from publicly available literature databases with *in vitro* experimental molecule screenings with the aim to identify novel indications, as in the case of digoxin and prostate cancer (67, 68). Indeed, the real power of computer-assisted drug repurposing resides on adopting an integrative strategy that combines the predictive and analytic capacity of *in silico* tools with some of the target biased or unbiased experimental evaluation/validation methods previously mentioned. This “systems pharmacology” approach

(69–71) across the boundaries of traditional disciplines would put researchers in a better-informed position to design more comprehensive repurposing strategies with more effective predictive capacity and, hopefully, improved candidate success rates.

## THE EMERGENCE OF DRUG REPURPOSING APPROACHES IN THE FIELD OF ANTIVIRAL DRUG DISCOVERY

These last 10 years, there has been a remarkable growing interest for drug repurposing in the field of antiviral drug discovery, fueled by the incontestable reality of many known viral infections still lacking specific treatment. This interest is inversely correlated with the very low number of classic antiviral molecules that have been market-approved these last 5 years, mostly for the treatment of hepatitis C virus or HIV-related pathologies (72). The best example of antiviral drug repurposing approaches are emerging viruses such as Ebola, Zika virus or MERS-CoV, for which there is an urgent and cost-effective need for therapeutics solutions. Indeed, to rapidly propose a solution in the context of a viral outbreak, one interesting approach consists to look at the available pharmacopeia used to treat pathogens. For example, chloroquine, a major antimalarial drug, has been proposed for the treatment of filoviral infections, and more largely for the treatment of other emerging pathogens, as it targets endosomal acidification, a pivotal step in the replication cycle of a large number of viruses (73, 74). Another interesting illustration is the previously cited example of favipiravir, which proved its repurposing potential for the treatment of Zika or Ebola viral infections (25, 43, 75).

## DRUG REPURPOSING FOR INFLUENZA VIRAL INFECTION

As mentioned before, the intrinsic ever-evolving nature of the virus, high transmissibility, host promiscuity, suboptimal vaccine efficacy, limited antiviral arsenal, and zoonotic, and pandemic potential are more than convincing factors to consider influenza viruses as attractive targets for drug repurposing. Despite many interesting omics-based approaches (76) or high-throughput screening of specific drug libraries, such as kinase inhibitors (77), no anti-influenza agent issued from drug repurposing has yet reached regulatory market approval. However, advances made during the last years forecast optimism. The following selected examples constitute a very good illustration of the diversity and capabilities of drug repurposing strategies for influenza infection. An exhaustive list of anti-influenza candidates issued from drug repurposing approaches is presented in **Table 2**.

The case of statins is arguably the best-known example of anti-influenza repurposing issued from clinical observations. In the early 2000s, clinicians observed that besides the cardioprotective activity of statins, these hydroxyl methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors approved for their use as cholesterol metabolism regulators could have pleiotropic anti-inflammatory and immunomodulatory effects, which could be of

benefit to improve survival of patients with severe influenza (78–80). Although many mouse and observational studies account for the protective role of statins in pneumonia, most *in vivo* studies reported so far failed to clearly demonstrate such a beneficial effect in the specific context of influenza infection (99–102). On the other hand, a few but not all observational studies highlighted an association between statin treatment with up to 41% reduction of 30-day all-cause mortality in patients hospitalized with laboratory-confirmed seasonal influenza (103–105). A randomized placebo-controlled Phase II clinical trial (NCT02056340) aimed at evaluating the potential effect of atorvastatin to reduce the severity of illness in influenza-infected patients is currently undergoing.

Nitazoxanide is another illustration of a serendipitous repurposing approach, and probably one of the most promising examples. Nitazoxanide is a thiazolide anti-infective initially licensed for the treatment of parasitic infections, for which anti-influenza properties were first documented by Rossignol et al. (81). Interestingly, the proposed mode of action of nitazoxanide toward influenza is clearly distinct to that for which it was designed in its initial indication, acting at the post-translational level by selectively blocking the maturation of the viral glycoprotein HA, with a consecutive impact on its intracellular trafficking and insertion into the host plasma membrane (81, 106). This drug presents potent antiviral activity against a large panel of circulating strains (82). The effectiveness of nitazoxanide in treating patients with non-complicated influenza was successful in a Phase IIB/III trial (107) and is currently being assessed in a Phase III clinical trial (NCT01610245).

BAY81-8781/LASAG (D, L-Lysine acetylsalicylate-glycine), a modified version of the anti-inflammatory drug acetylsalicylic acid (ASA) licensed for intravenous and inhalation delivery, is currently investigated as an anti-influenza treatment as a result of a mixed serendipitous and target-based repurposing strategy. It was initially shown that ASA had interesting antiviral effects against influenza viruses *in vitro* and *in vivo* via the inhibition of the NF- $\kappa$ B activating kinase I $\kappa$ B, which negatively impacts influenza vRNP transport and release of infectious viral particles (108–110). However, due to the pharmacokinetic limitations of ASA, the LASAG modified version with improved stability and tolerability was developed. Like ASA, this molecule also demonstrates antiviral activity against several human and avian influenza viruses *in vitro*. In a mouse infection model, inhalation of LASAG resulted in reduced lung viral titers and protection of mice from lethal infection (85). More recently, a Phase II proof-of-concept study comparing LASAG *versus* placebo in patients with severe influenza (all patients receiving Tamiflu as standard of care treatment) demonstrated that aerosolized LASAG improved the time to symptom alleviation compared to placebo, despite the absence of a statistically significant reduction of viral load in LASAG-treated group (86).

Naproxen constitutes a nice example of *in-silico* & target-based strategy for the identification of new antivirals. Lejal et al. used a structure-based modeling approach to identify drugs of interest directed against the nucleoprotein (NP) of influenza A virus, using the X-ray structure of the RNA-free NP of H1N1 as prototype. An *in-silico* screening, focused of a defined specific

**TABLE 2 |** Drug repurposing approaches for the treatment of influenza viral infections.

Name	Initial indication	Initial activity	Repurposing approach	Anti-influenza activity	Status	References
Statins (i.e., Atorvastatin)	Cholesterol modulators	HMG-CoA reductase inhibitor	Serendipity	Immunomodulator	Phase II (NCT02056340)	(78–80)
Nitazoxanide	Anti-parasitic Chronic hepatitis	Inhibition of the pyruvate: ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase cycle		HA maturation & transport inhibition	Phase III (NCT03336619)	(81, 82)
PPAR antagonists (i.e., Gemfibrozil)	Anti-hyperlipidemic	Hepatic gluco-genesis inhibitor	Serendipity & Phenotypic screening	Immunomodulator	Preclinical	(83, 84)
LASAG (BAY81-87981)	Anti-inflammatory	NF-κB inhibitor	Serendipity & Target-based	NF-κB inhibition	Phase II (2012-004072-19)	(85, 86)
Celecoxib	Anti-inflammatory	COX-2 inhibitor	Target-based	Immunomodulator	Phase III (NCT02108366)	(87, 88)
Etanercept	Anti-inflammatory Rheumatoid arthritis	Anti-TNF-α agent		Immunomodulator	Preclinical	(89)
Metformin	Approved Type 2 diabetes drug	Hepatic gluco-genesis inhibitor	Phenotypic screening	Immunomodulator Autophagy induction	Preclinical	(78, 83)
Gemcitabine	Approved anti-cancer drug	Ribonucleotide reductase inhibitor		Immunomodulator	Preclinical	(90)
Dapivirine	Phase III anti-HIV drug	Reverse transcriptase inhibitor		vRNP transport inhibition	Preclinical	(91)
Trametinib	Approved anti-cancer drug	MEK1/2 inhibitor		vRNP transport inhibition	Preclinical	(92)
Lisinopril	Approved anti-hypertensive drug	peptidyl dipeptidase inhibitor	<i>In-silico</i> assisted, target-based screening	NA inhibitor	Preclinical	(93)
Naproxen	Approved NSAID Phase I anticancer	COX-2 inhibitor		NP-RNA binding inhibitor	Phase II (SRCTN11273879)	(94)
Nalidixic acid	Approved antibiotic	Bacterial DNA replication inhibitor		NA inhibitor	Preclinical	(95)
Dorzolamide	Approved anti-glaucoma drug	Carbonic anhydrase inhibitor		NA inhibitor	Preclinical	(95)
Ruxolitinib	Approved for myelofibrosis treatment	JAK inhibitor		Virion formation & vRNA incorporation inhibition	Preclinical	(96)
Midodrine	Approved anti-hypertensive drug	Adrenergic alpha agonist	<i>In-silico</i> assisted, phenotypic screening	Immunomodulator	Phase II (NCT01546506)	(97)
Diltiazem	Approved anti-hypertensive drug	Ca <sup>2+</sup> channel inhibitor		Immunomodulator	Phase II (NCT03212716)	(98)

site of NP structure, has identified naproxen, a known inhibitor of inducible cyclooxygenase type 2 (COX-2) commonly used as non-steroidal anti-inflammatory drug. This identified molecule has shown antiviral properties against influenza A virus *in vitro* and *in vivo* (94). More recently, naproxen analogs with improved efficacy have been developed, showing high level of inhibition of both NP-RNA and NP-polymerase subunit PA complexes, without parallel inhibition of COX-2 (111, 112). Interestingly, in contrast to other examples of drug repurposing strategies, the example of naproxen remains virus-targeted and future works will determine if this drug will present the same Achilles' heel than classic antivirals regarding selection of antiviral resistance.

The last two examples of this chapter are midodrine and diltiazem, that we identified as influenza antivirals in the context of an *in-silico* assisted strategy based on transcriptional profiling. An emerging approach in drug repurposing is based on signature matching, which consists of comparing a specific characteristic of a drug—its cellular signature—to that of a disease (42). This approach, mostly based on transcriptomic data, was successfully exploited to identify drug repurposing opportunities in a large range of therapeutics areas, and notably in the field of oncology and rare diseases (42). Our group was the first to transpose this approach to the field of viral infectious diseases, thanks to the development and democratization of DNA-microarray and more recently RNAseq techniques. In a proof-of-concept study using an *in vitro* model of infection, we postulated that host global gene expression profiling can be considered as a “fingerprint” or signature of any specific cell state, including during infection or drug treatment, and hypothesized that the screening of databases for compounds that counteract virogenomic signatures could enable rapid identification of effective antivirals (97). Among the molecules identified *in silico*, midodrine, an adrenergic alpha receptor agonist widely used to treat hypotension, demonstrated very interesting *in vitro* antiviral activities (97). These results prompted the Phase II clinical evaluation of midodrine (NCT01546506) for the treatment of uncomplicated seasonal flu in primary care centers.

Based on this previous proof-of-concept obtained from *in vitro* gene expression profiles, we further improved the strategy by analyzing upper respiratory tract clinical samples collected from a cohort of influenza A(H1N1)pdm09-infected patients and determined their respective transcriptomic signatures. We then performed an *in-silico* drug screening and identified a list of candidate bioactive molecules with signatures anti-correlated with those of the patient's acute infection state. The potential antiviral properties of selected market-approved molecules were firstly validated *in vitro*, and the most effective compounds were further compared to oseltamivir for the treatment of influenza A(H1N1)pdm09 virus infections in mice and in a physiological *in vitro* model of reconstituted human airway epithelia (MucilAir™). These results notably highlighted diltiazem, a calcium channel blocker used as an anti-hypertensive drug, as a very promising repurposed host-targeted inhibitor of influenza infection (98). An ongoing French multicenter randomized clinical trial is investigating the effect of diltiazem-oseltamivir bitherapy compared with standard oseltamivir

monotherapy for the treatment of severe influenza infections in intensive care units (FLUNEXT trial NCT03212716).

## VIRUS-TARGETED vs. HOST-TARGETED THERAPY, WHY NOT BOTH?

“Two are better than one, because they have a good return for their labor” Ecclesiastes 4:9-10.

The concept of antiviral combination therapy was originally pioneered for antiretroviral treatments, with the primary goal of preventing or at least delaying the emergence of drug resistance via the targeting of multiple steps of the viral cycle (113). Another expected complementary goal is to obtain additive or synergistic effects by combining drugs, a “double-trigger” effect, to increase effectiveness and/or reduce dosage. In the context of influenza infections, the combination of classic antivirals, mostly NA inhibitors, was explored by several research groups, including ours, with relatively mixed conclusions. For example, in a mouse model, the combination of oseltamivir with zanamivir was shown to be not superior to zanamivir monotherapy in the context of influenza A(H3N2) or A(H1N1)pdm09 infection (114). A clinical trial was conducted during the A(H1N1)pdm09 pandemic in 2009-2010 (COMBINA trial NCT00830323) and failed to demonstrate whether oseltamivir/zanamivir combination therapy improved or reduced the effectiveness of oseltamivir alone in the treatment of influenza infections in community patients (115). Other clinical investigations have shown a greater effectiveness of such combination therapy to reduce influenza transmissibility (116).

As most alternative antiviral strategies for the treatment of influenza infections, including those related to drug repurposing and targeting the host instead of viral determinants, an emerging trend consists to propose innovative therapies that combine classic antivirals with host-targeting drugs, which starts to show promising results (87). For example, Belardo et al. have demonstrated, in cell culture-based assays using different human and avian models, that the combination of NA inhibitors and nitazoxanide presents synergistic anti-influenza effects (117). Convincing results were also obtained using a combination treatment including naproxen. In a clinical trial enrolling hospitalized patients infected by influenza A(H3N2), combination therapy with naproxen, oseltamivir, and clarithromycin showed improved efficacy in terms of hospital stay duration and patient mortality, when compared to oseltamivir treatment alone (118). In the context of the evaluation of the antiviral activity of diltiazem in the reconstituted human airway epithelium model MucilAir™, our group demonstrated that the diltiazem-oseltamivir combination treatment conferred a greater reduction of apical viral titers than that was measured with the same-dose monotherapy, with a marked delay of viral production (98). An ongoing French multicenter randomized clinical trial is investigating the effect of diltiazem-oseltamivir bitherapy compared with standard oseltamivir monotherapy for the treatment of

severe influenza infections in intensive care units (FLUNEXT trial NCT03212716).

Altogether, these results plead in favor of the use of drug repurposing for the improvement of the current standard of care anti-influenza therapy. In contrast to other technological domains, the innovation is not necessary chasing and replacing the established standard, and future works are still necessary to investigate the real impact of these novel “host & virus-targeted” multi-therapy approaches on the management and control of the emergence of viral resistance.

## CONCLUDING REMARKS

“We do not need to find new drugs; rather we need to find the patients who can benefit from existing drugs” the saying goes. Although somehow exaggerated, this statement summarizes pretty clearly the essence behind the drug repurposing initiative. Finding new indications for already-existing drugs has many benefits, mainly by improving cost-effectiveness, reducing risks, and shortening time to market (37, 41). The purpose of this review was to foster discussion on drug repurposing as an option to complete and implement our current anti-influenza therapeutic arsenal. We are facing an important need for the development of novel antiviral strategies that improve treatment effectiveness—especially in the case of severe diseases—and that are less prone to selection for antiviral resistance. In that regard, the identification and validation by different and complementary means of repurposed drugs is incontestably of great interest, notably in combination with current classic virus-targeted inhibitors. In addition, the deposition of data, including

negative results, into public database should be encouraged, as it would facilitate efforts to repurpose licensed or orphaned drugs, and consecutively increase our chances to find new efficient antiviral drugs. With a growing number of academic groups and pharmaceutical companies working on this emerging field, we should most certainly see interesting progress and efficient novel anti-influenza therapies reaching regulatory market approval in a near future.

In the context of a globalized world facing major vicissitudes including population dynamics, climate change and the multiple emergence/re-emergence of zoonotic viruses, the effectiveness and reaction force of the classic *de novo* development of antivirals is challenged. Despite inherent limits, drug repurposing offers a very large palette of possibilities to rapidly and efficiently find new antiviral drugs.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the French Ministry of Social Affairs and Health (DGOS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Claude Bernard Lyon 1, the Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA N° 14007029, and AccueilPro COOPERA N° 15458 grants).

## REFERENCES

1. Influenza (Seasonal). *World Health Organization*. Available online at: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (Accessed October 28, 2018).
2. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. (2018) 391:1285–300. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2
3. Pelletier AJ, Mansbach JM, Camargo CA. Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States. *Pediatrics*. (2006) 118:2418–23. doi: 10.1542/peds.2006-1193
4. Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol*. (2011) 9:590–603. doi: 10.1038/nrmicro2613
5. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. (2018) 4:3. doi: 10.1038/s41572-018-0002-y
6. Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet*. (2017) 390:697–708. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30129-0
7. Restivo V, Costantino C, Bono S, Maniglia M, Marchese V, Ventura G, et al. Influenza vaccine effectiveness among high-risk groups: a systematic literature review and meta-analysis of case-control and cohort studies. *Hum Vaccin Immunother*. (2017) 14:724–35. doi: 10.1080/21645515.2017.1321722
8. Buckland BC. The development and manufacture of influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. (2015) 11:1357–60. doi: 10.1080/21645515.2015.1026497
9. Paules CI, Marston HD, Eisinger RW, Baltimore D, Fauci AS. The pathway to a universal influenza vaccine. *Immunity*. (2017) 47:599–603. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.007
10. Khurana S. Development and regulation of novel influenza virus vaccines: a United States young scientist perspective. *Vaccines*. (2018) 6:E24. doi: 10.3390/vaccines6020024
11. Nguyen-Van-Tam JS, Venkatesan S, Muthuri SG, Myles PR. Neuraminidase inhibitors: who, when, where? *Clin Microbiol Infect*. (2015) 21:222–5. doi: 10.1016/j.cmi.2014.11.020
12. Sugaya N. Widespread use of neuraminidase inhibitors in Japan. *J Infect Chemother*. (2011) 17:595–601. doi: 10.1007/s10156-011-0288-0
13. WHO. *WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) Influenza and Other Influenza Viruses*. WHO (2009). Available online at: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_use\\_antivirals\\_20090820/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/) (Accessed January 24, 2019).
14. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*. (2005) 353:1363–73. doi: 10.1056/NEJMra050740
15. McKimm-Breschkin JL. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses*. (2013) 7:25–36. doi: 10.1111/irv.12047
16. Sunagawa S, Higa F, Cash HL, Tateyama M, Uno T, Fujita J. Single-dose inhaled laninamivir: registered in Japan and its potential role in control of influenza epidemics. *Influenza Other Respir Viruses*. (2013) 7:1–3. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00351.x
17. Jefferson T, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. (2014) CD008965. doi: 10.1002/14651858.CD008965.pub4



18. Dobson J, Whitley RJ, Pocock S, Monto AS. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet*. (2015) 385:1729–37. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62449-1
19. Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Muthuri SG, Al Masri M, Andrews N, et al. Impact of outpatient neuraminidase inhibitor treatment in patients infected with influenza A(H1N1)pdm09 at high risk of hospitalization: an individual participant data metaanalysis. *Clin Infect Dis*. (2017) 64:1328–34. doi: 10.1093/cid/cix127
20. Li TCM, Chan MCW, Lee N. Clinical implications of antiviral resistance in influenza. *Viruses*. (2015) 7:4929–44. doi: 10.3390/v7092850
21. Kamali A, Holodniy M. Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review. *Infect Drug Resist*. (2013) 6:187–98. doi: 10.2147/IDR.S36601
22. Takahita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. *Antiviral Res*. (2015) 117:27–38. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.02.003
23. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng Y-M, Osbourn M, Gehrig N, et al. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *N Engl J Med*. (2011) 365:2541–2. doi: 10.1056/NEJMc1111078
24. Cheung PPH, Watson SJ, Choy K-T, Fun Sia S, Wong DDY, Poon LLM, et al. Generation and characterization of influenza A viruses with altered polymerase fidelity. *Nat Commun*. (2014) 5:4794. doi: 10.1038/ncomms5794
25. Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, M'Lebing A-B, Beavogui A-H, Baize S, et al. Experimental treatment with favipiravir for ebola virus disease (the JIKI Trial): a historically controlled, single-arm proof-of-concept trial in Guinea. *PLoS Med*. (2016) 13:e1001967. doi: 10.1371/journal.pmed.1001967
26. McKimm-Breschkin JL, Jiang S, Hui DS, Beigel JH, Govorkova EA, Lee N. Prevention and treatment of respiratory viral infections: presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res*. (2018) 149:118–42. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.11.013
27. Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, Yamamoto A, Omoto S, Baba K, et al. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res*. (2018) 160:109–17. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.10.008
28. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, et al. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza in adults and adolescents. *N Engl J Med*. (2018) 379:913–23. doi: 10.1056/NEJMoa1716197
29. Roche Announces FDA Approval of Xofluz (baloxavir marboxil) for Influenza. Available online at: <https://www.roche.com/de/media/releases/med-cor-2018-10-24.htm> (Accessed October 28, 2018).
30. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, Noshi T, Yamaguchi H, Kawai M, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep*. (2018) 8:9633. doi: 10.1038/s41598-018-27890-4
31. Jackson GG, Muldoon RL, Akers LW. Serological evidence for prevention of influenza infection in volunteers by an anti-influenza drug adamantanamine hydrochloride. *Antimicrob Agents Chemother*. (1963) 161:703–7.
32. Rabinovich S, Baldini JT, Bannister R. Treatment of influenza. The therapeutic efficacy of rimantadine HCl in a naturally occurring influenza A2 outbreak. *Am J Med Sci*. (1969) 257:328–35.
33. Kim CU, Lew W, Williams MA, Wu H, Zhang L, Chen X, et al. Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J Med Chem*. (1998) 41:2451–60. doi: 10.1021/jm980162u
34. von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*. (1993) 363:418–23. doi: 10.1038/363418a0
35. Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, et al. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem*. (2000) 43:3482–3486. doi: 10.1021/jm0002679
36. Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*. (2009) 53:186–92. doi: 10.1128/AAC.00333-08
37. Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother*. (2002) 46:977–81. doi: 10.1177/095632020301400502
38. Strittmatter SM. Overcoming drug development bottlenecks with repurposing: old drugs learn new tricks. *Nat Med*. (2014) 20:590–1. doi: 10.1038/nm.3595
39. Drug Innovation. *Novel Drug Approvals for 2018*. (2018) Available online at: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm592464.htm> (Accessed October 28, 2018).
40. *Chart Pack: Biopharmaceuticals in Perspective, Summer 2018*. Phrma (2018). Available online at: <http://www.phrma.org/report/chart-pack-biopharmaceuticals-in-perspective-summer-2018> (Accessed October 28, 2018).
41. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. (2004) 3:673–83. doi: 10.1038/nrd1468
42. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. (2018). doi: 10.1038/nrd.2018.168. [Epub ahead of print].
43. Devillers J. Repurposing drugs for use against Zika virus infection. *SAR QSAR Environ Res*. (2018) 29:103–15. doi: 10.1080/1062936X.2017.1411642
44. Hernandez JJ, Pryszałak M, Smith L, Yanchus C, Kurji N, Shahani VM, et al. Giving drugs a second chance: overcoming regulatory and financial hurdles in repurposing approved drugs as cancer therapeutics. *Front Oncol*. (2017) 7:273. doi: 10.3389/fonc.2017.00273
45. Rehman W, Arfons LM, Lazarus HM. The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: lessons learned in drug development. *Ther Adv Hematol*. (2011) 2:291–308. doi: 10.1177/2040620711413165
46. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. (2006) 5:689–702. doi: 10.1038/nrd2030
47. Coleman CM, Sisk JM, Mingo RM, Nelson EA, White JM, Frieman MB. Abelson kinase inhibitors are potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus and middle east respiratory syndrome coronavirus fusion. *J Virol*. (2016) 90:8924–33. doi: 10.1128/JVI.01429-16
48. Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol*. (2008) 4:682–90. doi: 10.1038/nchembio.118
49. Hopkins AL. Drug discovery: predicting promiscuity. *Nature*. (2009) 462:167–8. doi: 10.1038/462167a
50. Reddy AS, Zhang S. Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev Clin Pharmacol*. (2013) 6:41–7. doi: 10.1586/ecp.12.74
51. Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. Shifting from the single- to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today*. (2013) 18:495–501. doi: 10.1016/j.drudis.2013.01.008
52. Naveja JJ, Dueñas-González A, Medina-Franco JL. Chapter 12 - drug repurposing for epigenetic targets guided by computational methods. In: *Epi-Informatics*, ed J. L. Medina-Franco (Boston: Academic Press), 327–57. doi: 10.1016/B978-0-12-802808-7.00012-5
53. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat Rev Drug Discov*. (2017) 16:531–43. doi: 10.1038/nrd.2017.111
54. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. (2011) 10:507–19. doi: 10.1038/nrd3480
55. Bastos LFS, Coelho MM. Drug repositioning: playing dirty to kill pain. *CNS Drugs*. (2014) 28:45–61. doi: 10.1007/s40263-013-0128-0
56. Loregian A, Palù G. How academic labs can approach the drug discovery process as a way to synergize with big pharma. *Trends Microbiol*. (2013) 21:261–4. doi: 10.1016/j.tim.2013.03.006
57. Jones LH, Bunnage ME. Applications of chemogenomic library screening in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. (2017) 16:285–96. doi: 10.1038/nrd.2016.244
58. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for “omics” research on drugs. *Nucleic Acids Res*. (2011) 39:D1035–41. doi: 10.1093/nar/gkq1126
59. Ferrero E, Dunham I, Sansau P. *In silico* prediction of novel therapeutic targets using gene-disease association data. *J Transl Med*. (2017) 15:182. doi: 10.1186/s12967-017-1285-6

60. Hurle MR, Yang L, Xie Q, Rajpal DK, Sanseau P, Agarwal P. Computational drug repositioning: from data to therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* (2013) 93:335–41. doi: 10.1038/clpt.2013.1
61. Ekins S, Mestres J, Testa B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol.* (2007) 152:9–20. doi: 10.1038/sj.bjp.0707305
62. Tari LB, Patel JH. Systematic drug repurposing through text mining. *Methods Mol Biol.* (2014) 1159:253–67. doi: 10.1007/978-1-4939-0709-0\_14
63. Cichonska A, Rousu J, Aittokallio T. Identification of drug candidates and repurposing opportunities through compound-target interaction networks. *Expert Opin Drug Discov.* (2015) 10:1333–45. doi: 10.1517/17460441.2015.1096926
64. Sidders B, Karlsson A, Kitching L, Torella R, Karila P, Phelan A. Network-based drug discovery: coupling network pharmacology with phenotypic screening for neuronal excitability. *J Mol Biol.* (2018) 430:3005–15. doi: 10.1016/j.jmb.2018.07.016
65. Chatterjee S, Szustakowski JD, Nanguneri NR, Mickanin C, Labow MA, Nohturnff A, et al. Identification of novel genes and pathways regulating SREBP transcriptional activity. *PLoS ONE.* (2009) 4:5197. doi: 10.1371/journal.pone.0005197
66. Oprea TI, Nielsen SK, Ursu O, Yang JJ, Taboureau O, Mathias SL, et al. Associating drugs, targets and clinical outcomes into an integrated network affords a new platform for computer-aided drug repurposing. *Mol Inform.* (2011) 30:100–11. doi: 10.1002/minf.201100023
67. Chiang AP, Butte AJ. Systematic evaluation of drug-disease relationships to identify leads for novel drug uses. *Clin Pharmacol Ther.* (2009) 86:507–510. doi: 10.1038/clpt.2009.103
68. Platz EA, Yegnasubramanian S, Liu JO, Chong CR, Shim JS, Kenfield SA, et al. A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. *Cancer Discov.* (2011) 1:68–77. doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0020
69. Allarakhia M. Open-source approaches for the repurposing of existing or failed candidate drugs: learning from and applying the lessons across diseases. *Drug Des Devel Ther.* (2013) 7:753–66. doi: 10.2147/DDDT.S46289
70. van der Graaf PH, Benson N. Systems pharmacology: bridging systems biology and pharmacokinetics-pharmacodynamics (PKPD) in drug discovery and development. *Pharm Res.* (2011) 28:1460–4. doi: 10.1007/s11095-011-0467-9
71. Zhou W, Wang Y, Lu A, Zhang G. Systems pharmacology in small molecular drug discovery. *Int J Mol Sci.* (2016) 17:246. doi: 10.3390/ijms17020246
72. Mercorelli B, Palù G, Lorigian A. Drug repurposing for viral infectious diseases: how far are we? *Trends Microbiol.* (2018) 26:865–76. doi: 10.1016/j.tim.2018.04.004
73. Akpovwa H. Chloroquine could be used for the treatment of filoviral infections and other viral infections that emerge or emerged from viruses requiring an acidic pH for infectivity. *Cell Biochem Funct.* (2016) 34:191–6. doi: 10.1002/cbf.3182
74. Al-Bari MAA. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol Res Perspect.* (2017) 5:e00293. doi: 10.1002/prp2.293
75. Pires de Mello CP, Tao X, Kim TH, Vicchiarelli M, Bulitta JB, Kaushik A, et al. Clinical regimens of favipiravir inhibit zika virus replication in the hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* (2018) 62:e00967–18. doi: 10.1128/AAC.00967-18
76. Ludwig S. Will omics help to cure the flu? *Trends Microbiol.* (2014) 22:232–3. doi: 10.1016/j.tim.2014.03.003
77. Perwitasari O, Yan X, O'Donnell J, Johnson S, Tripp RA. Repurposing kinase inhibitors as antiviral agents to control influenza A virus replication. *Assay Drug Dev Technol.* (2015) 13:638–49. doi: 10.1089/adt.2015.0003.drtr
78. Fedson DS. Treating influenza with statins and other immunomodulatory agents. *Antiviral Res.* (2013) 99:417–35. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.018
79. Fedson DS. Clinician-initiated research on treating the host response to pandemic influenza. *Hum Vaccin Immunother.* (2018) 14:790–5. doi: 10.1080/21645515.2017.1378292
80. Mehrbod P, Omar AR, Hair-Bejo M, Haghani A, Ideris A. Mechanisms of action and efficacy of statins against influenza. *Biomed Res Int.* (2014) 2014:872370. doi: 10.1155/2014/872370
81. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem.* (2009) 284:29798–808. doi: 10.1074/jbc.M109.029470
82. Tilmanis D, van Baalen C, Oh DY, Rossignol J-F, Hurt AC. The susceptibility of circulating human influenza viruses to tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide. *Antiviral Res.* (2017) 147:142–8. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.10.002
83. Moseley CE, Webster RG, Aldridge JR. Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice. *Influenza Other Respir Viruses.* (2010) 4:307–11. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00155.x
84. Budd A, Alleva L, Alsharif M, Koskinen A, Smythe V, Müllbacher A, et al. Increased survival after gemfibrozil treatment of severe mouse influenza. *Antimicrob Agents Chemother.* (2007) 51:2965–8. doi: 10.1128/AAC.00219-07
85. Droebner K, Haasbach E, Dudek SE, Scheuch G, Nocker K, Canisius S, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and antiviral activity of BAY 81-8781, a novel NF- $\kappa$ B inhibiting anti-influenza drug. *Front Microbiol.* (2017) 8:2130. doi: 10.3389/fmicb.2017.02130
86. Scheuch G, Canisius S, Nocker K, Hofmann T, Naumann R, Pleschka S, et al. Targeting intracellular signaling as an antiviral strategy: aerosolized LASAG for the treatment of influenza in hospitalized patients. *Emerg Microbes Infect.* (2018) 7:21. doi: 10.1038/s41426-018-0023-3
87. Davidson S. Treating influenza infection, from now and into the future. *Front Immunol.* (2018) 9:1946. doi: 10.3389/fimmu.2018.01946
88. Carey MA, Bradbury JA, Reboloso YD, Graves JP, Zeldin DC, Germolec DR. Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza A viral infection in mice. *PLoS ONE.* (2010) 5:e11610. doi: 10.1371/journal.pone.0011610
89. Shi X, Zhou W, Huang H, Zhu H, Zhou P, Zhu H, et al. Inhibition of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  with etanercept provides protection against lethal H1N1 influenza infection in mice. *Crit Care.* (2013) 17:R301. doi: 10.1186/cc13171
90. Denisova OV, Kakkola L, Feng L, Stenman J, Nagaraj A, Lampe J, et al. Obatoxax, saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit influenza A virus infection. *J Biol Chem.* (2012) 287:35324–32. doi: 10.1074/jbc.M112.392142
91. Hu Y, Zhang J, Musharrafieh RG, Ma C, Hau R, Wang J. Discovery of dapivirine, a nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, as a broad-spectrum antiviral against both influenza A and B viruses. *Antiviral Res.* (2017) 145:103–13. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.07.016
92. Schröder T, Dudek SE, Schreiber A, Ehrhardt C, Planz O, Ludwig S. The clinically approved MEK inhibitor Trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. *Antiviral Res.* (2018) 157:80–92. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.006
93. Rohini K, Shanthi V. Hyphenated 3D-QSAR statistical model-drug repurposing analysis for the identification of potent neuraminidase inhibitor. *Cell Biochem Biophys.* (2018) 76:357–76. doi: 10.1007/s12013-018-0844-7
94. Lejal N, Tarus B, Bouguyon E, Chenavas S, Bertho N, Delmas B, et al. Structure-based discovery of the novel antiviral properties of naproxen against the nucleoprotein of influenza A virus. *Antimicrob Agents Chemother.* (2013) 57:2231–42. doi: 10.1128/AAC.02335-12
95. Bao J, Marathe B, Govorkova EA, Zheng JJ. Drug repurposing identifies inhibitors of oseltamivir-resistant influenza viruses. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2016) 55:3438–41. doi: 10.1002/anie.201511361
96. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJS, Matsuoka Y, Tomita Y, et al. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe.* (2014) 16:795–805. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.002
97. Josset L, Textoris J, Lloriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, et al. Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS ONE.* (2010) 5:13169. doi: 10.1371/journal.pone.0013169
98. Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, Julien T, Padey B, Traversier A, et al. Repurposing of drugs as novel influenza inhibitors from clinical gene expression infection signatures. *Front Immunol.* (2019) 10:60. doi: 10.3389/fimmu.2019.00060
99. Kumaki Y, Morrey JD, Barnard DL. Effect of statin treatments on highly pathogenic avian influenza H5N1, seasonal and H1N1pdm09

- virus infections in BALB/c mice. *Future Virol.* (2012) 7:801–18. doi: 10.2217/fvl.12.71
100. Salomon R, Hoffmann E, Webster RG. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104:12479–81. doi: 10.1073/pnas.0705289104
  101. Belser JA, Szretter KJ, Katz JM, Tumpey TM. Simvastatin and oseltamivir combination therapy does not improve the effectiveness of oseltamivir alone following highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection in mice. *Virology.* (2013) 439:42–6. doi: 10.1016/j.virol.2013.01.017
  102. Radigan KA, Ulrich D, Misharin AV, Chiarella SE, Soberanes S, Gonzalez A, et al. The effect of rosuvastatin in a murine model of influenza A infection. *PLoS ONE.* (2012) 7:e35788. doi: 10.1371/journal.pone.0035788
  103. Enserink M. Infectious disease. Old drugs losing effectiveness against flu; could statins fill gap? *Science.* (2005) 309:1976–7. doi: 10.1126/science.309.5743.1976a
  104. Vandermeer ML, Thomas AR, Kamimoto L, Reingold A, Gershman K, Meek J, et al. Association between use of statins and mortality among patients hospitalized with laboratory-confirmed influenza virus infections: a multistate study. *J Infect Dis.* (2012) 205:13–9. doi: 10.1093/infdis/jir695
  105. Brett SJ, Myles P, Lim WS, Enstone JE, Bannister B, Semple MG, et al. Pre-admission statin use and in-hospital severity of 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLoS ONE.* (2011) 6:e18120. doi: 10.1371/journal.pone.0018120
  106. Rossignol J-F. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* (2014) 110:94–103. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.014
  107. Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, Resnick H, Samudrala S, Ginocchio C, et al. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis.* (2014) 14:609–18. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70717-0
  108. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, et al. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol.* (2007) 9:1683–94. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00902.x
  109. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature.* (1998) 396:77–80. doi: 10.1038/23948
  110. Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, et al. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem.* (2004) 279:30931–7. doi: 10.1074/jbc.M403258200
  111. Tarus B, Chevalier C, Richard C-A, Delmas B, Di Primo C, Slama-Schwok A. Molecular dynamics studies of the nucleoprotein of influenza A virus: role of the protein flexibility in RNA binding. *PLoS ONE.* (2012) 7:e30038. doi: 10.1371/journal.pone.0030038
  112. Dilly S, Fotso Fotso A, Lejal N, Zedda G, Chebbo M, Rahman F, et al. From naproxen repurposing to naproxen analogues and their antiviral activity against influenza A virus. *J Med Chem.* (2018) 61:7202–17. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00557
  113. Chaudhuri S, Symons JA, Deval J. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Res.* (2018) 155:76–88. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.05.005
  114. Pizzorno A, Abed Y, Rhéaume C, Boivin G. Oseltamivir-zanamivir combination therapy is not superior to zanamivir monotherapy in mice infected with influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses. *Antiviral Res.* (2014) 105:54–8. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.02.017
  115. Escuret V, Cornu C, Boutitie F, Enouf V, Mosnier A, Bouscambert-Duchamp M, et al. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res.* (2012) 96:130–7. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.08.002
  116. Carrat F, Duval X, Tubach F, Mosnier A, Van der Werf S, Tibi A, et al. Effect of oseltamivir, zanamivir or oseltamivir-zanamivir combination treatments on transmission of influenza in households. *Antivir Ther.* (2012) 17:1085–90. doi: 10.3851/IMP2128
  117. Belardo G, Cenciarelli O, La Frazia S, Rossignol JF, Santoro MG. Synergistic effect of nitazoxanide with neuraminidase inhibitors against influenza A viruses *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:1061–9. doi: 10.1128/AAC.03947-14
  118. Hung IFN, To KKW, Chan JFW, Cheng VCC, Liu KSH, Tam A, et al. Efficacy of clarithromycin-naproxen-oseltamivir combination in the treatment of patients hospitalized for influenza A(H3N2) infection: an open-label randomized, controlled, phase IIb/III trial. *Chest.* (2017) 151:1069–80. doi: 10.1016/j.chest.2016.11.012
- Conflict of Interest Statement:** AP, BP, OT, and MR-C are co-inventors of two patent applications filed by INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1, Laval University and Hospices Civils de Lyon for the repurposing of drugs as anti-influenza agents (WO/2016/146836 and WO/2017/174593).

Copyright © 2019 Pizzorno, Pudey, Terrier and Rosa-Calatrava. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 2. “Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia”

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC  
REPORTS**  
nature research

OPEN

# Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia

Received: 22 March 2019  
Accepted: 29 July 2019  
Published online: 07 August 2019

Claire Nicolas de Lamballerie<sup>1,2</sup>, Andrés Pizzorno<sup>1</sup>, Julia Dubois<sup>1</sup>, Thomas Julien<sup>1,3</sup>, Blandine Padey<sup>1,3</sup>, Mendy Bouveret<sup>1</sup>, Aurélien Traversier<sup>1</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>2</sup>, Bruno Lina<sup>1</sup>, Guy Boivin<sup>4</sup>, Olivier Terrier<sup>1</sup> & Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,3</sup>

Acute respiratory infections, a large part being of viral origin, constitute a major public health issue. To propose alternative and/or new therapeutic approaches, it is necessary to increase our knowledge about the interactions between respiratory viruses and their primary cellular targets using the most biologically relevant experimental models. In this study, we used RNAseq to characterize and compare the transcriptomic signature of infection induced by different major respiratory viruses (Influenza viruses, hRSV and hMPV) in a model of reconstituted human airway epithelia. Our results confirm the importance of several cellular pathways commonly or specifically induced by these respiratory viruses, such as the innate immune response or antiviral defense. A very interesting common feature revealed by the global virogenomic signature shared between hRSV, hMPV and influenza viruses is the global downregulation of cilium-related gene expression, in good agreement with experimental evaluation of mucociliary clearance. Beyond providing new information about respiratory virus/host interactions, our study also underlines the interest of using biologically relevant experimental models to study human respiratory viruses.

Acute respiratory infections (ARI) constitute a leading cause of acute illness worldwide and a major cause of death among young children, with nearly 2 million deaths per year<sup>1–3</sup>. Among a panoply of different viral and bacterial pathogens, respiratory viruses, such as influenza A and B viruses (IAV and IBV), respiratory syncytial virus (hRSV-A and hRSV-B), human metapneumovirus (hMPV-A and hMPV-B) or rhinoviruses (RV), represent the main etiologic agents of these infections<sup>2,4,5</sup>. In that regard, the limited or non-existent prophylactic and therapeutic arsenal available, coupled with the emergence of antiviral resistance, highlight the public health burden imposed by these respiratory pathogens. It appears therefore urgent to develop alternative and/or new therapeutic approaches, for which it is a necessary condition to increase our knowledge of the interactions between respiratory viruses and their primary cellular targets, namely respiratory epithelial cells.

The last decade has witnessed the development of high-throughput “omics” approaches that have contributed to deepen our understanding of the multiple levels of interplay between respiratory viruses and the host cell. Numerous studies have described the impact of infection on host gene expression *in vitro* or *in vivo*, mainly in the context of influenza viruses or hRSV and to a lesser extent for other respiratory viruses such as hMPV<sup>6–10</sup>. For example, several mRNA profiling studies, including ours, have highlighted the role of NF-κB, p53, or MAPK cellular

<sup>1</sup>Virologie et Pathologie Humaine - VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, 69008, France.

<sup>2</sup>Viroscan3D SAS, Lyon, 69008, France. <sup>3</sup>VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, 69008, France. <sup>4</sup>Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec City, QC, G1V 4G2, Canada. Olivier Terrier and Manuel Rosa-Calatrava contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T. (email: [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr)) or M.R.-C. (email: [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr))

pathways in the context of influenza virus infection<sup>11–13</sup>. Nevertheless, only few comparative studies between different respiratory viruses have been so far described in the literature, although such approaches would be very informative to determine common and/or specific viral “fingerprints” that could provide valuable insight on potential antiviral immune response countermeasures and other pathogenesis mechanisms. Moreover, we still face the challenge of achieving increased physiologic relevance by coupling transcriptomic analyses with measurable physiological, immunological and/or virological data.

In a context of limited access to large panels of high-quality clinical samples, human reconstituted airway epithelial (HAE) models appear as biologically relevant and useful tools for studying infection at the level of primary target cells for respiratory viruses. For example, both in-house and commercially available (i.e. Mucilair™) HAE models, composed of human primary ciliated columnar cells, mucus-secreting goblet and basal cells cultivated at the air-liquid interface, have been successfully used to study viral infections and evaluate antivirals<sup>14–17</sup>. In that regard, the aim of the present study was to perform a comparative analysis of transcriptomic signatures of infection among different major respiratory viruses (Influenza, hRSV and hMPV) in HAE, in order to identify and experimentally validate both common and specific key cellular pathways. Altogether, our results confirmed the importance of several cellular pathways, such as the interferon signaling and cilium-related pathways, specifically or commonly deregulated upon infection by different respiratory viruses, which were further validated through transversal analyses such as quantification of secreted cytokines/chemokines. Beyond providing new data highlighting the interplay between respiratory viruses and the host cells, this study also underlines the interest of using biologically relevant models such as reconstituted HAE as a good compromise between *in vitro* immortalized cell lines and *ex-vivo/in-vivo* experimental models for the functional study of respiratory pathogens.

## Results

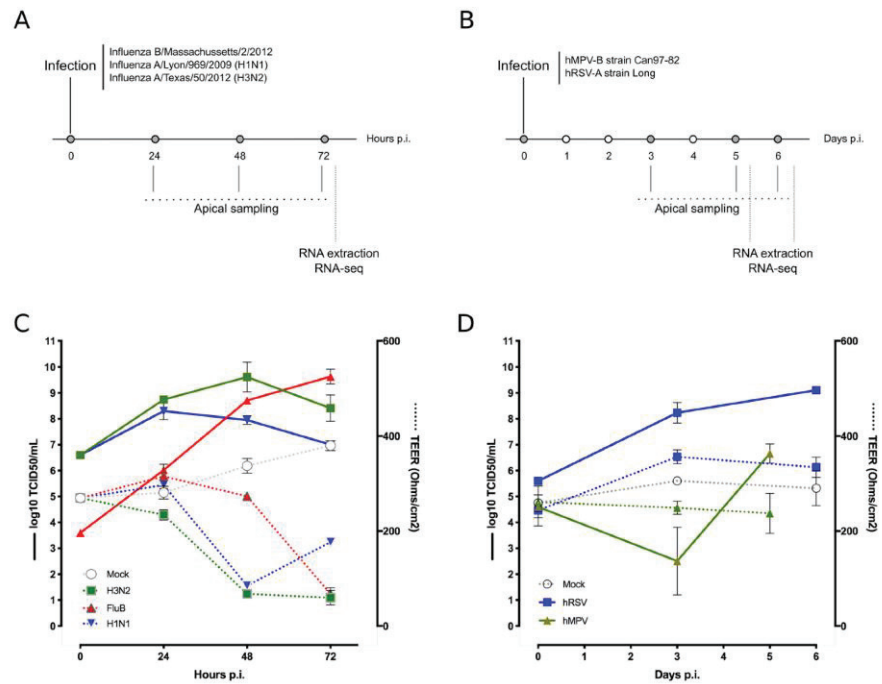
**Experimental setup and monitoring of viral infection in HAE.** The initial step of our study was to produce high quality, reproducible, and physiologically relevant material in order to transversely analyze the common and distinct features of infection with major respiratory viruses. To that end, we performed a series of experimental infections in HAE using specific parameters (infection protocol, MOI, time-points) previously optimized according to both the literature and in-house pilot studies, notably to take into account the inherent differences in viral kinetics among strains/viruses<sup>17,18</sup>. A summary of the two experimental setups performed, for influenza and hRSV/hMPV, respectively, is given in Fig. 1A,B. For the monitoring of viral production and cytokine/chemokine secretion, serial sampling at the apical surface of HAE was performed throughout the time-course of infection. The trans-epithelial electrical resistance (TEER), considered as an indirect marker of the epithelium integrity, was also measured at different time points (gray dots, Fig. 1A,B). Finally, HAE were harvested at 72 hpi (Fig. 1A) or 5 and 6 dpi (Fig. 2A) for RNA extraction and subsequent RTqPCR or high-throughput RNA sequencing.

Influenza viral production was observed at the HAE apical surface as early as 24 hpi, ranging between a minimum of 5.97 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml for influenza B and a maximum of 8.8 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml for H3N2. Depending on the strain, the viral replication peak was observed between 24 and 72 hpi (Fig. 1C). In the case of hRSV and hMPV infections, significant viral production was measured at the apical surface from 3 dpi, with the viral replication peak being attained between 5 and 6 dpi (Fig. 1D). As a result of these observations of peak viral replication, we selected 72 hpi, 5dpi and 6 dpi as the study end-point for influenza, hMPV and hRSV infections, respectively. Of note, hMPV-B viral titers at the apical surface remained limited even at 5 days post-infection (Fig. 1D). hMPV and hRSV titers at 6 dpi reached 6.42 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml and 9.13 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml, respectively (Fig. 1D). Trans-epithelial electrical resistance (TEER) values decreased drastically over time in the context of influenza infection (Fig. 1C) but remained stable, similar to that was observed for mock-infected HAE, in the case of hRSV and hMPV (Fig. 1D).

**Differential impact of infection on cytokine/chemokine secretion patterns.** To obtain a large overview of the inflammatory and non-inflammatory immune response following HAE infections, we quantified a panel of 27 different cytokines and chemokines using a bead-based multiplex immunoassay (Bio-Plex, Bio-Rad, USA). To facilitate the comparison between experimental conditions, results for each cytokine/chemokine were expressed as the log-transformed ratio compared to mock condition and presented in a radar chart (Fig. 2). All raw data are presented in Supplementary Table 1.

First, the general pattern of cytokine/chemokine secretion compared to mock was relatively similar between the different viruses tested. Indeed, this pattern was notably characterized by the high induction of interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) in the context of all viral infections studied. These two cytokines, known to be a central part of the pro-inflammatory T helper (Th) 1 response, showed mean relative secretion log-transformed ratios above 2.25 (Fig. 2). This was also the case, though to a slightly lesser extent, for IL-15, with mean secretion log-transformed ratios around 2.25. In addition, the relative level of several cytokines such as IL-5, IL-10, IL-7, IL-13 and Basic-FGF was not as impacted by the infection as the other chemokines/cytokines (Fig. 2). On the other side, we also observed some specificities in the case of hRSV and hMPV. For example, the relative levels of IL-8 and RANTES were increased in all the infections studied, with the notable exception of hMPV. A similar pattern was observed for GM-CSF and hRSV (Fig. 2). In addition, hMPV infection was the only experimental condition tested with a marked increase of VEGF relative level (Fig. 2). Altogether, these results highlight the consistency and reproducibility of the HAE model regarding cytokine secretion upon infection as well as the utility of the generated data for the discrimination between different viral infections.

**Transcriptional profiling of infections in HAE.** For a better understanding of the underlying host response to infection, HAE were lysed at 72 hpi, 5 dpi or 6 dpi and total RNA was extracted. cDNA libraries were then produced, amplified, and subjected to high-throughput sequencing. A Principal Component Analysis

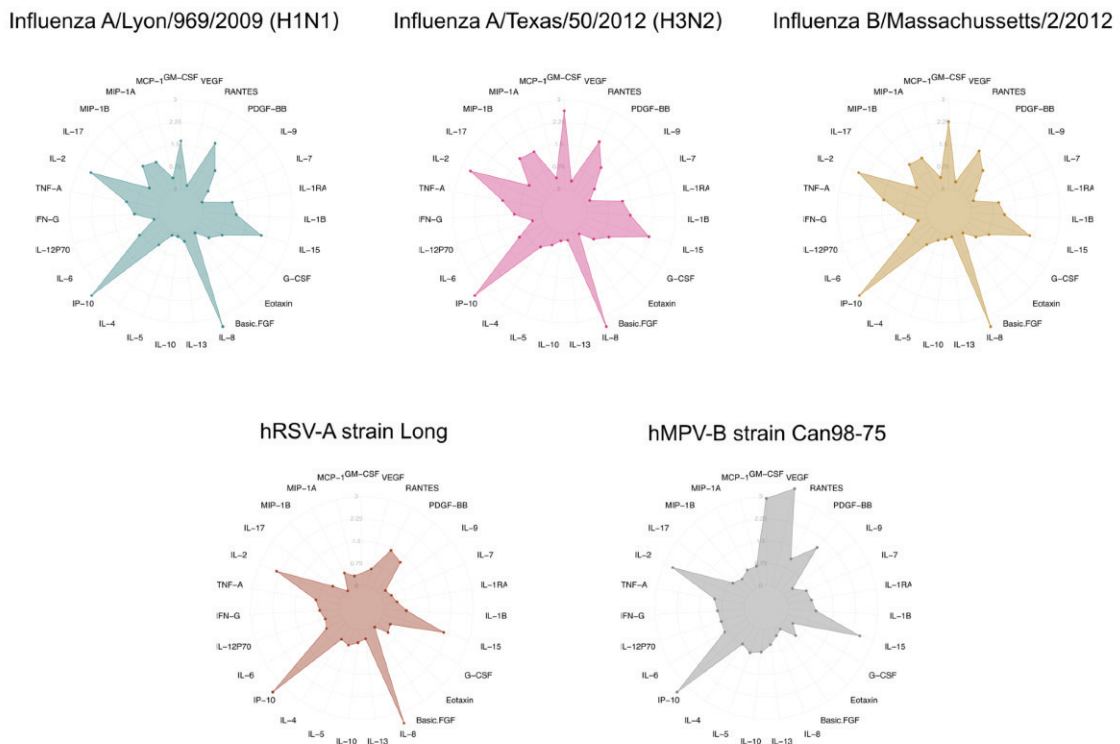


**Figure 1.** Viral infection in HAE: experimental protocol and biological monitoring results. (A,B) Apical poles were gently washed with 200  $\mu$ L of OptiMEM medium. 150  $\mu$ L of diluted viruses (Influenza B/Massachusetts/2/2012, Influenza A/Lyon/969/2009, Influenza A/Texas/50/2012 in panel A and hMPV-B strain CAN97-82 or hRSV-A strain Long in panel (B) were added to the apical pole and incubated for 1 h at 37  $^{\circ}$ C. The infection is mimicked in the mock condition by adding virus-free OptiMEM medium. The viral suspension was then removed and apical poles were washed with OptiMEM. The OptiMEM medium was removed and air-liquid interface was restored. Kinetic samplings and measures were performed at the specified timing and after the last sampling, cells were lysed in RLT buffer and stocked at  $-80^{\circ}$ C before RNA extraction. (C,D) Membrane resistance between the apical and basal pole was measured at each time-point. The resulting trans-epithelial resistance (TEER in Ohms/cm<sup>2</sup>) is represented in dotted line and color-coded in accordance with infectious condition (mock in white, H3N2 in green, influenza B in red and H1N1 in blue in panel C and blue for hRSV and green for hMPV-B in panel D). Viral production at the apical pole was assessed after apical medium collection at the indicated time-points: 24-48-72hpi for influenza viruses and 3dpi and 5 or 6dpi for hRSV and hMPV. Viral titers indicated at T = 0 in correspond to the input viral load as validated by back-titration. For each time-point, MDCK (influenza virus) or LLC-MK2 cells (hRSV/hMPV) were incubated with serial dilutions from collected sample for the determination of viral titers. The specific parameters (infection protocol, MOI, time-points) previously optimized allow a precious and precise infection monitoring with appropriate viral replication (increasing titers) and a dropping mobility capacity of cilium.

(PCA) was performed after data normalization, to assess if the generated data could allow differential clustering between experimental infections and the mock condition. The PCA shows a clear first level of differential clustering between the members of the *Orthomyxoviridae* and *Pneumoviridae* families, but also enables the specific distinction of mock-, Influenza-, hMPV- and hRSV-infected HAE (Fig. 3). Interestingly, differences were tenuous between influenza virus types and subtypes. Based on these PCA clustering results, we postulated that a deeper study of transcriptomic signatures through detailed comparative analysis of differentially modulated genes would provide significant insight on putative inter- and intra-virus family common or distinctive infection features.

#### General common and specific features of virogenomic signatures of infection in HAE.

Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model, corrected with the Holm method to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change  $>2$  and a corrected p-value  $<0.05$  were considered to be differentially expressed. A validation by RT-qPCR was performed on several genes (Supplementary Fig. 1). As shown in Table 1 and Fig. 4 (set size), the number of deregulated genes in the context of hRSV/hMPV infections was lower than that associated with influenza viruses. In addition, whereas the proportion of up-/down-regulated genes was well equilibrated for influenza H1N1 and B viruses, we observed a

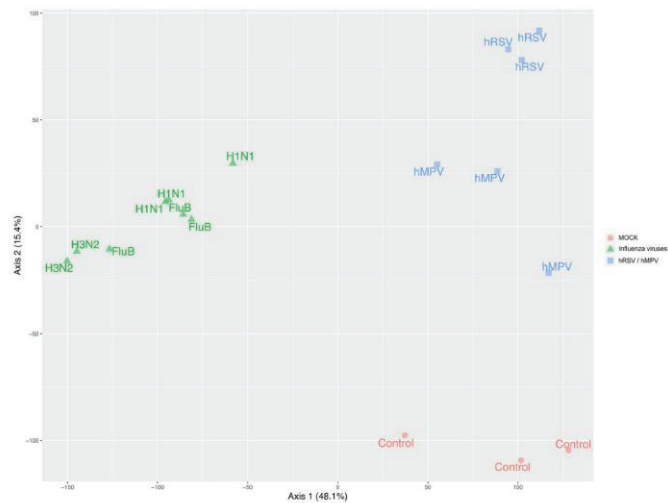


**Figure 2.** Comparison of immunity-related protein secretion profiles of infected airway epithelia. Chemokines and cytokines (FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$  and VEGF) harvested at the apical pole were quantified on a FLEXMAP 3D analyzer (Luminex, Austin, Texas, USA). Cytokine concentration values are represented in log<sub>10</sub>-transformation of the ratio (viral cytokine concentration) / (mock cytokine concentration). Because no signal could be assessed for GM-CSF, in the case for hRSV, this specific point was set at 0. Each radar chart accounts for the 27 cytokine/chemokine levels in each viral infection.

sharp disequilibrium in favor of up-regulated genes for hMPV, or down-regulated genes for influenza H3N2 and hRSV.

Following this initial observation, we separately analyzed the set of up-regulated (Fig. 4A) and down-regulated genes (Fig. 4B). We first focused our attention on the common set of genes differentially modulated by the 5 viruses studied, which could be considered as the main components of the global virogenomic signature of the infection state (black stars in Fig. 4A,B). This intersection signature consists of a set of 112 up-regulated genes (Fig. 4A) and 98 down-regulated genes (Fig. 4B) that represent around 7.9% and 5.6% of the total number of deregulated genes in the context of infection, respectively. Interestingly, these global signatures represent a large part of the hRSV (more than 37% of up-regulated genes in hRSV-infected HAE) and hMPV (more than 53% of down-regulated genes in hMPV-infected HAE) signatures (Fig. 4 and Table 1). As expected, different influenza viruses share a large set of deregulated genes, notably 156 up-regulated and 180 down-regulated genes. On the other hand, we also investigated the unique sets of genes exclusively modulated by each of the individual viruses tested (red dots in Fig. 4A,B). It is worth noting that these specific sets of genes represented an important proportion of the virogenomic signatures of each virus, particularly in the case of influenza A/Texas/50/2012 (H3N2), in which the number of genes specifically up-regulated ( $n = 181$ , Fig. 4A), and down-regulated ( $n = 441$ , Fig. 4B) represented almost 29% of the global H3N2 virogenomic signature. Overall, these results suggest that, at least in our experimental conditions, it is possible to identify both common and virus-specific features of how respiratory viral infections impact the cellular transcriptome, even when the compared viruses are very close (e.g. influenza viruses of the same type).

**Interferon/immune responses and cilium assembly/morphogenesis constitute the hallmarks of viral respiratory infection in HAE.** To provide further functional interpretation of the virogenomic signatures in HAE, we then performed a Gene Ontology (GO)-based functional enrichment analysis using the web-based DAVID toolkit. GO terms, and more particularly Biological Processes (BP), were considered enriched when their Benjamini-Hochberg corrected enrichment  $p$ -value was  $< 0.01$ . We first focused on BP enrichment



**Figure 3.** Principal component analysis (PCA) plot depicts significant differences between virus-induced transcriptomic signatures. Abundances in TPM (Transcripts Per Kilobase Million), counts and metadata were combined in a raw expression matrix. HAE infected by viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family (H3N2, H1N1, FluB) are color-coded in green, hMPV and hRSV in blue and mock-infected in red. The component 1 accounts for 48.1% of the total variance of the dataset whereas the second one accounts for 15.4%. The PCA plot showed a distinct progression of differential gene expression mainly between control – influenza and hRSV/hMPV conditions.

	Genes Up	Genes Down
Influenza A/Lyon/969/2009 (H1N1)	770	918
Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)	709	1461
Influenza B/Massachusetts/2/2012	767	790
hMPV-B strain Can97-82	325	182
hRSV-A strain Long	316	624

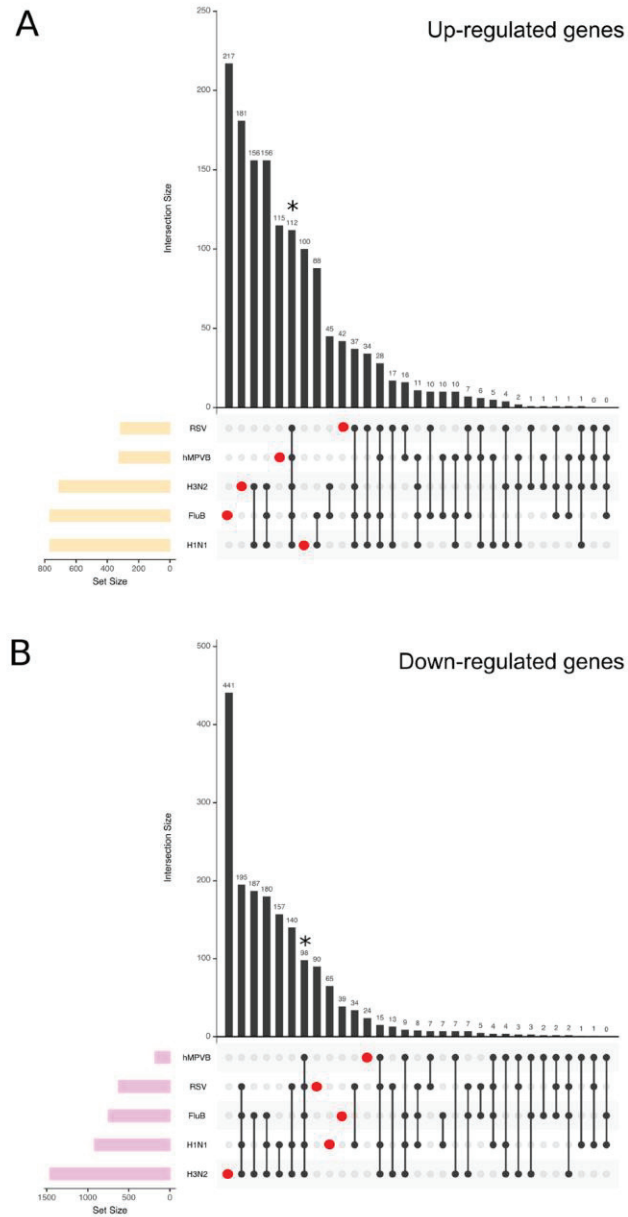
**Table 1.** Number of differentially over- or under-expressed genes compared to mock. Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Holm procedure was used to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change  $>2$  and a corrected p-value  $<0.05$  were considered as differentially expressed.

based on the list of up-regulated genes for each virus. Figure 5 shows the enriched BP shared by at least to different viruses. As anticipated, the most enriched BP common to all viruses were associated with Interferon response (IFN alpha - GO:0035455, IFN beta - GO:0035456 and IFN gamma - GO:0060333) and more largely Innate immune response (GO:0045087; GO:0006955) and negative regulation of viral genome (GO:0045071) (Fig. 5). Not surprisingly, a large part of the genes related with these GO terms correlate with the list of 112 up-regulated genes constituting the global virogenomic signatures of infection (black stars in Fig. 4A). Moreover, functional enrichment specific of the group of three influenza viruses studied was observed, notably through BP related to I-kappaB/NF-kappaB signaling (GO:0043123; GO:0042346; GO:0051092) or Apoptotic process (GO:0006915) (Fig. 5).

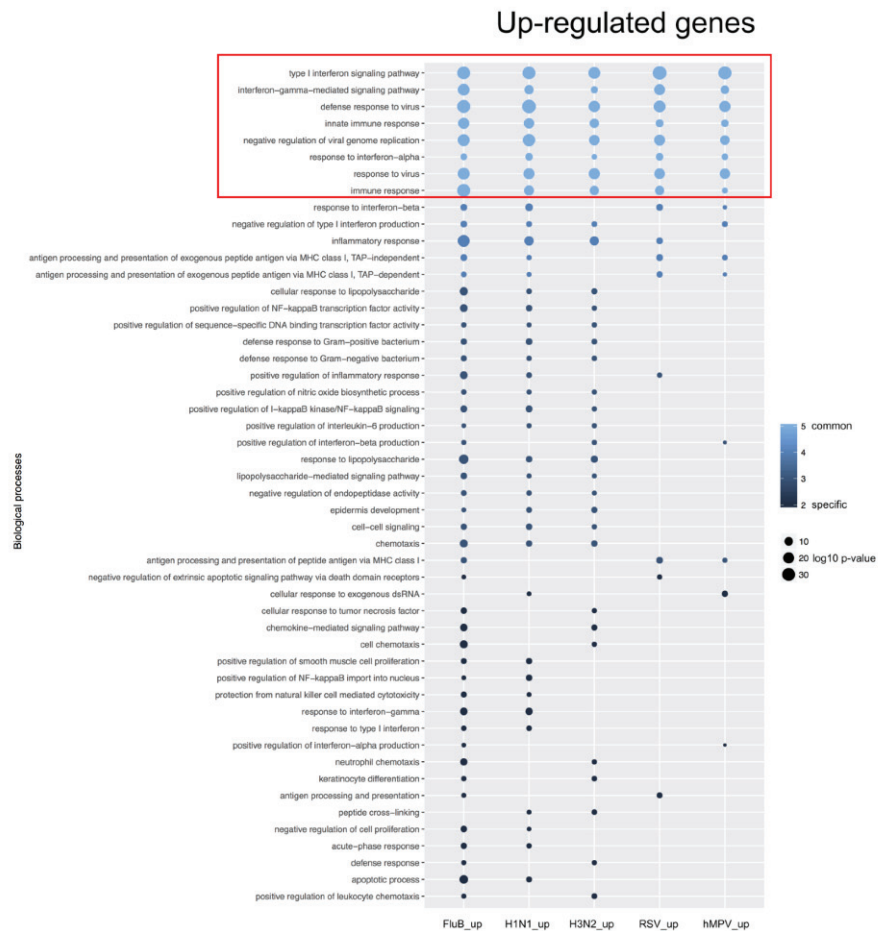
In parallel, we also performed an analogous analysis based on the list of down-regulated genes (Fig. 6A). A handful of BPs were identified as being associated with more than one virus, the most enriched BP common to all viruses being Cilium assembly (GO:0042384). Interestingly, other cilium-associated BP such as those related to Cilium morphogenesis or Cilium movement (GO:0060271; GO:0003341) were also enriched in four out of the fifth infections studied (H1N1, H3N2, FluB and hRSV). Most of the genes associated with these GO terms were present either in the list of 98 down-regulated genes constituting the global virogenomic signatures of infection or in the list of 195 down-regulated genes common to influenza viruses and hRSV (Fig. 4B). Interestingly, only the cilium-assembly BP was enriched in the context of hMPV infection, despite a similar number of downregulated genes compared to hRSV, suggesting major differences between these two Pneumoviruses.

To better illustrate the impact of infection on cilium-related BP, we used the list of genes associated to these BP and explored the functional association networks of their protein products using the STRING database<sup>19</sup>



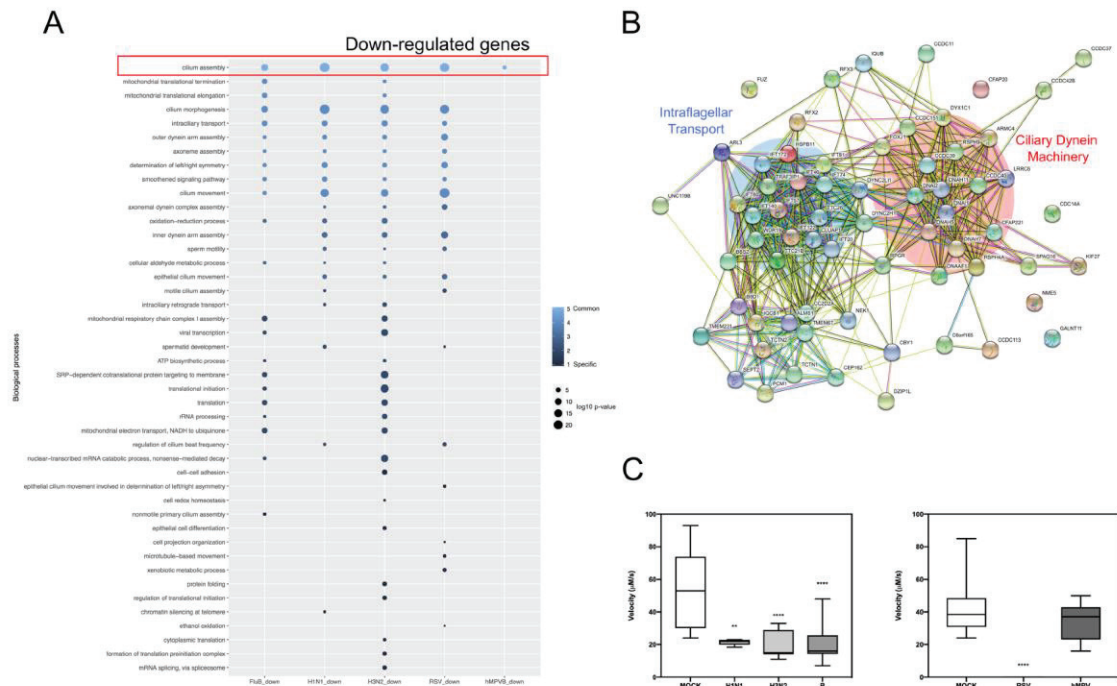


**Figure 4.** Intersections among host-infected signatures. Differential gene expression was calculated with a p-value threshold <0.05 and an absolute fold-change >2. Intersections among five viral signatures are shown. Panel A accounts for up-regulated genes and panel B for the down-regulated ones. The matrix of solid black or grey circles at the bottom illustrates the “presence” (black circle) or “absence” (grey circle) of the gene sets in each intersection. The numbers to the left of the matrix are set sizes. The colored bars on the top of the matrix represent the intersection sizes. hRSV and hMPV infections account for a lower number of genes differentially expressed and the H3N2 down-regulate the highest number of genes (>1000). 112 and 98 genes (black star) were commonly modulated in all infection studied but each infection also accounted for specific gene modulation (represented in red dots).



**Figure 5.** Up regulated genes mainly account for interferon/immune responses in viral-infected HAE. Enrichment was performed on each gene list (up-regulated genes) and biological processes enriched in a least one infection with a Benjamini corrected p-value inferior to 0.01 were plotted. The log<sub>10</sub>-transformed (Benjamini corrected enrichment p-value) is color-coded in a gradient from dark blue (specific to one infection) to pale blue (common between all five infections). Dot size is proportional to p-value. The absence of dot in a column signifies the absence of enrichment of this specific biological process with the defined thresholds. The only biological processes enriched in every infectious condition immune response related terms (type I interferon signaling pathway, response to virus, (defense) response to interferon-alpha, negative regulation of viral genome replication, interferon-gamma-mediated signaling pathway).

(<https://string-db.org>). As presented in Fig. 6B, this analysis highlighted a functional network based on 66 distinct proteins (nodes) and 488 protein-protein associations (edges). These associations, which indicate proteins sharing functions (not necessarily physical interaction), are organized in two major hubs concentrating a large number of edges. These two hubs regroup proteins related to ciliary dynein machinery and intraflagellar transport. Altogether, the results of gene enrichment analysis indicate that viral infections strongly impact the cilium-associated cellular machinery, in good agreement with different phenotypic observations. Indeed, beyond the fact that several measures, such as monitoring of TEER (Fig. 1C), suggest that, at least for influenza viruses, infection strongly impacts HAE physiology, we also obtained strong evidence of the negative impact of viral infection on mucociliary clearance. As illustrated in Fig. 6C, using polystyrene microbeads, the mean clearance velocity was reduced by more than 2-fold compared to the Mock condition in the case of influenza H1N1 (p-value < 0.01) and H3N2 and B (p-value < 0.0001) (Fig. 6C, left panel). In the context of hRSV infection, the mucociliary movement was completely abolished (p-value < 0.001), whereas it was only slightly reduced in hMPV-infected HAE (Fig. 6C, right panel). This observation validates a significant reduction of mucociliary



**Figure 6.** Cilium assembly/morphogenesis is down-regulated in viral-infected HAE. The significant enriched biological processes (down-regulated genes) induced by viral infections and their associated Benjamini-corrected p-values are shown (panel A). The log10-transformed (Benjamini corrected enrichment p-value) is color-coded in a gradient from dark blue (specific to one infection) to pale blue (common between all five infections). Dot size is proportional to p-value. The absence of dot in a column signifies the absence of enrichment of this specific biological process with the defined thresholds. The cilium assembly is common between all infections. A functional network constructed with the STRING database was used to better visualize genes commonly modulated during infections (panel B). The two resulting hubs account for proteins related to ciliary dynein machinery and intraflagellar transport. Finally, for an extra-validation of the impact of viral infection on mucociliary clearance, the velocity (panel C) of polystyrene beads was measured at the surface of infected HAE, in the same experimental conditions (MOI, timing) for H1N1, H3N2 and B (left panel), or hRSV hMPV (right panel) and compared to the velocity of identical beads in mock-infected HAE. \*\*\*p < 0.01 and \*\*\*\*p < 0.0001 compared to MOCK.

clearance consecutive to infection, and is in direct link with the described transcriptional downregulation of the cilium associated cellular machinery.

### Discussion

The main objective of this study was to perform a comparative analysis of transcriptomic signatures of infection among different major respiratory viruses (Influenza, hRSV and hMPV) in HAE. Since these viruses can cause relatively similar respiratory symptoms, it is indeed very interesting to compare their global impact at the level of their primary targets (e.g. respiratory cells) and consecutively better understand similarities and differences between viruses. It is worth noting that only few studies have performed such comparison, most of time limited to two viruses or viruses within the same family (e.g. among IAV subtypes), and with very specific and hence limited readouts (antiviral screening, miRNA profiling, etc)<sup>17,18,20,21</sup>. We advantageously used the HAE Mucilair model, which have been previously used in literature to study viral infections<sup>14–17,22,23</sup>. This experimental model constituted of human primary cells appears as an interesting compromise between the low availability/quantity/quality of clinical samples and the limited biological relevance of immortalized cell lines that are still widely used in fundamental research. A major challenge was to setup experimental conditions allowing a comparison between viruses that present different replicative and infectivity properties. After several setup preliminary experiments, we have defined adapted infection parameters (MOI, timing of infection, sampling time) for each virus in order to study and compare infections at a quite similar stage (during the viral peak). These conditions maximize the extent of HAE cells infected and hence ensure a transcriptional profile that will reflect a global state of infection. Interestingly, despite efficient infection, hRSV and hMPV did not significantly affect TEER values, in contrast with influenza viruses (Fig. 1), suggesting viral-dependent differences of impact on epithelium integrity. In addition we found that hMPV and hRSV viral peaks were reached much later than those of influenza viruses (Fig. 1),

which could be also explained by the inherent differences between viruses, but also by the differential mode of viral spreading from one cell to another<sup>24</sup>. Our results suggest that these inherent differences in viral replication kinetics observed in the clinic<sup>25</sup> are more authentically reproduced in the well-differentiated HAE model when compared to the classic monolayer cell lines widely used in the literature.

Another aim of the study was to couple transcriptomic data with different types of virological, immunological and physiological observations to highlight potential correlations that could help gain better insight from the comparative analysis of the different viruses studied. The use of the HAE model allowed us to monitor several parameters at comparable time points and to investigate possible correlations between phenotypic observations/physiological measures and virogenomic signatures. For example, we demonstrated that the viral peak was correlated with a marked decrease of TEER values and changes on the epithelial surface visible through optical microscopy in the case of influenza viruses (Fig. 1C), in good agreement with previously published observations by our group<sup>26</sup>. This inverse correlation could be linked with the strong negative impact of influenza viruses on the regulation of cilium-associated genes (Fig. 6), with a consecutive impact on epithelium integrity. The major enrichment of down-regulated cilium-associated genes observed was also clearly associated to a strong decrease of mucociliary clearance in the context of infection (Fig. 6C). Another interesting transversal observation was made at the cytokine level. Indeed, the retrospective analysis of our virogenomic profiles indicate a relatively good level of concordance between the regulation of genes coding cytokines/chemokines and the measure of cytokines by a multiplex immunoassay, as exemplified by IP-10 (and to a lesser extent RANTES, IL-6, MIP-1B, IL-1B or IL-1-RA), in line with previous observations<sup>27</sup> (Fig. 2, Supplementary Fig. 1 and Table 2).

The comparative analysis of transcriptional profiles generated in this study allowed us to establish a common global virogenomic signature of infection, constituted by a subset of 112 up-regulated and 98 down-regulated genes (Fig. 4A,B) that reflect the host response to the different respiratory viruses. Interestingly, we found that, despite being relatively distinct in many aspects of their infection cycle and pathogenesis, viruses such as hMPV and influenza viruses share a large common signature, mostly through the upregulation of genes directly or indirectly involved in the IFN response (Fig. 5), and notably the type III (lambda) IFN response (Supplementary Fig. 1). Type III is major IFN known to be secreted by the human respiratory epithelium following influenza and hRSV infections *in vivo*<sup>28,29</sup>, which also illustrates the biological relevance of the HAE experimental model used in this study. In contrast, less information is available regarding the IFN response in hMPV-infected individuals, but some reports suggest that hMPV infection also induces type III IFN *in vivo*, yet at lower levels in the case of premature infants<sup>30,31</sup>. Whereas the nature of the viral inducers of this type III IFN response in HAE could (or not) be different between influenza, hRSV and hMPV, this response most certainly occurs *via* the same ligands and signaling components, a phenomenon that could be considered of great interest especially in the context of viral co-infections and also for the design of broad-spectrum antiviral therapeutic strategies. Another interesting common feature revealed by the global virogenomic signature shared between hRSV, hMPV and influenza viruses is the global downregulation of cilium-related genes, mostly related to intraflagellar transport and ciliary dynein machinery (Fig. 6B), whose protein products are critical for the assembly, maintenance and function of motile and sensory cilia<sup>32</sup>. These transcriptomic data were in good agreement with the indirect evaluation of mucociliary clearance, using polystyrene microbeads (Fig. 6C). The mucociliary clearance is one of the first and foremost, though often overlooked, lines of defense of the epithelium against infection<sup>33</sup>. Indeed, a relatively limited amount of data, mostly obtained in studies dedicated to influenza viruses and hRSV, is available regarding the impact of respiratory viruses on the epithelium cilia. More particularly, the impact of respiratory viral infections on cilium-related gene expression was not specifically investigated. Several reports indicate that influenza infection in airway epithelial experimental models results in a loss of ciliated cells and the associated impairment of mucociliary clearance, which could explain why a primary viral infection can “pave the way” for a secondary infection by other pathogens such as bacteria<sup>34,35</sup>. In addition, hRSV has also been reported to induce an increase on ciliary dyskinesia combined with ciliary loss and epithelial damage, hence resulting in a strong decrease of mucociliary clearance<sup>36</sup>. This interplay between respiratory viruses and the cilium-related machinery is of great interest, even more in the context of pathological defective mucociliary clearance such as cystic fibrosis, where co-infections are known to be associated with more severe respiratory pathologies<sup>37,38</sup>.

In conclusion, our descriptive study using a comparative transversal approach in a HAE model highlights several facets of the host responses that are common/specific to the infection process by different major respiratory viruses. Future investigations will focus more precisely on the specific virogenomic profile of hMPV in HAE, which appears to be relatively distinct to the other viruses studied. In addition, these collected data constitute a very interesting starting point for future studies focused on specific cellular factors, sometimes overlooked in previous studies performed in less relevant cellular models. Our work also indicates that it is possible to combine different types of experimental approaches and parameters in order to discriminate the etiology of respiratory viral infections with very similar clinical manifestations. In that regard, further development in this direction would be promising for the future characterization of new biomarkers or groups of biomarkers of diagnostic interest, or as surrogates for the efficacy evaluation of future innovative treatments. Finally, the virogenomic signatures of infection determined in this study could also be used for the future identification and repurposing of molecules for their broad-spectrum antiviral activities<sup>26</sup> and/or alternatively, the identification of new cellular targets of choice for the design of new host-targeted therapeutic approaches.

## Materials and Methods

**Cells and viruses.** Influenza A/Lyon/969/2009(H1N1) (2009 pandemic strain), B/Massachusetts/2/2012 and A/Texas/50/2012(H3N2) viral strains were produced in MDCK cells (ATCC CCL-34), using EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza) and 1 µg/mL Lys-acetylated bovine pancreas trypsin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Viral titers in plaque forming units (PFU/ml) and tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/mL) were determined in MDCK cells as previously

described<sup>39,40</sup>. Respiratory syncytial virus (hRSV-A Long strain ATCC-VR26) and human metapneumovirus (hMPV-B strain CAN97-82 (B1) and CAN98-75 (B2)) were produced in Hep-2 cells (ATCC CCL-23) and in LLCMK2 cells (ATCC CCL7), respectively, using EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (Lonza), at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Viral stocks were titrated in tissue culture infectious dose 50% (TCID<sub>50</sub>/mL) in the case of hRSV and in fluorescent focus units (ffu/mL) in the case of hMPV, as previously described<sup>41</sup>.

**Viral infection in reconstituted human airway epithelium (HAE).** MucilAir HAE, reconstituted using human primary cells obtained from nasal biopsies, were purchased from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland) and maintained in air-liquid interphase with specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. For infection experiments, apical poles were gently washed twice with warm OptiMEM medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) and then infected with a 150 µL dilution of the different viruses in OptiMEM medium, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 (hMPV-B CAN97-82 and influenza B/Massachusetts/2/2012), 1 (RSV-A Long) or 10 (influenza A/Lyon/969/2009(H1N1) and influenza A/Texas/50/2012(H3N2)). After 1 h incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, the viral suspension was removed and HAE were again gently washed with 300 µL of OptiMEM. For mock infection, the same procedure was performed using OptiMEM as the inoculum. For viral kinetics studies, apical sampling was performed between 24- and 72-hours post-infection (hpi) for influenza viruses, or at 3 and 5- or 6-days post-infection (dpi) respectively for hMPV and RSV. Collected samples were separated into 2 tubes: one for viral titration and one for cytokine assay. Variations in trans-epithelial electrical resistance ( $\Delta$  TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter for TEER) and expressed as Ohm/cm<sup>2</sup>. At the end of viral kinetics (72 hpi, 5 dpi or 6 dpi), cells were harvested in RLT buffer (Qiagen) and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). For indirect evaluation of mucociliary clearance, 10 µm-diameter polystyrene microbeads were seeded onto the apical surface of HAE. The particle movement was tracked using videomicroscopy and ImageJ software and was expressed as a velocity (µm/s).

**Multiplex immunoassay of cytokines/chemokines.** Samples collected at apical poles of HAE were screened for the presence of 27 human cytokines and chemokines, as previously described<sup>27</sup>, using the Bio-Plex Pro Human Cytokine Standard 27-Plex kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) on a FLEXMAP 3D analyzer (Luminex, Austin, Texas, USA). Concentrations outside the observation range were arbitrary replaced by zero (if the observation is reported below the detection threshold) or 800000 (if the observation was above the detection threshold). Mean signal was calculated for each condition. For comparison purpose, for each cytokine/chemokine, results were expressed as log-transformed ratio compared to Mock except for the RSV GM-CSF condition where no signal could be measured for which it was set to zero. Visualization of results was achieved using the fmsb R package.

**Real-time quantitative PCR.** Each HAE was lysed with 150 µL of RLT buffer (Qiagen) 72 h p.i, 5dpi or 6dpi for influenza viruses, hMPV and hRSV, respectively. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After reverse transcription, real-time qPCR was performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 96-well plates. qPCR primers (GAPDH: Hs02758991\_g1, IFNL1: Hs00601677\_g1, IFNL2: Hs00820125\_g1, IFIT2: Hs00533665\_m1, IFI44L: Hs00915292\_m1) and probe (TaqMan gene expression assays) were provided by Thermo Fisher Scientific. GAPDH was included in each well, in duplex, as the endogenous standard reference. Each sample was analyzed in duplicate, and the cycle threshold (Ct) values were normalized against the endogenous GAPDH reference. Relative changes in gene expression were determined using the  $\Delta\Delta$ Ct method and reported as the fold change relative to the uninfected mock control.

**Sample processing, RNA preparation and sequencing.** The Scriptseq complete Gold kit-Low Input (SCL6EP, Epicentre) was used according to manufacturer's instructions to prepare cDNA libraries from 200 ng of total RNA. Amplified and indexed libraries with primers provided in the ScriptSeq Index PCR Primers kit (RSBC10948, Epicentre) were quantified with QuBit and Bioanalyzer2100, pooled in equimolar concentrations and sequenced as 100 bp paired-end reads on an Illumina HiSeq. 2500 system (Illumina, Carlsbad, CA), with a required minimum of 40 million reads sequenced per sample. Conversion and demultiplexing of reads were performed using bcl2fastq 1.8.4 (Illumina). The FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) was used for quality controls of the raw data. Reads were trimmed using the Trimmomatic software<sup>42</sup>, with a minimum quality threshold of Q30. Reads were pseudo-aligned to the Homo sapiens genome (GRCh38.p11) using the Kallisto software<sup>43</sup>. The results of the main quantification (abundance estimate in Transcripts Per Million) were used for principal component analysis (PCA) with the R packages factoextra and FactoMineR<sup>44</sup>. Statistical analysis was performed in R3.3.1 with the package EdgeR 3.14.0<sup>45</sup>. Differential expression was calculated by comparing each condition to the mock using a linear model. The Holm procedure was used to control the false discovery rate. Genes with an absolute fold change >2 and a corrected p-value < 0.05 were considered to be differentially expressed. Visualization of subsequent analysis results was achieved using the UpsetR and ggplot2 R packages.

**Functional analysis.** Pathway and functional enrichment analysis were carried out using the web-based tool DAVID v6.8 (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)<sup>46</sup>. GO terms and pathways were considered enriched when their Benjamini-Hochberg corrected enrichment p-value was below 0.01.

## References

- Williams, B. G., Gouws, E., Boschi-Pinto, C., Bryce, J. & Dye, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 25–32 (2002).
- Mandell, L. A. Etiologies of Acute Respiratory Tract Infections. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 503–506 (2005).
- WHO | Acute respiratory infections. WHO Available at, [http://apps.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index.html](http://apps.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html). (Accessed: 3rd June 2016).
- Seo, Y. B. *et al.* Etiology and Clinical Outcomes of Acute Respiratory Virus Infection in Hospitalized Adults. *Infect. Chemother.* **46**, 67–76 (2014).
- Dasaraju, P. V. & Liu, C. Infections of the Respiratory System. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
- Hancock, A. S. *et al.* Transcriptome Analysis of Infected and Bystander Type 2 Alveolar Epithelial Cells during Influenza A Virus Infection Reveals *In Vivo* Wnt Pathway Downregulation. *J. Virol.* **92** (2018).
- Parnell, G. P. *et al.* A distinct influenza infection signature in the blood transcriptome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Crit. Care Lond. Engl.* **16**, R157 (2012).
- Zhang, N. *et al.* Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection. *BMC Med. Genomics* **11**, 20 (2018).
- Ampuero, S. *et al.* Time-course of transcriptome response to respiratory syncytial virus infection in lung epithelium cells. *Acta Virol.* **62**, 310–325 (2018).
- Steerman, Y. *et al.* Dissection of Influenza Infection *In Vivo* by Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Syst.* **6**, 679–691.e4 (2018).
- Josset, L. *et al.* Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* **5** (2010).
- Terrier, O. *et al.* Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virol. J.* **8**, 285 (2011).
- Schmolke, M., Viemann, D., Roth, J. & Ludwig, S. Essential impact of NF-kappaB signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 5180–5189 (2009).
- Villeneuve, R., Shields, M. D. & Power, U. F. Respiratory syncytial virus interaction with human airway epithelium. *Trends Microbiol.* **21**, 238–244 (2013).
- Brookes, D. W., Miah, S., Lackenby, A., Hartgroves, L. & Barclay, W. S. Pandemic H1N1 2009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise in enzyme activity and viral fitness. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 466–470 (2011).
- van Doremalen, N. *et al.* A Single Amino Acid in the HA of pH1N1 2009 Influenza Virus Affects Cell Tropism in Human Airway Epithelium, but Not Transmission in Ferrets. *PLoS ONE* **6**, e25755 (2011).
- Boda, B. *et al.* Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res.* **156**, 72–79 (2018).
- González-Parra, G. *et al.* A comparison of RSV and influenza *in vitro* kinetic parameters reveals differences in infecting time. *PLoS One* **13**, e0192645 (2018).
- Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).
- Choi, W.-S. *et al.* Screening for Neuraminidase Inhibitor Resistance Markers among Avian Influenza Viruses of the N4, N5, N6, and N8 Neuraminidase Subtypes. *J. Virol.* **92** (2018).
- Terrier, O. *et al.* Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J. Gen. Virol.* **94**, 985–995 (2013).
- Reus, A. A. *et al.* Feasibility of a 3D human airway epithelial model to study respiratory absorption. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **28**, 258–264 (2014).
- Essaïdi-Laziosi, M. *et al.* Propagation of respiratory viruses in human airway epithelia reveals persistent virus-specific signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 2074–2084 (2018).
- Cifuentes-Muñoz, N., Dutch, R. E. & Cattaneo, R. Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLOS Pathog.* **14**, e1007015 (2018).
- Bagga, B. *et al.* Comparing influenza and RSV viral and disease dynamics in experimentally infected adults predicts clinical effectiveness of RSV antivirals. *Antivir. Ther.* **18**, 785–791 (2013).
- Pizzorno, A. *et al.* Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **10** (2019).
- Hoffmann, J. *et al.* Viral and bacterial co-infection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: a translational study. *Sci. Rep.* **6**, 38532 (2016).
- Andreaskos, E., Salagianni, M., Galani, I. E. & Koltsida, O. Interferon-λs: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis in the Respiratory Tract. *Front. Immunol.* **8**, 1232 (2017).
- Wells, A. I. & Coyne, C. B. Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends Immunol.* **39**, 848–858 (2018).
- Uche, I. K. & Guerrero-Plata, A. Interferon-Mediated Response to Human Metapneumovirus Infection. *Viruses* **10** (2018).
- Pancham, K. *et al.* Premature infants have impaired airway antiviral IFN $\gamma$  responses to human metapneumovirus compared to respiratory syncytial virus. *Pediatr. Res.* **78**, 389–394 (2015).
- Scholey, J. M. Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* **180**, 23–29 (2008).
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R. & Regamey, N. The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 210–229 (2011).
- Smith, C. *et al.* Influenza virus infection of human ciliated respiratory epithelial cells in culture. *Eur. Respir. J.* **42**, P4406 (2013).
- Wu, N.-H. *et al.* The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells. *Sci. Rep.* **6**, 39668 (2016).
- Smith, C. M. *et al.* Ciliary dyskinesia is an early feature of respiratory syncytial virus infection. *Eur. Respir. J.* **43**, 485–496 (2014).
- Hendricks, M. R. & Bomberger, J. M. Digging through the Obstruction: Insight into the Epithelial Cell Response to Respiratory Virus Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Virol.* **90**, 4258–4261 (2016).
- McCullers, J. A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 252–262 (2014).
- Pizzorno, A., Bouhy, X., Abed, Y. & Boivin, G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *J. Infect. Dis.* **203**, 25–31 (2011).
- Moules, V. *et al.* *In vitro* characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**, 215–224 (2010).
- Dubois, J. *et al.* Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *J. Gen. Virol.* **98**, 1174–1180 (2017).
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 2114–2120 (2014).
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527 (2016).
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).

45. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinform. Oxf. Engl.* **26**, 139–140 (2010).
46. Dennis, G. Jr. et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, (P3 (2003)).

### Acknowledgements

The authors want to thank Jacques Corbeil and Frederic Raymond (Research Center in Infectious Diseases of the CHU de Quebec and Laval University, Quebec) for their help and useful advice. This work was funded by grants from FINOVI foundation, the Région Auvergne Rhône-Alpes (CMIRA No. 14007029 and AccueilPro COOPERA No. 15458 grants), and Canadian Institutes of Health Research (No. 229733 and 230187). Claire Nicolas de Lamballerie was funded by National Association for Research in Technology (ANRT). Guy Boivin is the holder of the Canada Research Chair on influenza and other respiratory viruses. Funding institutions had no participation in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, or in the writing of the manuscript.

### Author Contributions

C.N.d.L., A.P., J.D., T.J., B.P., M.B., A.T., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. carried out the experiments and analysis of the results. C.N.d.L., A.P., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. participated to conception and coordination of the study. C.N.d.L., A.P., C.L.L., B.L., G.B., O.T. and M.R.C. designed the study and wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48013-7>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### 3. “In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2”

Antiviral Research 181 (2020) 104878



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)



Short Communication

#### *In vitro* evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2

Andrés Pizzorno<sup>a</sup>, Blandine Padey<sup>a,b</sup>, Julia Dubois<sup>a</sup>, Thomas Julien<sup>a,c</sup>, Aurélien Traversier<sup>a</sup>, Victoria Dulière<sup>a,c</sup>, Pauline Brun<sup>a,c</sup>, Bruno Lina<sup>a,d</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>a,c,\*\*,1</sup>, Olivier Terrier<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France

<sup>b</sup> Signia Therapeutics SAS, Lyon, France

<sup>c</sup> VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des Virus Influenza Sud, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
COVID-19  
Antivirals  
Drug combination  
Remdesivir  
Berberine  
Diltiazem

#### ABSTRACT

In response to the current pandemic caused by the novel SARS-CoV-2, identifying and validating effective therapeutic strategies is more than ever necessary. We evaluated the *in vitro* antiviral activities of a shortlist of compounds, known for their cellular broad-spectrum activities, together with drugs that are currently under evaluation in clinical trials for COVID-19 patients. We report the antiviral effect of remdesivir, lopinavir, chloroquine, umifenovir, berberine and cyclosporine A in Vero E6 cells model of SARS-CoV-2 infection, with estimated 50% inhibitory concentrations of 0.99, 5.2, 1.38, 3.5, 10.6 and 3 μM, respectively. Virus-directed plus host-directed drug combinations were also investigated. We report a strong antagonism between remdesivir and berberine, in contrast with remdesivir/diltiazem, for which we describe high levels of synergy, with mean Loewe synergy scores of 12 and peak values above 50. Combination of host-directed drugs with direct acting antivirals underscore further validation in more physiological models, yet they open up interesting avenues for the treatment of COVID-19.

Despite unprecedented global efforts during the last months in the fight of the COVID-19 pandemic, which include more than 500 randomized clinical trials (“Covid-19 living Data,” n.d.), neither a preventive vaccine nor an effective treatment as a potential complement to standard supportive care have yet been validated. This situation is more problematic in the case of severe patients, provided increasing clinical reports account for a rather biphasic pathophysiology. In fact, the initial phase of the disease is characterized by a typical virus-driven response, which might subsequently (by day 7–10 after symptom onset) shunt into an acute immunopathologic phase with an associated hypercytokinemia (Huang et al., 2020; Mehta et al., 2020; Zhu et al., 2020), hence adding more complexity to the choice of a potentially effective treatment. However, such “cytokine storm” is not independent of viral replication

but frequently an attempt to clear the viral aggression. In that regard, recent data suggest that high virus titers during the first week of infection could be correlated with a higher probability of moderate to severe clinical outcome (Liu et al., 2020b; Zheng et al., 2020). This highlights the value of identifying and validating molecules and/or combination of molecules with a strong SARS-CoV-2 antiviral activity for an early and effective reduction of viral load that could ultimately contribute to a more favorable clinical prognosis.

In this context, we sought to assess the *in vitro* antiviral activity of a shortlist of compounds known for their relative broad-spectrum antiviral activities that in our view have a rationale for a putative inhibitory effect against SARS-CoV-2 and, on top of that, could be readily available for further pre-clinical and clinical evaluation. Favipiravir (T-705; 6-

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team VirPath), Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France.

E-mail addresses: [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr) (M. Rosa-Calatrava), [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr) (O. Terrier).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104878>

Received 6 May 2020; Received in revised form 6 July 2020; Accepted 7 July 2020

Available online 15 July 2020

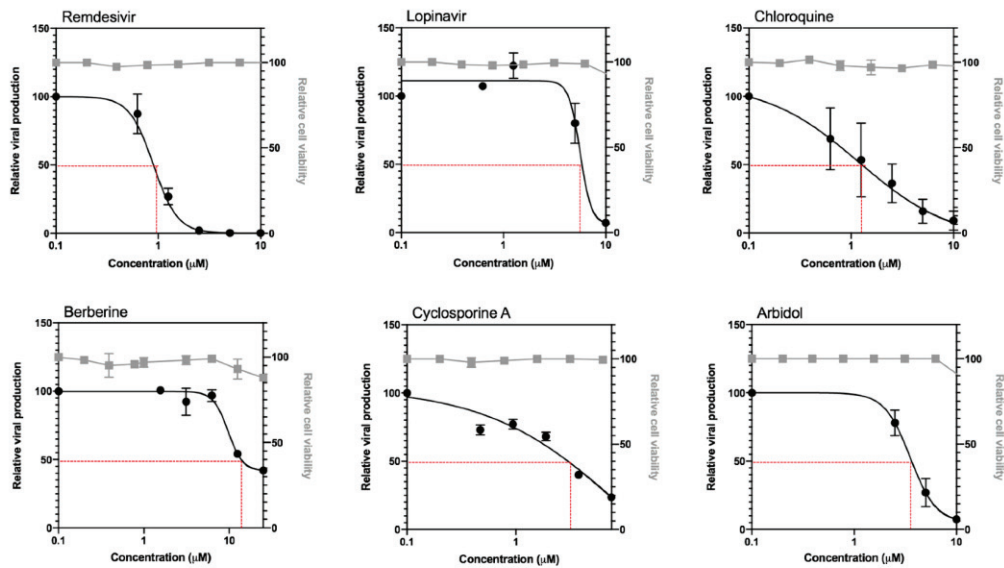
0166-3542/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



**Table 1**  
Antiviral activity of post-infection treatment with candidate molecules against SARS-CoV-2 *in vitro*.

	Drug class	Drug indication	CAS Number	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	CC50 ( $\mu\text{M}$ )	SI
Remdesivir	Antimetabolites Antiviral agents	Treatment of Ebola virus disease	1809249-37-3	0.987	275	278.62
Lopinavir	Antiviral agents	Treatment of HIV-infection	192725-17-0	5.246	45	8.57
Chloroquine	Antimalarial agents	Treatment of malaria, rheumatoid arthritis, glioma	54-05-7	1.38	238	172.46
Berberine	Alkaloid	Treatment of parasitic and fungal infections	2086-83-1	10.577	>400	>37.84
Cyclosporine A	Enzyme inhibitors Immunosuppressive agents	Prophylaxis of organ rejection, treatment of rheumatoid arthritis & dermatologic diseases	59865-13-3	3.048	>90	>29.53
Arbidol (umifenovir)	Antiviral agents	Treatment of influenza infection	131707-25-0	3.537	75	21.20
Diltiazem	antihypertensive & vasodilating agents	Management of hypertension	42399-41-7	>45	424	<9.42
Ribavirin	Hepatitis C & antiviral agents	Treatment of HCV infection	36791-04-5	>10	>100	nd
Favipiravir	Antiviral agents	Treatment of influenza infection	259793-96-9	>100	631	<6.31

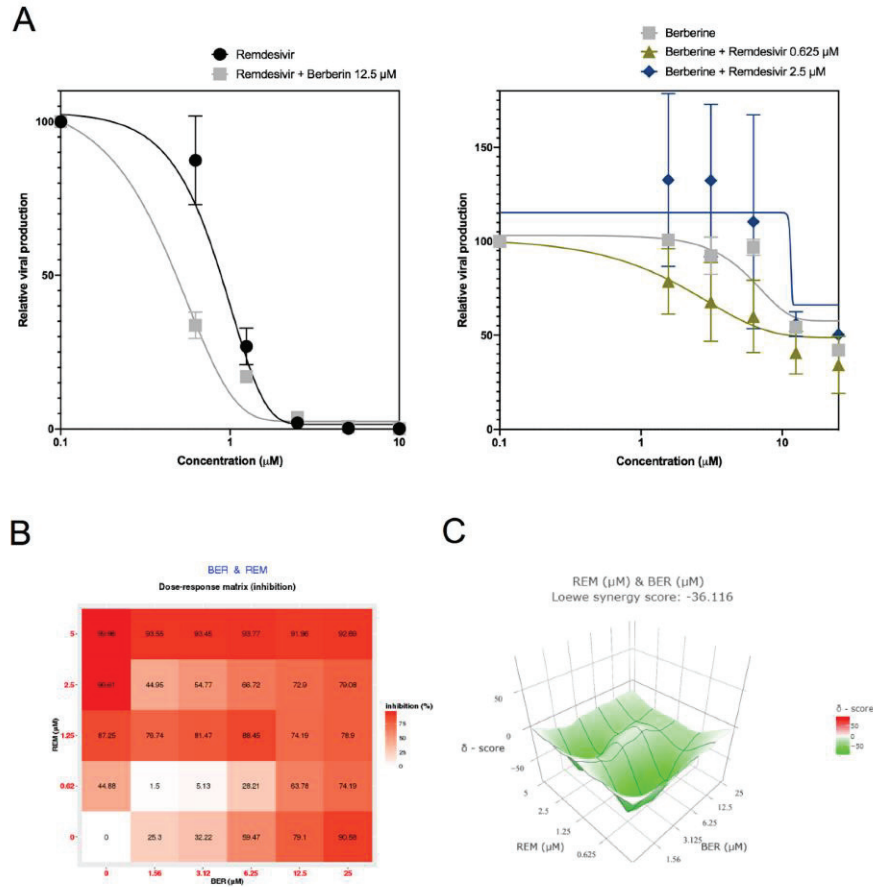


**Fig. 1.** Evaluation of antiviral activity of six drug candidates against SARS-CoV-2 *in vitro*. Vero E6 cells were infected by SARS-CoV-2 at a MOI of 0.01 and treated 1 h post infection (hpi) with serial dilutions of remdesivir, lopinavir, chloroquine, berberine, cyclosporine A and arbidol (umifenovir). Viral production was measured 48 hpi and expressed in relative values compared to the vehicle-treated control. The impact of treatment on cell viability was assessed by MTS assay (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega), and expressed in relative values compared to control. Cell viability measurements were performed to ensure that molecular viral quantification was performed within a non-cytotoxic concentration range that could bias the measurement.

fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamine) is a pyrazine derivative that has demonstrated potent antiviral activity against multiple RNA viruses, being currently approved in Japan for the treatment of influenza infections (Furuta et al., 2013, 2002). The ribonucleoside analog ribavirin (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is also known to show broad-spectrum antiviral activity and is used in combination with interferon- $\alpha$  to treat hepatitis C virus infection (Crotty et al., 2000; Sidwell et al., 1972). Umifenovir (Arbidol) is a small indole-derivative molecule, licensed in Russia and China for the prophylaxis and treatment of influenza and other respiratory viral infections (Blaising et al., 2014). Berberine is a plant-derived isoquinoline alkaloid, described as having broad antiviral activity, notably against influenza and alphaviruses (Varghese et al., 2016a; Yan et al., 2018). Cyclosporine A is a widely used immunosuppressant drug also known for its ability to inhibit the replication of several viruses, including several coronaviruses (de Wilde et al., 2011). Lastly, diltiazem is a voltage gated Ca<sup>2+</sup> channel

blocker commonly used as anti-hypertensive, which we have recently repurposed as a host-directed inhibitor of influenza virus (Pizzorno et al., 2019).

Molecules were obtained from Sigma-Aldrich and 10 mM stock solutions were prepared in DMSO (favipiravir, lopinavir, remdesivir, umifenovir), ethanol (berberine, cyclosporine A) or water (chloroquine, diltiazem, ribavirin). We therefore performed experimental infections in Vero E6 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 using the BetaCoV/France/IDF0571/2020 SARS-CoV-2 strain, previously isolated from one of the first COVID-19 cases in France. One-hour post infection (hpi), the viral inoculum was removed, and cells were treated with serial dilutions of the candidate molecules in infection media. Dilutions of the corresponding solvents in infection media were used for mock-treated controls. Supernatants were collected 48 hpi for subsequent viral titration by RT-qPCR, as described elsewhere (Pizzorno et al., 2020). Noteworthy, we included the active principles of the three drugs evaluated in



**Fig. 2.** Evaluation of remdesivir-berberine combined treatment against SARS-CoV-2 *in vitro*. **A.** Vero E6 cells were infected by SARS-CoV-2 at a MOI of 0.01 and treated 1 hpi with serial dilutions of remdesivir in the presence of different fixed concentrations of berberine (A, left panel) or, alternatively, serial dilutions of berberine in the presence of different fixed concentrations of remdesivir (A, right panel). Viral production was measured 48 hpi and expressed in relative values compared to the vehicle-treated control. **B.** Dose-response percent inhibition matrix of single and combined remdesivir-berberine treatments. **C.** Interaction landscape between remdesivir and berberine as calculated using the Loewe additive model. Areas with synergy scores of  $-10$  or lower (green) represent zones of drug antagonism.

the WHO's COVID-19 Solidarity Trial ("Solidarity 2020" clinical trial for COVID-19 treatments," 2020) as comparators: i) remdesivir, an experimental adenosine nucleotide analog prodrug previously evaluated in the context of the 2018 Kivu Ebola epidemic (Mulangu et al., 2019); ii) lopinavir, a protease inhibitor antiretroviral approved for the treatment of HIV infections (Chu, 2004); iii) chloroquine, an aminoquinolone derivative mainly used for the treatment of malaria but also for certain chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus (Al-Bari, 2017).

Table 1 and Fig. 1 recapitulate the main features of the evaluated compounds, including the calculated 50% inhibitory concentration (IC50), 50% cytotoxic concentration (CC50) and selectivity index (SI) values as well as the dose-response curves of the compounds with such an effect. As expected, calculated IC50 values for lopinavir, remdesivir and chloroquine were in the low micromolar range (5.2, 0.99 and 1.38  $\mu\text{M}$ , respectively), with the latter two showing a very favorable SI (278 and 172, respectively), in good agreement with recent reports (Choy et al., 2020; Wang et al., 2020). On the other hand, although their efficacy against influenza viruses was previously validated (data not

shown), neither diltiazem nor ribavirin or favipiravir showed antiviral activity against SARS-CoV-2 in the conditions tested. This is not surprising in the case of diltiazem, considering its recently described antiviral properties are mostly based on the capacity to induce type I and III interferon (IFN) antiviral responses (Pizzorno et al., 2019), which are partially abrogated in the Vero E6 cell line (Prescott et al., 2010). However, we would *a priori* have expected that broad spectrum inhibitors of viral RNA synthesis ribavirin and favipiravir show at least mild antiviral activity against SARS-CoV-2, notably in the context of preliminary clinical data suggesting a putative benefit of favipiravir for the treatment of COVID-19 patients in comparison with umifenovir (Chen et al., 2020a; Liu et al., 2020a). Nonetheless, our results are in line with recent observations by Choy and colleagues (Choy et al., 2020). Interestingly, umifenovir, berberine and cyclosporine A, three compounds previously reported to have broad antiviral activity, displayed dose-dependent antiviral responses against SARS-CoV-2. Umifenovir (IC50: 3.5  $\mu\text{M}$  and SI: 21) was reported to inhibit fusion between the viral envelope and the membrane of the target cell, although the exact mechanism of this inhibition is still not well described. Besides its

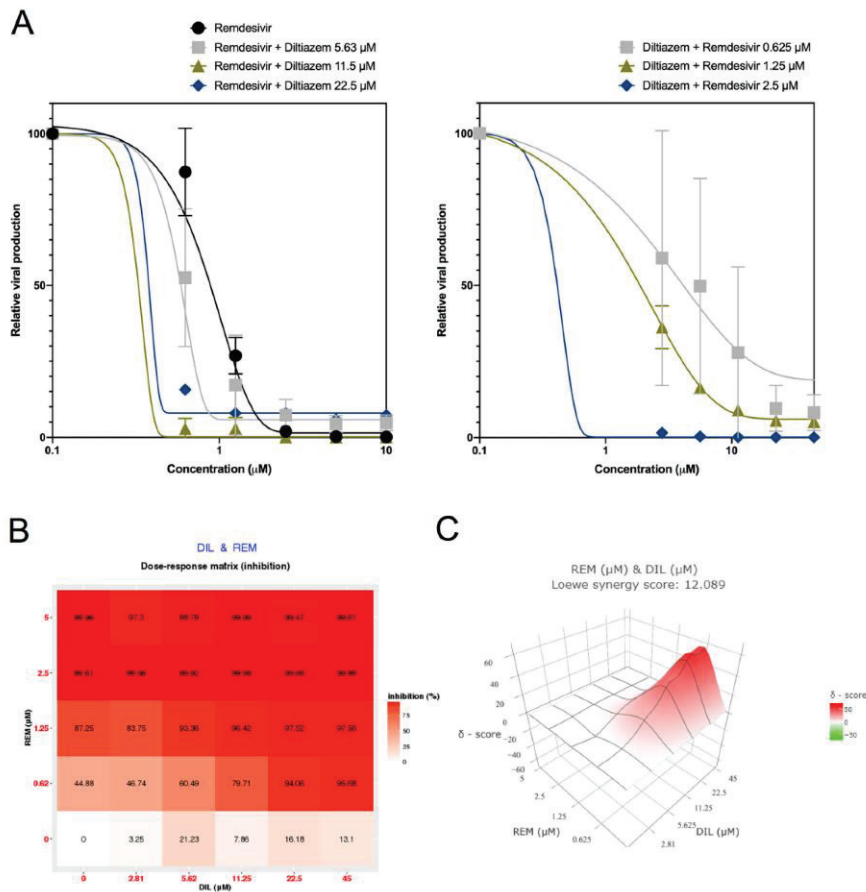
**Table 2**  
**Inhibitory effect of remdesivir-berberine combined treatment against SARS-CoV-2 *in vitro*.** For each experimental condition, IC50, CC50 and the corresponding SI values are listed.

Combination treatment	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	CC50 ( $\mu\text{M}$ )	SI
Remdesivir	0.987	275	278.62
Remdesivir + Berberine 12.5 $\mu\text{M}$	0.409	264	645.47
Berberine	10.577	> 400	> 37.84
Berberine + Remdesivir 0.625 $\mu\text{M}$	6.95		> 57.55
Berberine + Remdesivir 2.5 $\mu\text{M}$	8.237		> 48.56

anti-influenza properties, umifenovir has been shown to inhibit some arthropod-borne flaviviruses, including Zika, West Nile and tick-borne encephalitis virus (Haviernik et al., 2018). Umifenovir is currently being evaluated in clinical trials against COVID-19 (Chen et al., 2020a;

Liu et al., 2020a). Berberine (IC50: 10.6  $\mu\text{M}$  and SI: >37) has demonstrated *in vitro* and *in vivo* (mice) antiviral activity against influenza, Chikungunya and enterovirus 71, possibly by downregulating autophagy and the MEK/ERK signaling pathway (Varghese et al., 2016b, 2016b). Cyclosporine A (IC50: 3.0  $\mu\text{M}$  and SI: >29) was shown to be very effective in inhibiting two different coronaviruses *in vitro*, human coronavirus 229E (HCoV-229E) and mouse hepatitis virus (MHV) but not SARS-CoV (de Wilde et al., 2011). Although the exact mechanism by which cyclosporine A inhibits coronavirus replication remains to be established, an early blockage of viral RNA and protein synthesis has been suggested (de Wilde et al., 2011).

There is arguably a consensus among virologists that combining two compounds with antiviral activity and different viral or cellular targets could result in better virological and physiological responses than those of antiviral monotherapy, for which we decided to explore this hypothesis in the case of SARS-CoV-2. Provided recent results of clinical trials failed to show a therapeutic benefit of the use of either the lopinavir-ritonavir association or chloroquine (or its derivative hydroxychloroquine) in COVID-19 patients (Cao et al., 2020; Chen et al., 2020b; Magagnoli et al., 2020), we then selected remdesivir as the main



**Fig. 3.** Synergistic effect of remdesivir-diltiazem combined treatment against SARS-CoV-2 *in vitro*. **A.** Vero E6 cells were infected by SARS-CoV-2 at a MOI of 0.01 and treated 1 hpi with serial dilutions of remdesivir in the presence of different fixed concentrations of diltiazem (A, left panel) or, alternatively, serial dilutions of diltiazem in the presence of different fixed concentrations of remdesivir (A, right panel). Viral production was measured 48 hpi and expressed in relative values compared to the vehicle-treated control. **B.** Dose-response percent inhibition matrix of single and combined remdesivir-diltiazem treatments. **C.** Interaction landscape between remdesivir and diltiazem as calculated using the Loewe additive model. Areas with synergy scores of 10 or higher (red) represent zones of drug synergy.

**Table 3**  
**Inhibitory effect of remdesivir-diltiazem combined treatment against SARS-CoV-2 *in vitro*.** For each experimental condition, IC50, CC50 and the corresponding SI values are listed.

Combination treatment	IC50 ( $\mu$ M)	CC50 ( $\mu$ M)	SI
Remdesivir	0.987	275	278.62
Remdesivir	0.627	267	425.83
+ Diltiazem 5.62 $\mu$ M			
Remdesivir	0.116		2301.72
+ Diltiazem 11.5 $\mu$ M			
Remdesivir	0.228		1171.05
+ Diltiazem 22.5 $\mu$ M			
Diltiazem	>45	424	<9.42
Diltiazem	5.268	414	78.59
+ Remdesivir 0.625 $\mu$ M			
Diltiazem	1.892		218.81
+ Remdesivir 1.25 $\mu$ M			
Diltiazem	0.554		747.29
+ Remdesivir 2.5 $\mu$ M			

antiviral agent for our drug combination studies. Following the same infection protocol described above, remdesivir dose-response experiments were repeated in the presence of berberine or diltiazem, given their expected host-directed antiviral properties. Alternatively, berberine and diltiazem dose-response curves were performed in the presence of different fixed concentrations of remdesivir. Our results show that the presence of 12.5  $\mu$ M berberine induces a shift of the remdesivir dose-response towards lower drug concentration values (Fig. 2A, left panel), as evidenced by a >2-fold reduction of remdesivir IC50 (0.41  $\mu$ M versus 0.99  $\mu$ M), with the associated increase on the SI (Table 2). A similar trend was observed when we analyzed the berberine dose-response profile in the presence of 0.625  $\mu$ M remdesivir but not at higher remdesivir concentrations (Fig. 2A, right panel and Table 2). To further explore this combination, we used SynergyFinder (Janevski et al., 2017) to calculate and visualize synergy scores, using a wider range of remdesivir/berberine concentrations spanning 24 different pairwise combinations. Interestingly, although the dose-response matrix shows a large range of pairwise combination with significant inhibitory effect (Fig. 2B), calculated Loewe synergy scores (Fig. 2C) account for a strong antagonism between remdesivir and berberine, with negative values distributed all throughout the synergy map regardless of drug concentrations (Fig. 2B and C). Following an analogous approach, the presence of diltiazem induced a stronger shift in the dose-response curve of remdesivir (Fig. 3A, left panel), with an up to 8.5-fold reduction of remdesivir IC50 values (0.12  $\mu$ M versus 0.99  $\mu$ M in presence of 11.5  $\mu$ M diltiazem) and the consequent SI increase (Table 3). A similar trend was observed for diltiazem dose-response curves in the presence of remdesivir (Fig. 3A, right panel). SynergyFinder analysis revealed a clear synergistic inhibitory effect of the combination, driven mainly by remdesivir but also by diltiazem, as shown by both the dose-response matrix (Fig. 3B) and the three-dimensional synergy map (Fig. 3C), with mean Loewe synergy scores of 12 and peak values above 50. Similar results were obtained using the Zero Interaction Potency (ZIP), Highest Single Agent (HAS), and Bliss independence models. Interestingly, the Loewe synergy scores obtained were quite high in comparison to the previously published synergistic combination of remdesivir and emetine (Choy et al., 2020).

In conclusion, our study demonstrated the *in vitro* efficacy against SARS-CoV-2 of broad-spectrum antivirals such as Remdesivir, Lopinavir, chloroquine, Arbidol and Ribavirin and repurposable host-targeted drug candidates such as Berberine or cyclosporine A in monotherapy. As

already reported by our group and others for the treatment of severe forms of influenza infection (Dunning et al., 2014; Pizzorno et al., 2019), drug combination highlighted the added value of combining drugs with different modes of action as a strategy to improve antiviral therapy. From this perspective, the remdesivir/diltiazem combination seems particularly interesting for the treatment of COVID-19, with a synergistic antiviral effect against SARS-CoV-2 in a wide dose range that remains below reported remdesivir therapeutic plasma concentrations. Although berberine, cyclosporine A and the remdesivir-diltiazem combination showed interesting potential as SARS-CoV-2 inhibitors, we are nonetheless aware of the inherent limits of the Vero E6 *in vitro* model, which may not accurately reflect the potential efficacy of antiviral molecules in more physiological models. In addition, the *a priori* counter-intuitive antagonistic effect observed for the remdesivir/berberine combination further illustrates the challenge of proposing effective drug combinations based on individual drug-efficacy data. We therefore expect our data constitute a starting point for further validation of selected candidates in more complex and biologically relevant pre-clinical models of SARS-CoV-2 infection before consideration for evaluation in the clinical setting.

#### Acknowledgments

This work was funded by INSERM REACTING (REsearch & ACTION emerging infectious diseases), CNRS, and Mérieux research grants. AP, BP, TJ, AT, OT and MRC are co-inventors of a patent application filed by INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1 and Signia Therapeutics for the repurposing of diltiazem for the treatment of SARS-CoV-2 infections (FR 20/02351).

#### References

- Al-Bari, MdA.A., 2017. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* 5, e00293 <https://doi.org/10.1002/prp2.293>.
- Blaising, J., Polyak, S.J., Pécheur, E.-I., 2014. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antivir. Res.* 107, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.04.006>.
- Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, Jingli, Fan, G., Ruan, L., Song, B., Cai, Y., Wei, M., Li, X., Xia, J., Chen, N., Xiang, J., Yu, T., Bai, T., Xie, X., Zhang, L., Li, C., Yuan, Y., Chen, H., Li, Huadong, Huang, H., Tu, S., Gong, F., Liu, Y., Wei, Y., Dong, C., Zhou, F., Gu, X., Xu, J., Liu, Z., Zhang, Y., Li, Hui, Shang, L., Wang, K., Li, K., Zhou, X., Dong, X., Qu, Z., Lu, S., Hu, X., Ruan, S., Luo, S., Wu, J., Peng, L., Cheng, F., Pan, L., Zou, J., Jia, C., Wang, Juan, Liu, X., Wang, S., Wu, X., Ge, Q., He, J., Zhan, H., Qiu, F., Guo, L., Huang, C., Jaki, T., Hayden, F.G., Horby, P.W., Zhang, D., Wang, C., 2020. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe covid-19. *N. Engl. J. Med.* 382 (19), 1787–1799. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001282>.
- Chen, C., Zhang, Yi, Huang, J., Yin, P., Cheng, Z., Wu, J., Chen, S., Zhang, Yongxi, Chen, B., Lu, M., Luo, Y., Ju, L., Zhang, J., Wang, X., 2020a. Favipiravir versus arbidol for COVID-19: a randomized clinical trial. *medRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20037432>, 03.17.20037432.
- Chen, Z., Hu, J., Zhang, Zongwei, Jiang, S., Han, S., Yan, D., Zhuang, R., Hu, B., Zhang, Zhan, 2020b. Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial. *medRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20040758>, 03.22.20040758.
- Choy, K.-T., Wong, A.Y.-L., Kaewpreedee, P., Sia, S.F., Chen, D., Hui, K.P.Y., Chu, D.K.W., Chan, M.C.W., Cheung, P.P.-H., Huang, X., Peiris, M., Yen, H.-L., 2020. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication *in vitro*. *Antivir. Res.* 178, 104786 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>.
- Chu, C.M., 2004. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax* 59, 252–256. <https://doi.org/10.1136/thorax.2003.012658>.
- [WWW Document] Covid-19 living Data, 2020 (accessed 5.4.20). <https://covid-nma.com/>.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y.N., Hong, Z., Andino, R., Cameron, C.E., 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* 6, 1375–1379. <https://doi.org/10.1038/82191>.
- de Wilde, A.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Thiel, V., Narayanan, K., Makino, S., Snijder, E.J., van Hemert, M.J., 2011. Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 2542–2548. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034983-0>.
- Dunning, J., Baillie, J.K., Cao, B., Hayden, F.G., 2014. Antiviral combinations for severe influenza. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1259–1270. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70821-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70821-7).

- Furuta, Y., Gowen, B.B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D.F., Barnard, D.L., 2013. Favipiravir (F-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antivir. Res.* 100, 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>.
- Furuta, Y., Takahashi, K., Fukuda, Y., Kuno, M., Kamiyama, T., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H., Minami, S., Watanabe, Y., Narita, H., Shiraki, K., 2002. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 977–981. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.977-981.2002>.
- Haviernik, J., Štefánik, M., Fojtíková, M., Kali, S., Tordo, N., Rudolf, I., Hubálek, Z., Eyer, L., Ruzek, D., 2018. Arbidol (umifenovir): a broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses. *Viruses* 10, 184. <https://doi.org/10.3390/v10040184>.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond. Engl.* 395, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T., Tang, J., 2017. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose–response matrix data. *Bioinformatics* 33, 2413–2415. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx162>.
- Liu, Q., Fang, X., Tian, L., Chen, X., Chung, U., Wang, K., Li, D., Dai, X., Zhu, Q., Xu, F., Shen, L., Wang, B., Yao, L., Peng, P., 2020a. The effect of Arbidol Hydrochloride on reducing mortality of Covid-19 patients: a retrospective study of real world data from three hospitals in Wuhan. *medRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.20056523>, 04.11.20056523.
- Liu, Y., Yan, L.-M., Wan, L., Xiang, T.-X., Le, A., Liu, J.-M., Peiris, M., Poon, L.L.M., Zhang, W., 2020b. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* 20 (6), 656–657. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2).
- Magagnoli, J., Narendran, S., Pereira, F., Cummings, T., Hardin, J.W., Sutton, S.S., Ambati, J., 2020. Outcomes of hydroxychloroquine usage in United States veterans hospitalized with Covid-19. *medRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20065920>, 04.16.20065920.
- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., Manson, J.J., 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* 395 (10229), 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0).
- Mulangu, S., Dodd, L.E., Davey, R.T., Tshiani Mbaya, O., Proschan, M., Mukadi, D., Lusakibanza Manzo, M., Nzolo, D., Tshomba Oloma, A., Ibanda, A., Ali, R., Coulbaly, S., Levine, A.C., Grais, R., Diaz, J., Lane, H.C., Muyembe-Tamfum, J.-J., the Palm Writing Group, 2019. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. *N. Engl. J. Med.* 381, 2293–2303. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910993>.
- Pizzorno, A., Padey, B., Julien, T., Trouillet-Assant, S., Traversier, A., Errazuriz-Cerda, E., Fouret, J., Dubois, J., Gaymard, A., Lescure, F.-X., Dulière, V., Brun, P., Constant, S., Poissy, J., Lina, B., Yazdanpanah, Y., Terrier, O., Rosa-Calatrava, M., 2020. Characterization and treatment of SARS-CoV-2 in nasal and bronchial human airway epithelia. *bioRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.31.017889>, 03.31.017889.
- Pizzorno, A., Terrier, O., Nicolas de Lamballerie, C., Julien, T., Padey, B., Traversier, A., Roche, M., Hamelin, M.-E., Rhéaume, C., Croze, S., Escuret, V., Poissy, J., Lina, B., Legras-Lachuer, C., Textoris, J., Boivin, G., Rosa-Calatrava, M., 2019. Repurposing of drugs as novel influenza inhibitors from clinical gene expression infection signatures. *Front. Immunol.* 10, 60. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00060>.
- Prescott, J., Hall, P., Acuna-Retamar, M., Ye, C., Wathelet, M.G., Ebihara, H., Feldmann, H., Hjelle, B., 2010. New world hantaviruses activate IFN $\alpha$  production in type I IFN-deficient Vero E6 cells. *PLoS One* 5, e11159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011159>.
- Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare Lois, G.P., Allen, B., Witkowski Roland, J.T., Robins, K., 1972. Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705–706. <https://doi.org/10.1126/science.177.4050.705>.
- Solidarity, 2020. Clinical trial for COVID-19 treatments [WWW Document]. accessed 4.27.20. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments>.
- Varghese, F.S., Kaukinen, P., Gläser, S., Bespalov, M., Hanski, L., Wennerberg, K., Kümmerer, B.M., Ahola, T., 2016a. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antivir. Res.* 126, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.12.012>.
- Varghese, F.S., Thaa, B., Amrun, S.N., Simarmata, D., Rausalu, K., Nyman, T.A., Merits, A., McInerney, G.M., Ng, L.F.P., Ahola, T., 2016b. The antiviral alkaloid berberine reduces chikungunya virus-induced mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Virol.* 90, 9743–9757. <https://doi.org/10.1128/JVI.01382-16>.
- Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., Xiao, G., 2020. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 30, 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
- Yan, Y.-Q., Fu, Y.-J., Wu, S., Qin, H.-Q., Zhen, X., Song, B.-M., Weng, Y.-S., Wang, P.-C., Chen, X.-Y., Jiang, Z.-Y., 2018. Anti-influenza activity of berberine improves prognosis by reducing viral replication in mice. *Phytother. Res.* 32, 2560–2567. <https://doi.org/10.1002/ptr.6196>.
- Zheng, S., Fan, J., Yu, F., Feng, B., Lou, B., Zou, Q., Xie, G., Lin, S., Wang, R., Yang, X., Chen, W., Wang, Q., Zhang, D., Liu, Y., Gong, R., Ma, Z., Lu, S., Xiao, Y., Gu, Y., Zhang, J., Yao, H., Xu, K., Lu, X., Wei, G., Zhou, J., Fang, Q., Cai, H., Qiu, Y., Sheng, J., Chen, Y., Liang, T., 2020. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 369, m1443. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

## 4. “Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs”



### ARTICLE

# Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs

Jonathan Lopez<sup>1\*</sup>, Marine Mommert<sup>2,3\*</sup>, William Mouton<sup>2,4\*</sup>, Andrés Pizzorno<sup>4\*</sup>, Karen Brengel-Pesce<sup>2\*</sup>, Mehdi Mezidi<sup>5</sup>, Marine Villard<sup>4</sup>, Bruno Lina<sup>4,6</sup>, Jean-Christophe Richard<sup>5</sup>, Jean-Baptiste Fassier<sup>7,8</sup>, Valérie Cheynet<sup>2</sup>, Blandine Padey<sup>4,9</sup>, Victoria Duliere<sup>4,10</sup>, Thomas Julien<sup>4,10</sup>, Stéphane Paul<sup>4</sup>, Paul Bastard<sup>11,12,13</sup>, Alexandre Belot<sup>3,4</sup>, Antonin Bal<sup>5,6</sup>, Jean-Laurent Casanova<sup>11,12,13,14</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>4,10</sup>, Florence Morfin<sup>5,6</sup>, Thierry Walzer<sup>4</sup>, and Sophie Trouillet-Assant<sup>4</sup>

**IFN-I and IFN-III immunity in the nasal mucosa is poorly characterized during SARS-CoV-2 infection. We analyze the nasal IFN-I/III signature, namely the expression of ISGF-3–dependent IFN-stimulated genes, in mildly symptomatic COVID-19 patients and show its correlation with serum IFN- $\alpha_2$  levels, which peak at symptom onset and return to baseline from day 10 onward. Moreover, the nasal IFN-I/III signature correlates with the nasopharyngeal viral load and is associated with the presence of infectious viruses. By contrast, we observe low nasal IFN-I/III scores despite high nasal viral loads in a subset of critically ill COVID-19 patients, which correlates with the presence of autoantibodies (auto-Abs) against IFN-I in both blood and nasopharyngeal mucosa. In addition, functional assays in a reconstituted human airway epithelium model of SARS-CoV-2 infection confirm the role of such auto-Abs in abrogating the antiviral effects of IFN-I, but not those of IFN-III. Thus, IFN-I auto-Abs may compromise not only systemic but also local antiviral IFN-I immunity at the early stages of SARS-CoV-2 infection.**

### Introduction

Cell-intrinsic immunity starts with microbial detection through innate sensors. In case of infection by RNA viruses such as SARS-CoV-2, the sensing may involve cytosolic retinoic acid-inducible gene I, melanoma differentiation-associated protein 5 (Schultze and Aschenbrenner, 2021), and endosomal TLR3 (Gao et al., 2021). The activation of these receptors triggers a signaling cascade that leads to the induction of type I and III IFNs (IFN-I and IFN-III). During the early phase of this cascade, the transcription of different IFN-I and IFN-III genes and numerous IFN-stimulated genes (ISGs) is induced. Secreted IFN-I binds to IFN

receptors that signal through JAK1 and tyrosine kinase 2 and activate STAT1, STAT2, and IFN regulatory factor 9. The last three then form a complex called ISGF-3 that translocates to the nucleus and binds to IFN-stimulated response elements (ISREs), thereby inducing the expression of hundreds of ISGs, most of which have antiviral activity. Secreted IFN-III binds to another receptor complex composed of IFNLR and IL10RB and activates the same ISGF-3 complex, inducing the expression of a large number of overlapping ISGs (Lazear et al., 2019). ISGF-3 may also participate to the induction of ISGs downstream IFN-II

<sup>1</sup>Molecular biology core facility, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France; <sup>2</sup>Joint Research Unit Civils Hospices of Lyon-bioMérieux, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France; <sup>3</sup>Open Innovation & Partnerships, bioMérieux S.A., Marcy l’Etoile, France; <sup>4</sup>International Center of Research in Infectiology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1111, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5308, École normale supérieure Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, Rhône, France; <sup>5</sup>Intensive Care Medicine, Croix-Rousse hospital, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France; <sup>6</sup>Virology laboratory, Institute of Infectious Agents, Laboratory associated with the National Reference Centre for Respiratory Viruses, Civils Hospices of Lyon, Lyon, France; <sup>7</sup>Occupational Health and Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; <sup>8</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Institut français des sciences et technologies des transports, de l’aménagement et des réseaux, Unité Mixte de Recherche Épidémiologie et de Surveillance Transport Travail Environnement, UMR T\_9405, Lyon University, Lyon, France; <sup>9</sup>Signia Therapeutics SAS, Lyon, France; <sup>10</sup>VirNext, Faculty of Medicine RTH Laennec, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon University, Lyon, France; <sup>11</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France; <sup>12</sup>University of Paris, Imagine Institute, Paris, France; <sup>13</sup>St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY; <sup>14</sup>Howard Hughes Medical Institute, New York, NY.

\*J. Lopez, M. Mommert, W. Mouton, A. Pizzorno, and K. Brengel-Pesce contributed equally to this paper; Correspondence to Thierry Walzer: [thierry.walzer@inserm.fr](mailto:thierry.walzer@inserm.fr); Sophie Trouillet-Assant: [sophie.assant@chu-lyon.fr](mailto:sophie.assant@chu-lyon.fr)

On behalf of the Lyon COVID study group (Jimmy Perrot, Isabelle Mosnier, Kahina Saker, Guy Oriol, Sylvie Pons, Alexandre Gaymard, Laurence Generenaz, Sylvie Pillat, Bruno Pozzetto, Quentin Lebon, Virginie Pitiot, and Audrey Guichard).

© 2021 Lopez et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



(Platanitis et al., 2019) but is not essential for IFN- $\gamma$ -dependent immunity (Rosain et al., 2019).

IFN-I and IFN-III participate in the first line of defense against infection, as they promote virus clearance, induce tissue repair, and stimulate the adaptive immune response. However, IFN-I activity has been reported at very low or undetectable levels in the blood (Hadjadj et al., 2020; Trouillet-Assant et al., 2020b) and the nasal epithelium (Ziegler et al., 2021) of some critically ill COVID-19 patients. This defect is explained in some patients by inborn genetic defects of IFN-I induction or amplification (Zhang et al., 2020b) and in others by the presence of neutralizing autoantibodies (auto-Abs) against type I IFNs, mainly IFN- $\alpha$  and/or IFN- $\omega$  and, in rare cases, IFN- $\beta$  (Bastard et al., 2020). These auto-Abs underlie life-threatening pneumonia in at least 10% of intensive care unit (ICU)-admitted COVID-19 patients, as reported by multiple independent cohort studies (Zhang et al., 2020b; Bastard et al., 2020; Troya et al., 2021; Koning et al., 2021; van der Wijst et al., 2021 Preprint). While IFN-I immunity is essential for pulmonary immunity to SARS-CoV-2, the contribution of IFN-III immunity remains unknown.

The delayed production of IFN-I is thought to result in unbalanced immune responses unable to clear the virus (Channappanavar et al., 2016; Carvalho et al., 2021; Blanco-Melo et al., 2020). A two-step model of pathogenesis has proposed that insufficient IFN-I levels and hence insufficient ISGs induction during the first 10 d of infection underly viral spread, thereby accounting for the subsequent pulmonary and systemic inflammation that is characteristic of critical cases in which leukocytes attempt to resolve what IFN-I did not in the first place (Zhang et al., 2020a). However, few studies have performed longitudinal measurements of immunity during the acute phases of infection, especially in mildly symptomatic individuals, and thus the dynamics of IFN-I activity relative to virus infection and other immunological perturbations remains largely elusive. Moreover, early host-pathogen interactions occurring at the primary infection site (i.e., the nasal mucosa) are likely to influence in a major way the clinical outcome of infection (Robinot et al., 2021). While many studies have characterized the systemic immune response against SARS-CoV-2, little is known about the immune events occurring in the nasopharyngeal (NP) mucosa. Two recent RNA-sequencing studies have reported ISGs induction in the nasal mucosa of mildly symptomatic COVID-19 patients at diagnosis (Mick et al., 2020; Ng et al., 2021), but whether or how this induction correlates with viral parameters, the dynamics of the peripheral immune response, the delay after symptom onset, and the clinical outcome remains unclear. Moreover, epithelial cells specifically express the IFN- $\lambda$  (IFN-III) receptor. This receptor signals through a similar JAK-STAT pathway as the IFN-I receptor complex and induces many of the same ISGs that are regulated by the binding of ISGF-3 to ISREs (Schneider et al., 2014), and both IFN-I and IFN-III can restrict SARS-CoV-2 infection of human airway epithelial cultures (Vanderheiden et al., 2020). However, the relative contributions of IFN-I and IFN-III in the defense against SARS-CoV-2 infection in vivo remain unknown. Here, we set out to fill these gaps in knowledge by studying in parallel mucosal and systemic immunity in COVID-19 patients using different

Table 1. Demographic and clinical characteristics of health care workers with mild COVID-19 symptoms and critically ill COVID-19 patients

	Mild COVID-19 (n = 44)	Critically ill COVID-19 (n = 26)
<b>Demographics</b>		
Age (yr), median [IQR]	38.0 [28.8–48.0]	56.5 [54.0–68.0]
<b>Sex</b>		
Male, n (%)	5 (11)	19 (73)
Female, n (%)	39 (89)	7 (27)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), median [IQR]	23.9 [22.4–26.3]	30.2 [27.1–34.2]
<b>Clinical characteristics</b>		
Delay between symptom onset and ICU admission (days), median [IQR]	N/A	8.0 [6.0–11.8]
ICU length of stay (days), median (minimum-maximum)	N/A	11.5 (3–69)
Mortality, n (%)	N/A	8 (31)

All laboratory data were recorded at recipient inclusion. BMI, body mass index; IQR, interquartile range; N/A, not applicable.

RNA-based technologies and comparing patients with and without auto-Abs neutralizing IFN-I.

## Results

### Blood IFN-I activity is high at diagnosis and correlates with viral load in mildly symptomatic COVID-19 patients

We aimed to study the dynamics of nasal and blood transcriptome in patients during SARS-CoV-2 infection. For this purpose, we constituted a cohort of health care workers presenting mild COVID-19 symptoms (n = 44 patients; Trouillet-Assant et al., 2020a) and no respiratory coinfection and for whom the delay between symptom onset and SARS-CoV-2 molecular screening was  $\leq 7$  d (Table 1). We collected blood samples and nasal swabs weekly for 4 wk, starting at diagnosis (four different visits [V1–V4]; see Fig. S1, which outlines the study); a group of uninfected healthy controls (HCs) was also included (n = 5). We first measured the transcript levels of 800 genes associated with different immune pathways in blood cells using the NanoString technology (“host response” panel). We compared changes in gene expression between mildly symptomatic patients at each time point of the study (V1–V4) and HCs in order to identify differentially expressed genes (DEGs; Table S2). Most changes in gene expression were found at V1 (i.e., at diagnosis of COVID-19; Fig. S2 A). A principal-component analysis confirmed this result and additionally showed that all patients at V3 and V4 and two thirds of patients at V2 grouped together with HCs, while one third of V2 samples clustered between V1 and the other samples (Fig. 1 A). Thus, changes in gene expression in leukocytes mainly occurred before seroconversion, which generally occurs between V1 and V2 (Fig. S2 B). The top functional pathways associated with DEG at V1 according to the nSolver NanoString analysis software were ISGs, including IFN-I- and

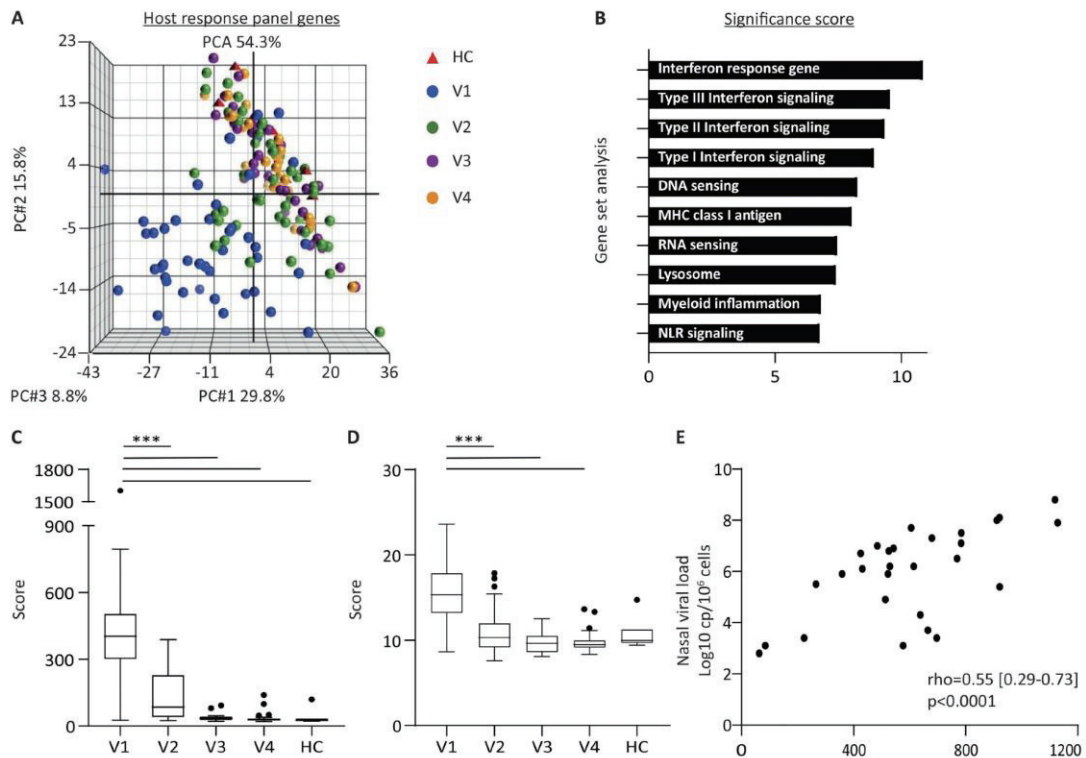
Lopez et al.

Impact of nasal IFN-I autoantibodies in COVID-19

Journal of Experimental Medicine

<https://doi.org/10.1084/jem.20211211>

2 of 14



**Figure 1. SARS-CoV-2 infection leads to a transient and acute type I/III IFN signature in the blood.** (A) Principal-component analysis (PCA) of NanoString host response gene expression data from blood of 5 HC (red triangles) and 44 COVID-19 patients (spheres) followed longitudinally from diagnosis (V1, blue) for 4 wk (V2, green; V3, purple; and V4, orange). The percentage of variance captured by each principal-component (PC) axis is indicated, as well as the total variance. The vector position for each sample was plotted and the visualization was performed using Genomics Suite 7 (Partek). (B) Pathway analysis for the 123 DEGs between V1 and V2/V3/V4 determined using nSolver NanoString analysis software. The significance scores for the top 10 pathways are indicated. NLR, nucleotide oligomerization domain-like receptor. (C and D) Box and whisker plots (using the Tukey method) showing the expression score of the indicated pathways from V1 to V4 for patients and for HCs. A Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). (E) Correlation between the nasal SARS-CoV-2 normalized viral load and the NanoString IFN score (49 genes differentially expressed between V1 and V2/V3/V4). The Spearman’s correlation coefficient is shown.

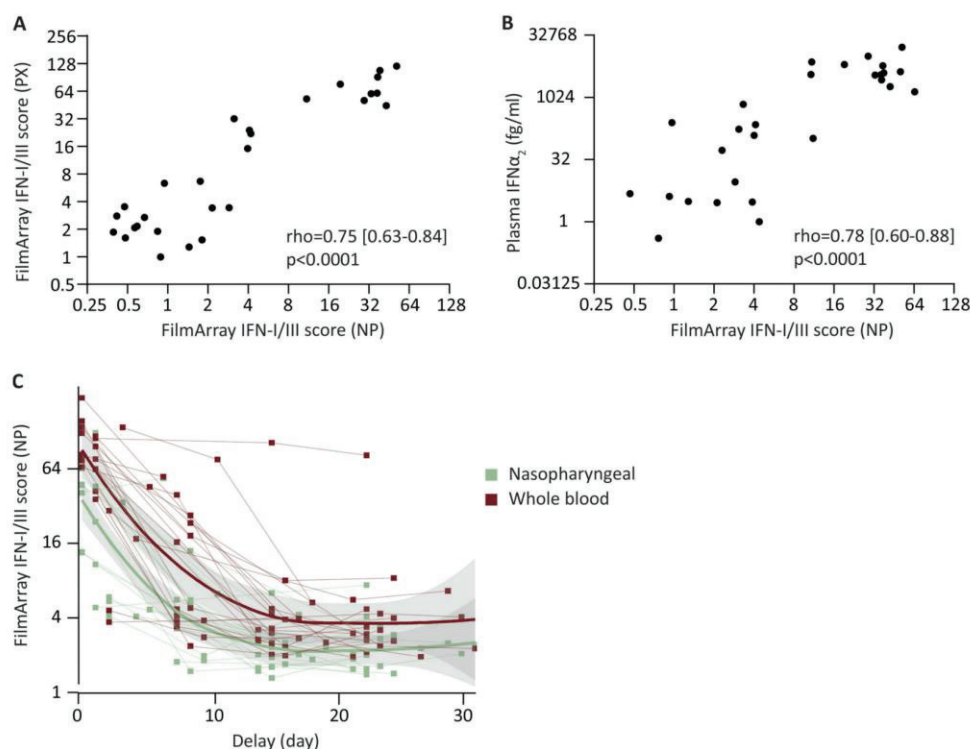
IFN-III-dependent ISGs (i.e., ISGs driven by ISGF-3 binding to ISRE) and IFN-II-dependent ISGs (i.e., ISGs mainly driven by  $\gamma$ -activated factor binding to gamma IFN activation sites; Fig. 1 B). To monitor the representation of these pathways in a longitudinal manner, we computed an expression score based on the combined expression of different ISGs (see Materials and methods). As shown in Fig. 1, C and D, the type I/III ISGs (ISG-I/III) and ISG-II scores were maximal at V1 and lower for other time points, even though they were still significantly higher at V2 compared with HC samples. Moreover, other pathways were significantly enriched at V1, including DNA/RNA sensing, MHC-I antigen presentation, lysosome, myeloid inflammation, and nucleotide oligomerization domain-like receptor signaling; for all these pathways, the scores were significantly higher at V1 compared with HCs and similar between other time points and HCs (Fig. S3). The ISG-I/III score at V1 was associated with the normalized viral load determined at diagnosis (Fig. 1 E; Spearman  $\rho = 0.55$ ,  $P < 0.0001$ ), but not with age, body mass index, or delay

after symptoms (Fig. S2 C). Altogether, these data highlight the predominance of ISGs among the genes induced in blood cells in response to SARS-CoV-2 infection, the transient nature of this induction, and its association with viral load.

#### Coordinated regulation of nasal and blood ISGs in response to IFN-I during infection

Next, we aimed to study the regulation and the role of IFN-I/III signaling in the nasal mucosa in response to SARS-CoV-2 infection. For this, we took advantage of the nasal swabs used for standard molecular SARS-CoV-2 screening. However, measuring the host response in such samples is technically challenging, as the amount of cellular material is extremely limited. To overcome this problem, we used the FilmArray technology, a nested PCR-based technique allowing rapid and sensitive measurement of ISGs transcripts that has been recently described (Mommert et al., 2021) and that we adapted for nasal swabs. This technique is advantageous, as it is semiautomated and also





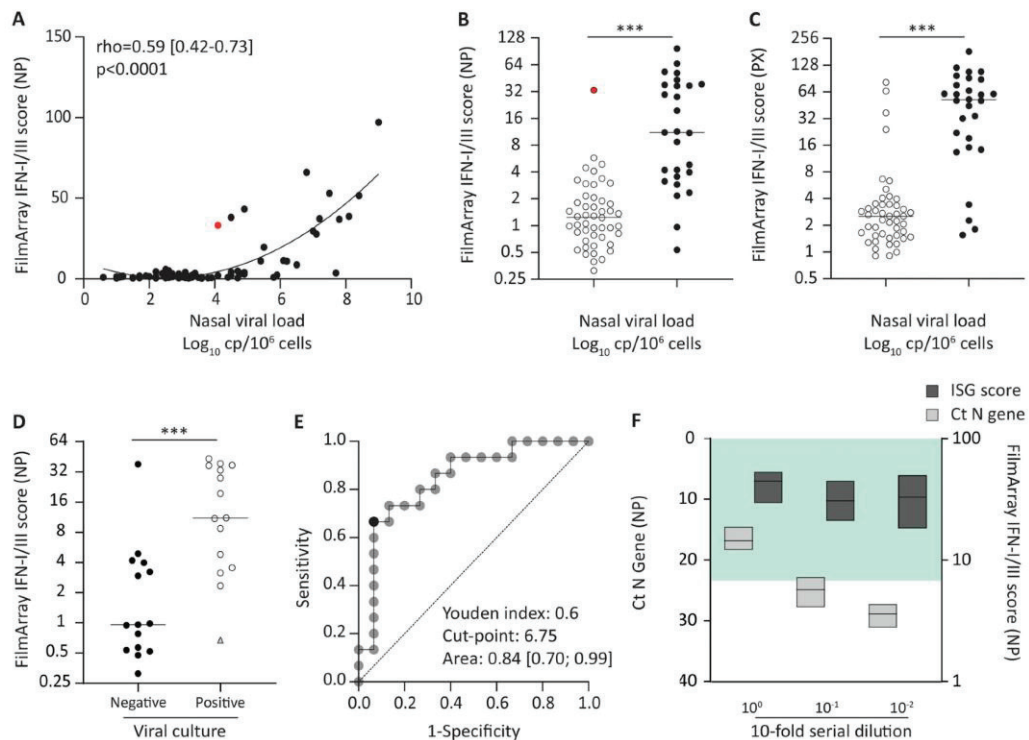
**Figure 2. Nasal and blood IFN-I/III scores are correlated during SARS-CoV-2 infection.** The NP IFN-I/III (IFN) score, defined by a four-ISGs transcriptional signature measured using FilmArray technology, was evaluated. **(A)** Correlation between the NP IFN-I/III score and the blood IFN-I/III score obtained from the PAXgene whole-blood sample (PX,  $n = 75$  longitudinal samples from 23 patients). The Spearman's correlation coefficient is shown. **(B)** Correlation between the IFN-I/III score and IFN- $\alpha_2$  levels (fg/ml) in plasma ( $n = 39$  samples with a detectable value from 23 patients), measured by single-molecule array using a commercial kit. The Spearman's correlation coefficient is shown. **(C)** Kinetic measurements of the NP (green) and blood IFN-I/III scores (red) post COVID-19 diagnosis.  $n = 75$  longitudinal samples from 23 patients. Fit Loess curves represent local polynomial regressions as determined by the Loess method. Confidence interval at 95% is indicated (gray area).

designed for clinical routine, providing an IFN-I/III score based on the quantification of four ISGs regulated through ISGF3-dependent ISREs (i.e., *IFI27*, *IFI44L*, *RSAD2*, and *IFIT1*; Hernandez et al., 2018). We monitored the nasal IFN-I/III score at diagnosis in 23 SARS-CoV-2-infected health care workers and compared this score with the blood IFN-I/III score and the serum level of IFN- $\alpha_2$  from the same patients. There was a strong correlation between nasal and blood IFN-I/III scores (Fig. 2 A) and between the nasal IFN-I/III score and serum IFN- $\alpha_2$  levels (Fig. 2 B; Spearman  $\rho > 0.75$  for both comparisons). We also measured the serum level of IFN- $\lambda_1$ , even though this cytokine is believed to act in a local manner (Park and Iwasaki, 2020). IFN- $\lambda_1$  was detectable in the serum of many patients, and its levels were also correlated with the nasal and blood IFN-I/III scores, but the correlation coefficient for these relations was lower than those of IFN- $\alpha_2$  and IFN-I/III scores (Fig. S4). We then compared the dynamics of the IFN-I/III score in the blood versus nasal mucosa, taking advantage of the availability of serial and paired blood samples and nasal swabs. Both parameters followed very similar kinetics, peaking at the earliest time points after symptom onset and rapidly decreasing thereafter, becoming

virtually negative 14 d after symptom onset (Fig. 2 C). This overlap confirms the coordination of nasal and systemic IFN-I/III antiviral defenses and shows that the nasal IFN-I/III score measured using FilmArray directly from swab samples is a faithful proxy of the blood IFN-I/III score in patients.

#### The nasal IFN-I/III score is correlated with the nasal SARS-CoV-2 load and virus infectivity

Next, we examined the possibility of using the nasal IFN-I/III score as a biomarker of SARS-CoV-2 infection when combined with SARS-CoV-2 RT-PCR. To this aim, we first tested the association between the nasal SARS-CoV-2 viral load and the nasal ISG-I/III score, both determined longitudinally and paired for each time point. There was a significant correlation between both parameters (Spearman  $\rho = 0.59$  [0.42; 0.73],  $P < 0.0001$ ; Fig. 3 A). Additionally, based on iterative comparisons, we found that a nasal viral load of 4.40  $\log_{10}$  copies [cp]/ $10^6$  cells discriminated best between patients with high and low IFN-I/III scores; accordingly, most patients with viral loads above 4.40  $\log_{10}$  cp/ $10^6$  cells had high nasal (Fig. 3 B) and blood (Fig. 3 C)



**Figure 3. The nasal IFN-I/III score is a surrogate marker of SARS-CoV-2 infectivity.** (A) Correlation between the NP IFN-I/III (IFN) score and the nasal SARS-CoV-2 normalized viral load ( $n = 75$  longitudinal samples from 23 patients) measured using the SARS-CoV-2 R-gene kit. The Spearman's correlation coefficient is shown. Red dot corresponds to a patient with a strong nasal IFN-I/III score at V1 despite a low viral load  $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$  cells. (B and C) Scatterplots showing nasal (B) and blood (PX, PAXgene; C) IFN-I/III scores in patients with normalized viral load superior or inferior to  $4.40 \log_{10} \text{ cp}/10^6$  cells ( $n = 75$  longitudinal samples from 23 patients). Red dot corresponds to a patient with a strong nasal IFN-I/III score at V1 despite a low viral load  $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$  cells. Statistical comparison was performed using a nonparametric Mann-Whitney test (\*\*\*,  $P < 0.001$ ). (D) Scatterplot of the NP IFN-I/III score in patients with positive or negative nasal SARS-CoV-2 viral culture ( $n = 30$  longitudinal samples from 12 patients). Filled circles represent negative virus culture samples, empty circles represent positive virus culture sample, and triangle corresponds to a sample positive on cell culture without cytopathic effect. Statistical comparison was performed using a nonparametric Mann-Whitney test (\*\*\*,  $P < 0.001$ ). (E) Receiver-operating characteristic curve discriminating between positive and negative SARS-CoV-2 viral culture result. Area under the curve and Youden index are calculated and represent the ability of the NP IFN-I/III score to separate positive and negative viral cultures. (F) 10-fold serial dilutions ( $10^0$  to  $10^{-2}$ ) of NP swab samples were performed and followed by measurements of IFN-I/III scores (dark gray, FilmArray) and SARS-CoV-2 load (Ct detection, light gray, SARS-CoV-2 R-gene kit). Data are expressed as floating bars ( $n = 3$ ; mean [min-max]). The green area depicts the cutoff point IFN-I/III score associated with positive viral culture (6.75).

IFN-I/III scores. A few patients had high ISGs scores despite low virus dose and vice versa, which suggests that other parameters than the virus dose, such as genetic variation, could influence ISGs induction upon infection. We then performed virus culture assays directly from nasal swabs in Vero cells as previously described (Bal et al., 2021) in order to evaluate the putative association between the nasal IFN-I/III score and the isolation of infectious virus from the swab. We found that positive virus cultures were usually associated with high median nasal IFN-I/III scores and, reciprocally, that negative cultures were almost always associated with low median IFN-I/III scores (Fig. 3 D). We then evaluated the interest of using the IFN-I/III score as a surrogate biomarker of replicative SARS-CoV-2 infection through a receiver-operating characteristic curve. The area (95% confidence interval) under the receiver-operating characteristic

curve was 0.84 (0.7; 0.99), revealing a good performance of the IFN-I/III score to predict the virus replication capacity with a cut-point score at 6.75 (Fig. 3 E). Of note, one patient had a strong nasal IFN-I/III score at V1 (33.2) despite a low viral load  $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$  cells (in red in Fig. 3, A and B). For this patient, V1 occurred only 1 d after symptom onset (unlike most of the other patients from the cohort), which suggests that the patient was probably in the ascending phase of viral replication at V1. Accordingly, for this patient, the IFN-I/III score remained high at V2 (43.2) and was associated with a high viral load ( $>4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$  cells); of note, the viral culture was positive for both V1 and V2 time points. Lastly, to further evaluate the relevance of using the IFN-I/III score as a marker of replicative infection, we performed comparative measurements of the IFN-I/III score and of the viral RNA in conditions of limiting material mimicked by

10-fold serial dilutions of positive swabs. The Ct (cycle threshold) values of the viral PCR rapidly increased upon swab dilutions, while the IFN-I/III scores remained relatively stable and consistently higher than the 6.75 value previously shown to discriminate between swabs containing or not replicative virus (Fig. 3 F). Altogether, our data highlight the relevance of using the nasal IFN-I/III score as a biomarker of active SARS-CoV-2 infection in combination with SARS-CoV-2 RT-PCR and as a tool to probe the mucosal pathogenesis of COVID-19 at the molecular and cellular levels.

#### The nasal IFN-I/III score is low in patients with neutralizing anti-type I IFN auto-Abs

A fraction of critically ill COVID-19 patients have low or undetectable blood IFN-I levels (Hadjadj et al., 2020; Trouillet-Assant et al., 2020b), which can be due to either inborn errors of IFN-I immunity (Zhang et al., 2020b), the presence of circulating auto-Abs that neutralize IFN- $\alpha$  and IFN- $\omega$ , or both (Bastard et al., 2020). These auto-Abs could also theoretically block mucosal IFN-I, but antibodies do not diffuse as well in tissues as they do in the blood (Iwasaki, 2017), and in some situations, they can be sequestered within the vascular compartment (Chen et al., 2018). We thus tested the relationships among disease severity, the presence of IFN-I auto-Abs, viral load, and nasal IFN-I/III score. We obtained blood and nasal swabs at ICU admission from 26 critically ill patients (Table 1). The presence of neutralizing auto-Abs against IFN- $\alpha$  and IFN- $\omega$  in serum was tested using a novel highly sensitive ELISA (Goncalves et al., 2021). We detected IFN- $\alpha$  and/or IFN- $\omega$  auto-Abs in the sera of 8 out of 26 critically ill patients and none of the mildly symptomatic patients (Fig. 4). While most patients without IFN-I auto-Abs and a viral load  $>4.4 \log_{10}$  cp/10<sup>6</sup> cells had a very high ISGs score (Fig. 4 A), patients with IFN-I auto-Abs had very low nasal IFN-I/III scores, irrespective of viral load, except for three patients who displayed auto-Abs against IFN- $\alpha_2$  only and for whom we assumed that IFN- $\omega$  could compensate the blockade of IFN- $\alpha_2$ . The other five patients had auto-Abs against both IFN- $\alpha$  and IFN- $\omega$  (Fig. 4 B). These data suggest that IFN-I auto-Abs could block IFN-I in the nasal mucosa as well, which was tested by assessing the presence of neutralizing IFN-I auto-Abs in nasal swabs in patients for whom serum auto-Abs levels were also determined. Interestingly, nasal IFN-I auto-Abs were detected in half of the patients who had serum auto-Abs (Table S3). This is consistent with their previous detection in a bronchoalveolar lavage (de Prost et al., 2021). The serum level of IFN-I auto-Abs was not correlated to that of the swab, but differences in the quality of the swab may explain this discrepancy.

Thus, our data suggest that (1) IFN-I is the main inducer of strong ISGs responses in the nasal mucosa, while IFN-III seems insufficient; (2) IFN-I auto-Abs compromise early antiviral defenses in the nasal mucosa of critically ill patients, especially when auto-Abs against both IFN- $\alpha_2$  and IFN- $\omega$  are present; and (3) IFN- $\omega$  is involved in nasal IFN-I immunity.

#### IFN-I auto-Abs block the antiviral effects of IFN-I in a human airway epithelium (HAE) model of SARS-CoV-2 infection

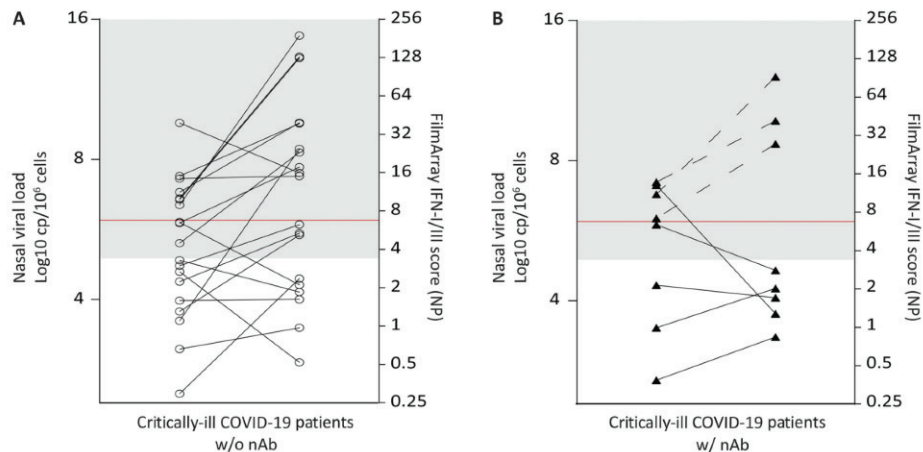
To assess the impact of IFN-I auto-Abs in the early defense against SARS-CoV-2 infection in a more direct manner, we used

a previously validated (Pizzorno et al., 2020) and predictive reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection. In this model, HAEs were treated (24 h before and 1 h after infection) with recombinant IFN- $\alpha_2$  in the presence or absence of pre-pandemic serum from HCs or patients with biallelic loss-of-function variants of AIRE (autoimmune regulator locus). The latter suffer from autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) and produce a broad range of auto-Abs, including neutralizing IFN-I auto-Abs (Bruserud et al., 2016; Levin, 2006; Meager et al., 2006). This range is very similar to what is found in a subset of patients with life-threatening COVID-19 (Bastard et al., 2020), which allows testing the impact of IFN-I auto-Abs without the confounding effects of anti-SARS-CoV-2 neutralizing Abs. While recombinant IFN- $\alpha_2$  significantly inhibited viral replication in the presence of serum from individuals without auto-Abs, this antiviral effect was completely abrogated in the presence of neutralizing auto-Abs from APS-1 individuals, as the viral titers were comparable to those of the untreated control (Fig. 5, A and B). These results were further confirmed by the reduced transepithelial electric resistance values (Fig. 5 C), which are used as reliable surrogate of epithelium integrity (Pizzorno et al., 2020). By contrast, the APS-1 serum had no effect on viral replication when applied in the absence of IFN-I. The presence of APS-1 serum was also associated with lower IFN- $\alpha_2$ -induced IFN-induced protein 44-like (IFI44L) expression (Fig. 5 D). Moreover, the use of a serum from a non-APS-1 individual with IFN-I auto-Abs not previously infected by SARS-CoV-2 showed the same results as those obtained with the APS-1 serum (Fig. S5), excluding the possibility that other auto-Abs not directed against IFN-I in the APS-1 serum may also influence results in the HAE model.

We then directly compared the antiviral effects and ISGs induction capacity of exogenous IFN- $\alpha_2$ , IFN- $\beta_1$ , IFN- $\lambda_1$ , IFN- $\lambda_2$ , IFN- $\lambda_3$ , and IFN- $\omega$  and the impact of IFN-I auto-Abs on these effects in the HAE model. A high concentration of all recombinant IFNs inhibited viral replication (Fig. 6, A-C) and induced IFI44L expression (Fig. 6 D); however, neutralizing auto-Abs abrogated only the effect of IFN- $\alpha_2$  and IFN- $\omega$  and not that of IFN- $\beta_1$ , IFN- $\lambda_1$ , IFN- $\lambda_2$ , or IFN- $\lambda_3$  (Fig. 6, A-D). Altogether, these results suggest that in the nasal mucosa of infected patients, IFN- $\alpha_2$  and IFN- $\omega$  have a prominent role in the antiviral response that cannot be compensated by other IFNs, probably not expressed at sufficient levels. Moreover, our results functionally validate the neutralizing activity of IFN-I auto-Abs, which further suggests that those Abs could compromise the nasal IFN-I response in a subset of critically ill patients.

## Discussion

We investigated herein anti-SARS-CoV-2 IFN-I immunity in a longitudinal way in patients with mild COVID-19 manifestations. This immunity is not well characterized, as most longitudinal studies have focused on hospitalized patients (Lucas et al., 2020; Liu et al., 2021; Szabo et al., 2021; Bernardes et al., 2020). IFN-I/III ISGs and IFN-II ISGs were the main groups of genes up-regulated in the blood during infection. This finding confirms the impact of IFNs in the antiviral immune response, which is



**Figure 4. Critically ill COVID-19 patients with auto-Abs have a weak nasal IFN-I/III score despite high virus load. (A and B)** Comparison of normalized nasal viral load and NP IFN-I/III (IFN) scores in critically ill COVID-19 patients without anti-IFN auto-Abs (A; empty spheres) or with neutralizing auto-Abs (nAb) against IFN- $\alpha$  (B; black triangles). The gray area represents the viral load obtained for 15 out of 17 mildly symptomatic COVID-19 patients (88%) with an IFN-I/III score >6.75 (cutoff value associated with positive viral culture, in red). Dashed lines represent patient with auto-Abs against IFN- $\alpha_2$  only.

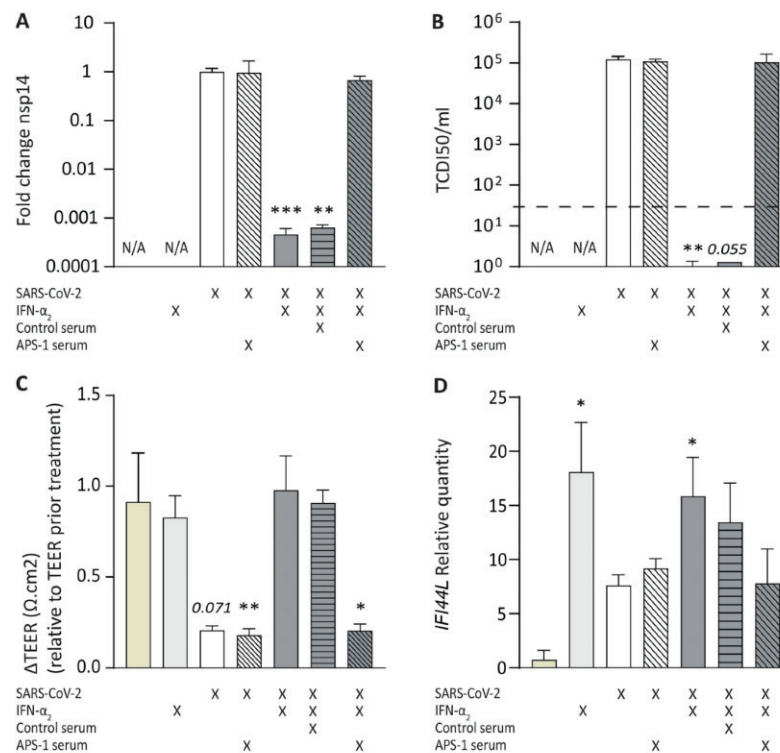
also supported by previous observations according to which severe COVID-19 patients develop auto-Abs against IFN-I or have inborn defects of IFN-I induction, amplification, or response (Bastard et al., 2020). Interestingly, other patients with these inborn defects in IFN-I induction or with auto-Abs against IFN-I are prone to other viral infections, for which there is incomplete penetrance (Bastard et al., 2021b; 2021c; Duncan et al., 2015; Gothe et al., 2020; Hernandez et al., 2019), while the penetrance of COVID-19 critical forms is probably very high. Our data show that in most patients with mild COVID-19, the up-regulation of ISGs was transient, maximal at diagnosis, and coordinated with antigen presentation, which presumably helps initiating the ensuing adaptive immune response. The ISGs wave indeed preceded seroconversion, which occurred on average 14 d after symptom onset, consistent with previous studies (Premkumar et al., 2020; Rydzynski Moderbacher et al., 2020).

We showed that the mucosal IFN-I/III signature was correlated with the blood IFN-I signature. Two recent studies have also reported a strong induction of ISGs in the nasal mucosa of SARS-CoV-2-infected patients, which was even higher compared with patients infected with other viruses, such as influenza or seasonal coronaviruses (Mick et al., 2020; Ng et al., 2021), confirming that a high ISGs expression is a hallmark of anti-SARS-CoV-2 mucosal immunity (Pizzorno et al., 2020). Interestingly, another study has also reported that the nasal ISGs expression was higher in pediatric than in adult patients infected with SARS-CoV-2 (Pierce et al., 2021), which could explain the differences in disease severity observed between these two populations. However, the pediatric patients included in the latter study were in fact symptomatic and presenting to the emergency department (Pierce et al., 2021), suggesting that their immune response was not comparable to typically asymptotically infected children.

Using FilmArray technology, we found that the nasal IFN-I/III score was commensurate to the viral load and to virus infectivity,

which is interesting, since SARS-CoV-2 RT-PCR results are often difficult to interpret in clinical routine when Ct values are high and in the absence of clinical manifestation (Han et al., 2021). The nasal ISG-I/III score could therefore be used as a biomarker of active SARS-CoV-2 infection in combination with SARS-CoV-2 RT-PCR to rapidly help in the identification of patients at risk of virus transmission and reciprocally help to avoid quarantine measures in patients who do not or no longer represent a possible source of contamination.

We also found that a sizeable fraction of critically ill patients had a low nasal IFN-I/III score despite a high viral load. These data extend previous findings that the blood IFN-I signature or the serum IFN-I concentration was very low in a subset of critically ill patients (Trouillet-Assant et al., 2020b; Bastard et al., 2020). Thus, the measurement of the nasal IFN-I/III score could be used to help stratify patients and identify patients at risk of developing severe symptoms at early stages of infection. Many COVID-19 therapeutic treatments are currently being tested (for a review, see Canedo-Marroquín et al., 2020), and it is likely that their efficacy will depend on their timely administration during the infection (Park and Iwasaki, 2020), which prompts the identification of early markers of disease severity. We also detected IFN-I auto-Abs in both serum and nasal swabs in a fraction of critically ill patients, in particular in patients with a low nasal IFN-I/III score despite a high viral load. These data suggest that IFN-I auto-Abs could explain the low nasal IFN score in a subset of patients and thus that IFNs-I are the main drivers responsible for inducing protective ISGs signatures in the nasal epithelium compared with IFNs-III. The observation that a few patients with IFN- $\alpha_2$  auto-Abs without IFN- $\omega$  auto-Abs had a high nasal IFN-I/III score suggests a redundancy between IFN- $\alpha$  and IFN- $\omega$  in this process. The blockade of IFN-I signaling at the site of virus infection could help virus dissemination by preventing the IFN-I system to render epithelial and



**Figure 5. Sera containing anti-IFN-I antibodies neutralize IFN- $\alpha_2$  antiviral activity in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection.** The effect of APS-1 serum was evaluated in an HAE model of SARS-CoV-2 infection. **(A)** Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN- $\alpha_2$  in the presence or absence of APS-1 patient or control serum, as indicated. Apical washes were performed 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. **(B)** Apical infectious viral titers 54 hpi determined by TCID50 (median tissue culture infectious dose). The dotted line depicts the limit of detection. **(C)** Relative TEER ( $\Delta$  TEER) between  $t = 0$  and  $t = 54$  hpi. **(D)** Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. A Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). In A, B, and D, the reference condition was SARS-CoV-2 alone (white bars), and in C, the reference was the mock condition (beige bars).

other ACE2-expressing cells refractory to infection. We demonstrated this experimentally using a reconstructed epithelium that we infected with SARS-CoV-2 and in which we showed that serum auto-Abs could block the effects of both IFN- $\alpha$  and IFN- $\omega$ . A recent study has reported the presence of IFN-I auto-Abs in tracheal aspirates as well (de Prost et al., 2021), suggesting that auto-Abs could block IFN-I signaling at multiple sites. We observed that some critically ill patients had a fairly low viral load despite the presence of anti-IFN-I auto-Abs. This could be explained by later sampling for these patients, associated with a spread of the infection to the lower lungs (Wang et al., 2020).

As recently discussed (Stertz and Hale, 2021), many questions remain, such as how auto-Abs that are produced at modest titers in the serum (Goncalves et al., 2021) block IFN-I at mucosal sites where their diffusion is likely rather limited, even though we detected them in the present study. Moreover, auto-Abs are difficult to manage in clinical practice (de Prost et al., 2021; Bastard et al., 2021a), and it is unclear which therapies should be

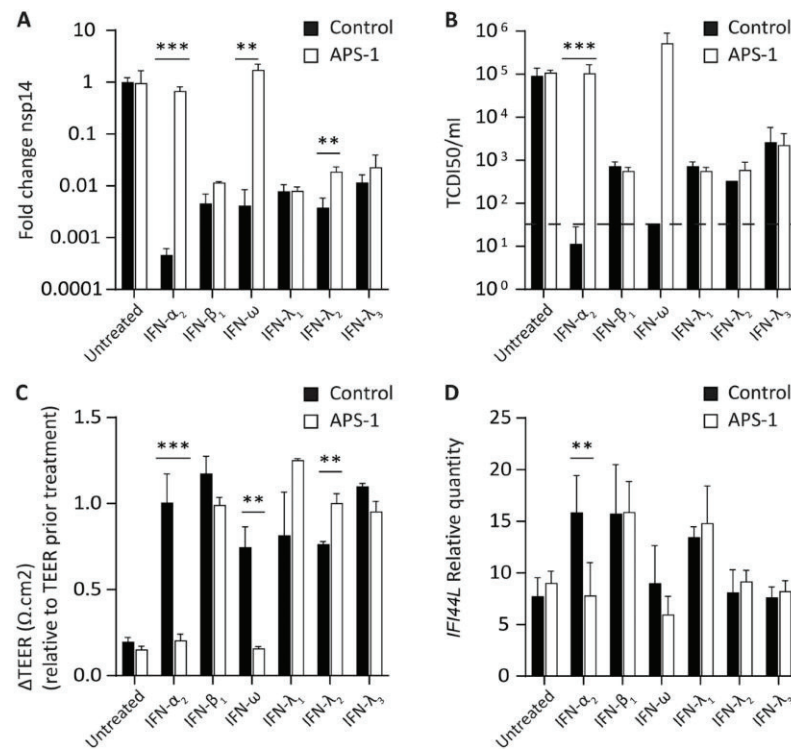
administered to COVID-19 patients upon detection of IFN-I auto-Abs. Our findings suggest that early therapy with IFN- $\beta$ , which is apparently not neutralized in most patients with auto-Abs against IFN-I and the response to which is not affected in most patients with inborn defects of IFN-I, may prevent the development of critical disease. An alternative is IFN-III, which displayed antiviral activity in our in vitro system regardless of the presence of IFN-I auto-Abs. Other studies have shown its efficacy in animal models (Park and Iwasaki, 2020). Many clinical trials on the prophylactic and therapeutic use of IFNs for COVID-19 care are ongoing (Sallard et al., 2020) and might bring answers to these questions.

## Material and methods

### Participants and ethics statement

#### HC participants

HCs were recruited among donors to the Lyon blood transfusion center (Etablissement Français du Sang) and were considered as



**Figure 6. Sera from APS-1 patients do not influence IFN-β<sub>1</sub>, IFN-λ<sub>1</sub>, IFN-λ<sub>2</sub>, and IFN-λ<sub>3</sub> antiviral activity but block IFN-α and IFN-ω antiviral activity.** The effect of APS-1 serum (white bars) was evaluated in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection in comparison with a control condition (black bars). **(A)** Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN-α<sub>2</sub>, IFN-β<sub>1</sub>, IFN-λ<sub>1</sub>, IFN-λ<sub>2</sub>, IFN-λ<sub>3</sub>, or IFN-ω in the presence or absence of APS-1 serum. Apical washes were performed at 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. **(B)** Apical infectious viral titers at 54 hpi determined by TCID<sub>50</sub>. The dotted line depicts the limit of detection. **(C)** ΔTEER between t = 0 and t = 54 hpi. **(D)** Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. Multiple t tests with Bonferroni-Dunn method were used for the statistical analysis of data presented in this figure (comparison between control and APS-1 serum conditions in each readout; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001).

a control group. According to French procedures, a written nonopposition to the use of donated blood for research purposes was obtained from HCs. The donors' personal data were anonymized before transfer to our research laboratory. We obtained approval from the local ethical committee and the French ministry of research (DC-2008-64) for handling and conservation of these samples.

**Mildly symptomatic COVID-19 participants**

A prospective longitudinal cohort study was conducted at the Hospices Civils de Lyon (university hospital of Lyon, France) including health care workers aged >18 yr, having given their written consent, accepting a 6-wk follow-up, and displaying at least one of the following symptoms suggestive of a SARS-CoV-2 infection: fever, respiratory symptoms, headache, anosmia, and ageusia (Trouillet-Assant et al., 2020a). Exclusion criteria were being pregnant or lactating. The COVID-19 diagnosis was confirmed by quantitative RT-PCR (Cobas SARS-CoV-2 Test; Roche

Diagnostics). The NP swab used were either in Copan Universal Transport Medium or in Cobas PCR medium tube. Clinical and microbiological data were collected for all included health care workers. Patients with a positive RT-PCR result at inclusion (V1) came back weekly (V2, V3, and V4) for blood and NP sampling until negativation (assessed by RT-PCR). Ethics approval was obtained from the national review board for biomedical research in April 2020 (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I, Marseille, France; ID RCB 2020-A00932-37), and the clinical study was registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT04341142, v3).

**Critically ill COVID-19 patients**

All critically ill patients, admitted to the ICU, were included in the MIR-COVID study. This study was registered to the Commission nationale de l'informatique et des libertés (French national data protection commission) under the number 20-097 and was approved by an ethical committee for biomedical research

(Comité de Protection des Personnes HCL) under the number 20-41. In agreement with the General Data Protection Regulation (Regulation [EU] 2016/679 and Directive 95/46/EC) and the French data protection law (law 78-17 on 06/01/1978 and Décret 2019-536 on 29/05/2019), we obtained consent from each patient or his/her next of kin. During the ICU stay, blood collected on EDTA tubes were used for anti-IFN antibody investigation as previously described. For this study, nasal swabs used for molecular SARS-CoV-2 screening at hospital admission were collected for additional experiments.

#### Whole-blood transcriptomic assessment

Total RNA was extracted from PAXgene tubes using the Maxwell 16 LEV simplyRNA Blood kit (Promega), following the manufacturer's guidelines. RNA quantity was determined using a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). 200 ng total RNA was hybridized with the nCounter Host Response panel (#LBL-10805-01; NanoString) and counted on an nCounter FLEX platform according to the manufacturer's guidelines. Table S1 provides more information on the panel and the genes measured. Raw counts were normalized using internal positive standards and 12 housekeeping genes. Using ROSALIND NanoString Gene Expression packages (<https://rosalind.onramp.bio/>), we performed differential expression analysis and gene set analysis with a cutoff at  $\pm 1.5$ -fold change and an adjusted P value < 0.05. Gene expression signatures were generated by summing for each of the 60 signatures encompassed in the panel (LBL-10805-01\_nCounter\_Host\_Reposne\_Gene\_List annotation file) the normalized counts of each gene divided by the median of expression in the control group. Statistical analysis and graphics were performed using Prism 9 software (<https://www.graphpad.com>).

#### FilmArray IFN panel

The first prototype of the IFN pouch encompasses four ISGs (IFN  $\alpha$  inducible protein 27, *IFI44L*, IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, radical S-adenosyl methionine domain containing 2) and three housekeeping genes (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, peptidylprolyl isomerase B, and 2,4-dienoyl-CoA reductase 1) for signal normalization. 100  $\mu$ l PAXgene blood or nasal pharyngeal swab samples was tested using the IFN prototype (Tawfik et al., 2020) according to the manufacturer's instructions. In brief, the pouches were hydrated with the hydration solution supplied with the kit. The PAXgene blood or nasal pharyngeal swab samples were mixed with 800  $\mu$ l of the sample buffer provided with the kit and directly injected into the pouch and ran on FilmArray 2.0 and FilmArray Torch instruments (BioFire Diagnostics). Results were delivered in <1 h. Using a research version of the instrument, real-time quantification cycle values and post-amplification melt peaks were determined for each assay. The normalized expression values of each assay were then computed using the internal reference genes. The nasal pharyngeal ISGs score was calculated using the same method applied for PAXgene sample as previously described (Pescarmona et al., 2019).

#### IFN- $\alpha$ and IFN- $\omega$ concentration determination

Serum IFN- $\alpha_2$  concentrations (fg/ml) from plasma were measured by single-molecule array using a commercial kit for

IFN- $\alpha_2$  quantification (Quanterix). The assay was based on a three-step protocol using an HD-1 Analyzer (Quanterix) and required 3 h of processing time from sample to result acquisition (Wilson et al., 2016). Plasma IFN-1 concentrations were determined using Meso Scale Discovery U-PLEX platform.

#### Viral load measurement

The SARS-CoV-2 load was determined from the nasal pharyngeal swabs using SARS-CoV-2 R-gene kit (bioMérieux). Briefly, nucleic acid extraction was performed from 0.2 ml nasal pharyngeal swabs on NUCLESENS easyMAG, and amplification was performed using Bio-Rad CFX96. The viral load was quantified using four internally developed quantification standards (QS1-QS4 at  $2.5 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^4$ , and  $2.5 \times 10^3$  cp/ml, respectively, of SARS-CoV-2 N gene DNA). These quantification standards were quality checked and quantified using the Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and Applied Biosystems QuantStudio 3D Digital PCR. In parallel, nasal pharyngeal swabs were tested using the CELL Control R-GENE kit (amplification of the *HPRT1* housekeeping gene) that contains two quantification standards (QS1 at  $10^4$  cp/ $\mu$ l DNA standard that is 50,000 cells/PCR [i.e.,  $1.25 \times 10^6$  cells/ml in our conditions] and QS2 at  $10^3$  cp/ $\mu$ l DNA standard that is 5,000 cells/PCR [i.e.,  $1.25 \times 10^5$  cells/ml in our conditions]) to normalize the viral load according to the sampling quality ( $\log_{10}$  [(number of SARS-CoV-2 copies per milliliter/number of cells per milliliter)  $\times 10^6$  cells per milliliter]).

#### Viral culture

Viral culture was performed following interim biosafety guidelines established by the World Health Organization [WHO/WPE/GIH/2020.3] from nasal pharyngeal swabs in Universal Transport Medium. RT-PCR-positive nasal pharyngeal swabs were inoculated on confluent Vero cells (ATCC CCL-81) in Eagle's minimum essential media supplemented with 2% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, and 2% inactivated fetal bovine serum. Plates were incubated at 33°C (which was determined to be the optimal temperature for virus cultures) and 5% CO<sub>2</sub> for 96 h. Cytopathic effects were monitored daily; samples were harvested when positive, while negative samples at 96 h underwent subculture on new plates. Culture supernatants were sampled at 2 h after inoculation, at 96 h, and after an additional 96 h on subculture. RNA from supernatants were extracted by the automated MGISP-960 workstation using MGI Easy Magnetic Beads Virus DNA/RNA Extraction Kit (MGI Tech), and SARS-CoV-2 detection was performed using TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit on a QuantStudio 5 System (Applied Biosystems and Thermo Fisher Scientific).

#### Serological investigation

The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies was evaluated using the Wantai Ab assay detecting total antibodies against the receptor-binding domain of the S protein.

The presence of anti-IFN- $\alpha_2$  antibodies was investigated using a commercially available kit (Thermo Fisher Scientific; Gonçalves et al., 2021). The neutralizing capacity of patient sera against IFN- $\alpha$  was then evaluated as previously described (Bastard et al., 2021c).

### Viral infection and IFN treatment in reconstituted HAE

MucilAir nasal HAE reconstituted from human primary cells was provided by Epithelix SARL and maintained in air-liquid interphase at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning) according to the manufacturer's instructions. 1 d before infection (d-1), HAEs were mock treated or treated through the basolateral pole with a 2 ng/ml or 20 ng/ml final dilution of recombinant IFN- $\alpha_{2a}$ , IFN- $\beta_1$ , IFN- $\lambda_1$ , IFN- $\lambda_2$ , IFN- $\lambda_3$  (PBL Assay Science), or IFN- $\omega$  (Merck) in 700  $\mu$ l MucilAir culture medium. To assess the potential neutralizing effect of anti-IFN-I antibodies, recombinant IFN- $\alpha_{2a}$  was preincubated (37°C, 1 h) before addition to HAE with a 1% final dilution of inactivated (56°C, 30 min) pre-COVID-19-pandemic patient sera, containing or not anti-IFN- $\alpha$  antibodies collected from autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients and HCs, respectively. A third serum, obtained from a non-autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patient who tested positive for auto-Abs against type I IFNs, was also used as control. 24 h after IFN treatment (d0) in the presence or not of sera, the apical poles of HAE were gently washed twice with warm OptiMEM medium (GIBCO BRL and Thermo Fisher Scientific) and then infected with a 150  $\mu$ l dilution of SARS-CoV-2 virus in OptiMEM medium at a multiplicity of infection of 0.1, as previously described (Pizzorno et al., 2020). Basolateral treatment with recombinant IFN (with or without sera) was repeated 1 hpi (hour postinfection) in the same conditions as on d-1. Variations in trans-epithelial electrical resistance (TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter) and expressed in Ohm/cm<sup>2</sup>. At 54 hpi, HAE apical poles were washed with warm OptiMEM and collected in two tubes, one for TCID50 viral titration and one for quantification of viral genome by RT-PCR. HAE cells were harvested in RLT buffer (Qiagen), and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) for subsequent gene expression analyses.

### Statistical analysis

Nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney tests and Spearman's correlation tests were performed for all comparisons, unless otherwise specified. A  $\chi^2$  test was performed to analyze contingency tables. To calculate the virus load threshold that better divided patients into two ISGs groups, we used the lowest P value of nonparametric significance test (Wilcoxon rank sum) iteratively applied to the ISGs score, split over normalized nasal viral load thresholds ranging from minimum (0.60) to maximum detected values (9.00) with a step of 0.01. All statistical analyses were conducted using R (the R Foundation; <https://www.r-project.org/foundation/>, version 3.6.1) and GraphPad Prism 8.3.0 software. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. Correlations were only performed on dually detected samples.

### Online supplemental material

Fig. S1 is a graphical outline of the study. Fig. S2 shows a heatmap of genes differentially expressed between COVID-19 patients at different time points after symptom onset. It also shows seroconversion relative to time after symptom onset and the

relations between the IFN score and clinical or virological parameters. Fig. S3 shows the dynamics of blood expression of transcripts related to different immune pathways during SARS-CoV-2 infection. Fig. S4 shows the correlation between blood IFN-I/III scores and serum IFN- $\lambda_1$  levels. Fig. S5 shows the effect of a serum from a non-APS-1 patient containing IFN-I auto-Abs on the antiviral activity of IFN-I in the HAE model of SARS-CoV-2 infection. Table S1 lists all genes whose expression is measured in the host response NanoString panel and functional annotation of these genes. Table S2 lists genes differentially expressed between blood cells in mild COVID-19 patients at diagnosis and blood cells from HCs. Table S3 is a contingency table relative to IFN- $\alpha$  auto-Ab detection from nasal and plasma paired samples from mildly symptomatic and critically ill COVID-19 patients.

### Acknowledgments

We thank all patients for their participation. We also thank all personnel of the occupational health and medicine department of Hospices Civils de Lyon who contributed to sample collection. Human biological samples and associated data were obtained from NeuroBioTec (Centre de Ressources Biologiques des Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; Biobank BB-0033-00046). We thank Karima Brahami and all members of the Direction de la Recherche Clinique et de l'innovation (Hospices Civils de Lyon) for their reactivity and Emilie Laurent and Cedrine Milesi (VirPath team) for their technical support. The authors would like to thank Hélène Boyer for a helpful review of the manuscript.

T. Walzer's laboratory is supported by the Agence Nationale de la Recherche, the Fondation ARC (équipe labellisée), and the Institut National du Cancer and receives institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Claude Bernard Lyon 1 University, and  cole normale supérieure de Lyon. The VirPath team is supported by REACTing, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche, and Institut Mérieux (Mérieux Research grant). This study was supported by the Hospices Civils de Lyon and the Fondation des Hospices Civils de Lyon. The Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases is supported by the National Institutes of Health (R01AI088364), the National Center for Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health Clinical and Translational Science Award program (UL1 TR001866), an Emergent Ventures Fast Grant, the Mercatus Center at George Mason University, the Fisher Center for Alzheimer's Research Foundation, the Meyer Foundation, the JPB Foundation, the Agence Nationale de la Recherche under the "Investments for the Future" program (ANR-10-IAHU-01), the Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases Laboratory of Excellence (ANR-10-LABX-62-IBEID), the French Foundation for Medical Research (EQU201903007798), the French Foundation for Medical Research and Agence Nationale de la Recherche GENCOVID project (ANR-20-COVI-0003), Agence Nationale de la Recherche Nord-Sud (ANRS-COV05), Agence Nationale de la Recherche



AABIFNCOV project (ANR-20-C11-0001), the Square Foundation, Grandir - Fonds de solidarité pour l'enfance, the SCOR Corporate Foundation for Science, the Howard Hughes Medical Institute, the Rockefeller University, the St. Giles Foundation, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the University of Paris.

Author contributions: J. Lopez contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft). M. Mommert contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, visualization, and methodology. W. Mouton contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft, review and editing). A. Pizzorno contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft, review and editing). K. Brengel-Pesce contributed to conceptualization, supervision, validation, investigation, and methodology. M. Mezidi contributed resources. J.-B. Fassier contributed resources and contributed to funding acquisition. M. Villard contributed to investigation and methodology. B. Lina contributed to methodology and funding acquisition. J.-C. Richard contributed resources. V. Cheynet contributed to data curation, formal analysis, supervision, validation, and methodology. B. Padey contributed to formal analysis and methodology. V. Duliere contributed to formal analysis and methodology. T. Julien contributed to formal analysis and methodology. S. Paul contributed resource. P. Bastard contributed to conceptualization, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft). A. Belot contributed resources and contributed to conceptualization. A. Bal contributed to conceptualization, formal analysis, validation, and methodology. J.-L. Casanova contributed to conceptualization and writing (original draft, review and editing). M. Rosa-Calatrava contributed to methodology and funding acquisition and writing (original draft, review and editing). F. Morfin contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, and methodology. T. Walzer contributed to conceptualization, methodology, investigation, visualization, and writing (original draft, review and editing). S. Trouillet-Assant contributed to conceptualization, resources, funding acquisition, investigation, visualization, methodology, project administration, and writing (original draft, review and editing).

Disclosures: M. Mommert, W. Mouton, K. Brengel-Pesce, A. Bal, and V. Cheynet reported personal fees from bioMérieux during the conduct of the study and personal fees from bioMérieux outside the submitted work. M. Mommert, K. Brengel-Pesce, and S. Trouillet-Assant have a patent to FR2107421 pending. A. Pizzorno, B. Padey, and M. Rosa-Calatrava reported a patent to FR 20/02351 (Therapeutic treatments against SARS-CoV-2) pending. S. Trouillet-Assant and J.-B. Fassier reported non-financial support from bioMérieux during the conduct of the study and non-financial support from bioMérieux outside the submitted work. No other disclosures were reported.

#### Lopez et al.

Impact of nasal IFN-I autoantibodies in COVID-19

Submitted: 3 June 2021

Revised: 17 July 2021

Accepted: 20 July 2021

## References

- Bal, A., M.-A. Traubad, J.-B. Fassier, M. Rabilloud, K. Saker, C. Langlois-Jacques, N. Guibert, A. Paul, D. Alfaiate, A. Massardier-Pilonchery, et al. COVID SER Study Group. 2021. Six-month antibody response to SARS-CoV-2 in healthcare workers assessed by virus neutralization and commercial assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 27:933–935. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.003>
- Bastard, P., L.B. Rosen, Q. Zhang, E. Michailidis, H.-H. Hoffmann, Y. Zhang, K. Dorgham, Q. Philippot, J. Rosain, V. Béziat, et al. COVID Human Genetic Effort. 2020. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 370:eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>
- Bastard, P., R. Lévy, S. Henriquez, C. Bodemer, T.-A. Szwebel, and J.-L. Casanova. 2021a. Interferon- $\beta$  Therapy in a Patient with Incontinentia Pigmenti and Autoantibodies against Type I IFNs Infected with SARS-CoV-2. *J. Clin. Immunol.* 41:931–933. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01023-5>
- Bastard, P., J. Manry, J. Chen, J. Rosain, Y. Seeleuthner, O. AbuZaitun, L. Lorenzo, T. Khan, M. Hasek, N. Hernandez, et al. 2021b. Herpes simplex encephalitis in a patient with a distinctive form of inherited IFNAR1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 131:e139980. <https://doi.org/10.1172/JCI139980>
- Bastard, P., E. Michailidis, H.-H. Hoffmann, M. Chbihi, T. Le Voyer, J. Rosain, Q. Philippot, Y. Seeleuthner, A. Gervais, M. Materna, et al. 2021c. Autoantibodies to type I IFNs can underlie adverse reactions to yellow fever live attenuated vaccine. *J. Exp. Med.* 218:e20202486. <https://doi.org/10.1084/jem.20202486>
- Bernardes, J.P., N. Mishra, F. Tran, T. Bahmer, L. Best, J.I. Blase, D. Bordoni, J. Franzenburg, U. Geisen, J. Josephs-Spaulding, et al. Deutsche COVID-19 Omics Initiative (DeCOI). 2020. Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasmablasts as Hallmarks of Severe COVID-19. *Immunity*. 53:1296–1314.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.017>
- Blanco-Melo, D., B.E. Nilsson-Payant, W.-C. Liu, S. Uhl, D. Hoagland, R. Møller, T.X. Jordan, K. Oishi, M. Panis, D. Sachs, et al. 2020. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 181:1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Bruserud, Ø., B.E. Oftedal, N. Landegren, M.M. Erichsen, E. Bratland, K. Lima, A.P. Jørgensen, A.G. Myhre, J. Svartberg, K.J. Fougner, et al. 2016. A Longitudinal Follow-up of Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101:2975–2983. <https://doi.org/10.1210/nc.2016-1821>
- Canedo-Marroquín, G., F. Saavedra, C.A. Andrade, R.V. Berrios, L. Rodríguez-Guilarte, M.C. Opazo, C.A. Riedel, and A.M. Kalergis. 2020. SARS-CoV-2: Immune Response Elicited by Infection and Development of Vaccines and Treatments. *Front. Immunol.* 11:569760. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569760>
- Carvalho, T., F. Krammer, and A. Iwasaki. 2021. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat. Rev. Immunol.* 21:245–256. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00522-1>
- Channappanavar, R., A.R. Fehr, R. Vijay, M. Mack, J. Zhao, D.K. Meyerholz, and S. Perlman. 2016. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-2-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 19:181–193. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>
- Chen, C.-C., E. Pouliquen, A. Broisat, F. Andreatta, M. Racapé, P. Bruneval, L. Kessler, M. Ahmadi, S. Bacot, C. Saison-Delaplace, et al. 2018. Endothelial chimerism and vascular sequestration protect pancreatic islet grafts from antibody-mediated rejection. *J. Clin. Invest.* 128:219–232. <https://doi.org/10.1172/JCI93542>
- de Prost, N., P. Bastard, R. Arrestier, S. Fourati, M. Mahévas, S. Burrel, K. Dorgham, G. Gorochov, Y. Tandjaoui-Lambiotte, I. Azzaoui, et al. 2021. Plasma Exchange to Rescue Patients with Autoantibodies Against Type I Interferons and Life-Threatening COVID-19 Pneumonia. *J. Clin. Immunol.* 41:536–544. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-00994-9>
- Duncan, C.J.A., S.M.B. Mohamad, D.F. Young, A.J. Skelton, T.R. Leahy, D.C. Munday, K.M. Butler, S. Morfopoulou, J.R. Brown, M. Hubank, et al. 2015. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. *Sci. Transl. Med.* 7:307ra154. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4227>

- Gao, D., M.J. Ciancanelli, P. Zhang, O. Harschnitz, V. Bondet, M. Hasek, J. Chen, X. Mu, Y. Itan, A. Cobat, et al. 2021. TLR3 controls constitutive IFN- $\beta$  antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons. *J. Clin. Invest.* 131:e134529. <https://doi.org/10.1172/JCI134529>
- Goncalves, D., M. Mezidi, M. Perret, K. Saker, N. Fabien, R. Pescarmona, C. Lombard, T. Walzer, J.L. Casanova, A. Belot, et al. 2021. Antibodies against type-I Interferon: detection and association with severe clinical outcome in COVID-19 patients. *Clin. Transl. Immunology*. In press.
- Gothe, F., C.F. Hattori, L. Truong, Z. Klimova, V. Kanderova, M. Fejtikova, A. Grainger, V. Bigley, J. Perthen, D. Mitra, et al. 2020. A novel case of homozygous IFNAR1 deficiency with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin. Infect. Dis.* ciaa1790. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1790>
- Hadjadji, J., N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Boussier, N. Smith, H. Péré, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, et al. 2020. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 369:718-724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
- Han, M.S., J.-H. Byun, Y. Cho, and J.H. Rim. 2021. RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. *Lancet Infect. Dis.* 21:165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30424-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30424-2)
- Hernandez, N., I. Melki, H. Jing, T. Habib, S.S.Y. Huang, J. Danielson, T. Kula, S. Drutman, S. Belkaya, V. Rattina, et al. 2018. Life-threatening influenza pneumonitis in a child with inherited IRF9 deficiency. *J. Exp. Med.* 215:2567-2585. <https://doi.org/10.1084/jem.20180628>
- Hernandez, N., G. Bucciol, L. Moens, J. Le Pen, M. Shahrooei, E. Goudouris, A. Shirvani, M. Changi-Ashtiani, H. Rokni-Zadeh, E.H. Sayar, et al. 2019. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J. Exp. Med.* 216:2057-2070. <https://doi.org/10.1084/jem.20182295>
- Iwasaki, A. 2017. Immune Regulation of Antibody Access to Neuronal Tissues. *Trends Mol. Med.* 23:227-245. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.004>
- Koning, R., P. Bastard, J.-L. Casanova, M.C. Brouwer, and D. van de Beek. with the Amsterdam U.M.C. COVID-19 Biobank Investigators. 2021. Autoantibodies against type I interferons are associated with multi-organ failure in COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 47:704-706. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06392-4>
- Lazear, H.M., J.W. Schoggins, and M.S. Diamond. 2019. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 50:907-923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- Levin, M. 2006. Anti-interferon auto-antibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3:e292. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030292>
- Liu, C., A.J. Martins, W.W. Lau, N. Rachmaninoff, J. Chen, L. Imberti, D. Mostaghimi, D.L. Fink, P.D. Burbelo, K. Dobbs, et al. COVID Clinicians. 2021. Time-resolved systems immunology reveals a late junction linked to fatal COVID-19. *Cell*. 184:1836-1857.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.018>
- Lucas, C., P. Wong, J. Klein, T.B.R. Castro, J. Silva, M. Sundaram, M.K. Ellingson, T. Mao, J.E. Oh, B. Israelow, et al. Yale IMPACT Team. 2020. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 584:463-469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>
- Meager, A., K. Visvalingam, P. Peterson, K. Möll, A. Murumägi, K. Krohn, P. Eskelin, J. Perheentupa, E. Husebye, Y. Kadota, and N. Willcox. 2006. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3:e289. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030289>
- Mick, E., J. Kamm, A.O. Pisco, K. Ratnasiri, J.M. Babik, G. Castañeda, J.L. DeRisi, A.M. Detweiler, S.L. Hao, K.N. Kangelaris, et al. 2020. Upper airway gene expression reveals suppressed immune responses to SARS-CoV-2 compared with other respiratory viruses. *Nat. Commun.* 11:5854. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19587-y>
- Mommert, M., M. Perret, M. Hockin, S. Viel, A. Belot, J.-C. Richard, M. Mezidi, J.-B. Fassier, E. Javouhey, A. Hemmert, et al. COVID-HCL Study Group. 2021. Type-I Interferon assessment in 45 minutes using the FilmArray<sup>®</sup> PCR platform in SARS-CoV-2 and other viral infections. *Eur. J. Immunol.* 51:989-994. <https://doi.org/10.1002/eji.202048978>
- Ng, D.L., A.C. Granados, Y.A. Santos, V. Servellita, G.M. Goldgof, C. Meydan, A. Sotomayor-Gonzalez, A.G. Levine, J. Balcerak, L.M. Han, et al. 2021. A diagnostic host response biosignature for COVID-19 from RNA profiling of nasal swabs and blood. *Sci. Adv.* 7:eabe5984. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5984>
- Park, A., and A. Iwasaki. 2020. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe*. 27:870-878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
- Pescarmona, R., A. Belot, M. Villard, L. Besson, J. Lopez, I. Mosnier, A.-L. Mathieu, C. Lombard, L. Garnier, C. Frachette, et al. 2019. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine*. 113:446-452. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.023>
- Pierce, C.A., S. Sy, B. Galen, D.Y. Goldstein, E. Orner, M.J. Keller, K.C. Herold, and B.C. Herold. 2021. Natural mucosal barriers and COVID-19 in children. *JCI Insight*. 6:e148694. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148694>
- Pizzorno, A., B. Padey, T. Julien, S. Trouillet-Assant, A. Traversier, E. Errazuriz-Cerda, J. Fouret, J. Dubois, A. Gaymard, F.-X. Lescure, et al. 2020. Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep Med*. 1:100059. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>
- Platanitis, E., D. Demiroz, A. Schneller, K. Fischer, C. Capelle, M. Hartl, T. Gossenreiter, M. Müller, M. Novatchkova, and T. Decker. 2019. A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat. Commun.* 10:2921. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10970-y>
- Premkumar, L., B. Segovia-Chumbez, R. Jodi, D.R. Martinez, R. Raut, A. Markmann, C. Cornaby, L. Bartelt, S. Weiss, Y. Park, et al. 2020. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 5:eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
- Robinot, R., M. Hubert, G.D. de Melo, F. Lazarini, T. Bruel, N. Smith, S. Levallois, F. Larrous, J. Fernandes, S. Gellenoncourt, et al. 2021. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat. Commun.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24521-x>
- Rosain, J., X.-F. Kong, R. Martinez-Barricarte, C. Oleaga-Quintas, N. Ramirez-Alejo, J. Markle, S. Okada, S. Boisson-Dupuis, J.-L. Casanova, and J. Bustamante. 2019. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update. *Immunol. Cell Biol.* 97:360-367. <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>
- Rydzynski Moderbacher, C., S.I. Ramirez, J.M. Dan, A. Grifoni, K.M. Hastie, D. Weiskopf, S. Belanger, R.K. Abbott, C. Kim, J. Choi, et al. 2020. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 183:996-1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
- Sallard, E., F.-X. Lescure, Y. Yazdanpanah, F. Mentre, and N. Peiffer-Smadja. 2020. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 178:104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
- Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice. 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32:513-545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schultze, J.L., and A.C. Aschenbrenner. 2021. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 184:1671-1692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>
- Stertz, S., and B.G. Hale. 2021. Interferon system deficiencies exacerbating severe pandemic virus infections. *Trends Microbiol.* S0966-842X(21)00060-3. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.03.001>
- Szabo, P.A., P. Dogra, J.I. Gray, S.B. Wells, T.J. Connors, S.P. Weisberg, I. Krupka, R. Matsumoto, M.M.L. Poon, E. Idzikowski, et al. 2021. Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19. *Immunity*. 54:797-814.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.005>
- Tawfik, D.M., L. Vachot, A. Bocquet, F. Venet, T. Rimmelé, G. Monneret, S. Blein, J.L. Montgomery, A.C. Hemmert, A. Pachot, et al. 2020. Immune Profiling Panel: A Proof-of-Concept Study of a New Multiplex Molecular Tool to Assess the Immune Status of Critically Ill Patients. *J. Infect. Dis.* 222(Suppl 2):S84-S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa248>
- Trouillet-Assant, S., C. Albert Vega, A. Bal, J.A. Nazare, P. Fascia, A. Paul, A. Massardier-Pilonchery, C. D Aubarede, N. Guibert, V. Pitiot, et al. COVID-SER study group. 2020a. Assessment of serological techniques for screening patients for COVID-19 (COVID-SER): a prospective, multicentric study. *BMJ Open*. 10:e041268. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041268>
- Trouillet-Assant, S., S. Viel, A. Gaymard, S. Pons, J.-C. Richard, M. Perret, M. Villard, K. Brengel-Pesce, B. Lina, M. Mezidi, et al. COVID HCL Study group. 2020b. Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 146:206-208.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.029>
- Troya, J., P. Bastard, L. Planas-Serra, P. Ryan, M. Ruiz, M. de Carranza, J. Torres, A. Martinez, L. Abel, J.-L. Casanova, and A. Pujol. 2021. Neutralizing

- Autoantibodies to Type I IFNs in >10% of Patients with Severe COVID-19 Pneumonia Hospitalized in Madrid, Spain. *J. Clin. Immunol.* 41:914–922. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01036-0>
- van der Wijst, M.G.P., S.E. Vazquez, G.C. Hartoularos, P. Bastard, T. Grant, R. Bueno, D.S. Lee, J.R. Greenland, Y. Sun, R. Perez, et al. 2021. Longitudinal single-cell epitope and RNA-sequencing reveals the immunological impact of type 1 interferon autoantibodies in critical COVID-19. *bioRxiv*. (Preprint posted March 10, 2021) <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434529>
- Vanderheiden, A., P. Ralfs, T. Chirkova, A.A. Upadhyay, M.G. Zimmerman, S. Bedoya, H. Aoued, G.M. Tharp, K.L. Pellegrini, C. Manfredi, et al. 2020. Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *J. Virol.* 94:e00985–e20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20>
- Wang, K., X. Zhang, J. Sun, J. Ye, F. Wang, J. Hua, H. Zhang, T. Shi, Q. Li, and X. Wu. 2020. Differences of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Shedding Duration in Sputum and Nasopharyngeal Swab Specimens Among Adult Inpatients With Coronavirus Disease 2019. *Chest.* 158:1876–1884. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.06.015>
- Wilson, D.H., D.M. Rissin, C.W. Kan, D.R. Fournier, T. Piech, T.G. Campbell, R.E. Meyer, M.W. Fishburn, C. Cabrera, P.P. Patel, et al. 2016. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J. Lab. Autom.* 21:533–547. <https://doi.org/10.1177/2211068215589580>
- Zhang, Q., P. Bastard, A. Bolze, E. Jouanguy, S.-Y. Zhang, A. Cobat, L.D. Notarangelo, H.C. Su, L. Abel, and J.-L. Casanova. COVID Human Genetic Effort. 2020a. Life-Threatening COVID-19: Defective Interferons Unleash Excessive Inflammation. *Med (N Y)*. 1:14–20. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.12.001>
- Zhang, Q., P. Bastard, Z. Liu, J. Le Pen, M. Moncada-Velez, J. Chen, M. Ogishi, I.K.D. Sabli, S. Hodeib, C. Korol, et al. NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group. 2020b. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 370:eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>
- Ziegler, C.G.K., V.N. Miao, A.H. Owings, A.W. Navia, Y. Tang, J.D. Bromley, P. Lotfy, M. Sloan, H. Laird, H.B. Williams, et al. 2021. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.023>

Supplemental material

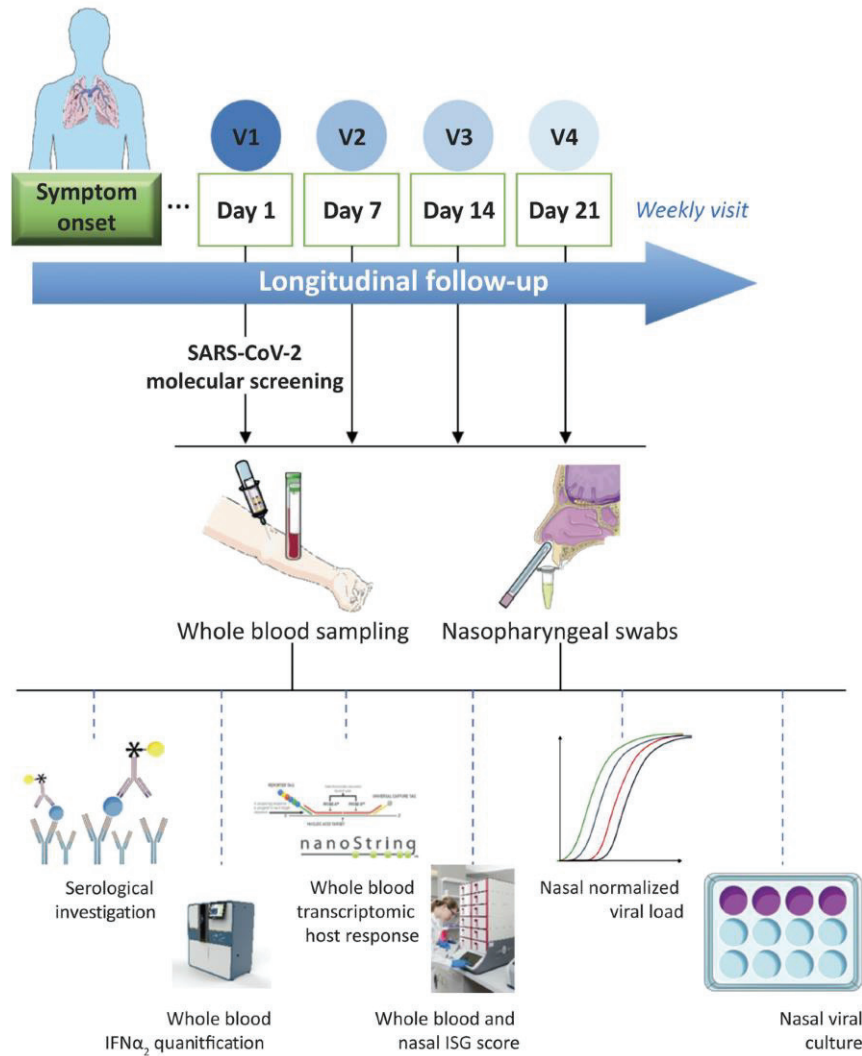


Figure S1. **Graphical outline of the study.** Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Simoa HD-1 illustration used with permission from Quanterix and Nanostring.

Downloaded from [http://jupress.org/jem/article-pdf/218/10/e20211211/1420970/jem\\_20211211.pdf](http://jupress.org/jem/article-pdf/218/10/e20211211/1420970/jem_20211211.pdf) by guest on 07 September 2021

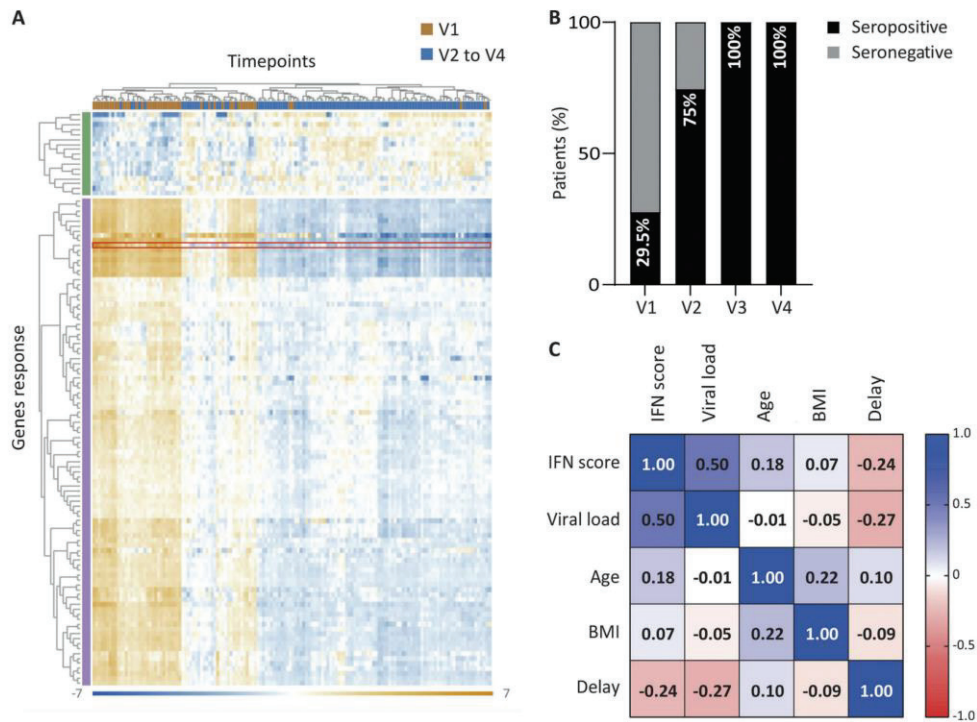


Figure S2. **Whole-blood transcriptomic analysis at different time points post-diagnosis.** (A) Unsupervised clustering of V1 (orange columns) and V2–V4 samples (blue columns) and DEGs, measured using the NanoString host response panel. The green vertical bar highlights the 17 genes down-regulated at V1 compared with V2/V3/V4, and the purple bar highlights the 106 genes up-regulated at V1 compared with V2/V3/V4. (B) Histogram bars showing the percentage of seroconverted (Wantai total SARS-CoV-2 Ig) patients within the cohort of mildly symptomatic COVID-19 health care workers at the different time points of the longitudinal follow-up. (C) Pearson correlation table between NanoString IFN score, nasal viral load, age, body mass index (BMI), and delay after symptoms.

Downloaded from <http://rupress.org/jem/article-pdf/121/11/2097/20211211.pdf> by guest on 07 September 2021

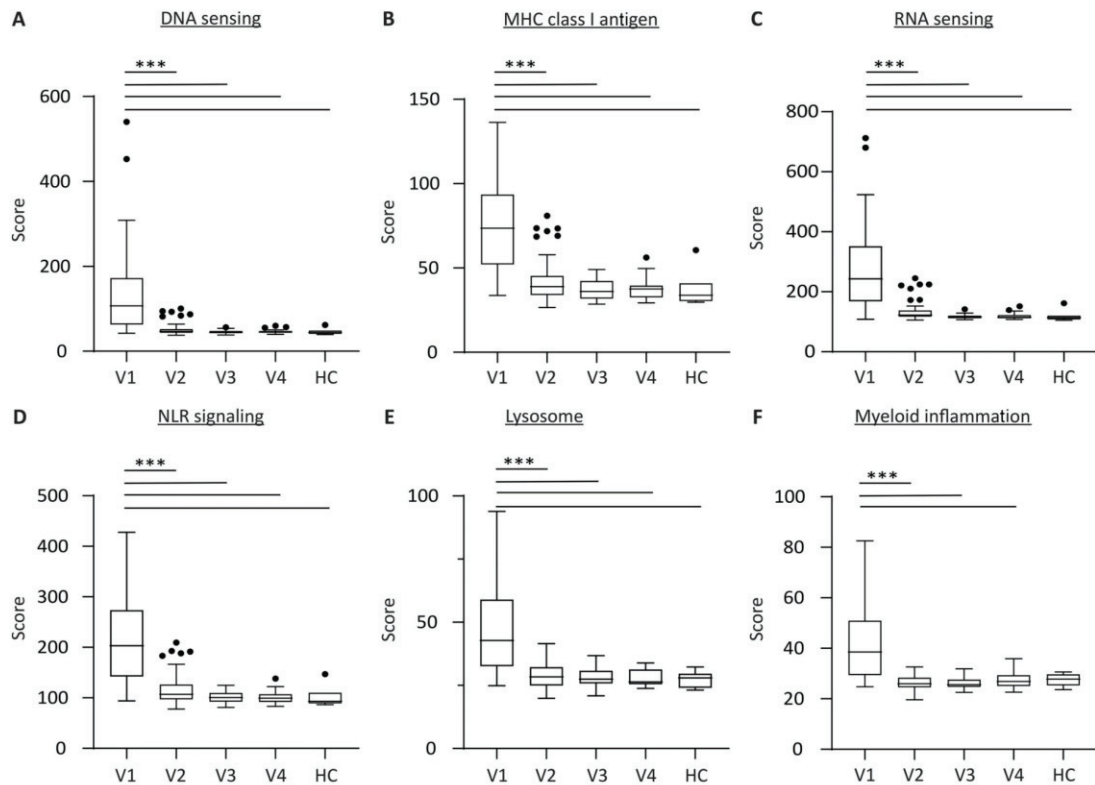


Figure S3. **Dynamics of induction in the blood of different immune pathways during SARS-CoV-2 infection. (A-F)** Boxplots showing the blood expression score for different pathways significantly modulated from V1 to V4. A Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

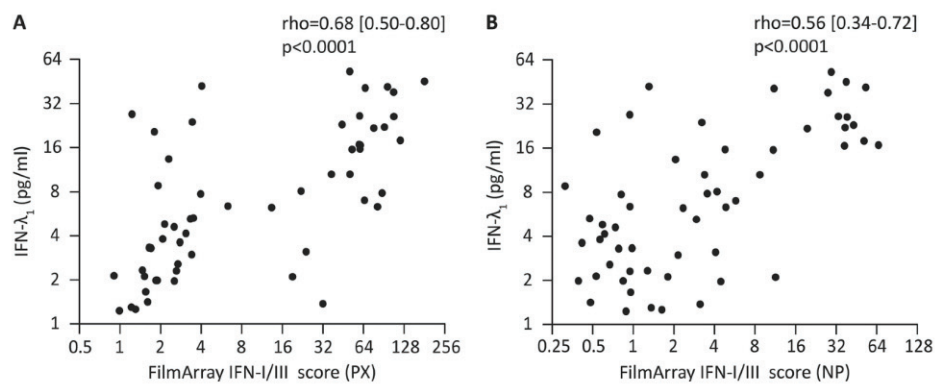


Figure S4. **Correlation between IFN-I/III scores and serum I IFN- $\lambda_1$  levels. (A and B)** Correlation between the blood (A; PX) or NP (B) IFN-I/III scores and plasmatic IFN- $\lambda_1$  levels ( $n = 56$  samples with a detectable value from 22 patients), determined by ELISA. The Spearman’s correlation coefficient is shown.

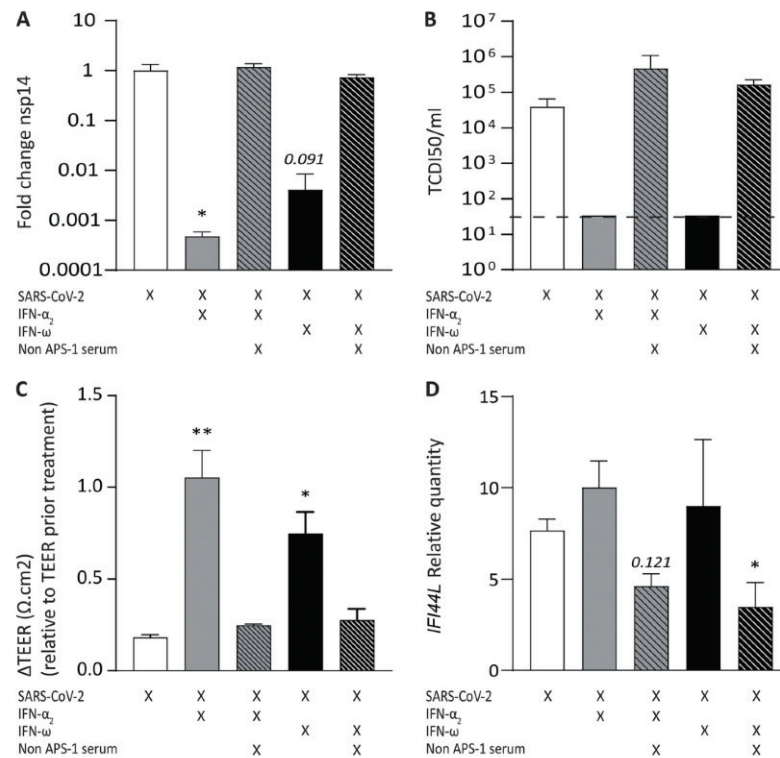


Figure S5. **Sera containing anti-IFN-I antibodies neutralize IFN- $\alpha_2$  antiviral activity in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection.** The effect of a serum from a non-APS-1 patient containing IFN-I auto-Abs was evaluated in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection. **(A)** Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN- $\alpha_2$  in the presence or absence of the indicated sera. Apical washes were performed 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. **(B)** Apical infectious viral titers 54 hpi determined by TCID50. The dotted line depicts the limit of detection. **(C)**  $\Delta$  TEER between  $t = 0$  and  $t = 54$  hpi. **(D)** Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. A Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). In all conditions, the reference condition was SARS-CoV-2 alone (white bars).

Tables S1 and S2 are provided online as separate Excel files, and Table S3 is provided online as a separate PDF. Table S1 lists all genes whose expression is measured in the host response NanoString panel and functional annotation of these genes. Table S2 lists genes differentially expressed between blood cells in mild COVID-19 patients at diagnosis and blood cells from HCs. Table S3 is a 2 x 2 contingency table relative to IFN- $\alpha$  auto-Ab detection from nasal and plasma paired samples from mildly symptomatic and critically ill COVID-19 patients.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Loret, T. Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de CeO<sub>2</sub>. (Université de technologie Compiègne, 2017).
2. Boers, J. E., Ambergen, A. W. & Thunnissen, F. B. J. M. Number and Proliferation of Basal and Parabasal Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 2000–2006 (1998).
3. Knight, D. A. & Holgate, S. T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* **8**, 432–446 (2003).
4. Ouvrard, A. Aérosolthérapie par nébulisation. (UFR Sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, 2014).
5. Hellings, P. W. & Steelant, B. Epithelial barriers in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **145**, 1499–1509 (2020).
6. Knudsen, L. & Ochs, M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* **150**, 661–676 (2018).
7. Alon, R. *et al.* Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat Rev Immunol* **21**, 49–64 (2021).
8. Merkus, P., Ebbens, F. A., Muller, B. & Fokkens, W. J. The ‘best method’ of topical nasal drug delivery: comparison of seven techniques. *Rhinology* **44**, 102–107 (2006).
9. Infections respiratoires aiguës : définition, symptômes et diagnostic. *Santé sur le net* <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/pneumologie/infections-respiratoires-aigues/>.
10. Seto, W. H., Conly, J. M., Pessoa-Silva, C. L., Malik, M. & Eremin, S. Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: an update. *East Mediterr Health J* **19 Suppl 1**, S39-47 (2013).
11. Pneumonie. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>.



12. *La santé respiratoire en Europe Faits et chiffres*. [http://fetedusouffle.com/wp-content/uploads/2014/05/french\\_lung\\_health\\_in\\_europe\\_facts\\_and\\_figures.pdf](http://fetedusouffle.com/wp-content/uploads/2014/05/french_lung_health_in_europe_facts_and_figures.pdf) (2013).
13. Drosten, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1967–1976 (2003).
14. Le SRAS-CoV, un coronavirus à l'origine d'une épidémie mondiale d'une ampleur considérable. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/infection-a-coronavirus/le-sras-cov-un-coronavirus-a-l-origine-d-une-epidemie-mondiale-d-une-ampleur-considerable>.
15. Devi, J. P. *et al.* Laboratory-confirmed case of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection in Malaysia: preparedness and response, April 2014. *Eurosurveillance* **19**, 20797 (2014).
16. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**, 1814–1820 (2012).
17. Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV). [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)).
18. CSR. MERS outbreaks. *World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean* <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>.
19. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727–733 (2020).
20. 2020 : une hausse des décès inédite depuis 70 ans - Insee Première - 1847. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/5347349>.
21. 6medias. Covid-19 : un coût bien plus élevé que prévu pour la Sécurité sociale. *Capital.fr* <https://www.capital.fr/economie-politique/covid-19-un-cout-bien-plus-eleve-que-prevu-pour-la-securite-sociale-1404376> (2021).

22. Oliva, J. & Terrier, O. Viral and Bacterial Co-Infections in the Lungs: Dangerous Liaisons. *Viruses* **13**, 1725 (2021).
23. Harish, M. & Ruhatiya, R. S. Influenza H1N1 infection in immunocompromised host: A concise review. *Lung India* **36**, 330–336 (2019).
24. Stefanska, I., Romanowska, M., Donevski, S., Gawryluk, D. & Brydak, L. B. Co-infections with influenza and other respiratory viruses. *Adv Exp Med Biol* **756**, 291–301 (2013).
25. Cillóniz, C. *et al.* Bacterial co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *Journal of Infection* **65**, 223–230 (2012).
26. Masiá, M. *et al.* Predictors of Pneumococcal Co-infection for Patients with Pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* **17**, 1475–1478 (2011).
27. Chertow, D. S. & Memoli, M. J. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA* **309**, 275–282 (2013).
28. Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* **198**, 962–970 (2008).
29. Vaillancourt, M. & Jorth, P. The Unrecognized Threat of Secondary Bacterial Infections with COVID-19. *mBio* **11**, e01806-20.
30. Yap, F. H. Y. *et al.* Increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition rate and change in pathogen pattern associated with an outbreak of severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis* **39**, 511–516 (2004).
31. Le Bayon, J.-C., Lina, B., Rosa-Calatrava, M. & Boivin, G. Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines. *Rev. Med. Virol.* **23**, 15–34 (2013).
32. Casalegno, J.-S. *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res.* **87**, 242–248 (2010).
33. Pavia, A. T. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* **52 Suppl 4**, S284-289 (2011).

34. Escuret, V. *et al.* A novel I221L substitution in neuraminidase confers high-level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J. Infect. Dis.* **210**, 1260–1269 (2014).
35. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 3 (2018).
36. Boktor, S. W. & Hafner, J. W. Influenza. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
37. Paules, C. & Subbarao, K. Influenza. *The Lancet* **390**, 697–708 (2017).
38. Killingley, B. & Nguyen-Van-Tam, J. Routes of influenza transmission. *Influenza Other Respir Viruses* **7**, 42–51 (2013).
39. Bean, B. *et al.* Survival of Influenza Viruses on Environmental Surfaces. *The Journal of Infectious Diseases* **146**, 47–51 (1982).
40. Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathogens* **3**, (2007).
41. Grippe saisonnière. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
42. CDC. Flu Symptoms & Complications. *Centers for Disease Control and Prevention* <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/symptoms.htm> (2021).
43. Rothberg, M. B., Haessler, S. D. & Brown, R. B. Complications of Viral Influenza. *Am J Med* **121**, 258–264 (2008).
44. Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. Pandemic Influenza’s 500th Anniversary. *Clin Infect Dis* **51**, 1442–1444 (2010).
45. Monto, A. S. & Fukuda, K. Lessons From Influenza Pandemics of the Last 100 Years. *Clin Infect Dis* **70**, 951–957 (2020).
46. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerg Infect Dis* **12**, 15–22 (2006).
47. Garten, R. J. *et al.* Antigenic and Genetic Characteristics of the Early Isolates of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* **325**, 197–201 (2009).
48. Giles, B. Development of a broadly reactive vaccine for highly pathogenic H5N1 influenza. (2011).

49. Karlsson, E. A. Review of global influenza circulation, late 2019 to 2020, and the impact of the COVID-19 pandemic on influenza circulation. *Weekly epidemiological record* (2021).
50. Seasonal influenza - Annual Epidemiological Report for 2017 - 2018. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2017-18-season> (2018).
51. SPF. Surveillance de la grippe en France, saison 2017-2018. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/grippe/surveillance-de-la-grippe-en-france-saison-2017-2018>.
52. Hammond, A. *et al.* Review of the 2018-2019 influenza season in the northern hemisphere. *Weekly Epidemiological Record* **94**, 345–365 (2019).
53. SPF. Surveillance de la grippe en France, saison 2018-2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/import/surveillance-de-la-grippe-en-france-saison-2018-2019>.
54. *Seasonal influenza - Annual Epidemiological Report for 2019–2020*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2019-2020> (2020).
55. SPF. Bulletin épidémiologique grippe. Bilan de la surveillance, saison 2019-2020. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/grippe/documents/bulletin-national/bulletin-epidemiologique-grippe.-bilan-de-la-surveillance-saison-2019-2020>.
56. SPF. Bulletin épidémiologique grippe, semaine 15. Bilan préliminaire. Saison 2020-2021. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/grippe/documents/bulletin-national/bulletin-epidemiologique-grippe-semaine-15.-bilan-preliminaire-saison-2020-2021>.
57. Halfmann, P. J. *et al.* SARS-CoV-2 Interference of Influenza Virus Replication in Syrian Hamsters. *The Journal of Infectious Diseases* **225**, 282–286 (2022).

58. Vo, H. H. H. Élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'encontre du virus de la grippe. (Université Claude Bernard - Lyon I, 2012).
59. Ma, J., Li, S., Li, K., Wang, X. & Li, S. Effects of the PA-X and PB1-F2 Proteins on the Virulence of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus in Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **9**, 315 (2019).
60. Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306–1312 (2001).
61. Bouvier, N. M. & Palese, P. THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. *Vaccine* **26**, D49–D53 (2008).
62. Wise, H. M. *et al.* A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *J Virol* **83**, 8021–8031 (2009).
63. Bavagnoli, L. *et al.* The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA. *Nucleic Acids Res* **43**, 9405–9417 (2015).
64. Hayashi, T., MacDonald, L. A. & Takimoto, T. Influenza A Virus Protein PA-X Contributes to Viral Growth and Suppression of the Host Antiviral and Immune Responses. *J Virol* **89**, 6442–6452 (2015).
65. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* **87**, 2455–2462 (2013).
66. Hao, W., Wang, L. & Li, S. Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus. *Pathogens* **9**, 812 (2020).
67. Koutsakos, M., Nguyen, T. H. O., Barclay, W. S. & Kedzierska, K. Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiol* **11**, 119–135 (2016).
68. Vasin, A. V. *et al.* Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research* **185**, 53–63 (2014).

69. Gao, J. *et al.* Antigenic Drift of the Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Neuraminidase Results in Reduced Effectiveness of A/California/7/2009 (H1N1pdm09)-Specific Antibodies. *mBio* **10**, e00307-19.
70. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
71. Samji, T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J Biol Med* **82**, 153–159 (2009).
72. Olson, A. C., Rosenblum, E. & Kuchta, R. D. Regulation of influenza RNA polymerase activity and the switch between replication and transcription by the concentrations of the vRNA 5' end, the cap source, and the polymerase. *Biochemistry* **49**, 10208–10215 (2010).
73. Perez, J. T. *et al.* Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11525–11530 (2010).
74. te Velthuis, A. J. W. & Fodor, E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol* **14**, 479–493 (2016).
75. Panthu, B. *et al.* The NS1 Protein from Influenza Virus Stimulates Translation Initiation by Enhancing Ribosome Recruitment to mRNAs. *J. Mol. Biol.* **429**, 3334–3352 (2017).
76. Terrier, O. *et al.* Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci Rep* **6**, 29006 (2016).
77. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
78. Zanin, M. *et al.* Pandemic Swine H1N1 Influenza Viruses with Almost Undetectable Neuraminidase Activity Are Not Transmitted via Aerosols in Ferrets and Are Inhibited by Human Mucus but Not Swine Mucus. *J Virol* **89**, 5935–5948 (2015).
79. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155–170 (2021).

80. Hamre, D. & Procknow, J. J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **121**, 190–193 (1966).
81. McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 933–940 (1967).
82. van der Hoek, L. *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**, 368–373 (2004).
83. Woo, P. C. Y. *et al.* Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol* **79**, 884–895 (2005).
84. Vabret, A. & Ar Gouilh, M. Coronavirus. in *Traité de Virologie Médicale, édition 2019* (2019).
85. Dijkman, R. *et al.* Isolation and Characterization of Current Human Coronavirus Strains in Primary Human Epithelial Cell Cultures Reveal Differences in Target Cell Tropism. *Journal of Virology* **87**, 6081–6090 (2013).
86. Chan, R. W. Y. *et al.* Tropism of and Innate Immune Responses to the Novel Human Betacoronavirus Lineage C Virus in Human Ex Vivo Respiratory Organ Cultures. *J Virol* **87**, 6604–6614 (2013).
87. van der Hoek, L. *et al.* Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* **2**, e240 (2005).
88. Hulswit, R. J. G. *et al.* Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *PNAS* **116**, 2681–2690 (2019).
89. Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450–454 (2003).
90. Hamming, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* **203**, 631–637 (2004).
91. Xu, H. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* **12**, 8 (2020).

92. Hofmann, H. *et al.* Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7988–7993 (2005).
93. Raj, V. S. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **495**, 251–254 (2013).
94. Ziegler, C. G. K. *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* **181**, 1016–1035.e19 (2020).
95. Sungnak, W. *et al.* SARS-CoV-2 Entry Factors are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. *Nat Med* **26**, 681–687 (2020).
96. Zhong, N. *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People’s Republic of China, in February, 2003. *Lancet* **362**, 1353–1358 (2003).
97. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271–280.e8 (2020).
98. Shieh, W.-J. *et al.* Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum Pathol* **36**, 303–309 (2005).
99. de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D. & Munster, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **14**, 523–534 (2016).
100. Touyz, R. M., Li, H. & Delles, C. ACE2 the Janus-faced protein - from cardiovascular protection to severe acute respiratory syndrome-coronavirus and COVID-19. *Clin Sci (Lond)* **134**, 747–750 (2020).
101. Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G. & Petersen, E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin Microbiol Infect* **26**, 729–734 (2020).
102. Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A. & Barvkar, V. T. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol* **61**, 180–202 (2021).



103. Durai, P., Batool, M., Shah, M. & Choi, S. Middle East respiratory syndrome coronavirus: transmission, virology and therapeutic targeting to aid in outbreak control. *Exp Mol Med* **47**, e181 (2015).
104. Widagdo, W. *et al.* Differential Expression of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor in the Upper Respiratory Tracts of Humans and Dromedary Camels. *J Virol* **90**, 4838–4842 (2016).
105. Hocke, A. C. *et al.* Emerging Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Causes Widespread Infection and Alveolar Damage in Human Lungs. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 882–886 (2013).
106. Widagdo, W., Sooksawasdi Na Ayudhya, S., Hundie, G. B. & Haagmans, B. L. Host Determinants of MERS-CoV Transmission and Pathogenesis. *Viruses* **11**, 280 (2019).
107. Lescure, F.-X. *et al.* Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases* **20**, 697–706 (2020).
108. Chronologie de l'action de l'OMS face à la COVID-19. <https://www.who.int/fr/news/item/29-06-2020-covidtimeline>.
109. Amanat, F. & Krammer, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* **52**, 583–589 (2020).
110. Lv, L., Li, G., Chen, J., Liang, X. & Li, Y. Comparative Genomic Analyses Reveal a Specific Mutation Pattern Between Human Coronavirus SARS-CoV-2 and Bat-CoV RaTG13. *Frontiers in Microbiology* **11**, 3013 (2020).
111. Tai, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* **17**, 613–620 (2020).
112. Hatmal, M. M. *et al.* Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. *Cells* **9**, 2638 (2020).

113. Kumar, S., Maurya, V. K., Prasad, A. K., Bhatt, M. L. B. & Saxena, S. K. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). *Virusdisease* **31**, 13–21 (2020).
114. Coutard, B. *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research* **176**, 104742 (2020).
115. Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9 (2020).
116. Pizzorno, A. *et al.* Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep Med* **1**, 100059 (2020).
117. Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde. <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde>.
118. Bunyavanich, S., Do, A. & Vicencio, A. Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA* **323**, 2427–2429 (2020).
119. Beyerstedt, S., Casaro, E. B. & Rangel, É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1–15 (2021) doi:10.1007/s10096-020-04138-6.
120. Saheb Sharif-Askari, N. *et al.* Airways Expression of SARS-CoV-2 Receptor, ACE2, and TMPRSS2 Is Lower in Children Than Adults and Increases with Smoking and COPD. *Mol Ther Methods Clin Dev* **18**, 1–6 (2020).
121. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* NEJMc2004973 (2020) doi:10.1056/NEJMc2004973.
122. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* **324**, 782–793 (2020).

123. Wei, W. E. *et al.* Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 - Singapore, January 23-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **69**, 411–415 (2020).
124. Kronbichler, A. *et al.* Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* **98**, 180–186 (2020).
125. Smith, T. P. *et al.* Temperature and population density influence SARS-CoV-2 transmission in the absence of nonpharmaceutical interventions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, e2019284118 (2021).
126. Chu, D. K. *et al.* Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **395**, 1973–1987 (2020).
127. Wu, Z. & McGoogan, J. M. 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* **323**, 1239–1242 (2020).
128. Salian, V. S. *et al.* COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol Pharm* acs.molpharmaceut.0c00608 (2021)  
doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608.
129. Giacomelli, A. *et al.* Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis* ciaa330 (2020)  
doi:10.1093/cid/ciaa330.
130. Garg, S. *et al.* Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 - COVID-NET, 14 States, March 1-30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **69**, 458–464 (2020).
131. Pranata, R., Lim, M. A., Huang, I., Raharjo, S. B. & Lukito, A. A. Hypertension is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **21**, 1470320320926899 (2020).

132. Fang, L., Karakiulakis, G. & Roth, M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med* **8**, e21 (2020).
133. Munshi, L., Fralick, M. & Fan, E. Prone positioning in non-intubated patients with COVID-19: raising the bar. *The Lancet. Respiratory Medicine* **8**, 744 (2020).
134. Bordallo, B., Bellas, M., Cortez, A. F., Vieira, M. & Pinheiro, M. Severe COVID-19: what have we learned with the immunopathogenesis? *Adv Rheumatol* **60**, 50 (2020).
135. Salasc, F., Lahlali, T., Laurent, E., Rosa-Calatrava, M. & Pizzorno, A. Treatments for COVID-19: Lessons from 2020 and new therapeutic options. *Current Opinion in Pharmacology* (2021) doi:10.1016/j.coph.2021.11.002.
136. Xu, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* **8**, 420–422 (2020).
137. Tang, N., Li, D., Wang, X. & Sun, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* **18**, 844–847 (2020).
138. Klok, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* **191**, 145–147 (2020).
139. Middeldorp, S. *et al.* Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost* **18**, 1995–2002 (2020).
140. Ackermann, H., Hage, S. R. & Ziegler, W. Brain mechanisms of acoustic communication in humans and nonhuman primates: An evolutionary perspective. *Behavioral and Brain Sciences* **37**, 529–546 (2014).
141. Levi, M., Thachil, J., Iba, T. & Levy, J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol* **7**, e438–e440 (2020).
142. Satre Buisson, L. Coagulopathie associée au COVID-19 : les éléments essentiels pour l’anesthésiste-réanimateur. *Prat Anesth Reanim* **24**, 190–195 (2020).
143. Terpos, E. *et al.* Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* 10.1002/ajh.25829 (2020) doi:10.1002/ajh.25829.

144. Ritchie, H. *et al.* Coronavirus Pandemic (COVID-19). *Our World in Data* (2020).
145. Historical data (to 14 December 2020) on the daily number of new reported COVID-19 cases and deaths worldwide. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/download-todays-data-geographic-distribution-covid-19-cases-worldwide> (2020).
146. Covid-19 : chronologie de la pandémie en Europe. *Touteleurope.eu* <https://www.touteleurope.eu/societe/covid-19-chronologie-de-la-pandemie-en-europe/> (2021).
147. Timeline: WHO's COVID-19 response. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>.
148. Santé publique France. *COVID-19 Point épidémiologique - Situation au 4 mars 2020 - 16h.* (2020).
149. WHO. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) - Situation Report – 75.* [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200404-sitrep-75-covid-19.pdf?sfvrsn=99251b2b\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200404-sitrep-75-covid-19.pdf?sfvrsn=99251b2b_4) (2020).
150. Santé publique France. *COVID 19 - Point épidémiologique hebdomadaire du 31 décembre 2020.* (2020).
151. Galloway, S. E. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **70**, 95–99 (2021).
152. Santé publique France. *COVID 19 - Point épidémiologique hebdomadaire du 25 mars 2021.* (2021).
153. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 7 December 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---7-december-2021>.
154. COVID Live Update: 268,980,225 Cases and 5,307,024 Deaths from the Coronavirus - Worldometer. <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>.

155. Hamed, S. M., Elkhatab, W. F., Khairalla, A. S. & Noreddin, A. M. Global dynamics of SARS-CoV-2 clades and their relation to COVID-19 epidemiology. *Sci Rep* **11**, 8435 (2021).
156. Viner, R. M. *et al.* Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatrics* **175**, 143–156 (2021).
157. Chakravarty, D. *et al.* Sex differences in SARS-CoV-2 infection rates and the potential link to prostate cancer. *Commun Biol* **3**, 1–12 (2020).
158. Funk, T. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill* **26**, 2100348 (2021).
159. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/emergencies/what-we-do/tracking-sars-cov-2-variants>.
160. Choi, J. Y. & Smith, D. M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* **62**, 961–968 (2021).
161. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812-827.e19 (2020).
162. Groves, D. C., Rowland-Jones, S. L. & Angyal, A. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. *Biochem Biophys Res Commun* **538**, 104–107 (2021).
163. Cov-Lineages. [https://cov-lineages.org/index.html#global\\_reports](https://cov-lineages.org/index.html#global_reports).
164. O’Toole, Á. *et al.* Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2. Preprint at <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16661.1> (2021).
165. Davies, N. G. *et al.* Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* **372**, eabg3055 (2021).
166. Washington, N. L. *et al.* Emergence and rapid transmission of SARS-CoV-2 B.1.1.7 in the United States. *Cell* **184**, 2587-2594.e7 (2021).
167. Soh, S. M., Kim, Y., Kim, C., Jang, U. S. & Lee, H.-R. The rapid adaptation of SARS-CoV-2—rise of the variants: transmission and resistance. *J Microbiol.* **59**, 807–818 (2021).

168. Faria, N. R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **372**, 815–821 (2021).
169. Ong, S. W. X. *et al.* Clinical and virological features of SARS-CoV-2 variants of concern: a retrospective cohort study comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.315 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis* ciab721 (2021) doi:10.1093/cid/ciab721.
170. Sanches, P. R. S. *et al.* Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). *J Virus Erad* **7**, 100054 (2021).
171. Shiehzadegan, S., Alaghemand, N., Fox, M. & Venketaraman, V. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin Pract* **11**, 778–784 (2021).
172. Campbell, F. *et al.* Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill* **26**, (2021).
173. Karim, S. S. A. & Karim, Q. A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet* **398**, 2126–2128 (2021).
174. Davies, N. G. *et al.* Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *medRxiv* 2021.02.01.21250959 (2021) doi:10.1101/2021.02.01.21250959.
175. Zhao, S. *et al.* An early assessment of a case fatality risk associated with P.1 SARS-CoV-2 lineage in Brazil: an ecological study. *J Travel Med* **28**, taab078 (2021).
176. van Kampen, J. J. A. *et al.* Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun* **12**, 267 (2021).
177. Planas, D. *et al.* Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med* **27**, 917–924 (2021).
178. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell* **184**, 2384–2393.e12 (2021).
179. Dejnirattisai, W. *et al.* Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell* **184**, 2939–2954.e9 (2021).

180. CoVariants. <https://covariants.org/>.
181. Wibmer, C. K. *et al.* SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med* **27**, 622–625 (2021).
182. Sheikh, A., McMenamin, J., Taylor, B. & Robertson, C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *Lancet* **397**, 2461–2462 (2021).
183. Charmet, T. *et al.* Impact of original, B.1.1.7, and B.1.351/P.1 SARS-CoV-2 lineages on vaccine effectiveness of two doses of COVID-19 mRNA vaccines: Results from a nationwide case-control study in France. *Lancet Reg Health Eur* **8**, 100171 (2021).
184. Torjesen, I. Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ* **375**, n2943 (2021).
185. Coronavirus (COVID-19) - Google Actualités. *Google Actualités*  
<https://news.google.com/covid19/map?hl=fr&gl=FR&ceid=FR:fr>.
186. Delfraissy, J.-F. *et al.* LA VAGUE OMICRON : UNE VAGUE TRES DIFFERENTE DES PRECEDENTES. **27** (2022).
187. GISAID - NextStrain. <https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>.
188. Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R. & Milo, R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife* **9**, e57309.
189. Yadav, R. *et al.* Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* **10**, 821 (2021).
190. Malone, B., Urakova, N., Snijder, E. J. & Campbell, E. A. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1–19 (2021) doi:10.1038/s41580-021-00432-z.
191. Gadhave, K. *et al.* Conformational dynamics of 13 amino acids long NSP11 of SARS-CoV-2 under membrane mimetics and different solvent conditions. *Microb Pathog* **158**, 105041 (2021).



192. Ogando, N. S. *et al.* The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Journal of Virology* **94**, e01246-20.
193. Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J. & Montoya, M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology* **12**, 2698 (2021).
194. Gaudin, Y. Structure des glycoprotéines de fusion virale de classe II dans leur conformation fusogène. *Virologie* **8**, 157–158 (2004).
195. Zhang, N. *et al.* Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol* **92**, 408–417 (2020).
196. Health, C. for D. and R. COVID-19 Tests and Collection Kits Authorized by the FDA: Infographic. *FDA* (2021).
197. Plateforme COVID-19. <https://covid-19.sante.gouv.fr/tests>.
198. Nypaver, C., Dehlinger, C. & Carter, C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *J Midwifery Womens Health* **66**, 45–53 (2021).
199. Zhao, W., Zhong, Z., Xie, X., Yu, Q. & Liu, J. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study. *AJR Am J Roentgenol* **214**, 1072–1077 (2020).
200. OMS. Détection des antigènes pour le diagnostic de l'infection à SARS-CoV-2. (2021).
201. Böger, B. *et al.* Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control* **49**, 21–29 (2021).
202. Table 3. Nucleic Acid Detection Based Tests | CDC. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-nucleic-acid-detection.html> (2020).
203. Corman, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* **25**, (2020).
204. 新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列 ( Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus) . [http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.html](http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html).

205. CDC. Labs. Centers for Disease Control and Prevention  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html> (2020).
206. Yüce, M., Filiztekin, E. & Özkaya, K. G. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosens Bioelectron* **172**, 112752 (2021).
207. Séquençage nouvelle génération (NGS) Clinisciences.  
<https://www.clinisciences.com/achat/cat-sequencage-nouvelle-generation-3452.html>.
208. Shu, Y. & McCauley, J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance* **22**, 30494 (2017).
209. Oude Munnink, B. B. *et al.* The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: real-time molecular epidemiology. *Nat Med* **27**, 1518–1524 (2021).
210. Antigenic test COVID + Influenza - One sample and 3 results Clinisciences.  
<https://www.clinisciences.com/en/read/newsletter-26/antigenic-test-covid-influenza-2322.html>.
211. WHO | Influenza (Seasonal). WHO  
<http://www.who.int.gate1.inist.fr/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
212. Maltezou, H. C., Theodoridou, K. & Poland, G. Influenza immunization and COVID-19. *Vaccine* **38**, 6078–6079 (2020).
213. Vaccination contre la grippe saisonnière. *Conseil National de l'Ordre des Médecins*  
<https://www.conseil-national.medecin.fr/publications/actualites/vaccination-grippe-saisonniere>  
 (2021).
214. Research, C. for B. E. and. Influenza Vaccine for the 2021-2022 Season. *FDA* (2021).
215. 2017-08-28-07-00-00. <https://www.sanofi.com/media-room/press-releases/2017/2017-08-28-07-00-00-1100795>.
216. Grippe. <https://vaccination-info-service.fr/Les-maladies-et-leurs-vaccins/Grippe>.
217. ModernaTX, Inc. *A Phase 1b, Randomized, Observer-Blind, Placebo-Controlled, Dose Ranging Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of mRNA-1653, a Combined Human Metapneumovirus (hMPV) and Parainfluenza Virus Type 3 (PIV3) Vaccine When Administered to*

- Adults, and to Children 12 to 59 Months of Age With Serologic Evidence of Prior Exposure.*  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04144348> (2021).
218. Shahzamani, K. *et al.* Vaccine design and delivery approaches for COVID-19. *Int Immunopharmacol* **100**, 108086 (2021).
219. Sahin, U. *et al.* COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* **586**, 594–599 (2020).
220. Baden, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* **384**, 403–416 (2021).
221. Commissioner, O. of the. Comirnaty and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. *FDA* (2021).
222. Lemiale, F. *et al.* Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. *Vaccine* **25**, 2074–2084 (2007).
223. Watanabe, Y. *et al.* Native-like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine. *ACS Cent Sci* **7**, 594–602 (2021).
224. Commissioner, O. of the. COVID-19 Vaccines. *FDA* (2021).
225. PINHO, A. C. COVID-19 vaccines. *European Medicines Agency*  
<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines> (2021).
226. Jones, I. & Roy, P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet* **397**, 642–643 (2021).
227. Mathieu, E. *et al.* A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat Hum Behav* **5**, 947–953 (2021).
228. Covid-19 : efficacité vaccinale. *EPI-PHARE* <https://www.epi-phare.fr/rapports-detudes-et-publications/impact-vaccination-covid-octobre-2021/> (2021).
229. Moghadas, S. M. *et al.* The impact of vaccination on COVID-19 outbreaks in the United States. *Clin Infect Dis* ciab079 (2021) doi:10.1093/cid/ciab079.

230. Chen, Y.-T. The Effect of Vaccination Rates on the Infection of COVID-19 under the Vaccination Rate below the Herd Immunity Threshold. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 7491 (2021).
231. Delta-19, a SARS-CoV-2 (Covid-19) & Universal Influenza Combination Vaccine. *Vivaldi Biosciences* <https://vivaldibiosciences.com/delta19>.
232. Loes, A. N., Gentles, L. E., Greaney, A. J., Crawford, K. H. D. & Bloom, J. D. Attenuated influenza virions expressing the SARS-CoV-2 receptor-binding domain induce neutralizing antibodies in mice. *bioRxiv* 2020.08.12.248823 (2020) doi:10.1101/2020.08.12.248823.
233. Pizzorno, A., Padey, B., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
234. Jackson, G. G., Muldoon, R. L. & Akers, L. W. SEROLOGICAL EVIDENCE FOR PREVENTION OF INFLUENZAL INFECTION IN VOLUNTEERS BY AN ANTI-INFLUENZAL DRUG ADAMANTANAMINE HYDROCHLORIDE. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **161**, 703–707 (1963).
235. Dong, G. *et al.* Adamantane-Resistant Influenza A Viruses in the World (1902–2013): Frequency and Distribution of M2 Gene Mutations. *PLoS One* **10**, e0119115 (2015).
236. Belshe, R. B., Burk, B., Newman, F., Cerruti, R. L. & Sim, I. S. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance. *J Infect Dis* **159**, 430–435 (1989).
237. Hayden, F. G. & Hay, A. J. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 119–130 (1992).
238. Rabinovich, S., Baldini, J. T. & Bannister, R. Treatment of influenza. The therapeutic efficacy of rimantadine HC1 in a naturally occurring influenza A2 outbreak. *Am J Med Sci* **257**, 328–335 (1969).
239. Kim, C. U. *et al.* Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J Med Chem* **41**, 2451–2460 (1998).
240. Lee, N. & Hurt, A. C. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: a clinical perspective. *Curr Opin Infect Dis* **31**, 520–526 (2018).

241. Abed, Y. & Boivin, G. A Review of Clinical Influenza A and B Infections With Reduced Susceptibility to Both Oseltamivir and Zanamivir. *Open Forum Infectious Diseases* **4**, (2017).
242. Pizzorno, A., Bouhy, X., Abed, Y. & Boivin, G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *The Journal of Infectious Diseases* **203**, 25–31 (2011).
243. Nguyen, H. T., Fry, A. M., Loveless, P. A., Klimov, A. I. & Gubareva, L. V. Recovery of a Multidrug-Resistant Strain of Pandemic Influenza A 2009 (H1N1) Virus Carrying a Dual H275Y/I223R Mutation from a Child after Prolonged Treatment with Oseltamivir. *Clinical Infectious Diseases* **51**, 983–984 (2010).
244. von Itzstein, M. *et al.* Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418–423 (1993).
245. Babu, Y. S. *et al.* BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem* **43**, 3482–3486 (2000).
246. Yamashita, M. *et al.* CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 186–192 (2009).
247. McKimm-Breschkin, J. L. & Barrett, S. Neuraminidase mutations conferring resistance to laninamivir lead to faster drug binding and dissociation. *Antiviral Res* **114**, 62–66 (2015).
248. Furuta, Y. *et al.* In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 977–981 (2002).
249. Goldhill, D. H. *et al.* The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 11613–11618 (2018).
250. Noshi, T. *et al.* In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Research* **160**, 109–117 (2018).

251. Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *New England Journal of Medicine* (2018) doi:10.1056/NEJMoa1716197.
252. Omoto, S. *et al.* Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep* **8**, 9633 (2018).
253. Trofimov, F. A., Tsyshkova, N. G., Zotova, S. A. & Grinev, A. N. Synthesis of a new antiviral agent, arbidole. *Pharm Chem J* **27**, 75–76 (1993).
254. Boriskin, Y. S., Leneva, I. A., Pécheur, E.-I. & Polyak, S. J. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr Med Chem* **15**, 997–1005 (2008).
255. Toledo-Rueda, W. *et al.* Antiviral resistance markers in influenza virus sequences in Mexico, 2000–2017. *Infect Drug Resist* **11**, 1751–1756 (2018).
256. Moscona, A. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. <http://dx.doi.org/insb.bib.cnrs.fr/10.1056/NEJMra050740> <https://www-nejm-org.insb.bib.cnrs.fr/doi/10.1056/NEJMra050740> (2009) doi:10.1056/NEJMra050740.
257. Dobson, J., Whitley, R. J., Pocock, S. & Monto, A. S. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **385**, 1729–1737 (2015).
258. Venkatesan, S. *et al.* Impact of Outpatient Neuraminidase Inhibitor Treatment in Patients Infected With Influenza A(H1N1)pdm09 at High Risk of Hospitalization: An Individual Participant Data Metaanalysis. *Clin Infect Dis* **64**, 1328–1334 (2017).
259. Dharan, N. J. *et al.* Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* **301**, 1034–1041 (2009).
260. Hurt, A. C. *et al.* Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Research* **83**, 90–93 (2009).
261. Storms, A. D. *et al.* Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010–11. *Emerg Infect Dis* **18**, 308–311 (2012).
262. Hayden, F. G. & Shindo, N. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Curr Opin Infect Dis* **32**, 176–186 (2019).

263. Furuta, Y. *et al.* Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Research* **100**, 446–454 (2013).
264. Sleeman, K. *et al.* In Vitro Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against Drug-Resistant Influenza and 2009 A(H1N1) Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2517–2524 (2010).
265. Sidwell, R. W. *et al.* Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 845–851 (2007).
266. Bixler, S. L. *et al.* Efficacy of favipiravir (T-705) in nonhuman primates infected with Ebola virus or Marburg virus. *Antiviral Res* **151**, 97–104 (2018).
267. Sissoko, D. *et al.* Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med* **13**, e1001967 (2016).
268. Caroline, A. L. *et al.* Broad Spectrum Antiviral Activity of Favipiravir (T-705): Protection from Highly Lethal Inhalational Rift Valley Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, e2790 (2014).
269. Joshi, S. *et al.* Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases* **102**, 501–508 (2021).
270. Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *New England Journal of Medicine* **379**, 913–923 (2018).
271. Ison, M. G. *et al.* Early treatment with baloxavir marboxil in high-risk adolescent and adult outpatients with uncomplicated influenza (CAPSTONE-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* **20**, 1204–1214 (2020).
272. Checkmahomed, L. *et al.* Impact of the Baloxavir-Resistant Polymerase Acid I38T Substitution on the Fitness of Contemporary Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) Strains. *J Infect Dis* **221**, 63–70 (2020).
273. Takashita, E. *et al.* Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Euro Surveill* **24**, (2019).

274. Lee, L. Y. *et al.* Evaluating the fitness of PA/I38T-substituted influenza A viruses with reduced baloxavir susceptibility in a competitive mixtures ferret model. *PLoS Pathog* **17**, e1009527 (2021).
275. Takashita, E. *et al.* Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis* **25**, 2108–2111 (2019).
276. Sato, M. *et al.* Detection of variants with reduced baloxavir marboxil and oseltamivir susceptibility in children with influenza A during the 2019-2020 influenza season. *J Infect Dis* **jjab196** (2021) doi:10.1093/infdis/jiab196.
277. Blaising, J., Polyak, S. J. & Pécheur, E.-I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: An update. *Antiviral Res* **107**, 84–94 (2014).
278. Kadam, R. U. & Wilson, I. A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 206–214 (2017).
279. Blaising, J. *et al.* Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking. *Antiviral Res* **100**, 215–219 (2013).
280. Wang, Y. *et al.* Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride in vitro and in vivo (mice and ferret). *Biomed Pharmacother* **91**, 393–401 (2017).
281. Pshenichnaya, N. Y. *et al.* Clinical efficacy of umifenovir in influenza and ARVI (study ARBITR). *Ter Arkh* **91**, 56–63 (2019).
282. Leneva, I. A. *et al.* Umifenovir susceptibility monitoring and characterization of influenza viruses isolated during ARBITR clinical study. *J Med Virol* **91**, 588–597 (2019).
283. Leneva, I. A., Russell, R. J., Boriskin, Y. S. & Hay, A. J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res* **81**, 132–140 (2009).
284. Cao, B. *Osetamivir and Arbidol Combination Antiviral Therapy Versus Osetamivir Monotherapy for the Treatment of Severe influenza: a Multicentre, Double-blind, Randomised Phase 3 Trial*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03787459> (2019).



285. Clark, M. P. *et al.* Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2. *J Med Chem* **57**, 6668–6678 (2014).
286. Han, A. *et al.* Safety and Efficacy of CR6261 in an Influenza A H1N1 Healthy Human Challenge Model. *Clin Infect Dis* **73**, e4260–e4268 (2021).
287. Sedeyn, K. & Saelens, X. New antibody-based prevention and treatment options for influenza. *Antiviral Res* **170**, 104562 (2019).
288. Beigel, J. H. Polyclonal and monoclonal antibodies for the treatment of influenza. *Curr Opin Infect Dis* **31**, 527–534 (2018).
289. Koszalka, P., Tilmanis, D. & Hurt, A. C. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. *Influenza Other Respir Viruses* **11**, 240–246 (2017).
290. Moss, R. B. *et al.* A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection. *J Infect Dis* **206**, 1844–1851 (2012).
291. Escuret, V. *et al.* Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res* **96**, 130–137 (2012).
292. Zhang, Y. *et al.* Efficacy of oseltamivir-peramivir combination therapy compared to oseltamivir monotherapy for Influenza A (H7N9) infection: a retrospective study. *BMC Infect Dis* **16**, 76 (2016).
293. Li, T. C. M., Chan, M. C. W. & Lee, N. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses* **7**, 4929–4944 (2015).
294. Marathe, B. M. *et al.* Combinations of Oseltamivir and T-705 Extend the Treatment Window for Highly Pathogenic Influenza A(H5N1) Virus Infection in Mice. *Sci Rep* **6**, 26742 (2016).
295. Kiso, M. *et al.* Combination Therapy With Neuraminidase and Polymerase Inhibitors in Nude Mice Infected With Influenza Virus. *J Infect Dis* **217**, 887–896 (2018).
296. Wang, Y. *et al.* Phase 2a, open-label, dose-escalating, multi-center pharmacokinetic study of favipiravir (T-705) in combination with oseltamivir in patients with severe influenza. *EBioMedicine* **62**, 103125 (2020).

297. Fukao, K. *et al.* Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection. *J Antimicrob Chemother* **74**, 654–662 (2019).
298. Mhamdi, Z. *et al.* Effects of Different Drug Combinations in Immunodeficient Mice Infected with an Influenza A/H3N2 Virus. *Microorganisms* **8**, (2020).
299. Park, J.-H. *et al.* Baloxavir-oseltamivir combination therapy inhibits the emergence of resistant substitutions in influenza A virus PA gene in a mouse model. *Antiviral Res* **193**, 105126 (2021).
300. Hoffmann-La Roche. *A Phase III, Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled, Multicenter Study To Evaluate the Efficacy and Safety of Baloxavir Marboxil in Combination With Standard-of-Care Neuraminidase Inhibitor in Hospitalized Participants With Severe Influenza.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03684044> (2020).
301. Schloer, S., Goretzko, J., Pleschka, S., Ludwig, S. & Rescher, U. Combinatory Treatment with Oseltamivir and Itraconazole Targeting Both Virus and Host Factors in Influenza A Virus Infection. *Viruses* **12**, 703 (2020).
302. White, C. A. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**, 43–49 (2004).
303. Belardo, G., Cenciarelli, O., Frazia, S. L., Rossignol, J. F. & Santoro, M. G. Synergistic Effect of Nitazoxanide with Neuraminidase Inhibitors against Influenza A Viruses In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2014).
304. Gamiño-Arroyo, A. E. *et al.* Efficacy and Safety of Nitazoxanide in Addition to Standard of Care for the Treatment of Severe Acute Respiratory Illness. *Clin Infect Dis* **69**, 1903–1911 (2019).
305. Tilmanis, D. *et al.* Host-targeted nitazoxanide has a high barrier to resistance but does not reduce the emergence or proliferation of oseltamivir-resistant influenza viruses in vitro or in vivo when used in combination with oseltamivir. *Antiviral Res* **180**, 104851 (2020).
306. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). *A Randomized Double-Blind Phase 2 Study Comparing the Efficacy, Safety, and Tolerability of Nitazoxanide Versus Placebo in Addition*

*to Standard Care for the Treatment of Hospitalized Subjects With Severe Acute Respiratory Illness.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02057757> (2018).

307. Romark Laboratories L.C. *A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Nitazoxanide and Nitazoxanide Plus Oseltamivir in the Treatment of Acute Uncomplicated Influenza.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01610245> (2018).
308. Reynard, O. *et al.* Identification of a New Ribonucleoside Inhibitor of Ebola Virus Replication. *Viruses* **7**, 6233–6240 (2015).
309. Commissioner, O. of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Drug for Treatment of COVID-19. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-drug-treatment-covid-19> (2021).
310. CZARSKA-THORLEY, D. First COVID-19 treatment recommended for EU authorisation. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-covid-19-treatment-recommended-eu-authorisation> (2020).
311. L'OMS ne recommande pas l'administration de remdesivir aux patients COVID-19. <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/who-recommends-against-the-use-of-remdesivir-in-covid-19-patients>.
312. BERBECE, C. EMA issues advice on use of Lagevrio (molnupiravir) for the treatment COVID-19. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-issues-advice-use-lagevrio-molnupiravir-treatment-covid-19> (2021).
313. Commissioner, O. of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19> (2021).

314. EMA. COVID-19: EMA recommends conditional marketing authorisation for Paxlovid. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-ema-recommends-conditional-marketing-authorisation-paxlovid> (2022).
315. Pfizer. *AN INTERVENTIONAL EFFICACY AND SAFETY, PHASE 2/3, DOUBLE-BLIND, 2-ARM STUDY TO INVESTIGATE ORALLY ADMINISTERED PF-07321332/RITONAVIR COMPARED WITH PLACEBO IN NONHOSPITALIZED SYMPTOMATIC ADULT PARTICIPANTS WITH COVID-19 WHO ARE AT INCREASED RISK OF PROGRESSING TO SEVERE ILLNESS.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04960202> (2022).
316. Macchiagodena, M., Pagliai, M. & Procacci, P. Characterization of the non-covalent interaction between the PF-07321332 inhibitor and the SARS-CoV-2 main protease. *J Mol Graph Model* **110**, 108042 (2022).
317. Ahmad, B., Batool, M., Ain, Q. U., Kim, M. S. & Choi, S. Exploring the Binding Mechanism of PF-07321332 SARS-CoV-2 Protease Inhibitor through Molecular Dynamics and Binding Free Energy Simulations. *Int J Mol Sci* **22**, 9124 (2021).
318. Pavan, M., Bolcato, G., Bassani, D., Sturlese, M. & Moro, S. Supervised Molecular Dynamics (SuMD) Insights into the mechanism of action of SARS-CoV-2 main protease inhibitor PF-07321332. *J Enzyme Inhib Med Chem* **36**, 1646–1650 (2021).
319. rjbonaobra. Casirivimab + Imdevimab (Ronapreve) - Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/ph/casirivimab-imdevimab-ronapreve/> (2021).
320. Commissioner, O. of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Additional Monoclonal Antibody for Treatment of COVID-19. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-monoclonal-antibody-treatment-covid-19> (2021).
321. Deeks, E. D. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs* **81**, 2047–2055 (2021).
322. Gupta, A. *et al.* Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N Engl J Med* **385**, 1941–1950 (2021).

323. RECOVERY Collaborative Group *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 693–704 (2021).
324. Tomazini, B. M. *et al.* Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA* **324**, 1307–1316 (2020).
325. L'OMS recommande de recourir à des antagonistes de l'interleukine 6 pour sauver la vie de patients atteints de la COVID-19 et demande instamment aux fabricants de s'unir aux efforts visant à améliorer rapidement l'accès à ces produits. <https://www.who.int/fr/news/item/06-07-2021-who-recommends-life-saving-interleukin-6-receptor-blockers-for-covid-19-and-urges-producers-to-join-efforts-to-rapidly-increase-access>.
326. Chua, S. C. J. H., Tan, H. Q., Engelberg, D. & Lim, L. H. K. Alternative Experimental Models for Studying Influenza Proteins, Host–Virus Interactions and Anti-Influenza Drugs. *Pharmaceuticals (Basel)* **12**, 147 (2019).
327. Takayama, K. In Vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol Sci* **41**, 513–517 (2020).
328. Pastor, D. M. *et al.* Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *Int J Clin Exp Med* **3**, 69–83 (2010).
329. Human primary cells versus cell lines: differences and advantages. *PromoCell* <https://promocell.com/in-the-lab/human-primary-cells-and-immortal-cell-lines/> (2019).
330. Kaur, G. & Dufour, J. M. Cell lines. *Spermatogenesis* **2**, 1–5 (2012).
331. Induced Pluripotent Stem Cell - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/induced-pluripotent-stem-cell>.

332. Park, D. Y., Kim, S., Kim, C. H., Yoon, J. H. & Kim, H. J. Alternative Method for Primary Nasal Epithelial Cell Culture Using Intranasal Brushing and Feasibility for the Study of Epithelial Functions in Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* **8**, 69–78 (2016).
333. Feng, W. *et al.* Human Normal Bronchial Epithelial Cells: A Novel In Vitro Cell Model for Toxicity Evaluation. *PLOS ONE* **10**, e0123520 (2015).
334. Zhu, Y., Chidekel, A. & Shaffer, T. H. Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses. *Critical Care Research and Practice* **2010**, e394578 (2010).
335. Shen, B. Q., Finkbeiner, W. E., Wine, J. J., Mrsny, R. J. & Widdicombe, J. H. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **266**, L493–L501 (1994).
336. Ramirez, R. D. *et al.* Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* **64**, 9027–9034 (2004).
337. Cozens, A. L. *et al.* CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 38–47 (1994).
338. Reddel, R. R. *et al.* Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or Transfection via Strontium Phosphate Coprecipitation with a Plasmid Containing SV40 Early Region Genes. *Cancer Res* **48**, 1904–1909 (1988).
339. Giard, D. J. *et al.* In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors<sup>2</sup>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417–1423 (1973).
340. Crapo, J. D. *et al.* Morphometric Characteristics of Cells in the Alveolar Region of Mammalian Lungs<sup>1–3</sup>. *American Review of Respiratory Disease* (2015).
341. Salomon, J. J. *et al.* The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier. *Mol Pharm* **11**, 995–1006 (2014).

342. Ren, H., Birch, N. P. & Suresh, V. An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport. *PLOS ONE* **11**, e0165225 (2016).
343. Green, I. J., Lieberman, M., Mogabgab, W. J., Peterkin, W. G. & Phillips, I. A. The Behavior of Influenza Viruses in Various Tissue Culture Systems. *The Journal of Immunology* **78**, 233–239 (1957).
344. Green, I. J. Serial propagation of influenza B (Lee) virus in a transmissible line of canine kidney cells. *Science* **138**, 42–43 (1962).
345. Gaush, C. R. & Smith, T. F. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* **16**, 588–594 (1968).
346. Hatakeyama, S. *et al.* Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol* **43**, 4139–4146 (2005).
347. Dissanayake, T. K. *et al.* Comparative Transcriptomic Analysis of Rhinovirus and Influenza Virus Infection. *Front Microbiol* **11**, 1580 (2020).
348. Ogando, N. S. *et al.* SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol* **101**, 925–940 (2020).
349. Felgenhauer, U. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. *J Biol Chem* **295**, 13958–13964 (2020).
350. Emeny, J. M. & Morgan, M. J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol* **43**, 247–252 (1979).
351. Prescott, J. *et al.* New World Hantaviruses Activate IFN $\lambda$  Production in Type I IFN-Deficient Vero E6 Cells. *PLoS One* **5**, e11159 (2010).
352. Lokugamage, K. G. *et al.* Type I Interferon Susceptibility Distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J Virol* **94**, e01410-20 (2020).
353. Choy, K.-T. *et al.* Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res* **178**, 104786 (2020).

354. Li, Y. *et al.* SARS-CoV-2 induces double-stranded RNA-mediated innate immune responses in respiratory epithelial-derived cells and cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**, e2022643118 (2021).
355. Wang, H. *et al.* Establishment and comparison of air-liquid interface culture systems for primary and immortalized swine tracheal epithelial cells. *BMC Cell Biol* **19**, 10 (2018).
356. Yaqub, N., Wayne, G., Birchall, M. & Song, W. Recent advances in human respiratory epithelium models for drug discovery. *Biotechnology Advances* **54**, 107832 (2022).
357. Rossi, G., Manfrin, A. & Lutolf, M. P. Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* **19**, 671–687 (2018).
358. Benali, R. *et al.* Tubule formation by human surface respiratory epithelial cells cultured in a three-dimensional collagen lattice. *Am J Physiol* **264**, L183-192 (1993).
359. Dye, B. R. *et al.* A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *eLife* **5**, e19732 (2016).
360. Dye, B. R. *et al.* In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife* **4**, e05098 (2015).
361. Huang, S. X. L. *et al.* Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **32**, 84–91 (2014).
362. Kim, J., Koo, B.-K. & Knoblich, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 571–584 (2020).
363. Li, Y., Wu, Q., Sun, X., Shen, J. & Chen, H. Organoids as a Powerful Model for Respiratory Diseases. *Stem Cells International* **2020**, e5847876 (2020).
364. Zhou, J. *et al.* Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus. *PNAS* **115**, 6822–6827 (2018).
365. Hui, K. P. Y. *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of influenza virus: an analysis of human airway organoids and ex-vivo bronchus cultures. *The Lancet Respiratory Medicine* **6**, 846–854 (2018).



366. Salahudeen, A. A. *et al.* Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in long-term human distal lung organoid cultures. *bioRxiv* 2020.07.27.212076 (2020) doi:10.1101/2020.07.27.212076.
367. Han, Y. *et al.* Identification of Candidate COVID-19 Therapeutics using hPSC-derived Lung Organoids. *bioRxiv* 2020.05.05.079095 (2020) doi:10.1101/2020.05.05.079095.
368. Sibinovska, N., Žakelj, S., Roškar, R. & Kristan, K. Suitability and functional characterization of two Calu-3 cell models for prediction of drug permeability across the airway epithelial barrier. *International Journal of Pharmaceutics* **585**, 119484 (2020).
369. He, R.-W. *et al.* Optimization of an air-liquid interface in vitro cell co-culture model to estimate the hazard of aerosol exposures. *Journal of Aerosol Science* **153**, 105703 (2021).
370. Kreft, M. E. *et al.* The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **69**, 1–9 (2015).
371. Sanchez-Guzman, D. *et al.* Long-term evolution of the epithelial cell secretome in preclinical 3D models of the human bronchial epithelium. *Sci Rep* **11**, 6621 (2021).
372. Heinen, N., Klöhn, M., Steinmann, E. & Pfaender, S. In Vitro Lung Models and Their Application to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Disease. *Viruses* **13**, 792 (2021).
373. Srinivasan, B. *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**, 107–126 (2015).
374. Chen, S. & Schoen, J. Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reproduction in Domestic Animals* **54**, 38–45 (2019).
375. Measurement of Transepithelial Electrical Resistance (TEER). *Ebrary* [https://ebrary.net/24380/health/measurement\\_transepithelial\\_electrical\\_resistance\\_teer](https://ebrary.net/24380/health/measurement_transepithelial_electrical_resistance_teer).
376. Huang, S. *et al.* Establishment and characterization of an in vitro human small airway model (SmallAir™). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **118**, 68–72 (2017).
377. Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L. & Cormet-Boyaka, E. Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Sci Rep* **9**, 500 (2019).

378. Maughan, E. F. *et al.* Cell-intrinsic differences between human airway epithelial cells from children and adults. 2020.04.20.027144  
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.20.027144v1> (2020)  
doi:10.1101/2020.04.20.027144.
379. Whitcutt, M. J., Adler, K. B. & Wu, R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of culture respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**, 420–428 (1988).
380. Innovative in vitro respiratory solutions - products. *Epithelix*  
<https://www.epithelix.com/products>.
381. EpiAirway 3D in vitro Microtissues. *MatTek Life Sciences*  
<https://www.mattek.com/products/epi-airway/> (2015).
382. Huang, S. X. L. *et al.* Highly efficient generation of airway and lung epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **32**, 84–91 (2014).
383. Hedström, U. *et al.* Bronchial extracellular matrix from COPD patients induces altered gene expression in repopulated primary human bronchial epithelial cells. *Sci Rep* **8**, 3502 (2018).
384. Huang, S., Wiszniewski, L., Constant, S. & Roggen, E. Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir™) to assess respiratory sensitizers. *Toxicol In Vitro* **27**, 1151–1156 (2013).
385. Wong, A. P. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol* **30**, 876–882 (2012).
386. Pharo, E. A. *et al.* Host–Pathogen Responses to Pandemic Influenza H1N1pdm09 in a Human Respiratory Airway Model. *Viruses* **12**, 679 (2020).
387. Zeng, H. *et al.* Tropism and infectivity of influenza virus, including highly pathogenic avian H5N1 virus, in ferret tracheal differentiated primary epithelial cell cultures. *J Virol* **87**, 2597–2607 (2013).
388. Boda, B. *et al.* Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res* **156**, 72–79 (2018).

389. Sims, A. C., Burkett, S. E., Yount, B. & Pickles, R. J. SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. *Virus Res* **133**, 33–44 (2008).
390. Jonsdottir, H. R. & Dijkman, R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virology* **13**, 24 (2016).
391. Robinot, R. *et al.* SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun* **12**, 4354 (2021).
392. Sheahan, T. P. *et al.* An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* **12**, (2020).
393. Papazian, D., Würtzen, P. A. & Hansen, S. W. K. Polarized Airway Epithelial Models for Immunological Co-Culture Studies. *Int Arch Allergy Immunol* **170**, 1–21 (2016).
394. Yonker, L. M. *et al.* Development of a Primary Human Co-Culture Model of Inflamed Airway Mucosa. *Sci Rep* **7**, 8182 (2017).
395. Pasma, T. *et al.* Development of an In Vitro Airway Epithelial–Endothelial Cell Culture Model on a Flexible Porous Poly(Trimethylene Carbonate) Membrane Based on Calu-3 Airway Epithelial Cells and Lung Microvascular Endothelial Cells. *Membranes (Basel)* **11**, 197 (2021).
396. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* **32**, 760–772 (2014).
397. Our technology | Organs-on-chip and how they work. *AlveoliX* <https://www.alveolix.com/our-technology/>.
398. Lung-Chip. *Emulate* <https://emulatebio.com/lung-chip/>.
399. Technology - TissUse GmbH. <https://www.tissuse.com/en/technology/>.
400. Si, L. *et al.* Discovery of influenza drug resistance mutations and host therapeutic targets using a human airway chip. 685552 (2019) doi:10.1101/685552.
401. Si, L. *et al.* A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics. *Nat Biomed Eng* **5**, 815–829 (2021).
402. Zhang, M. *et al.* Biomimetic Human Disease Model of SARS-CoV-2-Induced Lung Injury and Immune Responses on Organ Chip System. *Adv Sci (Weinh)* **8**, 2002928 (2020).

403. Park, J. Y. *et al.* Development of a functional airway-on-a-chip by 3D cell printing. *Biofabrication* **11**, 015002 (2018).
404. Durbin, R. K., Kolenko, S. V. & Durbin, J. E. Interferon Induction and Function at the Mucosal Surface. *Immunol Rev* **255**, 25–39 (2013).
405. Wu, W. & Metcalf, J. P. The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *JIN* **12**, 437–447 (2020).
406. Gilbert, C. *et al.* Age-Related Expression of IFN- $\lambda$ 1 Versus IFN-I and Beta-Defensins in the Nasopharynx of SARS-CoV-2-Infected Individuals. *Frontiers in Immunology* **12**, 4776 (2021).
407. Isaacs, A., Lindenmann, J. & Andrewes, C. H. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **147**, 258–267 (1957).
408. Alspach, E., Lussier, D. M. & Schreiber, R. D. Interferon  $\gamma$  and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**, (2019).
409. Kolenko, S. V. *et al.* IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* **4**, 69–77 (2003).
410. Sheppard, P. *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* **4**, 63–68 (2003).
411. Zhou, J. *et al.* Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cellular Physiology and Biochemistry* **51**, 173–185 (2018).
412. Hemann, E. A., Gale, M. & Savan, R. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. *Front Immunol* **8**, (2017).
413. Ge, D. *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401 (2009).
414. Suppiah, V. *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* **41**, 1100–1104 (2009).

415. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nature Genetics* **45**, 164–171 (2013).
416. Fang, M. Z., Jackson, S. S. & O'Brien, T. R. IFNL4: Notable variants and associated phenotypes. *Gene* **730**, 144289 (2020).
417. Terczyńska-Dyła, E. *et al.* Reduced IFN $\lambda$ 4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun* **5**, 5699 (2014).
418. Bamford, C. G. G. *et al.* A polymorphic residue that attenuates the antiviral potential of interferon lambda 4 in hominid lineages. *PLoS Pathog* **14**, (2018).
419. Ye, L., Schnepf, D. & Staeheli, P. Interferon- $\lambda$  orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* (2019) doi:10.1038/s41577-019-0182-z.
420. Andreakos, E., Zanoni, I. & Galani, I. E. Lambda interferons come to light: dual function cytokines mediating antiviral immunity and damage control. *Current Opinion in Immunology* **56**, 67–75 (2019).
421. Egli, A., Santer, D. M., O'Shea, D., Tyrrell, D. L. & Houghton, M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg Microbes Infect* **3**, e51 (2014).
422. Odendall, C. & Kagan, J. C. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. *Curr Opin Virol* **12**, 47–52 (2015).
423. Levy, D. E., Marié, I. J. & Durbin, J. E. Induction and Function of Type I and III Interferon in Response to Viral Infection. *Curr Opin Virol* **1**, 476–486 (2011).
424. Zhang, X. *et al.* Ku70 Is a Novel Cytosolic DNA Sensor that Induces Type-III Rather than Type-I IFN. *J Immunol* **186**, 4541–4545 (2011).
425. Denney, L. & Ho, L.-P. The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomed J* **41**, 218–233 (2018).

426. Siegel, R., Eskdale, J. & Gallagher, G. Regulation of IFN- 1 Promoter Activity (IFN- 1/IL-29) in Human Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* **187**, 5636–5644 (2011).
427. Crotta, S. *et al.* Type I and Type III Interferons Drive Redundant Amplification Loops to Induce a Transcriptional Signature in Influenza-Infected Airway Epithelia. *PLoS Pathog* **9**, (2013).
428. Odendall, C. *et al.* Diverse intracellular pathogens activate Type III Interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol* **15**, 717–726 (2014).
429. Broggi, A., Tan, Y., Granucci, F. & Zanoni, I. IFN- $\lambda$  suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat Immunol* **18**, 1084–1093 (2017).
430. Song, M. M. & Shuai, K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* **273**, 35056–35062 (1998).
431. Piganis, R. A. R. *et al.* Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. *J Biol Chem* **286**, 33811–33818 (2011).
432. Liu, B., Chen, S., Guan, Y. & Chen, L. Type III Interferon Induces Distinct SOCS1 Expression Pattern that Contributes to Delayed but Prolonged Activation of Jak/STAT Signaling Pathway: Implications for Treatment Non-Response in HCV Patients. *PLoS One* **10**, e0133800 (2015).
433. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* **32**, 513–545 (2014).
434. Andreakos, E., Salagianni, M., Galani, I. E. & Koltsida, O. Interferon- $\lambda$ s: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis in the Respiratory Tract. *Front Immunol* **8**, (2017).
435. Okabayashi, T. *et al.* Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res* **160**, 360–366 (2011).
436. Jewell, N. A. *et al.* Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol* **84**, 11515–11522 (2010).

437. Opitz, B. *et al.* IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular Microbiology* **9**, 930–938 (2007).
438. Chang, C.-Y., Liu, H. M., Chang, M.-F. & Chang, S. C. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein Suppresses Type I and Type III Interferon Induction by Targeting RIG-I Signaling. *J Virol* **94**, e00099-20 (2020).
439. Thomsen, M. M. *et al.* Defective interferon priming and impaired antiviral responses in a patient with an IRF7 variant and severe influenza. *Med Microbiol Immunol* **208**, 869–876 (2019).
440. Wu, W. *et al.* IRF7 Is Required for the Second Phase Interferon Induction during Influenza Virus Infection in Human Lung Epithelia. *Viruses* **12**, 377 (2020).
441. Yin, X. *et al.* MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* **34**, 108628 (2021).
442. Dixit, E. *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668–681 (2010).
443. Ding, S. & Robek, M. D. Peroxisomal MAVS activates IRF1-mediated IFN- $\lambda$  production. *Nature Immunology* **15**, 700–701 (2014).
444. Khantisitthiporn, O. *et al.* Viperin interacts with PEX19 to mediate peroxisomal augmentation of the innate antiviral response. *Life Sci Alliance* **4**, e202000915 (2021).
445. Wong, C. P. *et al.* Interplay between Zika Virus and Peroxisomes during Infection. *Cells* **8**, E725 (2019).
446. Swider, A., Siegel, R., Eskdale, J. & Gallagher, G. Regulation of interferon lambda-1 (IFNL1/IFN- $\lambda$ 1/IL-29) expression in human colon epithelial cells. *Cytokine* **65**, 17–23 (2014).
447. Salka, K. *et al.* Innate IFN-lambda responses to dsRNA in the human infant airway epithelium and clinical regulatory factors during viral respiratory infections in early life. *Clin Exp Allergy* **50**, 1044–1054 (2020).

448. Roy, S., Roy, D. G., Bhushan, A., Bharatiya, S. & Chinnaswamy, S. Functional genetic variants of the IFN- $\lambda$ 3 (IL28B) gene and transcription factor interactions on its promoter. *Cytokine* **142**, 155491 (2021).
449. Iversen, M. B., Ank, N., Melchjorsen, J. & Paludan, S. R. Expression of Type III Interferon (IFN) in the Vaginal Mucosa Is Mediated Primarily by Dendritic Cells and Displays Stronger Dependence on NF- $\kappa$ B than Type I IFNs. *J Virol* **84**, 4579–4586 (2010).
450. Mordstein, M. *et al.* Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections. *J Virol* **84**, 5670–5677 (2010).
451. Klinkhammer, J. *et al.* IFN- $\lambda$  prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *Elife* **7**, (2018).
452. Galani, I. E. *et al.* Interferon- $\lambda$  Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* **46**, 875-890.e6 (2017).
453. Pervolaraki, K., Guo, C., Albrecht, D., Boulant, S. & Stanifer, M. L. Type-Specific Crosstalk Modulates Interferon Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *J Interferon Cytokine Res* **39**, 650–660 (2019).
454. Forero, A. *et al.* Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity* **51**, 451-464.e6 (2019).
455. Pervolaraki, K. *et al.* Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. *PLoS Pathog* **14**, e1007420 (2018).
456. Zheng, Y. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 299 (2020).
457. Liou, T. G. *et al.* SARS-CoV-2 innate effector associations and viral load in early nasopharyngeal infection. *Physiol Rep* **9**, e14761 (2021).



458. Cheemarla, N. R. *et al.* Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics. *J Exp Med* **218**, e20210583 (2021).
459. Lieberman, N. A. P. *et al.* In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age. *PLoS Biol* **18**, e3000849 (2020).
460. Zhou, S. *et al.* A Neanderthal OAS1 isoform protects individuals of European ancestry against COVID-19 susceptibility and severity. *Nat Med* **27**, 659–667 (2021).
461. Banday, A. R. *et al.* Genetic regulation of OAS1 nonsense-mediated decay underlies association with risk of severe COVID-19. *medRxiv* 2021.07.09.21260221 (2021) doi:10.1101/2021.07.09.21260221.
462. Zeberg, H. & Pääbo, S. A genomic region associated with protection against severe COVID-19 is inherited from Neandertals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, e2026309118 (2021).
463. Horisberger, M. A., Staeheli, P. & Haller, O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1910–1914 (1983).
464. Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J. G. & Haller, O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol* **8**, 4518–4523 (1988).
465. Haller, O. & Kochs, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 79–87 (2011).
466. Fitzgerald, K. A. The Interferon Inducible Gene: Viperin. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 131–135 (2011).
467. Lei, N. *et al.* IFITM3 affects the level of antibody response after influenza vaccination. *Emerg Microbes Infect* **9**, 976–987 (2020).
468. Kummer, S., Avinoam, O. & Kräusslich, H.-G. IFITM3 Clusters on Virus Containing Endosomes and Lysosomes Early in the Influenza A Infection of Human Airway Epithelial Cells. *Viruses* **11**, E548 (2019).
469. Bailey, C. C., Huang, I.-C., Kam, C. & Farzan, M. Ifitm3 Limits the Severity of Acute Influenza in Mice. *PLoS Pathogens* **8**, e1002909 (2012).

470. Kenney, A. D. *et al.* IFITM3 protects the heart during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 18607–18612 (2019).
471. Everitt, A. R. *et al.* IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* **484**, 519–523 (2012).
472. Kristiansen, H. *et al.* Extracellular 2'-5' Oligoadenylate Synthetase Stimulates RNase L-Independent Antiviral Activity: a Novel Mechanism of Virus-Induced Innate Immunity. *J Virol* **84**, 11898–11904 (2010).
473. Wickenhagen, A. *et al.* A prenylated dsRNA sensor protects against severe COVID-19. *Science* **374**, eabj3624 (2021).
474. Marché français. <https://www.leem.org/marche-francais>.
475. Marché mondial. <https://www.leem.org/marche-mondial>.
476. How the pandemic has changed the rules for life sciences deals. [https://www.ey.com/en\\_gl/life-sciences/how-the-pandemic-has-changed-the-rules-for-life-sciences-deals](https://www.ey.com/en_gl/life-sciences/how-the-pandemic-has-changed-the-rules-for-life-sciences-deals).
477. Recherche et développement. <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>.
478. LEEM. Bilan économique des Entreprises du Médicament - Edition 2020.
479. Clinical trials. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/clinical-trials>.
480. Quel est le rôle de la recherche clinique ? <https://www.leem.org/index.php/100-questions/quel-est-le-role-de-la-recherche-clinique>.
481. Procédure AMM et CCP – Sedlex – La procédure française (INPI). *Sedlex* <https://www.sedlex.fr/patents-in-france/la-procedure-amm-et-les-ccp/>.
482. L'INPI fait le point sur le certificat complémentaire de protection (CCP). *INPI.fr* <https://www.inpi.fr/fr/nationales/l-inpi-fait-le-point-sur-le-certificat-complementaire-de-protection-ccp> (2017).
483. DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* **47**, 20–33 (2016).

484. Wong, C. H., Siah, K. W. & Lo, A. W. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* **20**, 273–286 (2019).
485. Reichert, J. M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 695–702 (2003).
486. Commissioner, O. of the. Fast Track, Breakthrough Therapy, Accelerated Approval, Priority Review. *FDA* <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/fast-track-breakthrough-therapy-accelerated-approval-priority-review> (2019).
487. Jin, G. & Wong, S. T. C. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discovery Today* **19**, 637–644 (2014).
488. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 673–683 (2004).
489. Bisgin, H. *et al.* Investigating drug repositioning opportunities in FDA drug labels through topic modeling. *BMC bioinformatics* **13**, S6 (2012).
490. Chaudhari, R., Tan, Z., Huang, B. & Zhang, S. Computational Polypharmacology: a New Paradigm for Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discov* **12**, 279–291 (2017).
491. Liu, X. *et al.* Predicting targeted polypharmacology for drug repositioning and multi-target drug discovery. *Curr Med Chem* **20**, 1646–1661 (2013).
492. Paolini, G. V., Shapland, R. H. B., van Hoorn, W. P., Mason, J. S. & Hopkins, A. L. Global mapping of pharmacological space. *Nat Biotechnol* **24**, 805–815 (2006).
493. Naveja, J. J., Dueñas-González, A. & Medina-Franco, J. L. Chapter 12 - Drug Repurposing for Epigenetic Targets Guided by Computational Methods. in *Epi-Informatics* (ed. Medina-Franco, J. L.) 327–357 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802808-7.00012-5.
494. Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S. & Houghten, R. A. Shifting from the single- to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**, 495–501 (2013).
495. Cha, Y. *et al.* Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British Journal of Pharmacology* **175**, 168–180 (2018).

496. Pushpakom, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 41–58 (2019).
497. Hernandez, J. J. *et al.* Giving Drugs a Second Chance: Overcoming Regulatory and Financial Hurdles in Repurposing Approved Drugs As Cancer Therapeutics. *Front Oncol* **7**, (2017).
498. Innovative Science & Technology. *Signia Therapeutics*  
<https://signiatherapeutics.com/fr/innovative-science-technology/>.
499. Anaxomics Biotech SL - Systems Biology Solutions. <https://www.anaxomics.com/index.php>.
500. Le repositionnement des médicaments à l'heure de la COVID-19.  
[https://www.wipo.int/wipo\\_magazine/fr/2020/02/article\\_0004.html](https://www.wipo.int/wipo_magazine/fr/2020/02/article_0004.html).
501. Rousseau, P. Protéger l'innovation au sein de l'industrie pharmaceutique : quelles marges de manœuvre ? Point de vue d'un praticien. *Cahiers Droit, Sciences & Technologies* 327–335 (2010)  
doi:10.4000/cdst.265.
502. Cipolla, D. C. & Gonda, I. Formulation technology to repurpose drugs for inhalation delivery. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **8**, 123–130 (2011).
503. Pollastri, M. P. & Campbell, R. K. Target repurposing for neglected diseases. *Future Medicinal Chemistry* **3**, 1307–1315 (2011).
504. CHARLTON, R. L., ROSSI-BERGMANN, B., DENNY, P. W. & STEEL, P. G. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology* **145**, 219–236 (2018).
505. Pandey, R. P. *et al.* New Approaches for the Treatment of Chagas Disease. *Curr Drug Targets* **22**, 835–841 (2021).
506. Veljkovic, V. *et al.* Virtual screen for repurposing approved and experimental drugs for candidate inhibitors of EBOLA virus infection. *F1000Res* **4**, (2015).
507. Uebelhoer, L. S. *et al.* High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses. *Antiviral Research* **106**, 86–94 (2014).
508. Johansen, L. M. *et al.* FDA-Approved Selective Estrogen Receptor Modulators Inhibit Ebola Virus Infection. *Science Translational Medicine* **5**, 190ra79-190ra79 (2013).

509. Mohanty, S., Harun Ai Rashid, M., Mridul, M., Mohanty, C. & Swayamsiddha, S. Application of Artificial Intelligence in COVID-19 drug repurposing. *Diabetes Metab Syndr* **14**, 1027–1031 (2020).
510. Pinzi, L., Tinivella, A., Caporuscio, F. & Rastelli, G. Drug Repurposing and Polypharmacology to Fight SARS-CoV-2 Through Inhibition of the Main Protease. *Front Pharmacol* **12**, 636989 (2021).
511. Singh, T. U. *et al.* Drug repurposing approach to fight COVID-19. *Pharmacol Rep* **72**, 1479–1508 (2020).
512. Ghofrani, H. A., Osterloh, I. H. & Grimminger, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 689–702 (2006).
513. LEEM. *Dossier de presse : Contrefaçon de médicaments, une atteinte à la santé publique.* <https://www.leem.org/presse/lutter-contre-les-faux-medicaments-une-urgence-pour-la-sante-publique-mondiale-0> (2017).
514. Papaseit, E., García-Algar, O. & Farré, M. Talidomida: una historia inacabada. *Anales de Pediatría* **78**, 283–287 (2013).
515. ATU/RTU - THALIDOMIDE CELGENE 50 mg, gélule - ANSM. <https://ansm.sante.fr/tableau-atu-rtu/thalidomide-celgene-50-mg-gelule>.
516. Holmes, A., McMenemy, M., Mulcahy, F. & Bergin, C. Thalidomide Therapy for the Treatment of Hypertrophic Herpes Simplex Virus--Related Genitalis in HIV-Infected Individuals. *Clinical Infectious Diseases* **44**, e96–e99 (2007).
517. Aronson, J. K. Old drugs – new uses. *British Journal of Clinical Pharmacology* **64**, 563–565 (2007).
518. Delahaye-Duriez, A., Réda, C. & Gressens, P. Identification de cibles thérapeutiques et repositionnement de médicaments par analyses de réseaux géniques. *Med Sci (Paris)* **35**, 515–518 (2019).
519. Hopkins, A. L. Predicting promiscuity. *Nature* **462**, 167–168 (2009).
520. Tan, W. Y. T., Young, B. E., Lye, D. C., Chew, D. E. K. & Dalan, R. Statin use is associated with lower disease severity in COVID-19 infection. *Sci Rep* **10**, 17458 (2020).

521. Statin Therapy in Acute Influenza - Study Results - ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02056340>.
522. Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. Système rénine-angiotensine-aldostérone et infections à COVID-19. (2020).
523. Kuba, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* **11**, 875–879 (2005).
524. Rothlin, R. P., Vetulli, H. M., Duarte, M. & Pelorosso, F. G. Telmisartan as tentative angiotensin receptor blocker therapeutic for COVID-19. *Drug Dev Res* **81**, 768–770 (2020).
525. FDA Orange Book - Databases A-Z - SWOSU Library. <https://library.swosu.edu/db/fda-orange-book.html>.
526. Jones, L. H. & Bunnage, M. E. Applications of chemogenomic library screening in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 285–296 (2017).
527. Yamamoto, M. *et al.* Identification of Nafamostat as a Potent Inhibitor of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein-Mediated Membrane Fusion Using the Split-Protein-Based Cell-Cell Fusion Assay. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 6532–6539 (2016).
528. Cao, J., Forrest, J. C. & Zhang, X. A screen of the NIH Clinical Collection small molecule library identifies potential anti-coronavirus drugs. *Antiviral Research* **114**, 1–10 (2015).
529. Gordon, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 Protein Interaction Map Reveals Targets for Drug-Repurposing. *Nature* **583**, 459–468 (2020).
530. Durdagi, S. *et al.* Near-physiological-temperature serial crystallography reveals conformations of SARS-CoV-2 main protease active site for improved drug repurposing. *Structure* **29**, 1382-1396.e6 (2021).
531. X-ray crystallography identifies drugs to be repurposed for COVID-19. *Scienceboard.net*  
<https://www.scienceboard.net/index.aspx?sec=ser&sub=def&pag=dis&ItemID=2439>.

532. Lamballerie, C. N. de. Analyse et exploitation de signatures transcriptomiques de patients infectés par des virus respiratoires en vue du repositionnement de médicaments pour de nouvelles indications thérapeutiques antivirales. (Université de Lyon, 2020).
533. Lengauer, T., Lemmen, C., Rarey, M. & Zimmermann, M. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discov Today* **9**, 27–34 (2004).
534. von Eichborn, J. *et al.* PROMISCUOUS: a database for network-based drug-repositioning. *Nucleic Acids Research* **39**, D1060–D1066 (2011).
535. Subramanian, I., Verma, S., Kumar, S., Jere, A. & Anamika, K. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinform Biol Insights* **14**, 1177932219899051 (2020).
536. Pinzi, L. & Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* **20**, 4331 (2019).
537. Rognan, D. Criblage virtuel par docking moléculaire.
538. Schweiker, S. S. A practical guide to molecular docking and homology modelling for medicinal chemists.
539. Bank, R. P. D. PDB Statistics: Growth of Structures from X-ray Crystallography Experiments Released per Year. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-xray>.
540. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res* **46**, D1074–D1082 (2018).
541. Lejal, N. *et al.* Structure-Based Discovery of the Novel Antiviral Properties of Naproxen against the Nucleoprotein of Influenza A Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 2231–2242 (2013).
542. Jin, Z. *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289–293 (2020).
543. Ray, A. K. *et al.* Repurposing of FDA-approved drugs as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease: Molecular insights into improved therapeutic discovery. *Comput Biol Med* **142**, 105183 (2022).

544. Chambers, D. C., Carew, A. M., Lukowski, S. W. & Powell, J. E. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology* **24**, 29–36 (2019).
545. Lamb, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nature Reviews Cancer* **7**, 54–60 (2007).
546. Connectivity Map (CMAP). *Broad Institute* <https://www.broadinstitute.org/connectivity-map-cmap> (2015).
547. Qu, X. A. & Rajpal, D. K. Applications of Connectivity Map in drug discovery and development. *Drug Discovery Today* **17**, 1289–1298 (2012).
548. Chen, F. *et al.* A systems-level study reveals host-targeted repurposable drugs against SARS-CoV-2 infection. *Mol Syst Biol* **17**, e10239 (2021).
549. Haffizulla, J. *et al.* Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis* **14**, 609–618 (2014).
550. Scheuch, G. *et al.* Targeting intracellular signaling as an antiviral strategy: aerosolized LASAG for the treatment of influenza in hospitalized patients. *Emerg Microbes Infect* **7**, 21 (2018).
551. Hung, D. I. F. *A Randomized Controlled Trial on the Treatment of Severe Influenza A Infection*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02108366> (2019).
552. Hung, I. F.-N., To, K. K. W., Chan, J., Chan, K.-H. & Yuen, K.-Y. O0815 Treatment of severe influenza A infection with celecoxib: a double-blind, randomised, controlled trial. in 2.
553. Hung, I. F. *et al.* Efficacy of clarithromycin-naproxen-oseltamivir combination in the treatment of patients hospitalized for influenza A (H3N2) infection: an open-label randomized, controlled, phase IIb/III trial. *Chest* **151**, 1069–1080 (2017).
554. Mackay Memorial Hospital. *Efficacy of Clarithromycin-Naproxen-Oseltamivir Combination Therapy vs. Oseltamivir Alone for Hospitalised Paediatric Influenza Patients*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04315194> (2020).



555. Lee, C.-W. *et al.* Efficacy of clarithromycin-naproxen-oseltamivir combination therapy versus oseltamivir alone in hospitalized pediatric influenza patients. *J Microbiol Immunol Infect* **54**, 876–884 (2021).
556. Hospices Civils de Lyon. *Confirmation of the Antiviral Effects of Midodrine Identified With a Gene Expression Signature-based Screening of Influenza A Virus Infected Cells.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01546506> (2015).
557. University Hospital, Lille. *Validation of the Efficiency of Molecules Reproposed on the Basis of Their Cellular Transcriptomic Signature, Antagonist of the Signature Determined in Infection Due to Virus Influenza A.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03212716> (2020).
558. Jialal, I., Miguelino, E., Griffen, S. C. & Devaraj, S. Concomitant reduction of low-density lipoprotein-cholesterol and biomarkers of inflammation with low-dose simvastatin therapy in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3136–3140 (2007).
559. MEHRBOD, P. *et al.* Simvastatin modulates cellular components in influenza A virus-infected cells. *Int J Mol Med* **34**, 61–73 (2014).
560. Almog, Y. *et al.* Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation* **110**, 880–885 (2004).
561. Brett, S. J. *et al.* Pre-admission statin use and in-hospital severity of 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLoS One* **6**, e18120 (2011).
562. Kwong, J. C., Li, P. & Redelmeier, D. A. Influenza morbidity and mortality in elderly patients receiving statins: a cohort study. *PLoS One* **4**, e8087 (2009).
563. Tsai, L.-W. *et al.* Statin Use and Influenza Vaccine Effectiveness in Persons >65 Years of Age, Taiwan. *Emerg Infect Dis* **26**, (2020).
564. Rossignol, J. F., La Frazia, S., Chiappa, L., Ciucci, A. & Santoro, M. G. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem* **284**, 29798–29808 (2009).

565. Tilmanis, D., van Baalen, C., Oh, D. Y., Rossignol, J.-F. & Hurt, A. C. The susceptibility of circulating human influenza viruses to tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide. *Antiviral Research* **147**, 142–148 (2017).
566. Droebner, K. *et al.* Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of BAY 81-8781, a Novel NF- $\kappa$ B Inhibiting Anti-influenza Drug. *Front Microbiol* **8**, 2130 (2017).
567. Carey, M. A. *et al.* Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza A viral infection in mice. *PLoS One* **5**, e11610 (2010).
568. Zheng, W. *et al.* Naproxen Exhibits Broad Anti-influenza Virus Activity in Mice by Impeding Viral Nucleoprotein Nuclear Export. *Cell Rep* **27**, 1875-1885.e5 (2019).
569. Dilly, S. *et al.* From Naproxen Repurposing to Naproxen Analogues and Their Antiviral Activity against Influenza A Virus. *J. Med. Chem.* **61**, 7202–7217 (2018).
570. Tarus, B. *et al.* Structure-based design of novel naproxen derivatives targeting monomeric nucleoprotein of Influenza A virus. *J Biomol Struct Dyn* **33**, 1899–1912 (2015).
571. Siddiqui, A. J. *et al.* Current status and strategic possibilities on potential use of combinational drug therapy against COVID-19 caused by SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn* 1–14 doi:10.1080/07391102.2020.1802345.
572. Han, F. *et al.* Current treatment strategies for COVID-19. *Mol Med Rep* **24**, 858 (2021).
573. Gordon, C. J. *et al.* Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *J Biol Chem* **295**, 6785–6797 (2020).
574. Vicenti, I., Zazzi, M. & Saladini, F. SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a therapeutic target for COVID-19. *Expert Opin Ther Pat* **31**, 325–337 (2021).
575. Warren, T. K. *et al.* Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature* **531**, 381–385 (2016).

576. Agostini, M. L. *et al.* Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *mBio* **9**, e00221-18 (2018).
577. Lo, M. K. *et al.* GS-5734 and its parent nucleoside analog inhibit Filo-, Pneumo-, and Paramyxoviruses. *Sci Rep* **7**, 43395 (2017).
578. Stuyver, L. J. *et al.* Ribonucleoside Analogue That Blocks Replication of Bovine Viral Diarrhea and Hepatitis C Viruses in Culture. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 244–254 (2003).
579. Sheahan, T. P. *et al.* Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci Transl Med* **9**, eaal3653 (2017).
580. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* **30**, 269–271 (2020).
581. Goldman, J. D. *et al.* Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 1827–1837 (2020).
582. WHO Solidarity Trial Consortium *et al.* Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med* **384**, 497–511 (2021).
583. Ansems, K. *et al.* Remdesivir for the treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev* **8**, CD014962 (2021).
584. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). *A Multicenter, Adaptive, Randomized Blinded Controlled Trial of the Safety and Efficacy of Investigational Therapeutics for the Treatment of COVID-19 in Hospitalized Adults.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04280705> (2020).
585. Spinner, C. D. *et al.* Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **324**, 1048–1057 (2020).
586. Yan, V. C. & Muller, F. L. Why Remdesivir Failed: Preclinical Assumptions Overestimate the Clinical Efficacy of Remdesivir for COVID-19 and Ebola. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, e01117-21.

587. de Wit, E. *et al.* Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 6771–6776 (2020).
588. Jorgensen, S. C., Kebriaei, R. & Dresser, L. D. Remdesivir: Review of pharmacology, pre-clinical data and emerging clinical experience for COVID-19. *Pharmacotherapy* 10.1002/phar.2429 (2020) doi:10.1002/phar.2429.
589. Commissioner, O. of the. FDA Approves First Treatment for COVID-19. *FDA* <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19> (2020).
590. Gilead Sciences. *A Phase 2/3 Single-Arm, Open-Label Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Efficacy of Remdesivir (GS-5734™) in Participants From Birth to < 18 Years of Age With COVID-19*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04431453> (2021).
591. Hernandez-Santiago, B. I., Beltran, T., Stuyver, L., Chu, C. K. & Schinazi, R. F. Metabolism of the anti-hepatitis C virus nucleoside beta-D-N4-hydroxycytidine in different liver cells. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4636–4642 (2004).
592. Agostini, M. L. *et al.* Small-Molecule Antiviral  $\beta$ -d-N 4-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *J Virol* **93**, e01348-19 (2019).
593. Toots, M. *et al.* Characterization of orally efficacious influenza drug with high resistance barrier in ferrets and human airway epithelia. *Sci Transl Med* **11**, eaax5866 (2019).
594. Ehteshami, M. *et al.* Characterization of  $\beta$ -d-N4-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e02395-16 (2017).
595. Yoon, J.-J. *et al.* Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, e00766-18 (2018).
596. Urakova, N. *et al.*  $\beta$ -d-N 4-Hydroxycytidine Is a Potent Anti-alphavirus Compound That Induces a High Level of Mutations in the Viral Genome. *J Virol* **92**, e01965-17 (2018).
597. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Schinazi, R. F. & Götte, M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *J Biol Chem* **297**, 100770 (2021).

598. Smith, E. C., Blanc, H., Surdel, M. C., Vignuzzi, M. & Denison, M. R. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog* **9**, e1003565 (2013).
599. Cox, R. M., Wolf, J. D. & Plemper, R. K. Therapeutically Administered Ribonucleoside Analogue MK-4482/EIDD-2801 Blocks SARS-CoV-2 Transmission in Ferrets. *Nat Microbiol* **6**, 11–18 (2021).
600. Jayk Bernal, A. *et al.* Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2116044.
601. Merck Sharp & Dohme Corp. *A Phase 2/3, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of MK-4482 in Non-Hospitalized Adults With COVID-19.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04575597> (2021).
602. Merck and Ridgeback Announce Submission of Emergency Use Authorization Application to the U.S. FDA for Molnupiravir, an Investigational Oral Antiviral Medicine, for the Treatment of Mild-to-Moderate COVID-19 in At Risk Adults. *Merck.com* <https://www.merck.com/news/merck-and-ridgeback-announce-submission-of-emergency-use-authorization-application-to-the-u-s-fda-for-molnupiravir-an-investigational-oral-antiviral-medicine-for-the-treatment-of-mild-to-moderate-c/>.
603. Zhou, S. *et al.*  $\beta$ -d-N4-hydroxycytidine Inhibits SARS-CoV-2 Through Lethal Mutagenesis But Is Also Mutagenic To Mammalian Cells. *J Infect Dis* **224**, 415–419 (2021).
604. Baranovich, T. *et al.* T-705 (Favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses In Vitro. *J Virol* **87**, 3741–3751 (2013).
605. Crotty, S., Cameron, C. E. & Andino, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6895–6900 (2001).
606. Te, H. S., Randall, G. & Jensen, D. M. Mechanism of Action of Ribavirin in the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **3**, 218–225 (2007).
607. Ghasemnejad-Berenji, M. & Pashapour, S. Favipiravir and COVID-19: A Simplified Summary. *Drug Res (Stuttg)* **71**, 166–170 (2021).

608. Udhwadia, Z. F. *et al.* Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *Int J Infect Dis* **103**, 62–71 (2021).
609. Cai, Q. *et al.* Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering (Beijing)* **6**, 1192–1198 (2020).
610. Srinivasan, K. & Rao, M. Understanding the clinical utility of favipiravir (T-705) in coronavirus disease of 2019: a review. *Ther Adv Infect Dis* **8**, 20499361211063016 (2021).
611. Elfiky, A. A. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci* **248**, 117477 (2020).
612. Nourian, A. & Khalili, H. Sofosbuvir as a potential option for the treatment of COVID-19. *Acta Biomed* **91**, 239–241 (2020).
613. Eslami, G. *et al.* The impact of sofosbuvir/daclatasvir or ribavirin in patients with severe COVID-19. *J Antimicrob Chemother* **75**, 3366–3372 (2020).
614. Simmons, B. *et al.* Sofosbuvir/daclatasvir regimens for the treatment of COVID-19: an individual patient data meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **76**, 286–291 (2021).
615. Sadeghi, A. *et al.* Sofosbuvir and daclatasvir compared with standard of care in the treatment of patients admitted to hospital with moderate or severe coronavirus infection (COVID-19): a randomized controlled trial. *J Antimicrob Chemother* **75**, 3379–3385 (2020).
616. Ortega, J. T., Serrano, M. L., Pujol, F. H. & Rangel, H. R. Unrevealing sequence and structural features of novel coronavirus using in silico approaches: The main protease as molecular target. *EXCLI J* **19**, 400–409 (2020).
617. Savarino, A. Expanding the frontiers of existing antiviral drugs: Possible effects of HIV-1 protease inhibitors against SARS and avian influenza. *J Clin Virol* **34**, 170–178 (2005).
618. Sheahan, T. P. *et al.* Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat Commun* **11**, 222 (2020).

619. RECOVERY Collaborative Group. Lopinavir-ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **396**, 1345–1352 (2020).
620. Cao, B. *et al.* A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med* **382**, 1787–1799 (2020).
621. Essam, A. *Comparative Therapeutic Efficacy and Safety of Remdesivir Versus Lopinavir/Ritonavir and Remdesivir Combination in COVID-19 Patients.*  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04738045> (2021).
622. Reis, G. *Hydroxychloroquine and Lopinavir/ Ritonavir for Hospitalization and Mortality Reduction in Patients With COVID-19 and Mild Disease Symptoms: ‘The Hope Coalition’.*  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04403100> (2021).
623. De Meyer, S. *et al.* Lack of antiviral activity of darunavir against SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis* **97**, 7–10 (2020).
624. Chen, J. *et al.* Antiviral Activity and Safety of Darunavir/Cobicistat for the Treatment of COVID-19. *Open Forum Infect Dis* **7**, ofaa241 (2020).
625. Di Castelnuovo, A. *et al.* Lopinavir/Ritonavir and Darunavir/Cobicistat in Hospitalized COVID-19 Patients: Findings From the Multicenter Italian CORIST Study. *Front Med (Lausanne)* **8**, 639970 (2021).
626. Khamitov, R. A. *et al.* [Antiviral activity of arbidol and its derivatives against the pathogen of severe acute respiratory syndrome in the cell cultures]. *Vopr Virusol* **53**, 9–13 (2008).
627. Wang, X. *et al.* The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov* **6**, 28 (2020).
628. Padhi, A. K., Seal, A., Khan, J. M., Ahamed, M. & Tripathi, T. Unraveling the mechanism of arbidol binding and inhibition of SARS-CoV-2: Insights from atomistic simulations. *Eur J Pharmacol* **894**, 173836 (2021).

629. Nojomi, M. *et al.* Effect of Arbidol (Umifenovir) on COVID-19: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis* **20**, 954 (2020).
630. Amani, B., Amani, B., Zareei, S. & Zareei, M. Efficacy and safety of arbidol (umifenovir) in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Immun Inflamm Dis* **9**, 1197–1208 (2021).
631. Huang, D. *et al.* Efficacy and safety of umifenovir for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* **93**, 481–490 (2021).
632. Zhu, Z. *et al.* Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J Infect* **81**, e21–e23 (2020).
633. Al-Bari, Md. A. A. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol Res Perspect* **5**, e00293 (2017).
634. Vincent, M. J. *et al.* Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology* **2**, 69 (2005).
635. Fantini, J., Di Scala, C., Chahinian, H. & Yahy, N. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection. *Int J Antimicrob Agents* **55**, 105960 (2020).
636. Aherfi, S. *et al.* Drug repurposing against SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MERS-CoV. *Future Microbiol* 10.2217/fmb-2021-0019 doi:10.2217/fmb-2021-0019.
637. Liu, J. *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* **6**, 16 (2020).
638. RECOVERY Collaborative Group *et al.* Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 2030–2040 (2020).
639. Maisonnasse, P. *et al.* Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates. *Nature* **585**, 584–587 (2020).
640. Elavarasi, A. *et al.* Chloroquine and Hydroxychloroquine for the Treatment of COVID-19: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gen Intern Med* **35**, 3308–3314 (2020).



641. Chen, P., Jhou, H., Ou-Yang, L. & Lee, C. Does hydroxychloroquine reduce mortality in patients with COVID-19? A meta-analysis with trial sequential analysis. *Int J Clin Pract* **75**, e14448 (2021).
642. Fiolet, T. *et al.* Effect of hydroxychloroquine with or without azithromycin on the mortality of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* **27**, 19–27 (2021).
643. Boulware, D. R. *et al.* A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 517–525 (2020).
644. Lewis, K. *et al.* The efficacy and safety of hydroxychloroquine for COVID-19 prophylaxis: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *PLoS One* **16**, e0244778 (2021).
645. Hoffmann, M. *et al.* Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, e00754-20 (2020).
646. Yamamoto, M. *et al.* The Anticoagulant Nafamostat Potently Inhibits SARS-CoV-2 S Protein-Mediated Fusion in a Cell Fusion Assay System and Viral Infection In Vitro in a Cell-Type-Dependent Manner. *Viruses* **12**, E629 (2020).
647. Sonawane, K. D. *et al.* Structural insights and inhibition mechanism of TMPRSS2 by experimentally known inhibitors Camostat mesylate, Nafamostat and Bromhexine hydrochloride to control SARS-coronavirus-2: A molecular modeling approach. *Inform Med Unlocked* **24**, 100597 (2021).
648. Li, K., Meyerholz, D. K., Bartlett, J. A. & McCray, P. B. The TMPRSS2 Inhibitor Nafamostat Reduces SARS-CoV-2 Pulmonary Infection in Mouse Models of COVID-19. *mBio* **12**, e0097021 (2021).
649. Zhuravel, S. V. *et al.* Nafamostat in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19 pneumonia: a randomised Phase II clinical trial. *EClinicalMedicine* **41**, 101169 (2021).
650. Riccio, A. *et al.* Impairment of SARS-CoV-2 spike glycoprotein maturation and fusion activity by the broad-spectrum anti-infective drug nitazoxanide. 2021.04.12.439201

doi:10.1101/2021.04.12.439201.

651. Rocco, P. R. M. *et al.* Early use of nitazoxanide in mild COVID-19 disease: randomised, placebo-controlled trial. *Eur Respir J* **58**, 2003725 (2021).
652. Sajid, M. S., Iqbal, Z., Muhammad, G. & Iqbal, M. U. Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology* **132**, 301–313 (2006).
653. Götz, V. *et al.* Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import. *Sci Rep* **6**, 23138 (2016).
654. Wagstaff, K. M., Rawlinson, S. M., Hearps, A. C. & Jans, D. A. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *J Biomol Screen* **16**, 192–200 (2011).
655. Kaur, H. *et al.* Ivermectin as a potential drug for treatment of COVID-19: an in-sync review with clinical and computational attributes. *Pharmacol Rep* 1–14 (2021) doi:10.1007/s43440-020-00195-y.
656. Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A. & Wagstaff, K. M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* **178**, 104787 (2020).
657. Prophylactic Ivermectin in COVID-19 Contacts - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04422561>.
658. Zein, A. F. M. Z., Sulistiyana, C. S., Raffaello, W. M. & Pranata, R. Ivermectin and mortality in patients with COVID-19: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Syndr* **15**, 102186 (2021).
659. Roman, Y. M. *et al.* Ivermectin for the treatment of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* ciab591 (2021) doi:10.1093/cid/ciab591.
660. Mahmud, R. *et al.* Ivermectin in combination with doxycycline for treating COVID-19 symptoms: a randomized trial. *J Int Med Res* **49**, 3000605211013550 (2021).

661. Yan, X. *et al.* Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates the expression of cyclooxygenase-2 by binding directly to regulatory elements for nuclear factor-kappa B and CCAAT/enhancer binding protein. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1417–1428 (2006).
662. Terrier, O. *et al.* Antiviral Properties of the NSAID Drug Naproxen Targeting the Nucleoprotein of SARS-CoV-2 Coronavirus. *Molecules* **26**, 2593 (2021).
663. IRCT | The effect of naproxen on the healing process of patients with COVID-19. <https://en.irct.ir/trial/46718>.
664. Asadi, M. *et al.* Efficacy of naproxen in the management of patients hospitalized with COVID-19 infection: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Diabetes Metab Syndr* **15**, 102319 (2021).
665. Clinical Trials Register. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2020-001301-23/FR>.
666. Hakeam, H. A. *et al.* Association of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Blockers With Severity of COVID-19: A Multicenter, Prospective Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **26**, 244–252 (2021).
667. Duarte, M. *et al.* Telmisartan for treatment of Covid-19 patients: An open multicenter randomized clinical trial. *EClinicalMedicine* **37**, 100962 (2021).
668. Tikoo, K. *et al.* Tissue specific up regulation of ACE2 in rabbit model of atherosclerosis by atorvastatin: role of epigenetic histone modifications. *Biochem Pharmacol* **93**, 343–351 (2015).
669. Shin, Y. H. *et al.* The effect of fluvastatin on cardiac fibrosis and angiotensin-converting enzyme-2 expression in glucose-controlled diabetic rat hearts. *Heart Vessels* **32**, 618–627 (2017).
670. Memel, Z. N. *et al.* Association of Statins and 28-Day Mortality Rates in Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Infect Dis* **225**, 19–29 (2021).
671. Vahedian-Azimi, A. *et al.* Improved COVID-19 ICU admission and mortality outcomes following treatment with statins: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci* **17**, 579–595 (2021).

672. Surma, S., Banach, M. & Lewek, J. COVID-19 and lipids. The role of lipid disorders and statin use in the prognosis of patients with SARS-CoV-2 infection. *Lipids Health Dis* **20**, 141 (2021).
673. Kollias, A. *et al.* Statin use and mortality in COVID-19 patients: Updated systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* **330**, 114–121 (2021).
674. Lu, Y., Liu, D. X. & Tam, J. P. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 344–349 (2008).
675. Rizk, J. G. *et al.* Pharmaco-Immunomodulatory Therapy in COVID-19. *Drugs* 1–26 (2020) doi:10.1007/s40265-020-01367-z.
676. Al Sulaiman, K. *et al.* The Role of Inhaled Corticosteroids (ICS) in Critically Ill Patients With COVID-19: A Multicenter, Cohort Study. *J Intensive Care Med* **37**, 248–257 (2022).
677. Cortegiani, A. *et al.* Rationale and evidence on the use of tocilizumab in COVID-19: a systematic review. *Pulmonology* **27**, 52–66 (2021).
678. Novartis Pharmaceuticals. *Phase 3 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Multi-center Study to Assess the Efficacy and Safety of Ruxolitinib in Patients With COVID-19 Associated Cytokine Storm (RUXCOVID)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04362137> (2021).
679. Gaspari, V., Zengarini, C., Greco, S., Vangeli, V. & Mastroianni, A. Side effects of ruxolitinib in patients with SARS-CoV-2 infection: Two case reports. *International Journal of Antimicrobial Agents* **56**, 106023 (2020).
680. Richardson, P. *et al.* Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet* **395**, e30–e31 (2020).
681. Kalil, A. C. *et al.* Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 795–807 (2021).
682. Echeverría-Esnal, D. *et al.* Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther* **19**, 147–163 (2021).
683. Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y. & Boivin, G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* **98**, 174–185 (2013).

684. Iskar, M. *et al.* Drug-Induced Regulation of Target Expression. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000925 (2010).
685. Josset, L. *et al.* Gene Expression Signature-Based Screening Identifies New Broadly Effective Influenza A Antivirals. *PLoS ONE* **5**, e13169 (2010).
686. Ehrhardt, C. *et al.* Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect.* **12**, 81–87 (2010).
687. Alonso, F. V. & Compans, R. W. Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J Cell Biol* **89**, 700–705 (1981).
688. Durr, F. E. & Lindh, H. F. Efficacy of ribavirin against influenza virus in tissue culture and in mice. *Ann N Y Acad Sci* **255**, 366–371 (1975).
689. Liao, S.-H. *et al.* Ribavirin attenuates the respiratory immune responses to influenza viral infection in mice. *Arch Virol* **162**, 1661–1669 (2017).
690. Rowe, T. *et al.* In vivo ribavirin activity against severe pandemic H1N1 Influenza A/Mexico/4108/2009. *J Gen Virol* **91**, 2898–2906 (2010).
691. Pushpakom, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 41–58 (2019).
692. Fujioka, Y. *et al.* A Sialylated Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host & Microbe* **23**, 809-818.e5 (2018).
693. Zhou, Y., Pu, J. & Wu, Y. The Role of Lipid Metabolism in Influenza A Virus Infection. *Pathogens* **10**, 303 (2021).
694. Rosa-Calatrava, M., Terrier, O., Nicolas, D. L. C., Boivin, G. & Pizzorno, M. A. Diltiazem for Use in the Treatment of Microbial Infections. (2021).
695. Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27–55 (1984).
696. Chou, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**, 621–681 (2006).

697. Wray, S. K., Gilbert, B. E., Noall, M. W. & Knight, V. Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* **5**, 29–37 (1985).
698. Beigel, J. H. *et al.* A Randomized Double-Blind Phase 2 Study of Combination Antivirals for the Treatment of Influenza. *Lancet Infect Dis* **17**, 1255–1265 (2017).
699. Yin, N. *et al.* Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One* **9**, e93960 (2014).
700. Tallarida, R. J. & Raffa, R. B. The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacol Ther* **127**, 165–174 (2010).
701. Analysis of Drug Interactions - Springer. in (ed. Cree, I. A.) (Humana Press, 2011).
702. Di Veroli, G. Y. *et al.* Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* **32**, 2866–2868 (2016).
703. Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T. & Tang, J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput Struct Biotechnol J* **13**, 504–513 (2015).
704. Park, S. *et al.* Combination effects of peramivir and favipiravir against oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A(H1N1) infection in mice. *PLoS One* **9**, e101325 (2014).
705. Ormond, L. *et al.* The Combined Effect of Oseltamivir and Favipiravir on Influenza A Virus Evolution. *Genome Biol Evol* **9**, 1913–1924 (2017).
706. Baz, M., Carbonneau, J., Rhéaume, C., Cavanagh, M.-H. & Boivin, G. Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus. *Viruses* **10**, E610 (2018).
707. Choy, K.-T. *et al.* Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res* **178**, 104786 (2020).

708. Cao, B. *A Phase 3 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Remdesivir in Hospitalized Adult Patients With Severe COVID-19.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04257656> (2020).
709. Pizzorno, A. *et al.* Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
710. Marin, B. G. *et al.* Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev Med Virol* **31**, 1–10 (2021).
711. Coomes, E. A. & Haghbayan, H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* e2141 (2020) doi:10.1002/rmv.2141.
712. Yang, Y. *et al.* Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 119-127.e4 (2020).
713. Paces, J., Strizova, Z., Smrz, D. & Cerny, J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res* **69**, 379–388 (2020).
714. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Bhattacharya, M. & Lee, S. S. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **24**, 4016–4026 (2020).
715. McKee, D. L., Sternberg, A., Stange, U., Laufer, S. & Naujokat, C. Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. *Pharmacol Res* **157**, 104859 (2020).
716. Pruijssers, A. J. *et al.* Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Rep* **32**, 107940 (2020).
717. Wang, Y. *et al.* Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* **395**, 1569–1578 (2020).
718. Siegel, D. *et al.* Discovery and Synthesis of a Phosphoramidate Prodrug of a Pyrrolo[2,1-f][triazin-4-amino] Adenine C-Nucleoside (GS-5734) for the Treatment of Ebola and Emerging Viruses. *J. Med. Chem.* **60**, 1648–1661 (2017).

719. Pizzorno, A. *et al.* In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2. *Antiviral Res* **181**, 104878 (2020).
720. Takashita, E. *et al.* Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol* **9**, 3026 (2018).
721. Lee, J. S. *et al.* Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. *Sci Immunol* **5**, eabd1554 (2020).
722. Hemann, E. A. *et al.* Interferon- $\lambda$  modulates dendritic cells to facilitate T cell immunity during infection with influenza A virus. *Nat Immunol* **20**, 1035–1045 (2019).
723. Ye, L. *et al.* Interferon- $\lambda$  enhances adaptive mucosal immunity by boosting release of thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* **20**, 593–601 (2019).
724. Interféron alfa : substance active à effet thérapeutique. VIDAL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/interferon-alfa-10737.html>.
725. Wang, H.-Q. *et al.* [Recombinant human interferon alpha 2b broad-spectrum anti-respiratory viruses pharmacodynamics study in vitro]. *Yao Xue Xue Bao* **49**, 1547–1553 (2014).
726. Matzinger, S. R., Carroll, T. D., Fritts, L., McChesney, M. B. & Miller, C. J. Exogenous IFN-alpha Administration Reduces Influenza A Virus Replication in the Lower Respiratory Tract of Rhesus Macaques. *PLOS ONE* **6**, e29255 (2011).
727. Monk, P. D. *et al.* Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med* **9**, 196–206 (2021).
728. Sleijfer, S., Bannink, M., Van Gool, A. R., Kruit, W. H. J. & Stoter, G. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci* **27**, 423–431 (2005).
729. Jafarzadeh, A., Nemati, M., Saha, B., Bansode, Y. D. & Jafarzadeh, S. Protective Potentials of Type III Interferons in COVID-19 Patients: Lessons from Differential Properties of Type I- and III Interferons. *Viral Immunol* **34**, 307–320 (2021).



730. Lopez, J. *et al.* Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *Journal of Experimental Medicine* **218**, e20211211 (2021).
731. University Health Network, Toronto. *Interferon Lambda for Immediate Antiviral Therapy at Diagnosis (ILIAD): A Phase II Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Trial to Evaluate the Effect of Peginterferon Lambda for the Treatment of COVID-19.* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04354259> (2021).
732. Feld, J. J. *et al.* Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir Med* **9**, 498–510 (2021).
733. Castro, L. S. *et al.* Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. *Vaccines* **9**, 328 (2021).
734. Takashita, E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **11**, a038687 (2021).
735. Checkmahomed, L. *et al.* In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses. *Viruses* **12**, 1139 (2020).
736. Hamza, H., Shehata, M. M., Mostafa, A., Pleschka, S. & Planz, O. Improved in vitro Efficacy of Baloxavir Marboxil Against Influenza A Virus Infection by Combination Treatment With the MEK Inhibitor ATR-002. *Front Microbiol* **12**, 611958 (2021).
737. Pleschka, S. *et al.* Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **3**, 301–305 (2001).
738. Rosa-Calatrava, M. *et al.* Composition Comprising Diltiazem for Treating a Viral Infection Caused by Sars-Cov-2 Viruses. (2021).
739. Terrier, O., Rosa-Calatrava, M., Boivin, G., Pizzorno, M.-A. & Padey, B. Combination of Diltiazem and Viral Polymerase Inhibitors. (2021).
740. MONO TILDIEM LP 200 mg gél LP. VIDAL <https://www.vidal.fr/medicaments/mono-tildiem-lp-200-mg-gel-lp-11165.html>.

741. Nicolas de Lamballerie, C. *et al.* Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia. *Sci Rep* **9**, 11493 (2019).
742. Albers, G. J. *et al.* IRF5 regulates airway macrophage metabolic responses. *Clin Exp Immunol* **204**, 134–143 (2021).
743. Krausgruber, T. *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12**, 231–238 (2011).
744. Kanaya, S., Arlock, P., Katzung, B. G. & Hondeghem, L. M. Diltiazem and verapamil preferentially block inactivated cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol* **15**, 145–148 (1983).
745. Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Zheng, N. & Catterall, W. A. Structural Basis for Diltiazem Block of a Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channel. *Mol Pharmacol* **96**, 485–492 (2019).
746. The ins and outs of virus trafficking through acidic Ca<sup>2+</sup> stores. *Cell Calcium* **102**, 102528 (2022).
747. Santoni, G. *et al.* Involvement of the TRPML Mucolipin Channels in Viral Infections and Anti-viral Innate Immune Responses. *Front Immunol* **11**, 739 (2020).
748. Wang, X. *et al.* Diltiazem inhibits SARS-CoV-2 cell attachment and internalization and decreases the viral infection in mouse lung. *PLOS Pathogens* **18**, e1010343 (2022).
749. Wang, Y. *et al.* DOES DILTIAZEM HAVE AN ADJUNCTIVE EFFECT TO OSELTAMIVIR IN TREATING INFLUENZA? *CHEST* **158**, A331 (2020).
750. Tsuda, T. *et al.* Inhalation of calcium channel blocking agents protects against methacholine-induced bronchoconstriction. *J Anesth* **7**, 397–404 (1993).
751. Hendeles, L., Hill, M., Harman, E., Moore, P. & Pieper, J. Dose-response of inhaled diltiazem on airway reactivity to methacholine and exercise in subjects with mild asthma. *Clin Pharmacol Ther* **43**, 387–392 (1988).
752. Foresi, A., Corbo, G. M., Ciappi, G., Valente, S. & Polidori, G. Effect of two doses of inhaled diltiazem on exercise-induced asthma. *Respiration* **51**, 241–247 (1987).

## Résumé

Les infections aigües respiratoires d'origine virale demeurent une préoccupation majeure de santé publique, impactant significativement nos sociétés d'un point de vue sanitaire, économique et sociétal. La pandémie actuelle de COVID-19 ne peut que renforcer ce constat et souligner l'importance de disposer d'un arsenal prophylactique et thérapeutique efficace pour lutter contre ces pathogènes respiratoires émergents et ré-émergents. L'apparition récurrente de mutations de résistance virale constitue la limite majeure des médicaments antiviraux classiques, et particulièrement de l'arsenal très limité à ce jour contre les virus respiratoires, légitimant ainsi le développement de nouvelles approches thérapeutiques, telles que le repositionnement de médicaments, les stratégies ciblant l'hôte ou encore les associations de molécules à activité antivirale et/ou immunomodulatrice.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est inscrit dans un programme de recherche visant à (i) développer une stratégie innovante permettant l'identification de molécules à fort potentiel pour leur repositionnement comme antiviraux contre les virus respiratoires, par un criblage *in silico* basé sur la comparaison de signatures virogénomiques et chemogénomiques ; (ii) mettre en œuvre de manière complémentaire des protocoles d'évaluation *in vitro* et *in vivo* de combinaisons de molécules ciblant la cellule-hôte avec des antiviraux classiques ciblant les déterminants viraux, afin d'en potentialiser l'efficacité tout en diminuant les risques d'apparition de résistance.

Mes travaux de thèse ont ainsi contribué à (i) la mise en place de modèles précliniques d'infection basés sur des cultures en interface air-liquide d'épithélium respiratoire humain reconstitué, pour l'évaluation de molécules antivirales en mono- et bithérapies, (ii) l'identification du diltiazem comme antiviral à large spectre via son mécanisme d'action stimulant l'expression des interférons lambda, (iii) la démonstration *in vitro* du bénéfice du diltiazem à potentialiser en combinaison l'efficacité d'antiviraux approuvés, et (iv) à la mise en œuvre de deux essais cliniques de phase II visant à évaluer le diltiazem chez des patients hospitalisés pour une grippe sévère (FLUNEXT) ou une pneumopathie hypoxémiante à COVID-19 (DICOV).

Mots clés : virus respiratoires, influenza, SARS-CoV-2, antiviraux, repositionnement de médicaments, combinaisons de molécules, synergie, diltiazem, épithélium respiratoire humain, interférons lambda, signatures virogénomiques et chemogénomiques, aérosolthérapie.

## Abstract

Acute respiratory infections of viral origin remain a major public health concern, significantly impacting our societies from a health, economic and societal point of view. The current COVID-19 pandemic can further support this observation and underline the importance of having an effective prophylactic and therapeutic arsenal to fight against these emerging and re-emerging respiratory pathogens. The recurrent emergence of viral resistance mutations constitutes the major limitation of conventional antiviral drugs, and particularly of the very limited arsenal, to date, against respiratory viruses. This legitimizes the development of new therapeutic approaches such as drug repurposing, strategies targeting the host, or drug combinations with antiviral and/or immunomodulatory activity.

In this context, my thesis work is part of a research program aimed at (i) developing an innovative strategy allowing the identification of molecules with high potential for their repositioning as antivirals against respiratory viruses, by *in silico* screening based on the comparison of virogenomic and chemogenomic signatures, and (ii) setting up methods to evaluate *in vitro* and *in vivo* combination of molecules targeting the host cell with conventional antivirals targeting viral determinants in order to potentiate antiviral effect while reducing the risk of emergence of viral resistance.

In summary, my thesis work has notably contributed to (i) the establishment of preclinical models of infection based on air/liquid interface cultures of reconstituted human respiratory epithelium, for the evaluation of antiviral drugs in mono- and bi-therapies, (ii) the identification of diltiazem as a broad-spectrum antiviral via its mechanism of action stimulating the expression of lambda interferons, (iii) the *in vitro* demonstration of the benefit of combined diltiazem in potentiating the efficacy of approved antiviral drugs, and (iv) the implementation of two phase II clinical trials evaluating the diltiazem, as a broad spectrum antiviral, in patients hospitalized for severe influenza (FLUNEXT) or for hypoxemic COVID-19 pneumonia (DICOV).

Key words: respiratory viruses, influenza, SARS-CoV-2, antiviral drugs, drug repurposing, drug combinations, synergy, diltiazem, human respiratory epithelium, interferon lambda, virogenomic and chemogenomic signatures, aerosol therapy.