



HAL
open science

Mécanismes d'entrée de SARS-CoV-2 : relation hôte-virus au site de primo-infection et repositionnement thérapeutique

Margot Morin-Dewaële

► To cite this version:

Margot Morin-Dewaële. Mécanismes d'entrée de SARS-CoV-2 : relation hôte-virus au site de primo-infection et repositionnement thérapeutique. Maladies infectieuses. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2023. Français. NNT : 2023PA120074 . tel-04684244

HAL Id: tel-04684244

<https://theses.hal.science/tel-04684244>

Submitted on 2 Sep 2024

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

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

UNIVERSITE PARIS-EST

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

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



UNIVERSITÉ
— PARIS-EST



Mécanismes d'entrée de SARS-CoV-2 : relation hôte-virus au site de primo-infection et repositionnement thérapeutique

Par **Margot MORIN-DEWAELE**

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

Présentée et soutenue publiquement le 13 janvier 2023

Devant un jury constitué de :

Dr Marie Galloux : Rapportrice

Dr Pierre-Olivier Vidalain : Rapporteur

Dr Sandrine Belouzard : Examinatrice

Pr Jean-Michel Pawlotsky : Directeur de thèse

Dr Patrice Bruscella : Encadrant

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr Jean-Michel Pawlotsky pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, sa bienveillance et son apport scientifique.

Je remercie tout particulièrement Patrice pour ces 4 années d'encadrements, de soutien durant toute cette thèse et pour m'avoir donné cette opportunité (et pour m'avoir supporté).

Je remercie également les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu durant ces 4 années :

Merci à Rozenn sans qui je n'aurais jamais tenu. Merci pour ton écoute, ta confiance et pour toutes ces discussions partagées.

Merci à Fatima qui a toujours été là aussi pour m'encourager et pour m'écouter.

Merci à Hakim pour ton soutien durant la période difficile du COVID, pour ta bonne humeur et tes chansons que tu m'as mises dans la tête tous les jours.

Merci à Laurent et François (poulet) avec qui j'ai partagé presque 3 années de thèse. Heureusement que vous étiez là ! Merci pour 2% aussi...

Merci à Camille et Céline pour m'avoir épaulé quand je suis arrivée, m'avoir formé et partagé leurs connaissances.

Merci à Amel, Camilia, Trung et Aurélie qui m'ont énormément soutenu sur les derniers mois, la rédaction, les pires moments finalement de cette thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire pour votre enthousiasme, votre bonne humeur et tous ces moments partagés : Anthony, Marie, Vincent, Alex, Slim, Elisabeth, Vanessa, Daniel, Pailine, Meriem, Camille, Eva, Nazim, Warda, Bryan, Sri, Dennis ...

Merci à mes parents pour m'avoir soutenu toutes ces années et avoir cru en moi. Je pense que je n'y serais jamais arrivé sans eux.

Merci à mes meilleures amies Kimberley et Marion pour nos soirées bars qui m'ont aidé à me changer les idées tout au long de ma thèse.

Merci à l'homme qui partage ma vie depuis 7 ans Corentin. Merci de me supporter au quotidien, de m'encourager et de m'épauler.

Enfin je remercie ma cousine Joëlle, mon cousin Mathieu et Rayan, mon beau frère Armand et mes beaux parents Brigitte et Patrice pour leurs encouragements tout au long de ce parcours.

Table des matières

Introduction	15
I) Généralités.....	15
A) Historiques des maladies infectieuses.....	15
B) Principaux virus responsables d'infections respiratoires aiguës chez l'homme ..	19
II) Physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2.....	21
A) Epidémiologie des coronavirus et du SARS-CoV-2	21
B) Classification	22
C) Transmission des coronavirus chez l'Homme.....	23
D) Aspect systémique de la COVID-19	25
E) Aspects virologiques	26
a) Structure de la particule virale	26
b) Génome du SARS-CoV-2.....	27
c) Protéines virales.....	28
i. Les protéines non structurales des coronavirus (NSP)	28
ii. Les protéines structurales des coronavirus.....	34
d) Cycle de vie des coronavirus.....	36
F) Rôle des facteurs cellulaires au site d'infection par le SARS-CoV-2	40
a) Le récepteur cellulaire ACE-2.....	40
b) Protéases cellulaires et protéine virale Spike	43
c) Rôle de l'environnement cellulaire de la cavité nasale lors de l'infection par SARS-CoV-2	45
G) Les vésicules extracellulaires	47
a) Les petites vésicules extracellulaires.....	47
i. Caractéristiques et composition	48
ii. Biogenèse et fonctions	49
iii. Relation des EVs avec les virus.....	52
iv. Rôle des vésicules dans la propagation d'infections virales (tableau 3).....	53
v. Rôle des vésicules dans l'inhibition d'infections virales (tableau 3)	54
vi. Rôle des vésicules dans l'infection par le SARS-CoV-2.....	55
III) Repositionnement thérapeutique pour lutter contre l'infection par le SARS-coV-2.....	58
A) Les vaccins	59
B) Apparition des variants de SARS-CoV-2.....	61
C) Efficacité de la vaccination sur les variants	63

D) Repositionnement d'antiviraux à action directe ou DAA (« direct -acting antivirals »).....	66
E) Repositionnement d'antiviraux ciblant l'hôte ou HTA (« host-targeting antivirals »).....	68
IV) Repositionnement thérapeutique de la desloratadine dans le cadre de la pandémie SARS-CoV-2	70
A) Les agents lysosomotropiques.....	72
B) Fonctionnement des CADs	73
C) Rôle des CADs dans les infections virales	74
Objectifs & problématiques	77
Matériel et méthodes.....	78
I) Culture cellulaire.....	78
a) Lignées cellulaires	78
b) Cultures primaires - Cellules épithéliales nasales humaines (CENH).....	78
c) Modèles d'infection	80
II) Biologie moléculaire	81
a) Extraction d'ARN	81
b) RT-qPCR	81
III) Biochimie.....	82
a) Western-blot	82
b) Immunofluorescence.....	82
c) Immunohistochimie sur CENH	83
d) Test de cytotoxicité	84
IV) Caractérisation de l'activité antivirale de molécules CADs « FDA-approved »	84
a) Screening des « CADs ».....	84
b) Gamme de concentrations de « CADs »	85
c) Expérience de temps d'ajout (« time-of-addition assay »)	85
d) Test d'entrée (« entry assay »)	85
e) Infection de CENHs par le SARS-CoV-2.....	86
V) Rôle proviral des petites vésicules extracellulaires de CENHs dans l'infection à SARS-CoV-2.....	86
a) Préparation des petites vésicules extracellulaires dérivées de CENHs	86
b) Microscopie électronique à transmission : caractérisation morphologique des mu-sEVs	87
c) Mesure de la taille et de la concentration des vésicules extracellulaires	87
Résultats.....	88

A) Rôle proviral des petites vésicules extracellulaires dérivées de cellules épithéliales humaines respiratoires dans l'infection par le SARS-CoV-2	88
B) La desloratadine, une drogue cationique amphiphile approuvée par la FDA, inhibe l'entrée du SARS-CoV-2 dans des cultures cellulaires et dans des cellules épithéliales nasales primaires humaines (CENHs).....	116
Discussion	131
Annexes.....	142
A) Repositionnement de l'Alisporivir dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2 142	
Références bibliographiques.....	147

Liste des figures

Figure 1 : Frise chronologique des différentes maladies infectieuses survenues du XIV^{ème} siècle à aujourd'hui.

Figure 2 : Frise temporelle indiquant les événements marquants au cours de la pandémie de SARS-CoV-2.

Figure 3 : Classification et taxonomie de la famille des *Coronaviridae*.

Figure 4 : Principales voies de transmission interhumaine du SARS-CoV-2.

Figure 5 : Détection du virus SARS-CoV-2 dans les différents organes et fluides biologiques du corps humain.

Figure 6 : Structure de la particule virale du SARS-CoV-2.

Figure 7 : Organisation du génome viral du SARS-CoV-2.

Figure 8 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine Spike du SARS-CoV-2.

Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la fusion des membranes virales et cellulaires.

Figure 10 : Représentation schématique des étapes de la réplication/transcription discontinue des coronavirus.

Figure 11 : Cycle de vie du SARS-CoV-2.

Figure 12 : Niveaux d'expression d'ACE2 dans le corps humain analysés par « single-cell RNA sequencing ».

Figure 13 : Système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS).

Figure 14 : Analyse structurale du trimère de spike du SARS-CoV-2.

Figure 15 : Schéma du tractus respiratoire et de l'épithélium nasal humain.

Figure 16 : Sécrétion des petites vésicules extracellulaires par différents organes et dans différents fluides biologiques.

Figure 17 : Biogenèse des petites vésicules extracellulaires.

Figure 18 : Mécanismes de sécrétion des exosomes

Figure 19 : Molécules antivirales approuvées contre les infections virales entre janvier 1959 et avril 2016.

Figure 20 : Illustration des différentes technologies utilisées pour le vaccin contre la COVID-19.

Figure 21 : Emplacement des différentes mutations d'acides aminés sur la protéine Spike des différents variants VOC (alpha, bêta, delta, gamma et omicron).

Figure 22 : Stratégies thérapeutiques utilisées ciblant le virus pour contrer l'infection par le SARS-CoV-2.

Figure 23 : Stratégies thérapeutiques utilisées ciblant l'hôte pour contrer l'infection par le SARS-CoV-2.

Figure 24 : Accumulation des molécules cationiques amphiphiles dans les endosomes/lysosomes.

Figure 25 : Mécanisme d'action des inhibiteurs fonctionnels de l'acide sphingomyélinase (FIASMAS).

Figure 26 : Mécanisme schématique de la pré-activation du virus par les exosomes issus du mucus de l'environnement nasal.

Figure 27 : Mécanisme schématique de la modulation de la perméabilité cellulaire par les exosomes portant ACE2 et TMPRSS2.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux virus responsables d'infections respiratoires aiguës (IRAs).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des fonctions des différentes protéines non structurales du SARS-CoV-2.

Tableau 3 : Liste non exhaustive du rôle des vésicules extracellulaires dans les infections virales.

Tableau 4 : Récapitulatif des principaux vaccins utilisés pour contrer le SARS-CoV-2.

Tableau 5 : Liste des VOCs et VOIs du SARS-CoV-2.

Tableau 6 : Repositionnement de molécules antivirales pour lutter contre la pandémie de COVID-19.

Tableau 7 : Liste des principaux « CADs » ayant une activité antivirale connue sur plusieurs virus de différentes familles.

Tableau 8 : Amorces et sondes utilisées pour la RT-qPCR.

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western-Blot et en immunofluorescence.

Tableau 10 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western-Blot et en immunofluorescence.

Abréviations

2'-O-MT : « 2'-O-methyltransferase »
3CLpro : « 3C-Like proteinase »
ACE : «Angiotensin »
ACE2 : « Angiotensin-converting enzyme 2 », enzyme de conversion de l'angiotensine 2
Adv : Adénovirus
ALI ; « Air-Liquide Interface »
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AngI : Angiotensine I
APN : Aminopeptidase N
ARNsg : ARN sous-génomique
ASM : Acide sphingomyélinase
AT1R/2R : « Angiotensin II type I/II receptor »
BoV : Bocavirus
CAD : « Cationic-amphiphilic drug », drogue cationique amphiphile
CENHs : Cellules Epithéliales nasales humaines
CH : « Central Helix »
CMV : Cytomégalovirus
CoV : Coronavirus
COVID-19 : « Coronavirus Disease », maladie à coronavirus
CPZ : Chlorpromazine
CTD : « C-terminal Domain »
CTD1 et 2 : « Carboxy-terminal domain 1, 2 »
DAA : « Direct-acting antivirals »
DC : « Dendritic Cells »
DDP4 : « Dipeptidyl peptidase 4 »
DMV : « Double membrane vesicles », vésicules à double membrane
DSD : Desloratadine
dUTPase : « deoxyuridine triphosphatase »
EBOV : Virus Ebola
EBV : Virus Epstein-Barr
EndoU : « Uridylate-specific endoribonuclease »
ERGIC : « Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment »
ESCRT : « Endosomal Sorting Complex Required for Transport »
EV : Entérovirus
EVs : « Extracellular Vesicles », vésicules extracellulaires
ExoN : « exoribonuclease »
FDA : « Food and Drug Administration »
FIASMA : « Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase », inhibiteurs fonctionnels de l'ASM
FP : « Fusion Peptide », peptide de fusion
HAT : « Human Airway Trypsin-like protease »
Hel1 : « superfamily helicase 1 »
hMPV : Métapneumovirus humain
hPIV : Parainfluenza virus humain

HR1 et 2 : « Heptad Repeat »
HSV-1 : « Herpes-simple 1 »
HTA : « Host-targeting antivirals »
hVRS : Virus Respiratoire Syncytial humain
IBV : « Infectious Bronchitis Virus », virus de la bronchite infectieuse
IEVs : « Large-extracellular vesicles », vésicules extracellulaires larges
IFN : Interféron
ILV : « Intraluminal vesicles », vésicules intraluminales
INNTI : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
INTI : Inhibiteur Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
IRABs : Infections Respiratoires Aiguës Basses
IRAs : Infections Respiratoires Aiguës
IRD : « Intrinsically Disordered Region »
IV : Influenza Virus
LE : « Late endosome », endosome tardif
LMP1 : « Latent Membrane Protein 1 »
LPV/RTV : Lopinavir/Ritonavir
MasR : « Mitochondrial Assembly Receptor »
MAVS : « Mitochondrial Antiviral Signaling protein »
MCC : « Mucociliary Clearance », clairance mucociliaire
MERS-CoV : « Middle East respiratory syndrome coronavirus », Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MT : Mycobacterium Tuberculosis
MV : « Measles Virus », virus de la rougeole
MVB : « Multivesicular body », corps multivésiculaire
N7-MT : « M7-methyl transferase »
NFkB : « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »
NGS : « Next-Generation Sequencing »
NiRAN : « Nidovirus RdRp Associated Nucleotidyltransferase »
NK : « Natural Killer »
NRP1 : Neuropiline-1
NSP : « non-structural protein », protéines non structurales
NT : « Untranslated region UTR », région non traduite
NTD : « N-terminal domain », domaine N-terminal
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : « Open Reading Frame »
PBMC : « Peripheral Mononuclear Blood Cells »
PC : Patients convalescents
PHB1 et 2 : Prohibitine 1 et 2
PLpro : « Papain-Like proteinase »
PolyA : queue poly adénylée
RAAS : « Renin Angiotensin-Aldosterone system », système rénine angiotensine aldostérone
RBD : « Receptor Binding Domain », domaine de liaison au récepteur
RBM : « Receptor Binding Motif », motif de liaison au récepteur
RdRp : « RNA-dependent RNA polymerase », ARN polymérase ARN dépendante

RDV : Remdesivir
RE : Réticulum endoplasmique
RTC : « Replication Transcription Complex », complexe de réplication transcription
RV : Rhinovirus
SARS-CoV-1 : « severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 », Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère 1
SARS-CoV-2 : « severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 »
sEVs : « small-extracellular vesicles », petites vésicules extracellulaires
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
TB : Tuberculose
TMPRSS2 : « Transmembrane serine protease 2 »
TRS : « Translated Replication Sequence », séquence de régulation de la transcription
TRS : « Transcription Regulatory Sequences »
Ub1 : « Ubiquitin-like »
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP : « Virus Like Particle »
VOC : « Variant of Concern »
VOI : « Variant of Interest »
VZV : « Varicella-zoster virus », virus de la varicelle
ZBD : « zinc binding domain »

Résumé en français

Le SARS-CoV-2 ("Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2"), nouveau membre de la sous famille des *Orthocoronavirinae* responsable de la maladie COVID-19, a émergé en décembre 2019 en Chine et s'est rapidement propagé dans le monde, causant une pandémie. Des efforts considérables ont été déployés, notamment pour développer en un temps record des vaccins efficaces contre le SARS-CoV-2, mais aussi pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'infection. Cependant, l'émergence de nouveaux variants montre la fragilité d'un système uniquement fondé sur les vaccins et souligne la nécessité de traitements préventifs et curatifs.

Dans une première partie de la thèse, nous avons analysé le rôle des petites vésicules extracellulaires (sEVs, "small extracellular vesicles") produites au niveau de l'épithélium respiratoire nasal dans l'infection par le SARS-CoV-2. Les sEVs sont sécrétées dans de nombreux fluides biologiques incluant le mucus de l'épithélium respiratoire. Nous avons caractérisé les sEVs produites dans le mucus par des CENH (Cellules Epithéliales Nasales Humaines) (mu-sEVs) produisant du mucus contenant ces vésicules (mu-sEVs) et montré que ces dernières contenaient ACE2 et TMPRSS2, respectivement le récepteur et la protéase essentiels pour l'entrée virale. Les mu-sEVs sont capables de cliver la protéine virale Spike au site S1/S2 et, ainsi, de faciliter l'exposition des RBD ("Receptor Binding Domain"), favorisant l'attachement du virus au récepteur cellulaire. Ainsi, les mu-sEVs sont capables de compléter le « priming » de Spike effectué par la furine intracellulaire. Ce « priming » extracellulaire est dépendant de l'activité du TMPRSS2 à la surface des mu-sEVs, génère des virions pré-activés capables de pénétrer plus rapidement dans les cellules cibles par fusion membranaire, et suggère un rôle facilitateur du mucus dans l'infection.

Dans une seconde partie de la thèse, nous avons évalué l'activité antivirale des agents cationiques amphiphiles (CAD, "Cationic Amphiphilic Drugs"). Parmi 8 CADs testés, 5 possèdent une activité antivirale contre le SARS-CoV-2. La desloratadine (DSD), un CAD antihistaminique, entraîne une diminution de la production d'ARN viral dès 2H post-infection, suggérant l'inhibition d'une étape précoce du cycle viral de SARS-CoV-2, probablement l'entrée. De plus, la DSD est active sur d'autres coronavirus (HCoV-229E et HCoV-OC43), suggérant une activité antivirale pan-coronavirus. Enfin, nous avons évalué l'effet antiviral de la DSD, *ex vivo*, sur des cultures de CENHs et avons démontré une diminution de la production d'ARN viral du SARS-CoV-2. La desloratadine, molécule très bien tolérée au sein de la population, pourrait donc être une alternative thérapeutique intéressante dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2.

Résumé en anglais

The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2, "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2"), a new member of the *Orthocoronavirinae* subfamily, emerged in December 2019 in China and rapidly spread around the world, causing a global pandemic. Considerable efforts have been made to rapidly develop effective vaccines against SARS-CoV-2, but also to understand the mechanisms underlying the infection. However, the emergence of new SARS-CoV-2 variants emphasizes the fragility of a system based on vaccines and highlights the need for preventive and curative treatments.

In the first part of this thesis, we analyzed the role of small extracellular vesicles (sEVs) secreted in the mucus of the respiratory nasal epithelium during SARS-CoV-2 infection. The sEVs are secreted in many biological fluids, including mucus of respiratory epithelium. We characterized the sEVs produced in the mucus by HENCs (Human Nasal Epithelial Cells) (mu-sEVs), and showed that they contain ACE2 and TMPRSS2, the receptor and protease critical for virus entry, respectively. The mu-sEVs can cleave the Spike viral protein at the S1/S2 site and thus facilitate the open conformation of the Receptor Binding Domain (RBD), favoring the attachment of the virus to the cellular receptor. Hence, we showed that mu-sEVs are able to complete Spike priming performed by the intracellular furin. This effect is mediated by vesicular TMPRSS2 activity, generates pre-activated virions prone to enter rapidly target cell using the fusion membrane pathway, and suggests a facilitating role of mucus during infection.

In the second part of this thesis, we evaluated the antiviral activity of cationic amphiphilic drugs (CADs). Among 8 CADs tested, 5 presented an antiviral activity against SARS-CoV-2. In particular, Desloratadine (DSD) induces a decrease in viral RNA production as early as 2 hours post-infection, suggesting that it targets an early stage of the viral cycle, probably viral entry. Moreover, DSD is effective on other coronaviruses (HCoV-229E and HCoV-OC43), suggesting a broad-spectrum anti-coronavirus activity. Finally, we evaluated the antiviral effect of DSD, *ex vivo*, on HNECs cultures and demonstrated a decrease of SARS-CoV-2 RNA production. Desloratadine, a well-tolerated approved drug, could therefore represent an interesting alternative antiviral therapy in the context of the SARS-CoV-2 pandemic.

Introduction

I) Généralités

Depuis la révolution néolithique, il y a 12 000 ans, les humains ont abandonné leur mode de vie nomade pour la sédentarisation et la pratique de l'agriculture. Les tribus de chasseurs-cueilleurs se sont déplacées pour vivre dans différents villages et pâturages (Dobson and Carper, 1996). Ces conditions de vie ont favorisé la proximité entre les humains et les animaux, altéré l'environnement et entraîné l'apparition de nombreuses maladies infectieuses. A partir du XIX^{ème} siècle, des vagues de contamination intenses sont répertoriées en raison de : l'intensification de l'élevage en zone périurbaine et l'augmentation de la population, favorisant notamment la dissémination importante d'agents pathogènes. En effet, c'est au XIX^e siècle que le terme de maladie zoonotique apparaît. Il regroupera les maladies infectieuses transmises de l'Homme à l'animal (zooanthroponose) et des animaux à l'Homme (anthropozoonose) telles que la rage, la peste ou la salmonellose (Morens and Fauci, 2020).

A) Historique des maladies infectieuses

Ainsi, l'Homme a été confronté à des maladies dues à des microorganismes causant de nombreuses épidémies/pandémies mortelles (Figure 1) (Morens et al., 2020). Le terme pandémie a été défini en 1666 par le médecin Gideon Harvey (1636/7-1702), un an après l'apparition de la peste, décrivant une épidémie sur une vaste zone géographique affectant une grande partie de la population et pouvant s'étendre à l'échelle mondiale.

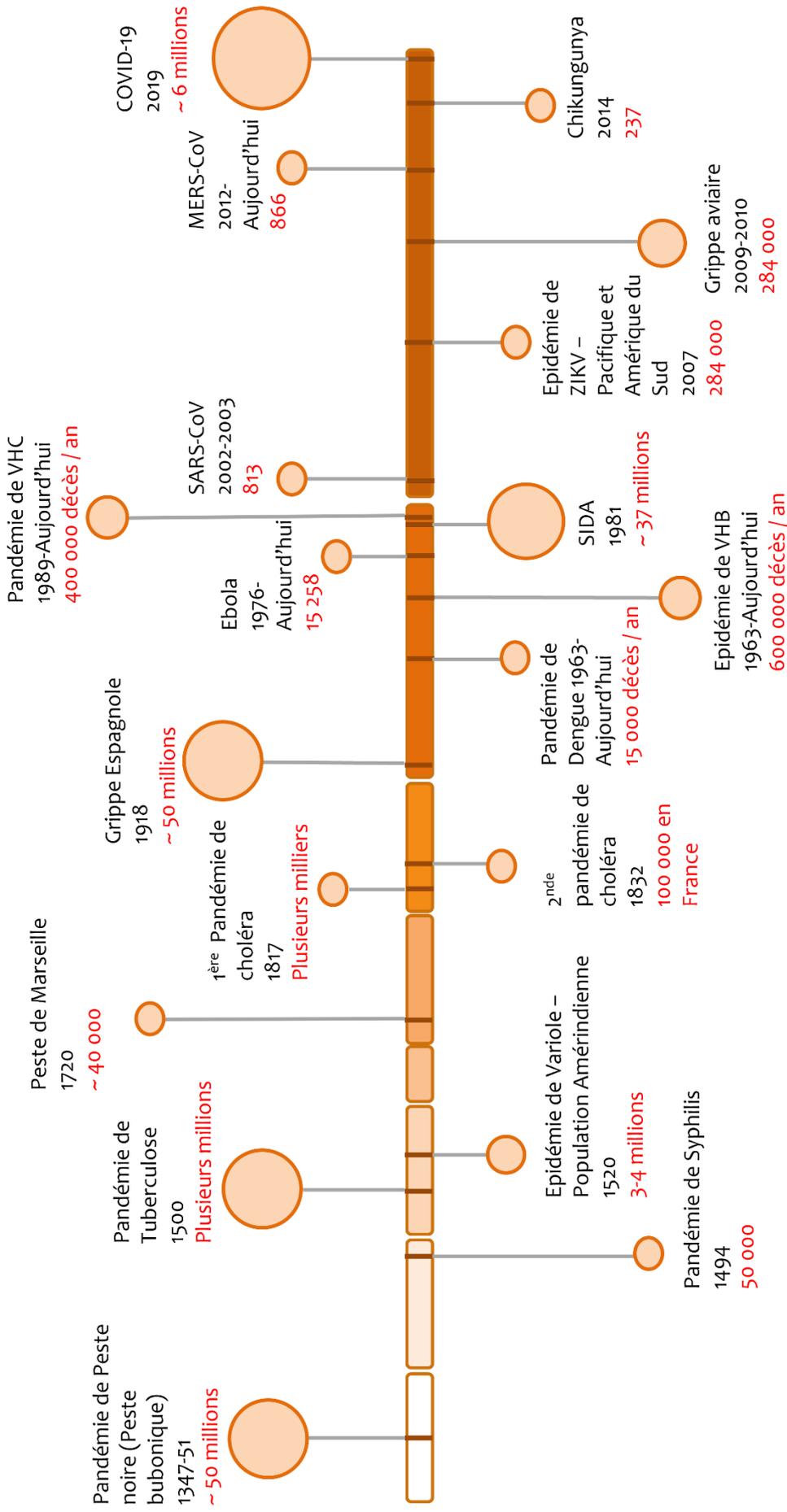


Figure 1 : Frise chronologique des différentes maladies infectieuses survenues du XIV^{ème} siècle à aujourd'hui. En rouge est inscrit le nombre de décès.

On peut ainsi noter la pandémie de peste noire (peste bubonique), causée par la bactérie *Yersinia Pestis* de 1347 à 1351, tuant plus de 50 millions de personnes, en Europe, Asie et au Moyen-Orient (Pollitzer and Organization, 1954)

Le siècle suivant, en 1494, une pandémie de Syphilis, une infection transmise sexuellement par la bactérie *Treponema Pallidum*, a frappé l'Europe, causant le décès de plus de 50 000 personnes (Morens et al., 2020).

Au XVIème siècle, une pandémie de tuberculose (TB) toucha le monde, causant plusieurs millions de décès. C'est seulement en 1882 que le scientifique Robert Koch découvrit l'agent étiologique de la TB, la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (MT) (Barberis et al., 2017).

En 1520, après la conquête du Nouveau-monde par les Européens, la maladie de la variole, dont la souche étiologique est le virus à ADN « Smallpox », a décimé plus de 4 millions d'Amérindiens (RILEY, 2010). En 1796, Edward Jenner, un médecin anglais, constate qu'une maladie bénigne des vaches, la vaccine, présentait des symptômes semblables à la variole touchant la population humaine. Les animaux guéris de la vaccine ne contractant pas la variole, il transmit donc la vaccine à un enfant (James Phipps) puis lui inocula la variole. L'enfant ne développa pas la maladie, et le principe de la vaccination était né. Le perfectionnement et la généralisation du vaccin antivariolique permettront l'éradication de la variole en 1977 (Thèves et al., 2016).

En 1720, une résurgence de la pandémie de peste du XIVe siècle se produit en France. Environ 50% de la population de la ville de Marseille décéda en quelques mois (Raoult, 2016).

En 1817, la pandémie de Choléra, dont l'agent étiologique est le bacille *Vibrio Cholerae*, marque le début d'une nouvelle ère. A partir de l'Inde, foyer infectieux du pathogène, la maladie suit les voies du commerce pour s'étendre aux quatre coins du monde soulignant la propagation d'infections jusqu'à devenir des pandémies mondiales (Piret and Boivin, 2020).

La plus grande pandémie du XXème siècle est apparue en 1918 avec la grippe espagnole, dont l'agent étiologique est la souche H1N1 du virus influenza A. Cette pandémie entraînera le décès de 20 à 50 millions de personnes, soit 2 à 5 fois plus que la première guerre mondiale (Morens et al., 2021).

Le virus Ebola (de la famille des *Filoviridae*), responsable de la fièvre hémorragique Africaine, a été identifié pour la première fois en 1976 au Soudan et en République démocratique du Congo et a entraîné le décès de respectivement 151 et 280 personnes. A ce jour, ce virus est toujours endémique dans certaines régions du monde, et a ré-émergé en décembre 2013 en Guinée, emportant la vie de 11 000 personnes (Fenollar and Mediannikov, 2018).

En 1959, les premiers signes d'infection de l'Homme par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), alors inconnu, sont observés à Kinshasa, au Congo belge (Zhu et al., 1998). A la fin

des années 1970, le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) causera de nombreux décès aux Etats-Unis au sein de la population homosexuelle. Ce n'est qu'en 1983 que Françoise Barré-Sinoussi, Jean-Claude Chermann et Luc Montagnier de l'Institut Pasteur découvrent le virus VIH responsable du SIDA. La période comprenant le début des années 80 à aujourd'hui est toujours marquée par cette pandémie touchant les 5 continents (Greene, 2007). On dénombre en effet plus de 40,1 millions de décès dans le monde sur cette période. Aujourd'hui, le SIDA est devenu une maladie chronique que l'on soigne avec un arsenal d'antirétroviraux. La trithérapie d'antiviraux, se composant généralement de deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) et d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI), permet aujourd'hui la survie de 8 patients infectés sur 10 (Chelli et al., 2016). Cependant, le SIDA reste toujours à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique de portée mondiale.

Parmi les virus responsables de maladies chroniques, on retrouve les virus des hépatites B et C (VHB/VHC) responsables d'inflammation du foie. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 58 millions de personnes sont porteuses du virus de l'hépatite C et 296 millions d'individus vivent avec l'hépatite B de façon chronique. Les manifestations cliniques peuvent aussi bien être aiguës que chroniques et évoluer vers la cirrhose ou le cancer primitif du foie (carcinome hépatocellulaire). Un vaccin sûr et efficace est disponible pour lutter contre les infections par le VHB, tandis que seuls des traitements antiviraux existent contre le VHC et l'accès au diagnostic et aux traitements reste limité, surtout dans les pays en voie de développement (données de l'OMS).

Enfin, il existe de nombreux cas d'émergences virales avec des arbovirus (« Arthropode-borne Virus »), dont la transmission se fait par un arthropode hématophage tel que les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Les arboviroses se caractérisent par des symptômes grippaux avec l'apparition de fortes fièvres et de céphalées, sans manifestations respiratoires. On peut citer comme exemples :, le virus du Nil Occidental (« West Nile Virus », WNV), le virus Chikungunya (« Chikungunya Virus », CHIKV) identifié pour la première fois en Tanzanie en 1952 et qui touche près de 1500 personnes, le virus de la fièvre jaune (« Yellow Fever », YFV), le virus de la Dengue (« Dengue Virus », DENV) ou encore le virus Zika (« Zika Virus », ZIKV) qui est responsable de plusieurs milliers de cas d'infections par an chez les nouveau-nés dans le Pacifique et en Amérique du Sud (Plourde, A., et al).

B) Principaux virus responsables d'infections respiratoires aiguës chez l'homme

Les infections respiratoires aiguës (IRAs) sont des pathologies touchant les adultes, les enfants et les personnes âgées. Ces infections peuvent provoquer de simples rhumes mais, dans certains cas, leur survenue sur un terrain fragilisé ou chez des personnes ayant des comorbidités peut provoquer des pneumonies mortelles et donc nécessiter une hospitalisation (Mathers et al., 2006). Dans le monde, les IRAs sont responsables d'environ 4 millions de décès par an et 98% d'entre elles touchent l'arbre respiratoire inférieur (Jain et al., 2015; McIntosh, 2002). Selon les statistiques publiées par l'OMS entre 2000 et 2013, les IRAs constituent la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans (Giersing et al., 2019). Les IRAs ont donc un impact socio-économique important, notamment en ce qui concerne le nombre et la durée des hospitalisations (Fendrick et al., 2003).

On notera que 80 à 90% des étiologies des IRAs sont d'origine virale (Bobossi Serengbe et al., 2015). Parmi les virus responsables de ces infections, on retrouve : (i) les *paramyxoviridae* avec le virus respiratoire syncytial humain (hVRS), le métapneumovirus (hMPV) et les virus parainfluenza (hPIV) ; (ii) les *picornaviridae* avec les rhinovirus (RV) et les entérovirus (EV) ; (iii) les *coronaviridae* avec les coronavirus (CoV) ; (iv) les *orthomyxoviridae* avec les virus influenza (IV) ; (v) les *adénoviridae* comprenant les adénovirus (AdV) ; et enfin (vi) les *parvoviridae* avec le bocavirus (BoV) (Tableau 1).

VIRUS	FAMILLE VIRALE	STRUCTURE	EPIDEMIOLOGIE	PREVALENCE	CLINIQUES	POPULATIONS A RISQUE	REFERENCES
Virus respiratoire syncytial (hVRS)	Paramyxoviridae	ARN simple brin négatif	<ul style="list-style-type: none"> + 30 millions de cas par ans dans le monde chez les enfants <5 ans³ <ul style="list-style-type: none"> + 3 millions d'hospitalisations³ Epidémiologie hivernale 	1 ^{er} rang des bronchiolites ¹	Rhinorrhée, éternuements, toux, pharyngite, bronchite, fatigue, fièvre	<ul style="list-style-type: none"> Bébés prématurés Jeunes enfants <5 ans Personnes âgées Personnes immunodéprimées 	Shi, T., et al, 2017 Domachowske, JB., et al, 2020
Métapneumo virus (hMPV)			<ul style="list-style-type: none"> Contamination précoce (<2 ans) Epidémies hivernales 10% des infections virales respiratoires basses chez les enfants hospitalisés¹ 	4 ^{ème} rang des IRA (mondial)	Fièvre, congestion nasal, toux, bronchite, pneumonie	<ul style="list-style-type: none"> Jeunes enfants <5 ans 	Freytmuth, F., et al, 2009 Edwards, KM., et al, 2013
Parainfluenza virus (PIV)			<ul style="list-style-type: none"> 2-17% des infections respiratoires chez les jeunes enfants après le VRS² <ul style="list-style-type: none"> Seconde cause d'hospitalisation pour IRA chez les moins de 18 ans² 	10% des IRA causées par PIV-3 ²	Rhinorrhée, toux, diphtérie laryngienne, bronchiolite et pneumonie	<ul style="list-style-type: none"> Enfants <5 ans Personnes immunodéprimées Personnes âgées 	Henrickson, KJ., et al, 2003 Lee, M-S., et al, 2004 Abedi, GR., et al, 2013 Shay, DK., et al, 1999
Rhinovirus (RV)	Picornaviridae	ARN simple brin positif	<ul style="list-style-type: none"> A l'origine des rhumes dans 80% des cas pendant les saisons à prévalence élevée (niveau mondial) 	3 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (21%) ¹	Rhume, otite, rhinosinusite	<ul style="list-style-type: none"> Enfants Personnes asthmatiques et transplantées 	Jacobs, SE., et al, 2013 Vandini, S., et al, 2013 Hayden, FG., et al, 2004
Entérovirus (EV)			<ul style="list-style-type: none"> Incidence différente chaque année EV71 responsable du syndrome « pieds-mains-bouche » 10% d'EV détecté chez les enfants souffrant de bronchiolites³ 	4% des IRA ¹	Symptômes variés : conjonctivite, dysfonctionnement neurologiques, perturbations respiratoires et intestinales	<ul style="list-style-type: none"> Enfants <1 an Enfants asthmatiques 	Khetsuriani, N., et al, 2006 Andréoletti, L., et al, 2009
Coronavirus (CoV)			<ul style="list-style-type: none"> Contamination précoce (100% avant 5 ans) Responsable de 10-15% des rhumes Epidémies hivernales 	4 ^{ème} rang des ARI (10%) ¹	Fièvre, toux, difficulté respiratoire, fatigue, maux de tête, congestion nasale	<ul style="list-style-type: none"> Individus immunodéprimés Enfants Personnes âgées 	Killerby, ME., et al, 2018 Gaunt, ER., et al, 2010 Vabret, A., et al, 2009 Wat, D., et al, 2003
Influenza virus (IV)	Orthomixoviridae	ARN simple brin négatif	<ul style="list-style-type: none"> 5 millions de cas graves chaque année⁴ 290-560K décès par an dans le monde⁴ 	2 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (33%) ¹	Frissons, fièvre, toux, douleurs musculaires, céphalées	<ul style="list-style-type: none"> Enfants <5 ans Adultes >65 ans Femmes enceintes Individus immunodéprimés 	Thompson, WW., et al, 2009 Nair, H., et al, 2011
Adénovirus (AdV)	Adenoviridae	ADN double brin	<ul style="list-style-type: none"> Fin de l'hiver, début du printemps Sérotype 1 et 2 endémique Sérotype 3, 4, 7 et 21 causent des maladies respiratoires aiguës 	5-10% des maladies virales respiratoires ¹	Fièvre, rhinite, pharyngite, toux et conjonctivite	<ul style="list-style-type: none"> Enfants Sujets immunodéprimés 	Lion, T., et al, 2014 Shieh, W-J., et al, 2021 Gray, GC., et al, 2000
Bocavirus (BoV)	Parvoviridae	ADN simple brin	<ul style="list-style-type: none"> Contamination précoce (<2 ans) Circulation annuelle (pic fin hiver – début printemps) Co-infections fréquentes 	5-10% des IRA ⁶	Fièvre, toux, rhinorrhée, détresse respiratoire, perturbations intestinales	<ul style="list-style-type: none"> Enfants <2 ans 	Manning, A., et al, 2006 Kesebir, D., et al, 2006 Foulongne, V., et al, 2008

Tableau 1 : Principaux virus responsables d'infections respiratoires aiguës (IRAs)

¹ étude réalisée au CHU de Caen entre 2000 et 2006 chez des enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour IRA (Freytmuth et al., 2010)

² étude menée aux Etats-Unis dans les services pédiatriques entre 1980-1996 (Shay et al., 1999)

³ étude systématique et de modélisation à partir de données publiées entre le 1^{er} janvier 1995 et le 31 décembre 2016 sur des enfants hospitalisés pour des IRAs associées au RSV dont l'âge est inférieur à 5 ans (Shi et al., 2017)

⁴ étude systématique et de méta-analyse menées à partir de données publiées entre le 1^{er} janvier 1995 et le 31 octobre 2010 sur des enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour des infections respiratoires aiguës basses (IRABs) (Nair et al., 2011)

⁵ étude menée en France au CHU de Reims sur la prévalence d'Entérovirus (EV) associée à une bronchiolite ou une exacerbation d'asthme entre 1995 et 2009, données de la littérature (Andréoletti et al., 2009)

⁶ études diagnostics en laboratoire chez des enfants de moins de 2 ans testés négatifs pour le VRS, PIV (1-3), IV A et B et AdV. Les écouvillons obtenus entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2004 ont été testé par PCR pour les BoV (Kesebir et al., 2006)

De manière importante, il faut noter que les infections respiratoires aiguës sont de plus en plus présentes dans la population humaine. Les années 2000 ont été marquées par l'émergence de coronavirus provoquant des pathologies graves, dont le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-1) en 2002, puis 10 ans plus tard l'émergence du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV). Aujourd'hui, le monde connaît une pandémie globale avec l'émergence du SARS-CoV-2 en décembre 2019 en Chine. Les résultats de ce manuscrit se concentrent essentiellement sur ce nouveau coronavirus. Face à l'urgence sanitaire, notre laboratoire a focalisé sa thématique de recherche sur la relation hôte-coronavirus et le repositionnement thérapeutique pour lutter contre cette pandémie.

II) Physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2

A) Epidémiologie des coronavirus et du SARS-CoV-2

Sept coronavirus décrits à ce jour peuvent infecter la population humaine, en causant des manifestations cliniques allant du rhume commun à des infections respiratoires mortelles.

Trois bêta-coronavirus hautement pathogènes ont causé des infections respiratoires sévères. Le SARS-CoV-1 apparu en Chine en 2002 ayant contaminé plus de 8000 personnes entre novembre 2002 et juillet 2003 et causé la mort de 774 d'entre elles. Le MERS-CoV qui a émergé en 2012 en Arabie Saoudite et a contaminé 2494 personnes, dont 858 n'ont pas survécu à l'infection. Pour finir le SARS-CoV-2 en 2019, dans la province de Hubei en Chine. Ce dernier engendre une pandémie mondiale dont les événements chronologiques sont décrits en figure 2.

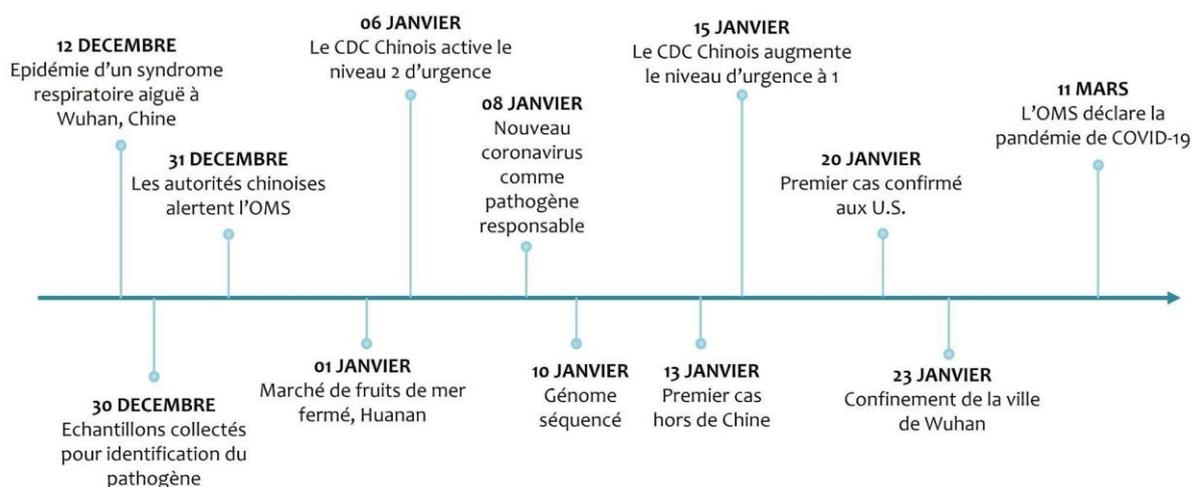


Figure 2 : Frise temporelle indiquant les événements marquant au cours de la pandémie de SARS-CoV-2 (BioRender)

Le 12 décembre 2019, une épidémie se déclare à Wuhan, en Chine. Les symptômes cliniques vont de simples fièvres accompagnées de toux à des pneumonies atypiques (N. Zhu et al., 2020). Le 30 décembre, 4 cas de pneumonies d'origine inconnue sont rapportés et transmis aux hôpitaux locaux pour identification de l'agent pathogène responsable. L'analyse par séquençage haut débit (« Next-Generation Sequencing », NGS) des ARN isolés de ces 4 échantillons indique 79,6% d'identité de séquence avec le SARS-CoV-1 et surtout 96% avec un coronavirus de chauve-souris, la souche Bat CoV RaTG13 (Zhou, P., et al, 2020).

Ainsi, l'agent pathogène responsable de ces cas de pneumonies sévères correspond à un nouveau bêtacoronavirus, d'abord appelé 2019-nCoV (Zhou, P., et al, 2020 ; Lu, R., et al, 2020). Ce dernier sera renommé SARS-CoV-2 pour sa grande homologie de séquence avec le génome du SARS-CoV-1 apparu presque 20 ans plus tôt en Chine.

Le 13 janvier 2020, un premier cas de COVID-19 (« coronavirus disease 2019 ») est détecté en Thaïlande. L'inquiétude grimpe dans le monde lorsque des premiers cas apparaissent aux Etats-Unis le 20 janvier. La Chine décide alors de confiner la ville de Wuhan pour une durée indéterminée le 23 janvier 2020. Malgré la prise en charge rapide des patients dans le monde, l'épidémie s'est propagée à très grande vitesse, se transformant ainsi en pandémie mondiale. Le 11 mars 2020, l'OMS déclare une situation d'urgence sanitaire mondiale et la pandémie de COVID-19.

B) Classification

Les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales* (International Committee on Taxonomy of Viruses), de la famille des *Coronaviridae* et de la sous-famille des *Orthocoronavirinae*. Il existe 4 genres : Alpha-coronavirus, Bêta-coronavirus, Gamma-coronavirus et Delta-coronavirus (Figure 3).

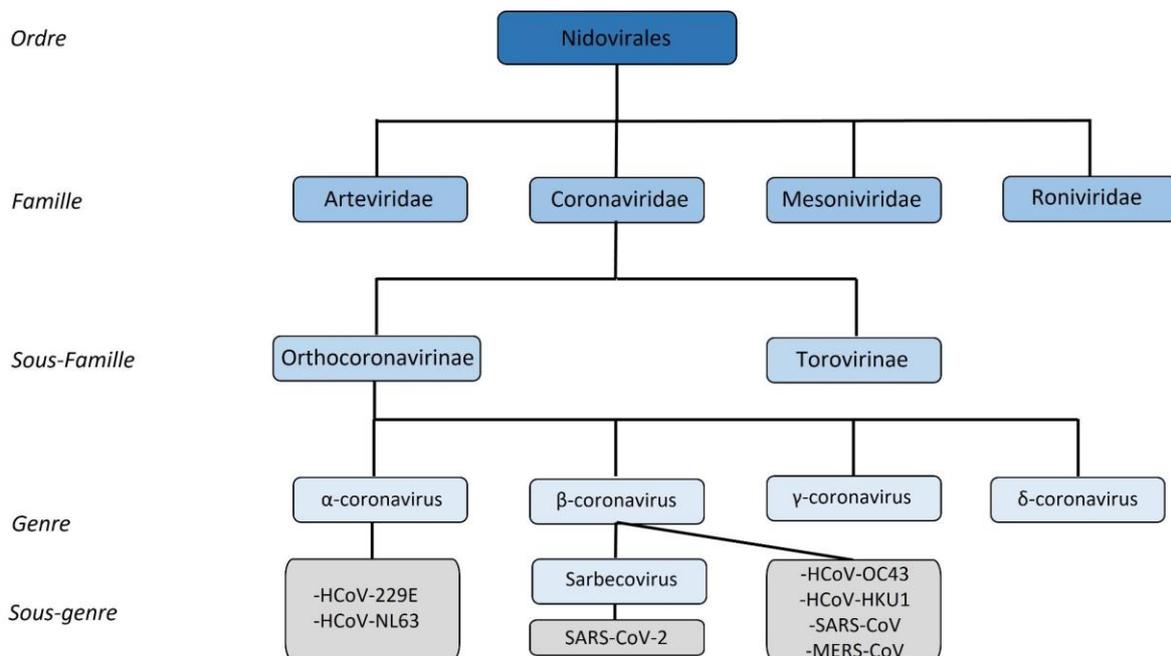


Figure 3 : Classification et taxonomie de la famille des *Coronaviridae*. La sous-famille des *orthocoronavirinae* est divisée en 4 genres : alpha-, bêta-, gamma- et delta-coronavirus. On retrouve deux coronavirus capables d’infecter l’homme appartenant au genre alpha-coronavirus avec le HCoV-229E et -NL63. Le genre bêta-coronavirus comporte : le HCoV-OC43, -HKU1, le SARS-CoV et le MERS-CoV. Le SARS-CoV-2 appartenant au genre des bêta-coronavirus et au sous genre sarbecovirus.

Sept coronavirus décrits à ce jour peuvent infecter les humains, causant des manifestations cliniques allant du rhume commun à des infections respiratoires mortelles. Quatre coronavirus humains sont endémiques : HCoV-229E et HCoV-NL63 appartenant au genre alpha-coronavirus et HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 au genre bêta-coronavirus. Ils sont capables d’infecter une grande diversité d’hôtes et peuvent causer des infections des tractus respiratoires haut et bas (Vabret et al., 2009). Trois bêta-coronavirus hautement pathogènes ont causé des infections respiratoires sévères, le SARS-CoV, le MERS-CoV, avec des taux de mortalité respectifs de 10% et 30% et récemment le SARS-CoV-2 qui appartient au sous-genre sarbecovirus.

Les coronavirus constituent un sujet de recherche majeur étant donné la mortalité viro-induite associée à une grande capacité de causer des épidémies au sein de la population humaine (Chan et al., 2013; Cheng et al., 2007).

C) Transmission des coronavirus chez l’Homme

Les coronavirus ont une grande aptitude à franchir la barrière d’espèce. Les souches SARS-CoV et MERS-CoV proviendraient de l’évolution de souches respectivement présentes chez la civette palmée et le dromadaire (Cui et al., 2019). Bien que la polymérase virale possède une activité de relecture car la NSP14 possède une exonucléase qui corrige les erreurs d’incorporation, des

mutations ponctuelles peuvent avoir lieu (environ 10^6 par nucléotide et par cycle de réplication), conférant à leur génome une certaine plasticité et un potentiel évolutif significatif. Pour exemple, Guan et al en 2003 ont montré que le génome du virus HCoV-OC43 était phylogénétiquement proche (à 90%) du génome du coronavirus bovin. Cette transmission inter-espèces serait due à des recombinaisons homologues. De plus, la proximité entre l'Homme et l'animal augmenterait la probabilité d'une transmission inter-espèce (Guan et al., 2003).

Considéré comme une zoonose, l'origine du SARS-CoV-2 a été récemment proposée. Une étude française a montré que le virus était très proche phylogénétiquement du virus de chauve-souris (RaTG13) et également d'un coronavirus retrouvé chez le pangolin. La théorie, similaire à celles établies pour le SARS-CoV et le MERS-CoV, est que le SARS-CoV-2 proviendrait originellement de la chauve-souris, considéré comme le réservoir naturel, en passant par un hôte intermédiaire : le pangolin (Temmam et al., 2022).

Le SARS-CoV-2 peut infecter des personnes de tous âges et genres. La transmission de ce virus peut s'effectuer de plusieurs manières ; (1) directe, par transmission de gouttelettes respiratoires, d'un individu infecté à un individu sain (les individus infectés pouvant être symptomatiques ou asymptomatiques) ; (2) indirecte, par contact avec une surface infectée (fomites) ; (3) par transmission verticale, de la mère à l'enfant (Kumar et al., 2021; Musa et al., 2021; Raschetti et al., 2020). Toutefois, les voies de transmissions incluant le lait maternel, la voie sexuelle et la transmission *via* les larmes et sécrétions conjonctivales, considérées comme un potentiel risque d'infection, n'ont pas été démontrées (Q. Hu et al., 2021; Meyerowitz et al., 2021). Les principales transmissions directes ou indirectes entre individus, par voie aérienne, sont représentées sur la figure 4 (Harrison et al., 2020).

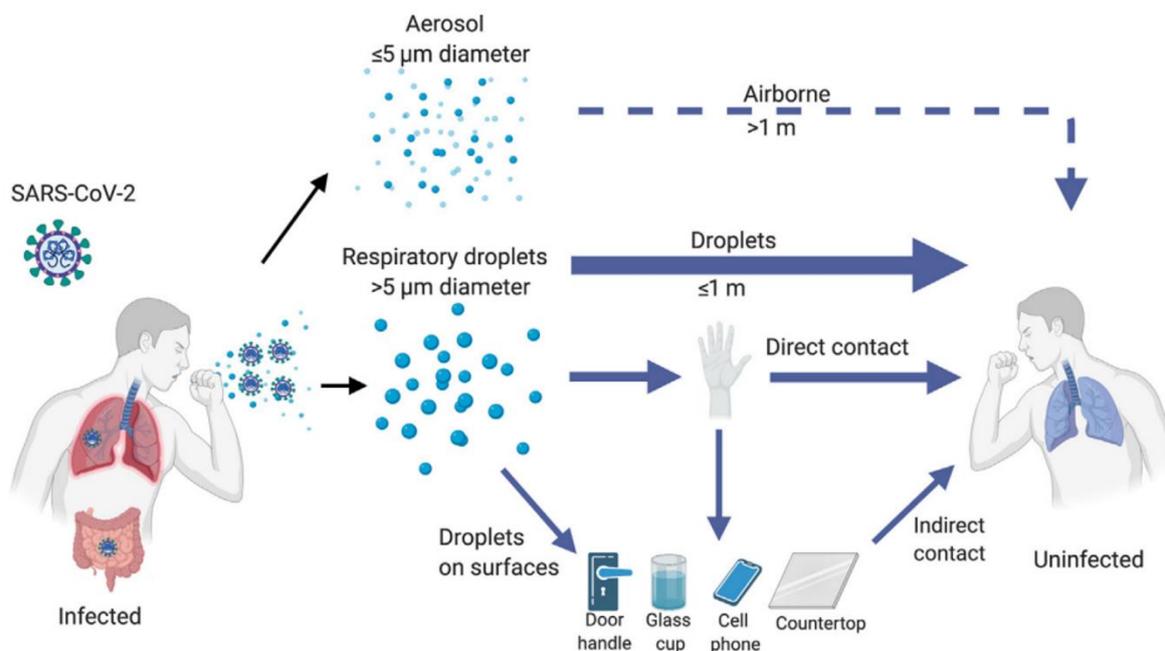


Figure 4 : Principales voies de transmission interhumaine du SARS-CoV-2 (Harrison et al., 2020).

Un individu malade peut produire des gouttelettes respiratoires de tailles différentes : les particules de diamètre $>5 \mu\text{m}$ se retrouvent sur les surfaces et peuvent infecter des individus sains à proximité. Les particules de taille $<5 \mu\text{m}$ (aérosols) se retrouvent dans l'air ambiant pour une durée plus longue. Avec la ventilation, ces particules vont se propager et se mêler à l'air ambiant et sont alors capables d'infecter des personnes saines à distance.

D) Aspect systémique de la COVID-19

La COVID-19 est une pathologie caractérisée initialement en tant que maladie respiratoire. Bien que les symptômes prédominants soient liés à une infection de l'épithélium nasal du tractus respiratoire haut pour migrer vers les poumons et le tractus respiratoire bas, les composants viraux (ARN et protéines virales) ont également été détectés dans d'autres organes et fluides biologiques, suggérant ainsi un caractère systémique de l'infection (Trypsteen et al., 2020).

L'appareil respiratoire est le premier site d'infection du SARS-CoV-2. De fait, le virus a été détecté dans des lavages broncho-alvéolaires chez les premiers patients identifiés le 24 janvier 2020. La présence de particules virales a été rapidement montrée au sein des différentes parties de l'arbre respiratoire : le nez, le pharynx, la trachée et les poumons. Les premières analyses d'écouvillons nasopharyngés ont démontré la présence d'une plus grande concentration de virus en comparaison avec les écouvillons oraux pharyngés. Ceci suggère une entrée du virus initiale au niveau de la cavité nasale (Gupta et al., 2020; Synowiec et al., 2021). Par la suite, l'apparition de

symptômes cliniques extra-pulmonaires chez les patients infectés par le SARS-CoV-2 a suggéré la présence du virus dans de nombreux organes : les poumons (tractus respiratoire bas), la trachée, les intestins, la peau, les reins, le pancréas, le cerveau et enfin le cœur (Liu et al., 2021; Shen et al., 2022).

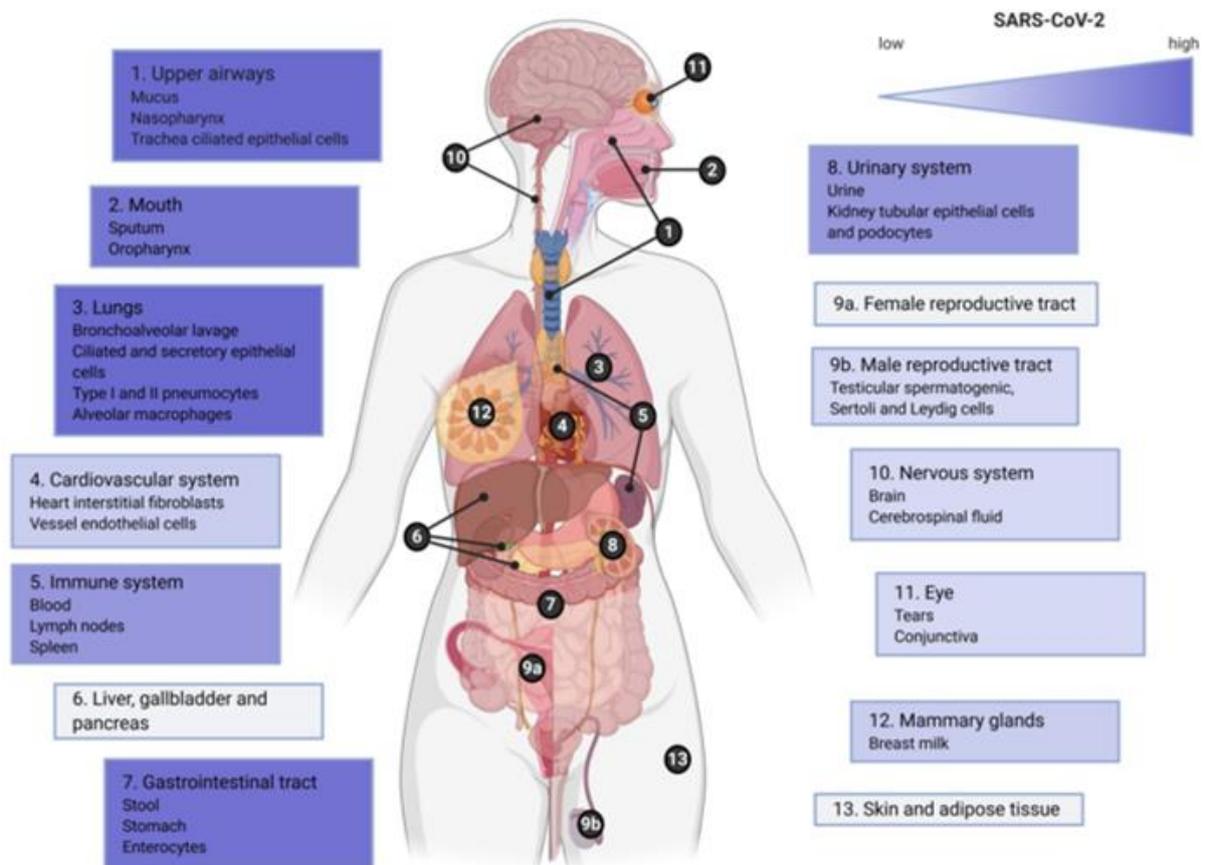


Figure 5 : Détection du SARS-CoV-2 dans les différents organes et fluides biologiques du corps humain. Détection de l'ARN viral par RT-qPCR, de l'ARN ou des protéines virales par immunofluorescence, microscopie électronique, immunohistochimie. Figure adaptée de (Trypsteen et al., 2020).

E) Aspects virologiques

a) Structure de la particule virale

Les particules virales de SARS-CoV-2 ont une taille d'environ 100 nm de diamètre. Leur aspect en couronne, visible au microscope électronique, est à l'origine de leur appellation « coronavirus » et est dû aux projections de protéines Spike (S) (Neuman et al., 2006). Structuralement, la particule virale possède une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées 3 protéines : la glycoprotéine de surface spike (S), la protéine de membrane (M) et la protéine d'enveloppe (E). A l'intérieur de la particule virale, la nucléoprotéine (N), constitue la quatrième protéine structurale du virion (Pizzato et al., 2022).

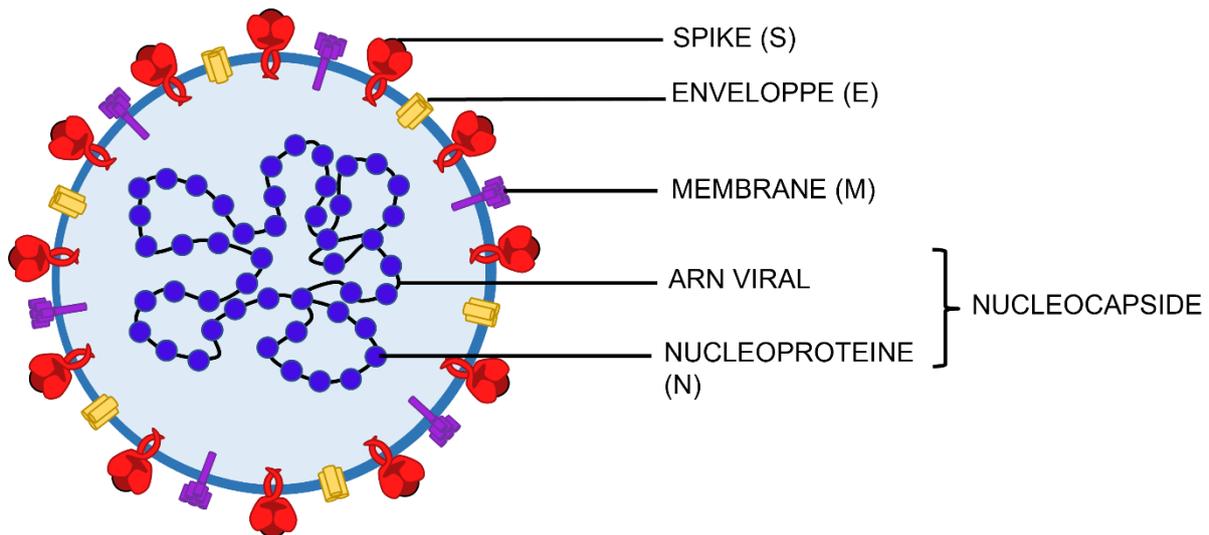


Figure 6 : Structure de la particule virale du coronavirus (SARS-CoV-2). La particule virale est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées spike (S), la protéine de membrane (M) et la protéine d'enveloppe E. A l'intérieur de la particule virale, on retrouve l'ARN viral entouré par la nucléoprotéine (N), cet ensemble forme la nucléocapside (BioRender).

b) Génome du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN simple brin de polarité positive, non segmenté et enveloppé, d'environ 29 800 nucléotides, ce qui le classe parmi les plus grands virus à ARN connus à ce jour. L'ARN viral est protégé par la nucléoprotéine (N) formant une nucléocapside de forme hélicoïdale (de Haan et al., 2002). Les extrémités 5' et 3' de l'ARN viral constituent des régions non-traduites, (NT, « *Untranslated region, UTR* »), formant des structures secondaires essentielles pour la réplication et la transcription (Yang and Leibowitz, 2015). La région 5'-NT contient cinq structures en tige-boucles (SL1-SL5; « *stem-loop* »), dont SL3 abritant la séquence de régulation transcriptionnelle (TRS-L), essentielle pour la génération des ARNm sous-génomiques (Miao et al., 2021). L'ARN viral possède une coiffe m⁷Guanosine à son extrémité 5' non-traduite (NT) et une queue polyadénylée (polyA) en 3'-NT.

Le génome est organisé en 14 cadres ouverts de lecture (« *Open Reading Frame, ORF* ») codants 27 protéines structurales et non-structurales (Wu et al., 2020). Des séquences TRS uniques (« *body-TRS* ») se situent en amont de chaque gène structural (Kim et al., 2020). (**Figure 7**).

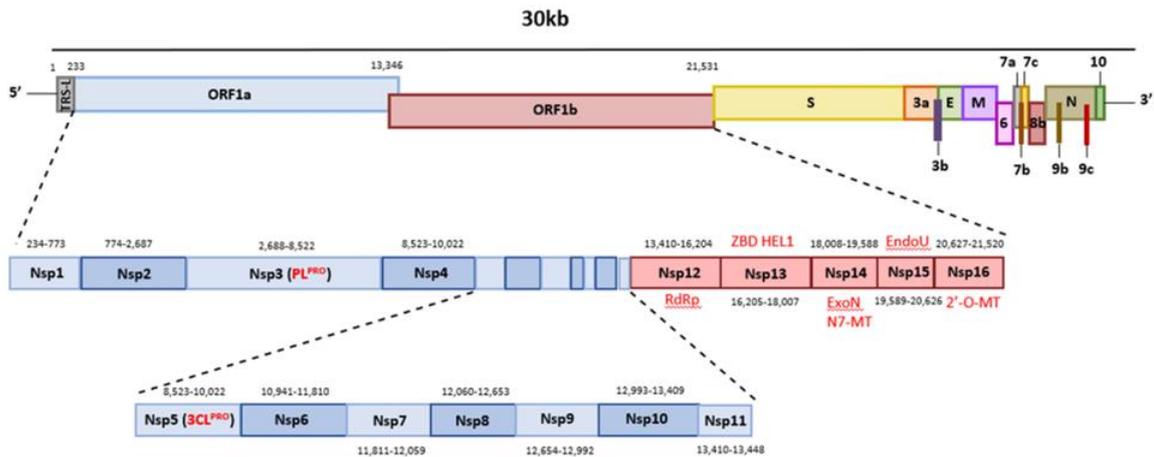


Figure 7 : Organisation du génome viral du SARS-CoV-2. Le génome comprend une région 5' Leader non traduite (NT). Les deux premiers tiers du génome correspondent aux ORF1a et ORF1b (rouge et bleu). Ainsi, la région de 233 à 13,346 nucléotides code les protéines non structurales NSP1 à NSP16. Le dernier tiers correspond aux gènes codant les protéines structurales, S, E, M et N et les protéines accessoires. Les fonctions principales des protéines non structurales sont indiquées sur le schéma. TRS-L : séquence régulatrice de transcription « leader », PLPRO : « papain-like proteinase » ; 3CLPRO : « 3C-like proteinase » ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante ; ZBD : « zinc-binding domain » ; HEL1 : « superfamily 1 helicase » ; ExoN : exoribonucléase ; N7-MT : « M7-methyl transferase » ; endoU : « uridylate-specific endoribonuclease » ; 2'-O-MT : 2'O-méthyl transférase. Figure réalisée par BioRender.

Deux cadres ouverts de lecture ORF1a et ORF1b couvrent approximativement 67% du génome complet. Ces ORF sont chevauchants, et codent 16 protéines non structurales (NSP 1-NSP16). Le tiers restant du génome viral code les protéines structurales S, E, M et N et 10 protéines accessoires (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8a, ORF8b, ORF9b, ORF9c, ORF10).

c) Protéines virales

i. Les protéines non structurales des coronavirus (NSP)

La traduction des ORF1a et ORF1b à partir du génome viral peut donner les deux polyprotéines virales pp1a (NSP1-11) et pp1ab (NSP1-16). La description de ce mécanisme est indiquée dans le chapitre traitant de la traduction (page 34). Dans le cas du SARS-CoV-2, on considère que pp1a est approximativement 1,4 à 2,2 fois plus traduit que pp1ab (Finkel et al., 2021).

NSP1

NSP1 joue un rôle important au cours du cycle de vie du SARS-CoV-2. Cette protéine, de 19,8 kDa perturbe fortement les fonctions biologiques de la cellule-cible en réprimant l'expression de gènes cellulaires. Dans le cas du SARS-CoV-1, NSP1, qui présente une homologie de séquence de 84% avec NSP1 de SARS-CoV-2, est un facteur de virulence majeur qui interagit avec la petite sous-

unité 40S du ribosome, entraînant l'arrêt de la traduction d'ARNm cellulaires, à la fois *in vitro* et *in cellulo*, et réduisant ainsi la réponse immunitaire (Schubert et al., 2020; Thoms et al., 2020).

NSP2

Dans le cas du SARS-CoV-1, il a été montré que NSP2 (70,5 kDa) interagissait avec les prohibitines 1 et 2 (PHB1 et PHB2) qui sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire, la migration et la différenciation cellulaire. L'interaction de NSP2 avec PHB1 et PHB2 pourrait jouer un rôle dans la réplication virale en modifiant l'environnement de la cellule hôte (Cornillez-Ty et al., 2009). Une étude structurale récente a montré que la région N-terminale de NSP2 contenait 3 structures en doigts de zinc (Ma et al., 2021), qui permettraient à la protéine d'interagir avec des ARNs. Ceci renforce l'hypothèse d'une autre fonction de NSP2 dans l'initiation de la traduction des ARN messagers viraux par interaction avec le complexe de réplication/transcription (« replication transcription complex », RTC) (Gupta et al., 2021).

NSP3

La protéine NSP3 est une protéine multi-domaine de 200 kDa qui possède :

- un domaine « ubiquitin-like» (Ubl1) capable de lier l'ARN viral à la nucléocapside,
- Un macro-domaine dans la région 3 de la protéine, qui serait capable d'inhiber l'immunité innée via l'inversion de la protéine ADP ribose (Russo et al., 2021)
- un domaine protéase de type papaine dans la région 8 de NSP3 (« papain-like protease » (PLpro)) (Gao et al., 2021), qui clive NSP1, NSP2 et NSP3 elle-même, maturant ainsi la polyprotéine virale. NSP3 clive également des protéines de l'hôte telles que l'ISG15 au niveau de résidus ubiquitinylés (lysine en position 48), affaiblissant ainsi l'activité antivirale induite par l'interféron (Klemm et al., 2020; Lei et al., 2018).
- Enfin, la région 11 permettrait l'ancrage du complexe de réplication viral aux vésicules doubles-membranes dérivées du réticulum endoplasmique (DMVs « double-membrane vesicles »), site de la synthèse active d'ARN viral (Lei et al., 2020a; Roingeard et al., 2022).

NSP4

De nombreuses études sur les virus ARN ont montré un rôle important des domaines transmembranaires des protéines non structurales dans la réplication virale. Dans le cas du SARS-CoV-1, il a été montré que l'interaction entre NSP3 et NSP4 *via* leur domaines transmembranaires était cruciale pour la réplication au sein des DMVs (Sakai et al., 2017). De plus, Xu et al. (2009) ont montré la localisation de NSP4 à la membrane du réticulum endoplasmique, puis son recrutement

au sein du complexe de réplication dans les cellules infectées par le SARS-CoV-1. L'ensemble de ces données suggère que NSP4 jouerait un rôle dans l'assemblage du complexe de réplication (RTC) des coronavirus.

NSP5

NSP5 possède un domaine « 3-Chymotrypsin-Like protease » (3CLpro) participant au clivage des polyprotéines virales afin de donner des protéines fonctionnelles individualisées NSP4 à NSP16, indispensables au cycle de vie du virus (Law et al., 2007). En outre, dans le cas de SARS-CoV-1, NSP5 induit la production de cytokines et de chemokines dans les cellules humaines de poumons. Un rôle similaire a été montré pour SARS-CoV-2 avec l'activation par NSP5 de la SUMOylation de la protéine MAVS (« Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein »), entraînant une augmentation de l'expression de cette dernière et induisant la voie NF κ B (W. Li et al., 2021). Cette étude a permis l'identification du rôle crucial de NSP5 dans la régulation de la réponse immunitaire innée, en induisant la synthèse de cytokine *via* l'activation de la voie NF κ B.

NSP6

Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, NSP6 participe à la formation du complexe de réplication/transcription (RTC) avec NSP3 et NSP4. De plus, Benvenuto et al. (2020) ont montré que des mutations présentes dans NSP6 pourraient affecter la structure et la stabilité de cette protéine et ainsi modifier la pathogénicité du SARS-CoV-2. Cependant, la fonction exacte de ces mutations reste encore à élucider.

NSP7/NSP8

Ces deux protéines non structurales sont les co-facteurs de l'ARN polymérase ARN dépendante NSP12 du virus SARS-CoV-2. Le complexe « core » de la sous unité catalytique de NSP12 se lie à l'hétérodimère NSP7-8 et à une sous unité additionnelle de NSP8 au niveau d'un autre site de liaison (Peng et al., 2020). Cette interaction jouerait un rôle dans la thermostabilité de la polymérase.

NSP9

D'une longueur de 110 acides aminés, la protéine virale NSP9 a été beaucoup étudiée dans les années 2000. Dans le cas de l'infection par le HCoV-229E et le SARS-CoV-1, NSP9 est active sous forme homodimérique et est capable de se lier à des acides nucléiques de manière non spécifique,

avec une plus grande affinité pour les ARN simples brins (Ponnusamy et al., 2008; Sutton et al., 2004). Cependant, sa fonction n'est pas encore bien décrite, bien que sa structure ait été publiée (Miknis et al., 2009).

NSP10

La structure cristallographique de NSP10 a été montrée dans le cadre de l'infection par le SARS-CoV-1. Cette protéine non structurale possède une forte affinité pour les ARN, *via* ses motifs en doigts de zinc (Joseph et al., 2007). Plus récemment, il a été mis en évidence l'interaction de NSP10 avec les protéines NSP14 et NSP16, régulant ainsi leur fonction (détaillé ci-après) (Bouvet et al., 2012, 2010).

NPS12

La protéine virale non structurale NSP12 constitue l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale, associée à ses deux co-facteurs NSP7 et NSP8. Elle est essentielle pour la synthèse d'ARNs viraux (Subissi et al., 2014). NSP12 contient également un domaine *Nidovirus RdRp Associated Nucleotidyltransferase* (NiRAN) séparé de la RdRp par un domaine d'interface (Hillen et al., 2020). Ce domaine possède une activité de liaison aux nucléosides triphosphates (Dwivedy et al., 2021). Dans le cas de l'infection par le SARS-CoV-2, NSP12 atténue la réponse interféron de type I en inhibant la translocation d'IRF3 au noyau (W. Wang et al., 2021).

NPS13

NSP13 contient deux domaines importants : un domaine hélicase et un domaine RNA 5' triphosphatase. Le complexe NSP10-13-14-16 participerait à la formation de la coiffe au niveau de l'extrémité 5-NT du génome viral. De plus, NSP13 jouerait un rôle dans l'évasion à la réponse immunitaire en antagonisant la signalisation de l'interféron (IFN), plus particulièrement en empêchant la phosphorylation de STAT1 et de STAT2 induite par l'INF_β (Fung et al., 2022; Xia et al., 2020; Yuen et al., 2020).

NSP14

NSP14 joue un rôle crucial dans la synthèse de l'ARN viral. Son activité 3'-5' exonucléase permet la correction des ARN synthétisés (Gribble et al., 2021). Grâce à son domaine guanine-N7-méthyltransférase, NSP14 joue aussi un rôle dans le rajout de la coiffe 5'UTR des ARN avec les co-

facteurs NSP10 et NSP16 (Chen et al., 2011; Minskaia et al., 2006; Ogando et al., 2020; Snijder et al., 2003).

NSP15

NSP15 contient un domaine endoribonuclease (endoU), très conservé chez les coronavirus, permettant le clivage des ARN au niveau des bases uridines. Cette fonction fait de NSP15 une protéine non structurale importante dans la pathogenèse des coronavirus (Saramago et al., 2022). En effet, cette RNase est responsable de la dégradation des ARN double brin, empêchant leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Deng et al., 2017; Kindler et al., 2017).

NSP16

L'activité 2'-O-méthyl transférase (2'-O-MTase) de NSP16 permet la formation de la coiffe et, dans le cas de l'infection par le SARS-CoV-1, le complexe NSP10-16 pourrait participer à la synthèse d'ARN viral (Decroly et al., 2011), (Bouvet et al., 2012).

L'ensemble des fonctions connues pour les protéines virales non structurales des coronavirus est résumé dans le tableau 2 ci-dessous :

Protéines non structurales (NSP)	Fonctions connues	Références
Nsp1	Inhibition de la machinerie de traduction et de la production des facteurs immunitaires de l'hôte Inhibe la traduction des ARNm de l'hôte	Thoms et al., 2020 Schubert et al., 2020
NSP2	Interagit avec des ARN Perturbation de la fonctions et morphologie des mitochondries Perturbation de la prolifération cellulaire	Gupta et al., 2021 Cornillez-Ty et al., 2009 Ma et al., 2021
NSP3	Ubl1 liaison à l'ARN viral ADP ribose (ADPr) PL ^{Pro} clivage des polyprotéines virales Ancrage de NSP3 aux DMVs	Lei et al., 2018 Gao et al., 2021 Klemm et al., 2020
NSP4	Assemblage au niveau du complexe de réplication et des DMVs	Sakai et al., 2017 Xu et al., 2009
NSP5	3CL ^{Pro} clivage des polyprotéines de NSP4 à NSP16 Induction de NF-KB en dérégulant MAVS	Law et al., 2007 Li et al., 2021
NSP6	Affecte l'autophagie virale	Benvenuto et al., 2020
NSP7/NSP8	Co-facteur de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp)	Peng et al., 2020
NSP9	Liaison aux acides nucléiques	Ponnusamy et al., 2008 Sutton et al., 2004 Miknis et al., 2009
NSP10	Motif en doigts de zinc permettant sa liaison aux ARN Interaction avec NSP14 et NSP16	Joseph et al., 2007 Bouvet et al., 2010, 2012
NSP11	Inconnu	
NSP12	ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) Région NiRAN Atténuation de la réponse INF-I	Subissi et al., 2014 Hillen et al., 2020 Wang et al., 2021
NSP13	Formation de la coiffe en 5'-NT	Yuen et al., 2020
NSP14	Fidélité de la RdRp Cofacteur de NSP10	Minskaia et al., 2006 Snijder et al., 2003
NSP15	Bloque la réponse interféron	Yuen et al., 2003
NSP16	Forme un complexe avec NSP10 Participe à la formation de la coiffe en 5'-NT	Decroly et al., 2011 Bouvet et al., 2012

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des fonctions des différentes protéines non structurales du SARS-CoV-2

ii. Les protéines structurales des coronavirus

Spike (S)

L'entrée du SARS-CoV-2 est dépendante de la protéine structurale Spike (S) qui donne sa forme en couronne à la particule virale. Spike est organisée en trimère et est considérée comme une protéine de fusion de classe I, car elle participe à la fois à la reconnaissance du récepteur de la cellule hôte, mais aussi à la fusion des membranes cellulaires et virales. Cette protéine est composée d'environ 1300 acides aminés, et est subdivisée en deux sous unités contenant des régions portant des fonctions essentielles pour l'entrée virale (Figure 8).

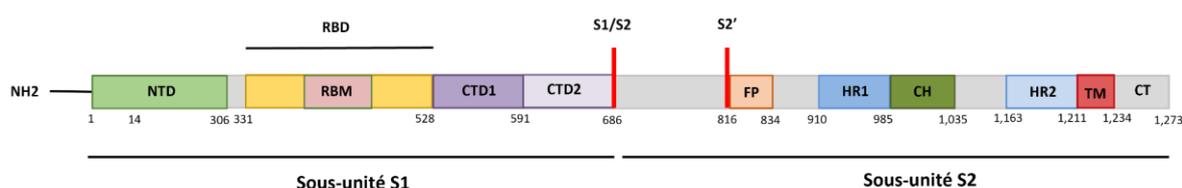


Figure 8 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine Spike du SARS-CoV-2. La protéine Spike est composée de deux sous-unités : S1 et S2, qui comportent les composants fonctionnels majeurs pour l'entrée virale : NTD (vert clair) ; RBM (« Receptor Binding Motif », rose) ; CTD1 et CTD2 (« Carboxy-terminal domain » 1 et 2, en violet) ; FP (« Fusion Peptide », orange) ; HR1, HR2 (« Heptad Repeat » 1 et 2, bleu) ; CH (« Central Helix », vert foncé) ; TM (« Transmembrane domain », rouge) ; CT (« cytoplasmic tail », gris). Les traits rouges correspondent aux deux sites de clivages de spike en position 686 et 816 (S1/S2 et S2' respectivement). Le domaine RBD (« Receptor Binding Domain ») contient la région RBM.

La sous unité S1 de S du SARS-CoV-2 (pos.1 – 686 acide aminés) est subdivisée en deux sous-domaines, le NTD (« N-terminal domain ») et le CTD (« C-terminal domain ») qui comporte le domaine de liaison au récepteur ACE-2 (« receptor-binding domain », RBD) *via* la région RBM (« receptor-binding motif », motif de liaison au récepteur).

La sous-unité S2 contient le peptide hydrophobe de fusion (« fusion peptide », FP), deux domaines de répétition « heptad repeat » (HR1 et HR2), un domaine transmembranaire (« transmembrane domain », TM) et une queue cytoplasmique (« cytoplasmic tail », CT).

Le mécanisme de fusion est initié par l'interaction des RBDs de Spike avec le récepteur cellulaire ACE2. Des clivages protéolytiques de spike -décrits plus loin dans le manuscrit (page 40)- sont essentiels pour permettre la libération du domaine S1 (Figure 9 – étape 1), l'extension de HR1 et l'ancrage du peptide de fusion dans la membrane plasmique de la cellule hôte (figure 9 – étape 2). L'interaction entre HR1 et HR2 entraîne la formation d'une structure en épingle à cheveux

rapprochant les membranes virales et cellulaires (figure 9 – étape 3). L'association de HR1 et HR2 permet la formation d'un pore qui va progressivement s'élargir. L'ensemble de ce phénomène permet la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule (figure 9 – étape 4) (Jackson et al., 2022; Rajah et al., 2022; Tang et al., 2020; Walls et al., 2017).

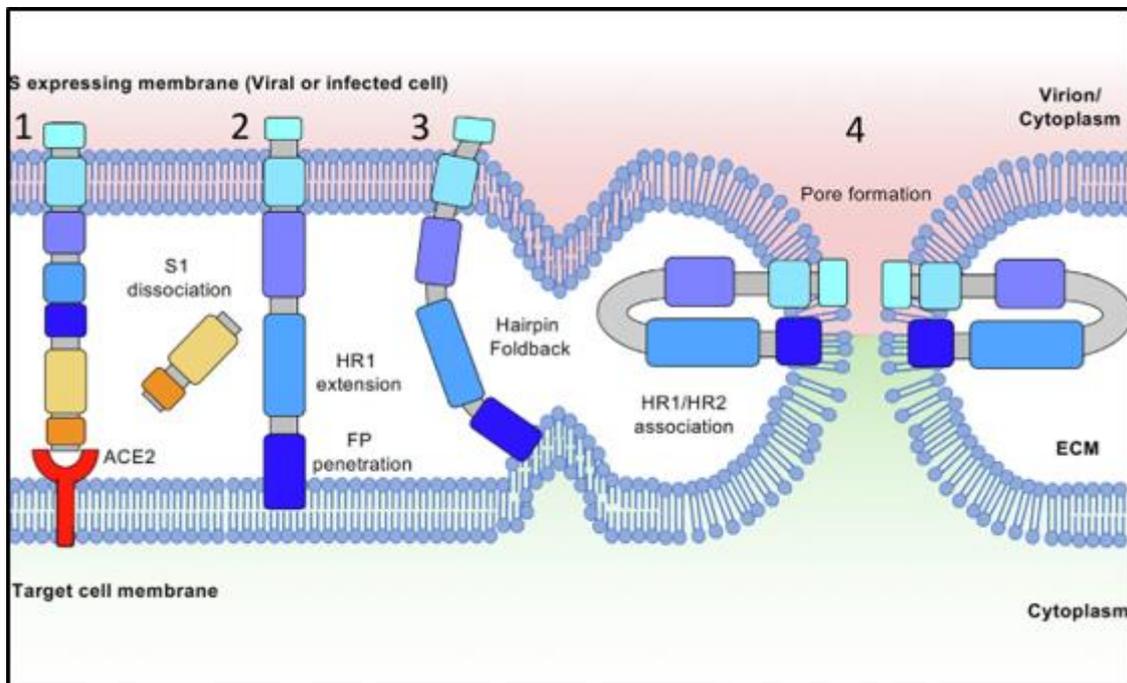


Figure 9 : Mécanisme moléculaire de la fusion des membranes virales et cellulaires. (1) La protéine Spike s'associe avec ACE-2 via ses RBDs. (2) Le domaine S1 se dissocie de spike, conduisant à l'extension du domaine HR1 permettant au peptide de fusion (FP) de s'enfoncer dans la membrane plasmique de la cellule cible. (3) Les domaines HR1 et HR2 se rejoignent en formant une structure en épingle à cheveux rapprochant les membranes cellulaires et virales. (4) L'association de HR1 et HR2 permet la formation d'un pore membranaire permettant au génome viral d'être libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Protéine d'enveloppe (E)

La protéine d'enveloppe est la plus petite des protéines structurales, mais aussi la moins étudiée. Elle est très conservée dans les différents sous-types viraux. D'environ 100 acides aminés, elle possède un domaine hydrophobe et interagit avec M afin d'assurer le maintien de la structure de la particule virale du SARS-CoV-2 (Alsaadi et al., 2020; El Omari et al., 2019). Comme dans le cas du SARS-CoV-1, la protéine E du SARS-CoV-2 pourrait être impliquée dans de nombreux mécanismes importants pour la pathogenèse virale, tels que l'assemblage et la courbure de la membrane pour le relargage des virions néo-synthétisés (Cao et al., 2021; Nieto-Torres et al., 2014).

Protéine de membrane (M)

La protéine M des coronavirus est la protéine structurale la plus abondante. Elle est constituée d'un ectodomaine N-terminal glycosylé, de trois domaines transmembranaires et d'un endodomaine C-terminal. L'interaction entre M et les autres protéines structurales est essentielle pour l'assemblage et le relargage des particules virales en dehors de la cellule hôte (Tseng et al., 2010)). Enfin, les protéine M et E interagissent *via* leurs domaines C-terminaux et cette interaction est suffisante pour la formation des VLP (« Virus-Like Particle ») (Lu et al., 2007; Mortola and Roy, 2004; Sullivan et al., 2022).

Nucléoprotéine (N)

La nucléoprotéine est une phosphoprotéine de 422 acides aminés (46 kDa) composée d'une région N-terminale (NTD) et d'une région C-terminale (CTD). Ces régions sont séparées par des régions intrinsèquement désordonnées (« Intrinsically Disordered Regions », IRD) modulant l'interaction avec des ARNs (Chang et al., 2014, 2006). N possède deux fonctions principales : (i) elle interagit avec l'ARN viral pour former une nucléocapside compacte de forme hélicoïdale ; (ii) elle régule la transcription d'ARN viraux (Carlson et al., 2020). La nucléoprotéine peut être amenée à interagir avec les protéines structurales au cours de l'assemblage et du relargage des virions en dehors de la cellule hôte.

d) Cycle de vie des coronavirus

Entrée virale

L'interaction entre la protéine Spike (S) du virus et le récepteur cellulaire détermine le tropisme du virus.

La première étape du cycle est l'attachement de la protéine S d'un coronavirus *via* son RBD avec le récepteur cellulaire. Le HCoV-229E utilise comme récepteur l'aminopeptidase N (APN), HCoV-OC43 l'acide N-acétylneuraminique (« N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid ») et le MERS-CoV la Dipeptidyl peptidase 4 (DDP4). Enfin, le HCoV-NL63, SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2 utilisent l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE-2) dont les caractéristiques seront détaillées dans la suite de ce manuscrit (Belouzard et al., 2012; Fehr and Perlman, 2015; Hoffmann et al., 2020). Le cycle viral du SARS-CoV-2 débute par l'attachement du virus à son récepteur cellulaire (Figure 11 - étape 1). On notera, que la neuropiline-1 (NRP1) a récemment été proposée comme un co-récepteur de SARS-CoV-2 (Cantuti-Castelvetri et al., 2020).

Comme dans le cas du SARS-CoV-1, le SARS-CoV-2 peut entrer dans la cellule de deux manières : (i) par fusion TMPRSS2-dépendante avec la membrane plasmique de la cellule-cible, ou (ii) par la voie endosomale. L'acidification du pH au sein de l'endosome entraîne l'activation des cathépsines B ou L qui permettront finalement la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale et la libération du génome viral dans le cytoplasme. Ces mécanismes d'entrée dépendent de la disponibilité de protéases cellulaires et seront approfondis plus loin dans le manuscrit (page 40). L'ARN viral du SARS-CoV-2 est coiffé et polyadénylé, il peut donc être directement pris en charge par la machinerie cellulaire de traduction (Jackson et al., 2022; Shang et al., 2020).

Traduction

Une fois l'ARN viral libéré dans le cytoplasme (figure 11 – étape 2), il sera traduit par les ribosomes cellulaires pour donner deux polyprotéines : pp1a et pp1ab (figure 11 - étape 3). La séquence correspondant à ORF1A se termine par un codon stop, et par conséquent la polyprotéine de type pp1a est majoritairement synthétisée. Pp1a sera maturée par action de protéases virales en protéines non-structurales NSP1-11. Un glissement du ribosome au niveau de la séquence charnière entre ORF1A et ORF1B entraîne un décalage du cadre ouvert de lecture et permet au ribosome de poursuivre la traduction de ORF1B pour former la polyprotéine de type pp1ab qui donnera l'ensemble des 16 protéines non structurales (NSP1-16). Le clivage des polyprotéines est assuré par les protéases virales nsp3 (Mpro) et nsp5 (CLpro). Les 16 protéines non structurales sont notamment nécessaires pour former : (i) le complexe de réplication/transcription (« replication/transcription complex », RTC), (ii) les vésicules doubles-membranes (« double-membrane vesicles », DMV), qui sont des altérations de la composition du réticulum endoplasmique (RE) où a lieu la réplication virale (Ben Hu et al., 2021; Malone et al., 2022; V'kovski et al., 2021; Wong and Saier, 2021).

Réplication/transcription

Le génome viral ARN positif pleine longueur va servir de matrice pour la synthèse d'un brin d'ARN négatif (antigénome). Ce dernier va à son tour servir de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN viraux de polarité positive pleine longueur qui peuvent être encapsidés dans de nouvelles particules virales (figure 11 - étape 4a).

En parallèle, à partir du génome viral ARN positif pleine longueur, une transcription discontinue peut se mettre en place selon le modèle de Sawicki et Sawicki (Sawicki and Sawicki,

1995) (figure 10). Au cours de la synthèse du brin négatif, la polymérase virale nsp12 rencontre des séquences TRS (« Transcription Regulatory Sequences ») situées en amont des ORFs codant les protéines virales structurales dans le dernier tiers du génome, du côté de l'extrémité 3'-NT. La polymérase virale peut alors arrêter la synthèse de brins négatifs puis la reprendre à une TRS localisée au niveau de la séquence « leader » à l'extrémité 5'-NT du génome (figure 10). Ce mécanisme permet la formation d'ARN sous génomiques (ARNsg (-)) de polarité négative (3'-5') (figure 11 - étape 4b) qui vont servir de matrice pour la formation d'ARN messagers viraux sous-génomiques, de polarité positive, qui seront finalement traduits pour donner les protéines virales structurales, S, E, M et N, nécessaires à la formation des nouveaux virions (Sola et al., 2015)(figure 11 - étape 5).

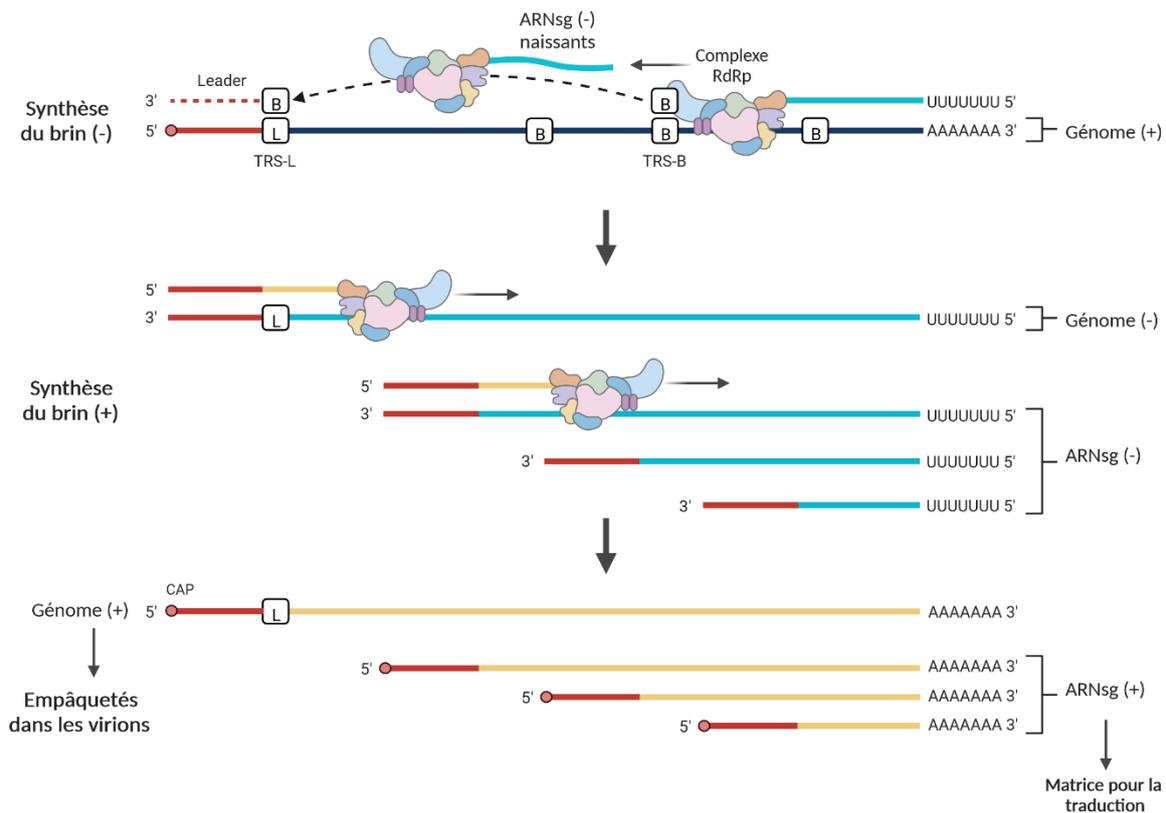


Figure 10 : Représentation des étapes de répllication et de transcription des coronavirus. A partir du génome (+), la RdRp synthétise un antigénome (-) qui va servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes. Au cours de la synthèse de cet ARN (-), la RdRp peut s'arrêter au niveau d'une TRS pour la reprendre à une TRS localisé au niveau de la séquence « leader ». Ce mécanisme donne naissance à des ARN sous génomiques de polarité négative (ARNsg (-)) qui vont pouvoir être pris en charge par la machinerie cellulaire pour synthétiser des protéines structurales et accessoires nécessaires à la formation des nouveaux virions. L'ARN (+) est synthétisé à partir du brin d'ARN (-) et va pouvoir être directement encapsidé dans les nouvelles particules virales.

Assemblage

Une fois traduites, les protéines structurales S, E et M vont transiter par la membrane du réticulum endoplasmique et migrer jusqu'au compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi. A la lumière de l'ERGIC (« Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment »), la protéine N va interagir avec les brins d'ARN nouvellement synthétisés pour former la nucléocapside (figure 11 - étape 6) et avec les protéines structurales (figure 11 - étape 7). Les virions néoformés vont alors être libérés par un processus d'exocytose (figure 11 - étape 8).

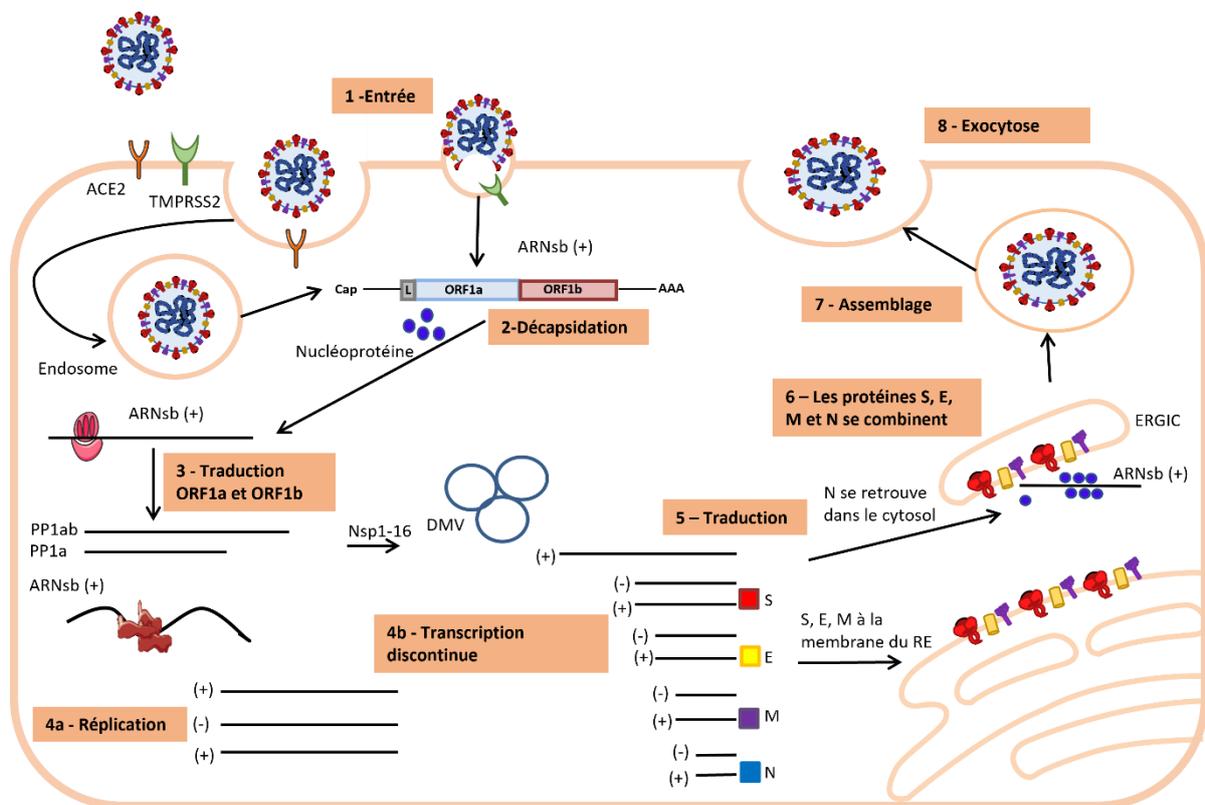


Figure 11 : Cycle de vie du SARS-CoV-2. (1) L'entrée virale débute par l'attachement du virus au récepteur ACE-2. Le virus rentre (i) soit par fusion à la membrane plasmique, (ii) soit par la voie endosomale, en fonction des protéases cellulaires disponibles. Le génome viral est libéré dans le cytoplasme ; (2) décapsidation, séparation de l'ARN viral et de la protéine N ; (3) le génome viral (coiffé et polyadénylé) est pris en charge par les ribosomes cellulaires et la traduction des polyprotéines ORF1a et ORF1b est réalisée. Les protéines non structurales nouvellement synthétisées forment les usines de réplication, après clivages par les protéases virales NSP3 et NSP5 ; (4a) le génome viral pleine longueur de polarité (+) est répliqué (-) pour former de nouveaux génomes ARN pleine longueur de polarité (+) qui pourront être encapsidés ; (4b) la transcription discontinuée permet la synthèse d'ARN sous-génomiques (-) et des ARN messagers viraux (+) de différentes longueurs, qui seront traduits (5) en protéines structurales ; (6) l'assemblage des protéines S, E, M et N se fait au niveau de l'ERGIC et le nouveau virion est assemblé (7) ; (8) les nouveaux virions se retrouvent dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'exocytose.

F) Rôle des facteurs cellulaires au site d'infection par le SARS-CoV-2

a) Le récepteur cellulaire ACE-2

Le SARS-CoV-2 infecte initialement le tractus respiratoire supérieur. L'analyse d'une cohorte de patients atteints de la COVID-19 a montré une expression élevée du récepteur ACE-2 dans les cellules de l'épithélium respiratoire supérieur (Chua et al., 2020). Ces données sont corrélées par une analyse *via* « single-cell RNA-sequencing », indiquant une forte expression d'ACE-2 dans les cellules en gobelet et ciliées de l'épithélium nasal (Sungnak et al., 2020b). Ces cellules de l'épithélium nasal constituent probablement le site initial d'infection par SARS-CoV-2 (Ravindra et al., 2020).

De plus, les cellules alvéolaires épithéliales de type II (pneumocytes de type II, AT2), impliquées dans la sécrétion du surfactant des alvéoles pulmonaires, expriment significativement ACE-2 (Zhao et al., 2020). Ceci indique que ces cellules de l'épithélium alvéolaires pourraient constituer un second site d'infection.

La protéine ACE-2 a également été détectée dans différentes régions extra-pulmonaires telles que le cœur, les reins, l'endothélium des vaisseaux sanguins et les intestins (Trypsteen et al., 2020) (Figure 12).

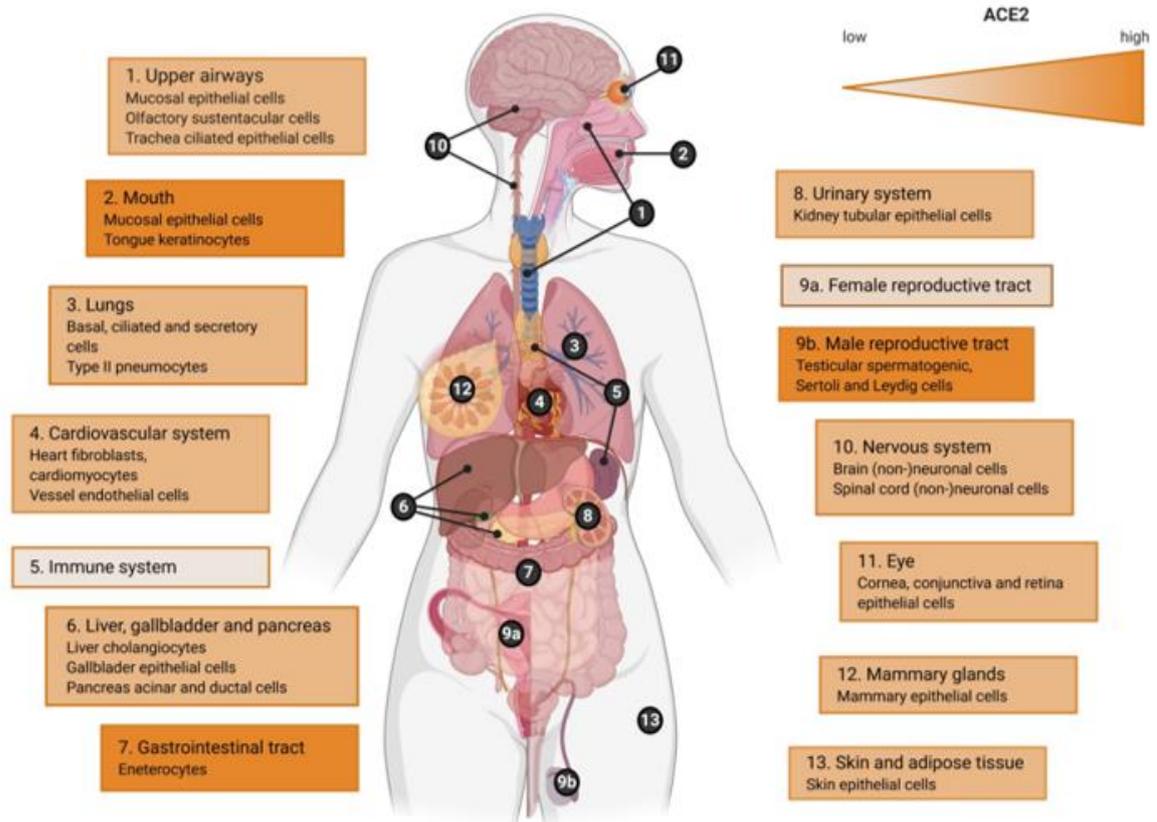


Figure 12 : Niveaux d'expression d'ACE2 dans le corps humain analysé par « single-cell RNA sequencing » (Trypsteen et al., 2020).

En 2005, des chercheurs se sont intéressés au rôle du récepteur ACE-2 dans l'infection par le SARS-CoV-1. Dans un modèle murin, Yang et al ont montré que la surexpression d'ACE-2 aggravait la maladie associée à l'infection par ce coronavirus, démontrant que l'entrée virale était une étape cruciale dans la pathogénicité (Yang et al., 2007). Cependant, ces lésions étaient atténuées dans le cas de l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation rénine-angiotensine (Imai et al., 2005). Par la suite, l'implication du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS, « Renin-Angiotensin-Aldosterone System »), dans l'apparition de lésions sévères au niveau des poumons à la suite de l'infection par SARS-CoV-1 a été largement étudiée. Il a été montré que la diminution de la biodisponibilité de ACE-2, suite à son interaction avec la protéine virale Spike du SARS-CoV-1, contribuait à l'apparition de lésions sévères dans les poumons (Kuba et al., 2005).

En effet, dans un contexte physiologique, le RAAS est un système hormonal régulant la pression artérielle, l'équilibre hydrique et électrolytique, ainsi que la résistance vasculaire systémique (Li et al., 2017). Dans ce système, ACE-2 fonctionne comme une carboxypeptidase en

clivant un résidu de l'angiotensine I (Ang I), générant les peptides Ang1-7 (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000).

L'Ang II est formé par action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) sur l'Ang I et peut (i) se lier aux récepteurs AT1R et AT2R ou (ii) être clivée -principalement- par ACE-2 en peptides plus petits Ang 1-7 agissant directement sur un autre récepteur : MasR (« Mitochondrial Assembly Receptor »), générant une vasodilatation qui entraîne une diminution globale de l'inflammation, du stress oxydatif et des lésions des poumons, ainsi que dans les autres organes (figure 13A). En outre, les deux voies connues de RAAS possèdent des actions opposées : (i) la voie AngII - AT1R - AT2R est une voie pro-inflammatoire ; (ii) la voie Ang II - Ang (1-7) - MasR inhibe les actions de la voie Ang II - AT1R - AT2R et est anti-inflammatoire (Lubel and Garg, 2020; Zambelli et al., 2015).

Au cours de l'infection, la protéine Spike se lie au récepteur ACE-2 qui ne peut plus jouer son rôle dans le la métabolisation de l'AngII en Ang 1-7. Ainsi, la voie AngII – AT1R – AT2R n'est plus bloquée par la voie ACE2-Ang – 1-7 – MASR et ce déséquilibre provoque des lésions pulmonaires (Figure 13B) (Caputo et al., 2022; Chen et al., 2022; Matsuzawa et al., 2022)

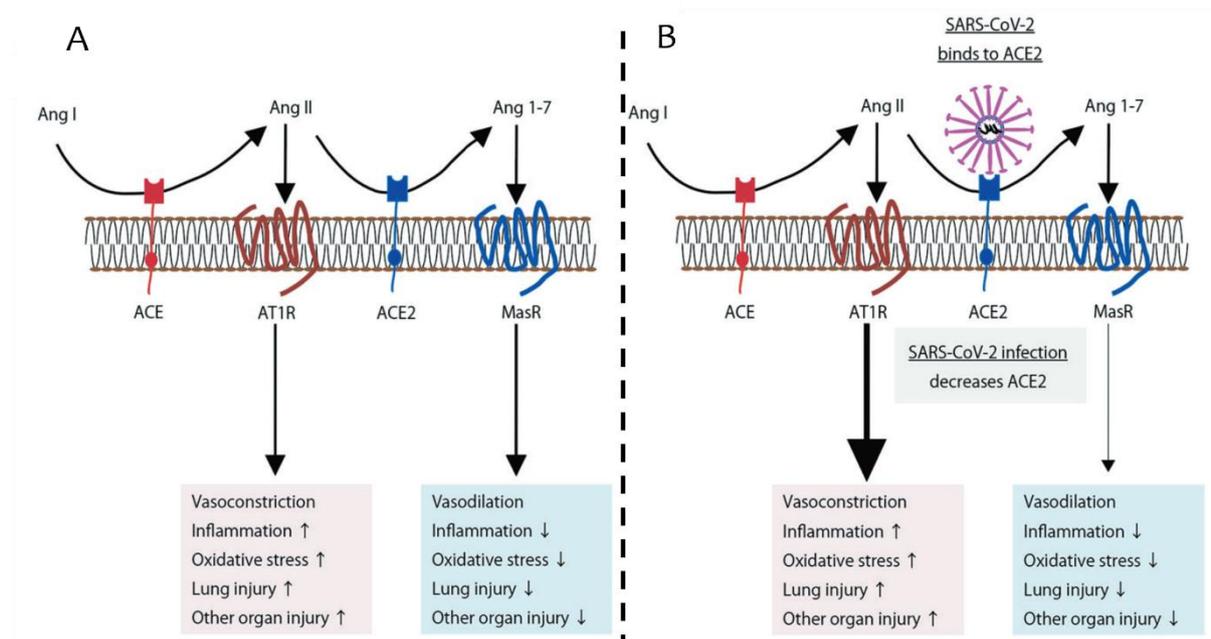


Figure 13 : Système rénine angiotensine aldostérone (RAAS). (A) Dans des conditions physiologiques, l'angiotensine II (AngII) est formée par l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) sur l'angiotensine I (AngI). L'AngII peut se fixer sur le récepteur AT1R ou bien être métabolisé par ACE2 en Ang 1-7 qui se fixe alors sur le récepteur MasR. Ces deux voies forment un équilibre entre la vasoconstriction et la vasodilatation. (B) Dans les conditions d'infection, le SARS-CoV-2 se fixe sur ACE2, empêchant ainsi son rôle dans le métabolisme de l'AngII. Ce phénomène favorise la voie de vasoconstriction et augmente l'inflammation et les lésions tissulaires (Matsuzawa et al., 2022).

b) Protéases cellulaires et protéine virale Spike

L'entrée du SARS-CoV dans la cellule-cible peut se faire selon deux mécanismes d'entrée : (i) la fusion à la membrane plasmique (« early pathway ») et/ou (ii) la voie endosomale (« late pathway »). Ces deux mécanismes impliquent un changement de conformation de la protéine Spike (pré-fusion à post-fusion) qui est induit par des clivages protéolytiques séquentiels au niveau de deux sites spécifiques.

Spike de SARS-CoV-1

Le premier clivage permet le « priming » (activation) de Spike et a lieu au site charnière S1/S2 par action de la protéase cellulaire TMPRSS2 (pos. 667) (Belouzard et al., 2009). D'autres protéases pourraient jouer un rôle dans le « priming », dont la protéase HAT (Human Airway Trypsin-like protease) (pos. 667) et la cathépsine L (pos. 678), protéase endosomale dont le fonctionnement nécessite un pH acide. Dans ce dernier cas, ceci suggère un « priming » de Spike dans l'endosome (Belouzard et al., 2010).

Le second clivage constitue le « triggering », qui correspond au déclenchement de la fusion des membranes cellulaires et virales. Le clivage TMPRSS2-dépendant au niveau du site S2' de Spike (à l'intérieur de la sous-unité S2, pos. 797) est essentiel (Belouzard et al., 2012; Walls et al., 2016, 2017).

Spike de SARS-CoV-2

Alors que de nombreuses études ont montré que l'affinité de la protéine Spike^{SARS-CoV-2} pour ACE-2 était comparable, voire inférieure à celle de Spike^{SARS-CoV-1} (Ou et al., 2020; Shang et al., 2020; Walls et al., 2020), il a aussi été déterminé que le RBD^{SARS-CoV-2} présentait une plus grande affinité pour ACE-2 que le RBD^{SARS-CoV-1} (Yan et al., 2020). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par des changements conformationnels de Spike du SARS-CoV-2.

En effet, des études de microscopie cryo-électronique ont révélé l'existence de plusieurs conformations possibles au sein de la structure du trimère de Spike de SARS-CoV-2 en état de pré-fusion (figure 14). En conformation « fermée » de Spike, le RBD est inaccessible pour ACE2 (Benton et al., 2020). Afin d'interagir avec ACE2, Spike doit d'être dans une conformation « ouverte », avec des RBD exposés.

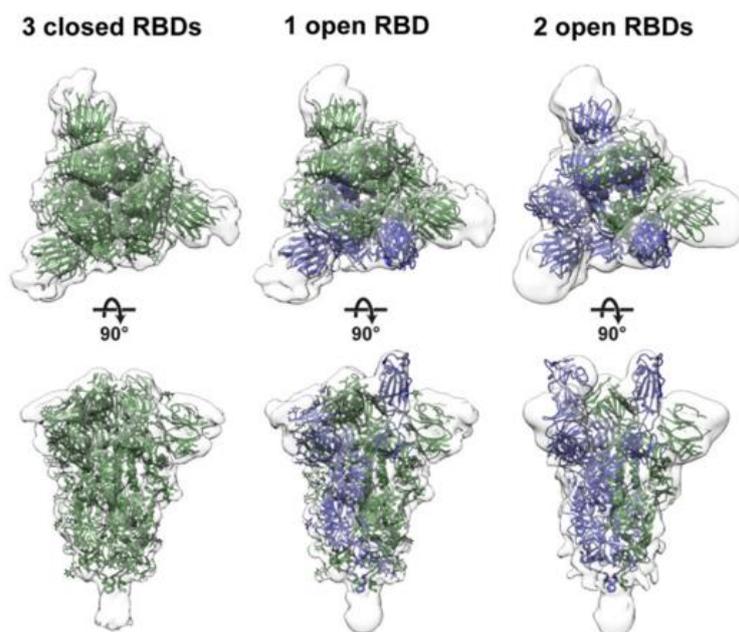


Figure 14 : Analyse structurale du trimère de spike du SARS-CoV-2. (Ke et al., 2020)

Le passage de la conformation « fermée » à « ouverte » de la protéine trimérique spike nécessite des clivages par les protéases de l'hôte, dont l'expression/disponibilité influence le tropisme du virus (Cai et al., 2020; Millet and Whittaker, 2015). Comme pour le SARS-CoV, la protéine Spike de SARS-CoV-2 subit deux clivages protéolytiques : le « priming » au niveau du site S1/S2 afin d'activer la protéine spike et de permettre une conformation « ouverte » exposant le RBD. Le « triggering » au site S2' localisé du domaine S2 qui va exposer le peptide de fusion et permettre la fusion des membranes virales et cellulaires (Tortorici and Velesler, 2019; Whittaker et al., 2021) (figure 14).

Très rapidement après l'émergence du SARS-CoV-2, l'utilisation de lignées cellulaires exprimant TMPRSS2 (Matsuyama et al., 2020) ou de camostat mésylate, un inhibiteur de sérine protéases, a montré un rôle essentiel de TMPRSS2 dans l'entrée du virus (Hoffmann et al., 2020). De manière intéressante, d'autres protéases comme TMPRSS11D/13 seraient impliquées dans le clivage de spike nécessaire pour l'entrée du SARS-CoV-2 (Kishimoto et al., 2021). TMPRSS2 cliverait la protéine Spike du SARS-CoV-2 au site S2' en position 815 (Bestle et al., 2020). Le rôle de la cathepsine L dans l'entrée de SARS-CoV-2 a également été montré par l'utilisation de modèles cellulaires dépourvus de TMPRSS2 (VERO-E6) et des inhibiteurs spécifiques de cathepsines (dont le E64d) (Bestle et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Ou et al., 2020; W. Wang et al., 2021). Ainsi SARS-CoV-2 utilise la voie d'entrée endosomale.

Enfin, l'analyse des séquences de la protéine S du SARS-CoV-2, en comparaison avec le SARS-CoV-1, a montré la présence d'un motif polybasique de 12 nucléotides situé au niveau du site S1/S2 (PRRAR). Les recherches de Bestle et al. ont démontré que ce site était sensible aux clivages par la furine, une proprotéine convertase (PC) intracellulaire, présente dans le trans-golgi, capable de cliver au niveau de résidus basiques (Seidah et al., 2012). Ceci avait déjà été montré chez MERS-CoV (bêta-coronavirus), qui subit des clivages protéolytiques par la furine aux sites S1/S2 et S2' et le virus de la bronchite infectieuse (IBV, « Infectious Bronchitis Virus », gamma-coronavirus) (Millet and Whittaker, 2015).

Le clivage par la furine au site S1/S2 pourrait servir pour pré-activer les virions SARS-CoV-2 nouvellement synthétisés. Ce mécanisme faciliterait l'entrée du virus dans d'autres types cellulaires pauvres en protéases TMPRSS2 ou en cathepsines (Shang et al., 2020).

Les structures de pré-fusion des trimères de S du SARS-CoV-2 ont été caractérisées : (i) soit après expression ectopique et purification des formes solubles de S, (ii) soit sur des virions intacts produits après infection de cellules VERO-E6 ou Calu-3 (Ke et al., 2020; Walls et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Dans ce dernier cas, il a été montré que 45-55% des virus sécrétés se retrouvaient avec un seul RBD exposé et deux RBDs enfouis, et dans 30/40% des cas avec trois RBD en position enfouie (Ke et al., 2020) (figure 14). Ce phénomène permettrait au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Ke et al., 2020; Xu et al., 2021).

c) Rôle de l'environnement cellulaire de la cavité nasale lors de l'infection par SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 peut utiliser deux voies d'entrée pour infecter une cellule-cible : (i) la voie de fusion à la membrane plasmique (« early pathway ») qui est dépendante de TMPRSS2, et (ii) la voie endosomale (« late pathway »), dépendante des cathepsines. Il est considéré que la cavité nasale est le site initial de l'infection par SARS-CoV-2 car les prélèvements naso-pharyngés de patients contiennent plus de virus que les échantillons oro-pharyngés (Gupta et al., 2020).

Le tractus respiratoire est subdivisé en deux parties : (i) le tractus respiratoire haut contenant la cavité nasale, le larynx et le pharynx ; (ii) le tractus respiratoire bas contenant la trachée, les bronches et les poumons (Figure 15a) (Cone, 2009).

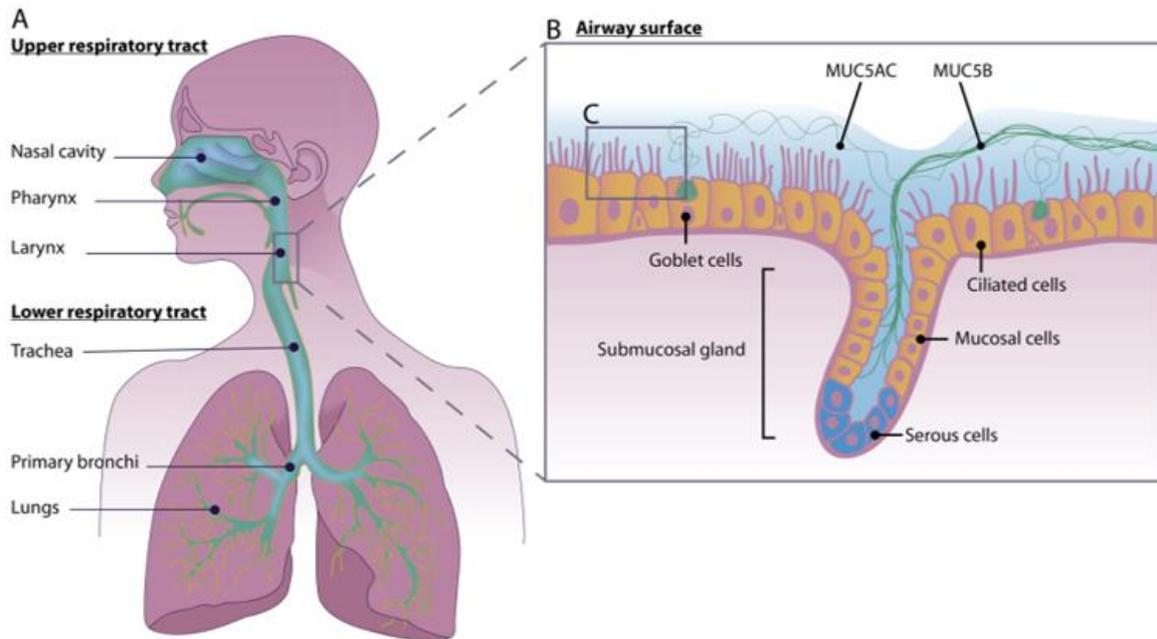


Figure 15 : Schéma du tractus respiratoire et de l'épithélium nasal humain. (A) Le tractus respiratoire haut contient la cavité nasale, le pharynx et le larynx tandis que le tractus respiratoire bas contient la trachée, les bronches et les poumons. (B) L'épithélium nasal est composé de glandes sous-muqueuses, de cellules en gobelet, basales, ciliées et d'une couche de mucus.

L'épithélium nasal est composé de plusieurs types cellulaires, dont les glandes sous-muqueuses, les cellules en gobelet (participant à la sécrétion de mucus), basales et ciliées, ainsi qu'une couche de mucus protectrice (Figure 15b). En 2020, l'analyse de l'expression génique à partir de biopsies et brossages nasaux de donneurs sains a été effectuée afin de déterminer la présence du récepteur ACE-2 et des protéases cellulaires au niveau de l'épithélium respiratoire. Sans surprise, l'ARNm d'ACE-2 et de TMPRSS2 sont retrouvés dans l'épithélium nasal, et plus particulièrement au niveau des cellules en gobelet et ciliées (Manna et al., 2022; Sungnak et al., 2020b; Ziegler et al., 2020). Ces données renforcent la pertinence de l'utilisation d'un modèle *ex vivo* de cellules épithéliales nasales humaines (CENHs) à l'interface air-liquide (ALI « Air-liquid interface ») (Sungnak et al., 2020a), capable de reproduire la physiologie de l'épithélium respiratoire nasal.

Le mucus sécrété par les cellules en gobelet représente la première barrière de défense du corps humain. Son principal rôle est l'élimination des pathogènes *via* la clairance mucociliaire (MCC « Mucociliary Clearance »), qui résulte d'une étroite collaboration entre les cellules sécrétrices de mucus et la motilité des cils des cellules ciliées. La MCC permet le transport et le renouvellement du mucus hors de la surface de l'épithélium nasal (Cone, 2009; Fernández-Blanco et al., 2018; Janssen et al., 2016). Le principal composant du mucus est la mucine, codée par plus de 22 gènes

identifiés chez l'Homme. Au niveau de l'épithélium nasal, MUC5AC et MUC5B constituent les mucines solubles sécrétées par les cellules en gobelet, et MUC1, MUC4 et MUC16 sont les mucines transmembranaires exprimées au niveau apical de toutes les cellules de l'épithélium (Lillehoj et al., 2013; Smith et al., 2020; Zou et al., 2020).

Au cours de l'infection par le SARS-CoV-2, la première barrière biologique que ce virus va rencontrer est le mucus. Les cellules en gobelet et ciliées représentent le site de primo-infection du virus et la clé pour la compréhension de la transmission. Cependant, cette barrière n'est pas imperméable puisque le gel de mucine, composé de pores d'environ 500 nm, est suffisamment large pour laisser pénétrer des particules virales dont la taille est comprise entre 30 et 200 nm de diamètre (Cone, 2009; Fahy and Dickey, 2010; Janssen et al., 2016).

G) Les vésicules extracellulaires

a) Les petites vésicules extracellulaires

Les petites vésicules extracellulaires (« small extracellular vesicles », sEVs) sont présentes dans de nombreux fluides biologiques (Ibrahim and Marbán, 2016), notamment : le sang (Chen et al., 2010), les lavages broncho alvéolaires (Kesimer et al., 2009; Levänen et al., 2013), le fluide cérébro-spinal (Street et al., 2012), les ascites (Runz et al., 2007), la salive, la sueur, le sperme, les urines (Fernández-Llama et al., 2010), les larmes, le lait maternel (Admyre et al., 2007) ou encore le mucus nasal (Lässer et al., 2016, 2011b, 2011a; Wu et al., 2015) (Figure 16).

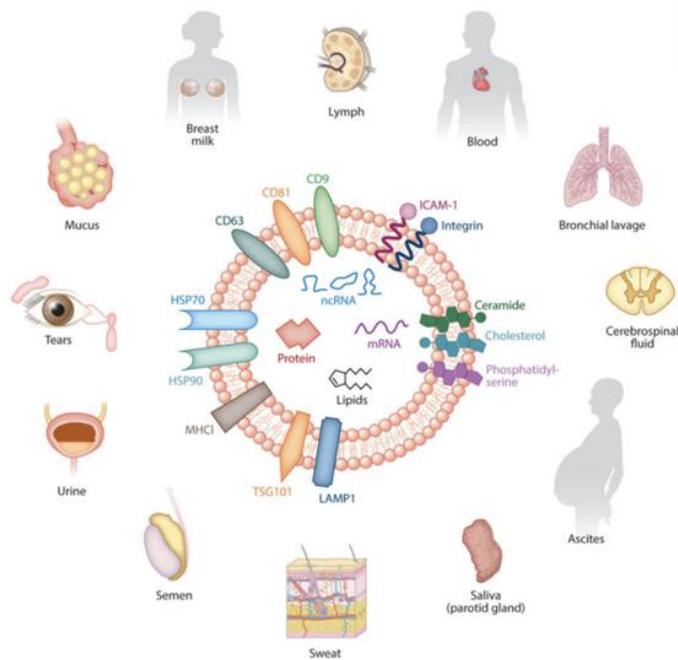


Figure 16 : Sécrétion des petites vésicules extracellulaires par différents organes et dans différents fluides biologiques. Les sEVs sont retrouvées dans la lymphe, le sang, les lavages broncho alvéolaires, le fluide cérébro-spinal, l'ascite, la salive, la sueur, le sperme, les urines, les larmes, le mucus et le lait maternel (Adapté de (Ibrahim and Marbán, 2016))

i. Caractéristiques et composition

Considérées comme les “poubelles de la cellule” (Pan et al., 1985), les vésicules extracellulaires, nom attribué en 1987 par Johnstone (Johnstone et al., 1987), jouent un rôle essentiel dans la communication intercellulaire courte et longue distance dans le corps humain (Akers et al., 2013). Les vésicules extracellulaires (« extracellular vesicles », EVs) sont divisées en 3 sous-groupes selon leur critère de taille et de biogenèse (Pegtel et al., 2014) : les sEVs (« small extracellular vesicles », exosomes), les IEVs (« large extracellular vesicles », microvésicules) et les corps apoptotiques. Le terme IEVs (microvésicules de taille comprise entre 100 nm et 1 µm) réfère généralement aux vésicules qui bourgeonnent directement de la membrane plasmique. Enfin le terme corps apoptotiques (50nm à 5µm) correspond aux vésicules provenant directement d'une cellule en apoptose (Caruso and Poon, 2018; van Niel et al., 2018).

D'une taille inférieure à 200 nm de diamètre, les sEVs présentent des cargos diversifiés, entourés d'une bicouche lipidique, comprenant majoritairement des protéines, des ARNs codants et non-codants tels que des microARNs (Zomer et al., 2010) qui leur permettent de moduler l'expression de gènes dans des cellules réceptrices (Thakur et al., 2014; Théry et al., 2018; van Niel et al., 2022) et de nombreux lipides tels que le cholestérol, la céramide ou encore des phosphatidylsérines (Subra et al., 2010). Les protéines les plus courantes retrouvées dans la

membrane vésiculaire appartiennent à la classe des transporteurs membranaires ou des protéines de fusion telles que les tétraspanines (CD63, CD9, CD81), des protéines chaperonnes (HSP) et des marqueurs endosomaux (Alix) (Zakharova et al., 2007).

Du fait de leur rôle essentiel dans la communication cellule-cellule, les sEVs représentent une piste thérapeutique majeure. On peut citer 3 axes principaux :

- Il a été montré que les sEVs sécrétées à partir de cellules cancéreuses transféraient un contenu altéré dans des cellules réceptrices saines, et jouaient un rôle dans la progression tumorale (Thakur et al., 2014; van Niel et al., 2022; Zhang and Yu, 2019).
- Le contenu des vésicules circulant dans le sang pourrait représenter un marqueur important dans le diagnostic de nombreuses maladies (Doyle and Wang, 2019; Kalluri and LeBleu, 2020).
- Enfin, de nombreux travaux tendent à utiliser les exosomes comme outil thérapeutique en utilisant : (i) leur capacité de ciblage de cellules spécifiques, (ii) leur capacité de délivrance dans le cytoplasme et, (iii) dans le cas des affections du système nerveux central, leur capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (Wiklander et al., 2019)

ii. Biogenèse et fonctions

Les sEVs constituent l'une des classes les plus étudiées de vésicules extracellulaires ("extracellular vesicles", EVs). Ils trouvent leur origine dans le réseau de la voie endosomale qui commence avec (i) la déformation de la membrane plasmique qui forme des endosomes précoces (« early endosomes »), puis (ii) leur maturation en endosomes tardifs (« late endosomes ») par bourgeonnement vers l'intérieur de vésicules intraluminales (ILV « intraluminal vesicles ») (figure 17). Les corps multi-vésiculaires ainsi formés peuvent avoir deux destins différents : ils sont soit dégradés par fusion avec un lysosome, soit relargués dans le milieu extracellulaire après fusion avec la membrane plasmique. Ce sont ces ILV qui seront nommées exosomes ou sEVs une fois sécrétées (figure 17). Les microvésicules d'une taille supérieure à 200 nm sont des vésicules formées par un processus de bourgeonnement de la membrane plasmique. Enfin, les corps apoptotiques sont beaucoup plus grands, de 1 à 5 µm et sont générés à partir d'une cellule en cours d'apoptose (figure 17).

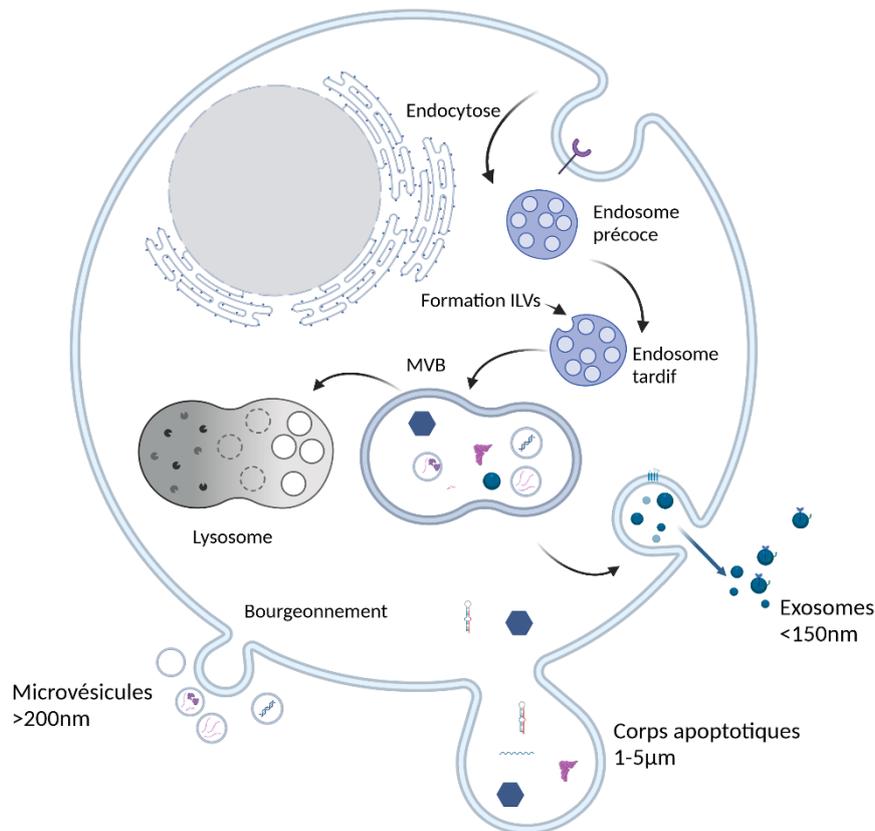


Figure 17 : Biogenèse des petites vésicules extracellulaires. Les exosomes (petites vésicules extracellulaires) sont d'origine endosomale et sont caractérisés par un diamètre de 50-150 nm. Les microvésicules, de 100 à 500 nm de diamètre sont générées par bourgeonnement ou exocytose de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques d'une taille comprise entre 1 et 5 µm sont générés par le décollement de la membrane plasmique des cellules en cours d'apoptose. Figure adaptée sur Biorender.

La formation des ILVs peut se faire par 2 mécanismes (figure 18) :

(i) la voie classique, celle de l'ESCRT (« Endosomal Sorting Complex Required for Transport ») qui désigne une machinerie d'environ 30 protéines divisées en 4 complexes. L'ESCRT-0 reconnaît et séquestre les protéines transmembranaires ubiquitinées à la membrane endosomale, puis les répartit en microdomaines (Hanson and Cashikar, 2012). Il se lie ensuite au complexe ESCRT-I, qui à son tour recrute ESCRT-II. Les deux complexes entament alors la déformation de la membrane en bourgeons. Ce mécanisme permet aux protéines cytosoliques et aux ARN d'entrer dans les vésicules en formation. Le complexe ESCRT-II recrute ensuite ESCRT-III au sein des vésicules en formation et provoque un clivage de la membrane plasmique nécessaire pour libérer les vésicules intraluminales, tandis que les molécules d'ubiquitine et les sous-unités ESCRT sont libérées dans le cytosol

pour leur recyclage (D'Souza-Schorey and Schorey, 2018; Hanson and Cashikar, 2012; Schorey et al., 2015; Schorey and Harding, 2016).

(ii) la voie ESCRT-indépendante ou alternative, telles que les voies « synthetin-Alix » (Baietti et al., 2012), ainsi que des machineries tétraspanines (van Niel et al., 2011) qui appartiennent à une superfamille caractérisée par 4 domaines transmembranaires et des molécules lipidiques comme les céramides, favorisant l'invagination de la membrane (Dreyer and Baur, 2016; Urbanelli et al., 2019).

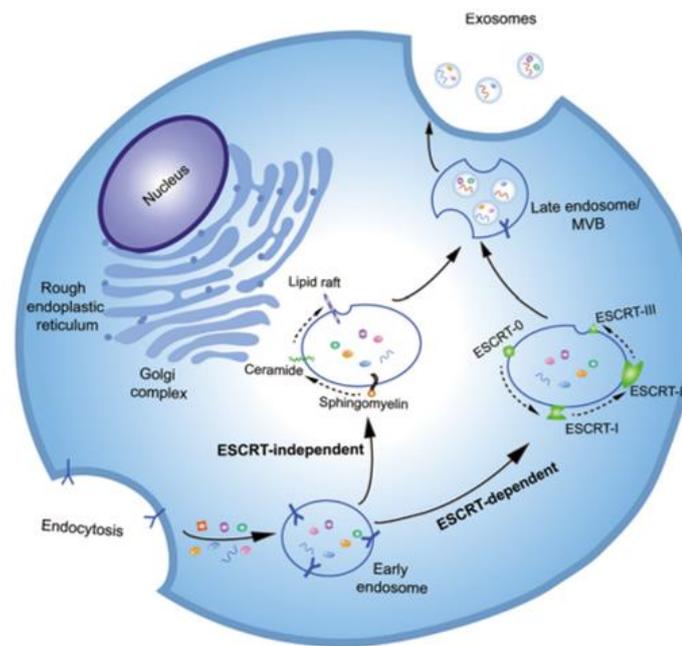


Figure 18 : Mécanismes de sécrétion des exosomes. A partir de l'invagination de la membrane plasmique, il y a la formation d'un endosome précoce qui se transforme en endosome tardif (MVB) avec des vésicules intraluminales (ILVs) par deux mécanismes : la voie ESCRT dépendante ou la voie ESCRT indépendante. Figure adaptée de (Y. Zhao et al., 2021).

Les mécanismes de sécrétion des sEVs ne sont pas totalement élucidés. Cependant, Shurer et ses collègues ont émis l'hypothèse d'un rôle du glycocalyx dont les composants pourraient déstabiliser la membrane plasmique et jouer un rôle dans le relargage des EVs

En conclusion, dans des conditions physiologiques, les petites vésicules extracellulaires (sEVs) sont impliquées dans divers processus biologiques, dont : la présentation antigénique (Raposo et al., 1996), la communication et la protection neuronale (Fauré et al., 2006), la coagulation (Berckmans et al., 2011), la cicatrisation (Biró et al., 2003), la maturation du sperme (Sullivan et al., 2005) et la régulation des réponses immunitaires contre le fœtus au cours de la grossesse (Stefanski et al., 2019).

D'autre part, les vésicules extracellulaires jouent un rôle clé dans les processus de pathogenèse incluant les cancers, les maladies auto-immunes, l'inflammation (Silverman and Reiner, 2011) et les infections virales (Schwab et al., 2015). Les agents pathogènes comme les virus semblent profiter de la tendance naturelle des cellules hôtes à libérer des vésicules extracellulaires pour transporter leur propre matériel génétique ou protéines, évitant ainsi leur reconnaissance en tant que molécules du non-soi par le système immunitaire. Elles peuvent ainsi promouvoir l'infection à l'intérieur de l'hôte.

iii. Relation des EVs avec les virus

Les EVs et les virus ont plusieurs points communs qui peuvent expliquer un intérêt de la part de la communauté scientifique : leur taille (30nm - 1000nm), leur composition structurale et biochimique (Schorey et al., 2015; Valadi et al., 2007). Les EVs et les virus partagent également des processus biologiques similaires :

- Bourgeoisement et relargage : à titre d'exemple la machinerie ESCRT est impliquée dans le bourgeoisement et le relargage des particules du VIH (Bieniasz, 2006; Morita and Sundquist, 2004). Un grand nombre de virus à ARN enveloppé, tels que les *Arénavirus*, les *Rhabdovirus*, les *Filovirus*, les *Réovirus* et les *Paramyxovirus*, utilisent la voie ESCRT-indépendante, en bourgeoisant directement *via* des domaines spécifiques de la membrane plasmique : les radeaux lipidiques enrichis en glycosphingolipides, cholestérol et céramide (Ju et al., 2021; Meng and Lever, 2021; Nguyen and Hildreth, 2000; Urata and Yasuda, 2012). Les protéines comme les tétraspanines forment un cluster avec les autres protéines transmembranaires et cytosoliques, induisant ainsi le bourgeoisement de microdomaines (Trajkovic et al., 2008). Comme le glycocalyx peut jouer un rôle dans le relargage des vésicules, il se peut aussi qu'il joue un rôle dans l'absorption de certains virus tels que Influenza A (Le Mercier et al., 2019; Shurer et al., 2019; Taghavi et al., 2022).
- Transfert de matériel biologique : En effet, EVs et virus peuvent se lier à la membrane plasmique des cellules réceptrices et après un événement de fusion, libérer leur cargo dans le cytosol, influençant ainsi l'activité cellulaire (Colombo et al., 2014).

Ces similarités entre les virus (en particulier les rétrovirus) et les vésicules extracellulaires, ont engendré des conjectures quant à leur origine. Deux théories alternatives ont été proposées :

(i) l'hypothèse du cheval de Troie, suggérant que les rétrovirus sont des vésicules qui ont évolué à la suite d'une mutation du gène « gag », qui était à l'origine codé par un rétro transposon intégré. Dans cette perspective, les caractéristiques typiques des rétrovirus auraient été acquises par divergence évolutive ; le mécanisme de biogenèse de la production des vésicules aurait été utilisé pour former les particules virales (Gould et al., 2003).

(ii) La seconde théorie n'associe pas les virus et les exosomes. Elle permet de justifier les similarités en donnant plus d'importance au phénomène de convergence évolutive qui aurait entraîné le partage des mêmes voies de biogenèse pour les vésicules et les virus (Pelchen-Matthews et al., 2004).

La ressemblance remarquable entre les EVs et les virus entraîne aussi des problèmes d'étude de modèles. Les virus et les vésicules font la même taille, il est donc difficile de les séparer par ultracentrifugation différentielle. Certains chercheurs ont donc proposé de séparer les EVs des particules virales en exploitant leur capacité de migration dans un gradient de densité ou encore en utilisant la présence de marqueurs spécifiques (Caobi et al., 2020).

iv. Rôle des vésicules dans la propagation d'infections virales (tableau 3)

Les EVs sont capables de transférer différentes biomolécules dans les cellules réceptrices. Pour exemple, on peut citer des protéines, à la fois transmembranaires et solubles, des lipides tels que la prostaglandine et la phosphatidylcholine, des acides nucléiques, notamment des microARNs et des métabolites. Tous ces composants peuvent avoir un impact à la fois sur les cellules réceptrices et à plus grande échelle sur le système immunitaire de l'hôte.

Les EVs peuvent délivrer des protéines qui rendent la cellule plus sensible à l'infection.

- VIH et la protéine nef : au cours de l'infection, cette protéine virale perturbe les fonctions cellulaires, optimise la réplication virale et limite les mécanismes de défense de l'hôte. Elle joue un rôle dans l'immunodéficience associée au SIDA. Nef est relarguée et véhiculée (Ali et al., 2010) par les sEVs, rendant les cellules cibles plus susceptibles à l'infection par le VIH (Arenaccio et al., 2015; Lenassi et al., 2010; Schaefer et al., 2008).
- EBV (« Epstein-Barr virus ») et l'oncoprotéine LMP1 (« Latent Membrane Protein 1 ») : cette protéine capable d'inhiber les cellules NK (« Natural Killer »), a été détectée dans les sEVs relarguées des cellules tumorales, supportant l'hypothèse du rôle des EVs dans la

propagation de l'infection et l'évasion de la réponse immunitaire (Flanagan et al., 2003; Meckes et al., 2010).

- HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1) et microARNs : les sEVs libérées par des cellules infectées par HSV-1 peuvent contenir des microARNs viraux (miR-H28 et miR-H29) produits tardivement durant l'infection. Lorsque ces microARN sont exprimés de manière ectopique dans les cellules humaines avant infection, ils réduisent la production des ARNm et des protéines virales. En outre, ils sont plus abondants dans les cellules latentes de réactivation. L'ensemble de ces données indique que le HSV-1 utilise des stratégies de régulation de sa propre expression pour maximiser sa propagation (Han et al., 2016).
- VHC (virus de l'Hépatite C) : les protéines virales structurales d'enveloppe E1 et E2 et l'ARN du VHC ont été retrouvées au sein des sEVs qui sont ainsi capables de transmettre l'infection aux cellules réceptrices de manière similaire aux particules virales libres (Longatti, 2015; Ramakrishnaiah et al., 2013).

v. Rôle des vésicules dans l'inhibition d'infections virales (tableau 3)

Le second rôle des EVs dans les infections virales ne se limite pas à la propagation du virus mais à la susceptibilité des EVs à induire une réponse immunitaire (Lindenbergh and Stoorvogel, 2018; Théry et al., 2009).

- EBV et propagation d'antigènes viraux : les sEVs libérées d'une cellule B infectée sont capables de stimuler le développement des cellules B chez des porteurs sains, entraînant le développement d'allergies ou de maladies auto-immunes (Gutzeit et al., 2014).
- EBV et dUTPase : le groupe d'Ariza a montré que les sEVs issues de cellules de Raji infectées par l'EBV contenaient des quantités importantes de déoxyuridine triphosphatase (dUTPase) activant la voie NFkB et la sécrétion de cytokines des cellules dendritiques (« Dendritic cells », DCs) et des cellules mononucléaires périphériques du sang (« Peripheral Mononuclear Blood Cells », PBMC) (Ariza et al., 2013).
- VIH et protéines antivirales de l'hôte : dans le cas du VIH, les sEVs libérées par les cellules infectées transportent une protéine de l'hôte APOBEC3G (A3G) inhibant la réplication du virus. (Khatua et al., 2009).

vi. Rôle des vésicules dans l'infection par le SARS-CoV-2

Il existe peu de résultats faisant part d'un rôle des EVs lors d'infection par des virus respiratoires. Le récepteur cellulaire APN du HCoV-229E a été détecté dans les sEVs sécrétées par des mastocytes et des cellules gliales (Skokos et al., 2001) (Potolicchio et al., 2005). En outre, Earnest et al ont montré que la tétraspanine CD9 de la membrane cellulaire, également présente à la membrane des sEVs, facilitait l'entrée du MERS-CoV et induisait une infection robuste dans les poumons de souris *in vivo*. Ceci suggère que les sEVs pourraient faciliter l'infection en transférant leurs tétraspanines CD9 sur des cellules réceptrices (Earnest et al., 2017).

En revanche, depuis l'apparition du SARS-CoV-2, les hypothèses se bousculent quant au rôle des vésicules dans l'infection.

A partir de sérums de patients convalescents, des chercheurs de l'Ohio ont purifié des vésicules et ont montré la présence de la protéine Spike du SARS-CoV-2 dans les vésicules extracellulaires. Leurs résultats suggèrent que les vésicules, provenant de cellules surexprimant spike, pourraient servir de leurre et empêcher la neutralisation du virus par des anticorps monoclonaux qui ciblaient spike en promouvant ainsi l'infection (Troyer et al., 2021). Dans cette étude, les chercheurs n'ont pas fait la distinction spécifique et la caractérisation par taille des EVs.

Une autre étude américaine a évalué la composition du plasma de patients positifs au SARS-CoV-2 en comparaison à des patients sains. Leur étude montre que les exosomes (sEVs), provenant de plasmas de patients atteints par le COVID-19, expriment plus d'ACE-2 par rapport aux patients sains. Les chercheurs ont donc corrélé ces résultats avec la sévérité de la maladie, en estimant que plus le patient était malade, plus il produisait de vésicules extracellulaires contenant ACE-2 (El-Shennawy et al., 2022). De la même manière, les résultats de l'étude de Krishnamachary et al., évaluant la présence de petites et larges vésicules extracellulaires circulantes de patients COVID-19, a révélé un enrichissement de protéines signatures pro-inflammatoires, pro-coagulation et immunomodulatrices de la pathogenèse de la maladie. Ces données laissent à penser que les EVs issus de patients atteints de SARS-CoV-2 pourraient servir de modèle prédictif de la sévérité de la maladie (Krishnamachary et al., 2021).

Enfin, de nombreuses études ont utilisé les EVs pour la délivrance de leur cargo, tel que des protéines, de l'ADN, de l'ARNm, des ARN non codants, ainsi que des lipides à des organes cibles (Liang, 2021). On peut notamment noter que les EVs possédant ACE2 et TMPRSS2, purifiées initialement de cellules HEK293-T ou -FT, réduisent l'infection par le SARS-CoV-2 (Cocozza, 2022 ; Kim 2022). Ces données justifient l'utilisation d'EVs en tant qu'agents thérapeutiques, modèle

proposé depuis plusieurs années (Wiklander, 2019), dans l'infection initiale ou la dissémination du SARS-CoV-2 afin de réduire la charge virale et la gravité de la maladie.

FAMILLE VIRALE	VIRUS	VIRUS A ARN/ADN	RÔLE DES VESICULES	MECANISME D'ACTION	REFERENCES
PICORNAVIRIDAE	Coxsackievirus B1	ARN simple brin positif	Contiennent du matériel viral	Proviral	Sin et al., 2017 Inal
	Enterovirus 71 (EV71)		Contiennent ARN EV71, protéine VP1		Mao et al., 2016
	Hépatite A (HAV)		Résistance à la neutralisation par les anticorps		Feng et al., 2013
TOGAVIRIDAE	Chikungunya (CHIKV)	ARN simple brin positif	Détourne machinerie des corps apoptotiques	Proviral	Caruso and Poon, 2018
HERPESVIRIDAE	Virus Epstein-Barr (EBV)	ADN double brin linéaire	Capable de capter LMP1 (Latent Membrane Protein 1) → manipulation du microenvironnement tumoral Inhibition de la prolifération des cellules T et NK Transport du HLA de classe II	Proviral	Flanagan et al., 2003 Meckes et al., 2010 Dukers et al., 2000 Keryer-Bibens et al., 2006
			Transport de la dUTPase	Antiviral	Ariza et al., 2013
	HSV-1		Transport de micro-ARN, ARN messagers de l'HSV-1 et STING	Antiviral	Kalamvoki et al., 2014
			Transport des miR-H28 et miR-H29 incorporés dans les vésicules	Proviral	Han et al., 2016
FILOVIRIDAE	Ebola	ARN simple brin négatif	Transport de VP40 dans le noyau des cellules via la liaison au promoteur de la cycline D1 Modulation de la machinerie des ARNi, comme Dicer & Ago	Proviral	Pleet et al., 2018 Pleet et al., 2016
PARAMYXOVIRIDAE	RSV	ARN simple brin négatif	Induction de médiateurs pro-inflammatoires	Antiviral	Chahar et al., 2018 Corsello et al., 2022
ORTHOMYXOVIRIDAE	Influenza A	ARN simple brin négatif	Contiennent le micro-ARN hsa-miR-1975	Antiviral	Liu et al., 2019
			Transport des virions vers le pôle apical par attachement de Rab11 de vésicules	Proviral	Bruce et al., 2010
HEPADNAVIRIDAE	VHB	ADN double brin circulaire	Transport de HBx → transfert horizontal	Proviral	Kapoor et al., 2017
			Activation du ligand NKG2D	Antiviral	Kouwaki et al., 2016
RETROVIRIDAE	VIH	ARN simple brin positif	Transport de APOBEC3G (A3G) dans les exosomes	Antiviral	Khatua et al., 2009
			Transport de Nef	Proviral	Arenaccio et al., 2015 Lenassi et al., 2010 Schaefer et al., 2008 Cosset and Dreux, 2014
FLAVIVIRIDAE	VHC	ARN simple brin positif	Liaison aux particules virales Liaison du miR-122 et Ago2	Proviral	Longatti, 2015 Bukong et al., 2014
	ZIKA		Liaison du miR C19MC aux exosomes	Antiviral	Delorme-Axford et al., 2013
			Modulation de l'activité de SMPD3	Proviral	Bayer et al., 2018 Zhou et al., 2019
CORONAVIRIDAE	SARS	ARN simple brin positif	Transport de Spike	Antiviral	Kuate et al., 2007
	SARS-CoV-2		Transport de l'ARN viral	Proviral	Kwon et al., 2020
			Transport d'ACE-2		Kang, 2020

Tableau 3 : Liste non exhaustive du rôle des vésicules dans les infections virales.

III) Repositionnement thérapeutique pour lutter contre l'infection par le SARS-coV-2

Depuis les années 1960, la recherche de traitements antiviraux s'est accélérée. Un nombre très important de molécules antivirales a été décrit dans la littérature, mais seulement 90 d'entre elles ont reçu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) contre un nombre limité de virus : HIV (« Human Immunodeficiency Virus »), HCV (« Hepatitis C Virus »), HSV (« Herpes Simplex Virus »), Influenza Virus (IV), VZV (« Varicella-Zooster Virus »), HBV (« Hepatitis B Virus »), CMV (« Human Cytomegalovirus »), RSV (« Respiratory Syncytial Virus ») et HPV (« Human Papillomavirus ») (De Clercq and Li, 2016) (figure 19).

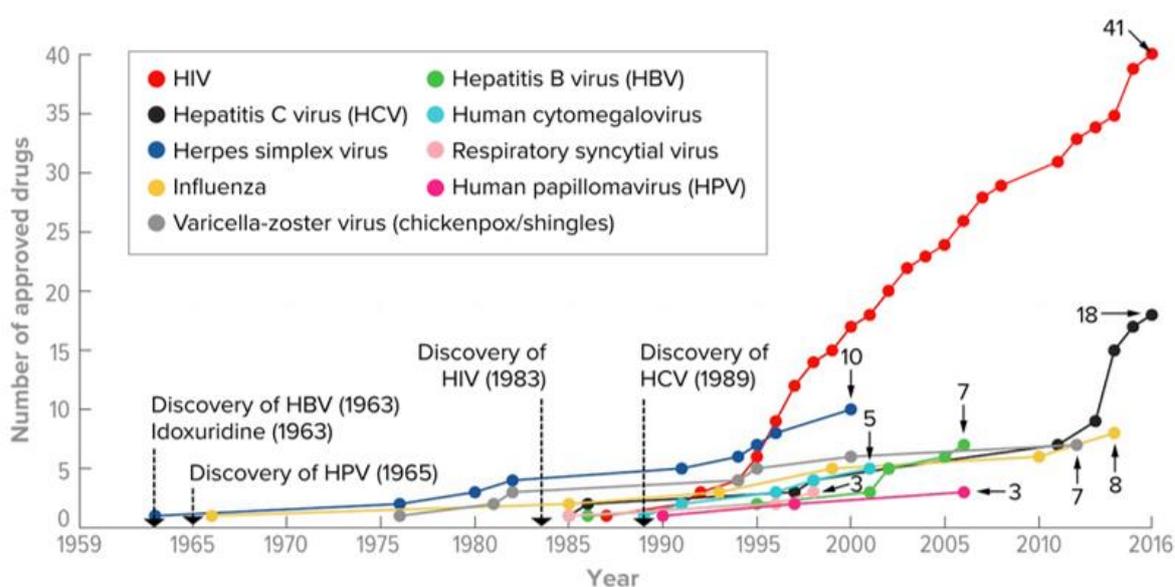


Figure 19 : Molécules antivirales approuvées entre janvier 1959 et avril 2016 (HIV, HCV, HSV, influenza, Chickenpox, HBV, Human cytomegalovirus, RSV et HPV) (De Clercq and Li, 2016).

De fait, pour les virus hautement pathogènes tels que Ebola ou encore MERS-CoV, aucune molécule antivirale ou stratégie vaccinale n'est disponible, définissant des infections virales orphelines de traitements (De Clercq and Li, 2016). De plus, bien que les traitements antiviraux pour lutter contre les infections à HIV et HCV soient des succès thérapeutiques, ils n'en demeurent pas moins coûteux et longs à développer.

Le repositionnement de médicaments déjà approuvés est donc une stratégie thérapeutique intéressante. De plus, le fait de s'appuyer sur des connaissances préexistantes réduit considérablement les coûts et le temps de développement : (i) modèle d'action d'antiviral contre une pathologie, (ii) pharmacologie et (iii) toxicité d'une molécule antivirale chez l'homme. Il existe néanmoins toujours un besoin urgent de recherche de nouveaux antiviraux dans

l'indication d'anciennes infections virales et surtout dans l'indication de l'émergence de nouveaux virus.

Depuis décembre 2019, les recherches sur le nouveau coronavirus SARS-CoV-2 ont pris une grande ampleur afin de lutter contre cette infection. Plusieurs approches thérapeutiques ont été utilisées :

- 1) Les vaccins, avec notamment l'utilisation de la technologie fondée sur les acides nucléiques,
- 2) Le repositionnement des antiviraux à action directe ou DAA (« Direct-Acting Antivirals »),
- 3) Le repositionnement des antiviraux ciblant l'hôte ou HTA (« host-targeting antivirals »),
- 4) La modulation de la réponse inflammatoire pour limiter la pathogénicité associée à l'infection.

A) Les vaccins

L'approche vaccinale permet de générer une immunité collective dans la population générale. Un an et demi après l'apparition du COVID-19, plus de 184 candidats vaccins étaient en développement, dont 105 en essais cliniques (Flanagan et al., 2021). Le développement de ces candidats vaccins a non seulement fait appel à des technologies traditionnelles (vaccins utilisant des virus entiers vivants atténués ou inactivés, vaccins à sous-unités protéiques et particules pseudo-virales (VLP)), mais aussi à de nouvelles technologies jamais utilisées auparavant pour les vaccins humains, dont les vaccins à acides nucléiques (ARNm et ADN) répliquatifs et non répliquatifs (figure 20).

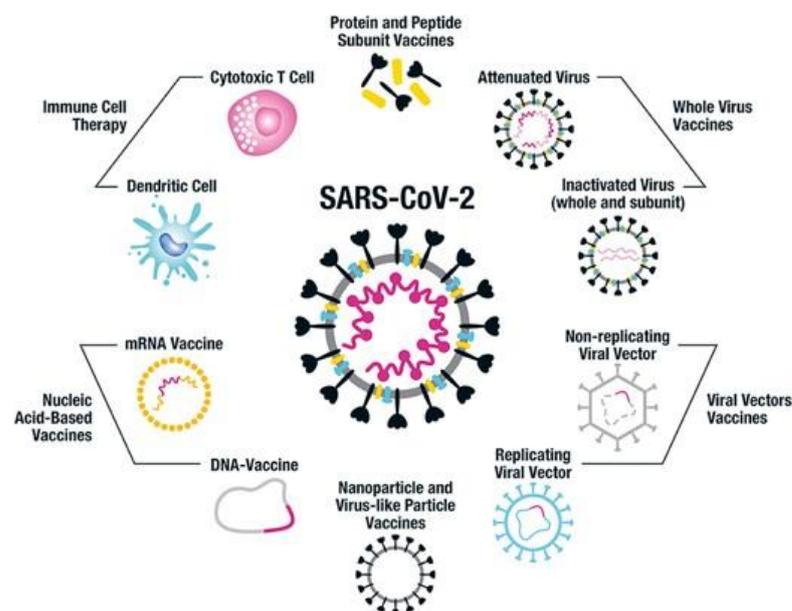


Figure 20 : Illustration des différentes technologies utilisées pour synthétiser un vaccin contre le COVID-19 (Flanagan et al., 2021).

Dans le cas des vaccins dits vivants atténués, le virus entier a été modifié et provoque une forme atténuée de la maladie (vaccin contre l'hépatite A, la varicelle). Très immunogènes, il faut généralement une dose unique de ce type de vaccin pour produire une immunité sur le long terme.

En comparaison aux vaccins atténués, les vaccins inactivés (ex : vaccin contre la poliomyélite) sont moins immunogènes et leur administration nécessite plus d'une dose pour obtenir une immunité adéquate.

Les vaccins contenant des protéines ou sous-unités peptidiques (vaccin saisonnier contre le virus de la grippe) ciblent des épitopes clés, sont combinés à des adjuvants, et seront reconnus par une cellule présentatrice d'antigène.

Quant aux vaccins à particules virales (VLP) comme le vaccin contre le papillomavirus, un système d'expression permet de produire des protéines qui s'auto-assemblent en particules virales injectées, puis présentées par les cellules présentatrices d'antigènes aux cellules B et T pour susciter une réponse immunitaire.

En ce qui concerne les nouvelles technologies utilisées pour la création de vaccins, les plateformes utilisent des vecteurs viraux ou directement des acides nucléiques. Leur fonctionnement est fondé sur l'utilisation d'un véhicule qui délivre un gène/ARN d'intérêt dans des cellules. La prise en charge de ces molécules par la machinerie cellulaire permettra leur traduction et la stimulation d'une réponse immunitaire. Le matériel génétique incorporé dans le véhicule n'est pas intégré à l'ADN de l'hôte.

Deux types de vecteurs viraux peuvent être synthétisés : les répliatifs et les non répliatifs. Le vaccin le plus connu contre le SARS-CoV-2 utilise un vecteur viral non répliatif, un adénovirus de chimpanzé (AstraZeneca, tableau 4). Les vaccins à ARN messagers, en développement depuis une dizaine d'années, sont fondés sur la capacité de transporter des ARNs dans des nanoparticules, à l'intérieur des cellules où ils peuvent être pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire.

Aujourd'hui, la plupart des vaccins contre le SARS-CoV-2 sont capables de provoquer une réponse immunitaire contre la protéine virale Spike, responsable de l'attachement du virus au récepteur cellulaire ACE-2. Cependant, tous les candidats vaccins ne ciblent pas la protéine d'attachement, mais aussi la nucléoprotéine ou encore les protéines de membrane M (Flanagan et al., 2020).

Vaccins	Développeur	Types	Antigène	Date de développement	Références
CoronaVac	Sinovac	Virus inactivé	Virus entier	29/08/2020 Chine	Palacios et al., 2020
BNT162b2	Pfizer, BioNTech	Nanoparticules ARNm-lipide	Protéine S (2P)b	02/12/2020 – UK	Polack et al., 2020
Gam-COVID-Vac (sputnik v)	Gamaleya Research Institute, Russie	Vecteur adénoviral non répliquatif rAd26	Protéine S	05/12/2020 – Russie	Logunov et al., 2021
mRNA-1273	Moderna, USA	Nanoparticules ARNm-lipide	Protéine S (2P)b	18/12/2020 - UK	Baden et al., 2021
AZD1222 (Covishield)	AstraZeneca, Oxford	Vecteur adénoviral non répliquatif ChAdOx1	Protéine S	30/12/2020 - UK	Barrett et al., 2021
BBV152 (Covaxin)	Bhrata Biotech International	Virus inactivé	Virus entier	02/01/2021 – Inde	Ella et al., 2021
Ad26.COV2.S	Janssen Pharmaceutical (Johnson&Johnson)	Vecteur adénoviral non répliquatif rAd26	Protéine S	17/02/2021 – Afrique du Sud	Mercado et al., 2020
NVX-CoV2373	Novavax	Nanoparticules de sous-unités protéiques	Protéine S	20/12/2021 - USA	Keech et al., 2020

Tableau 4 : Récapitulatif des principaux vaccins utilisés contre le SARS-CoV-2.

B) Apparition des variants de SARS-CoV-2

Après la première année de l'apparition du SARS-CoV-2 au sein de la population, la capacité évolutive constante de ce coronavirus a été mise en évidence avec l'apparition de variants. Ceci a été observé grâce à l'analyse par séquençage haut débit d'échantillons de patients collectés dans le monde. Malgré le faible taux de mutation des coronavirus dû à l'activité exonucléase de NSP14, le SARS-CoV-2 bénéficie d'un taux de réplication élevé et est capable de réarranger son génome au cours de la réplication, favorisant ainsi l'apparition de nouveaux variants. De fait, son taux de mutation est comparable aux autres virus à ARN (10^4 mutations par nucléotide). Plusieurs variants ont aujourd'hui un impact important sur la santé publique car ils possèdent une capacité de transmission plus importante, induisent une pathogénicité plus sévère ou encore sont capables d'échapper à la réponse immunitaire et vaccinale.

Les différents variants ont été classés selon leur « dangerosité » pour la santé humaine. Les variants dits préoccupants ou VOCs (« Variants of Concern ») ou les variants à suivre VOIs (« Variants of Interest ») ont ainsi été définis (tableau 5). Selon l'OMS, les VOCs ont émergé de la

souche ancestrale isolée à Wuhan et possèdent une meilleure transmissibilité, une virulence plus importante et une résistance aux vaccins ou à l'immunité acquise (Atlanta GUSDoHaHS. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, United States of America: Centers for Disease Control and Prevention (2021)).

VARIANTS	LIGNAGE	ORIGINE	MUTATION D'INTERET (SPIKE)
VOC			
ALPHA	B.1.1.7	Angleterre – 09/2020	N501Y, D614G, P681H
BETA	B.1.351	Afrique du Sud – 05/2020	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V
GAMMA	P.1	Brésil – 11/2020	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y
DELTA	B.1.617.2	Inde – 10/2020	L452R, T478K, D614G, P681R
OMICRON	B.1.1.529	Afrique du Sud et Boswana – 11/2021	A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, Δ212, ins215EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F
VOI			
EPSILON	B.1.427/429	Etats-Unis – 03/2020	L452R, D614G
ZETA	P.2	Brésil – 04/2020	E484K, D614G
ETA	B.1.525	Multiple – 12/2020	E484K, D614G, Q677H
THETA	P.3	Philippines – 01/2021	E484K, N501Y, D614G, P681H
IOTA	B.1.526	Etats-Unis – 11/2020	E484K, D614G, A701V
KAPPA	B.1.617.1	Inde – 10/2020	L452R, E484Q, D614G, P681R
LAMBDA	C.37	Pérou – 12/2020	L452Q, F490S, D614G
MU	B.1.621	Colombie – 01/2021	R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H

Tableau 5 : Liste des VOCs et VOIs du SARS-CoV-2. Source : (“ECDC,” 2022)

La substitution D614G a été la première identifiée et correspond à une mutation dans la séquence de la protéine Spike du virus (Korber et al., 2020). Elle confère un avantage en terme de capacité répliquative et une infectivité accrue par rapport à la souche originale de Wuhan (Plante et al., 2021; B. Zhou et al., 2021). Cependant, la neutralisation par les sérums de patients convalescents restait très efficace (Garcia-Beltran et al., 2021; Legros et al., 2021).

Les premiers variants préoccupants (VOCs) sont apparus fin 2020 et ont eu un grand impact sur la santé publique. Grâce aux capacités de surveillance génomique, il a été possible d'analyser l'évolution du virus au niveau mondial (“Nextstrain,” 2022; Rambaut et al., 2020).

Le variant alpha (B.1.1.7) a été détecté pour la première fois fin septembre 2020 et est rapidement devenu la souche dominante au Royaume-Uni (“ECDC,” 2022; Tang et al., 2021; Volz et al., 2021).

Le variant bêta (B.1.351), identifié pour la première fois en octobre 2020, est ensuite devenu la souche dominante à l’origine de la seconde vague en Afrique du Sud (Tegally et al., 2021). De la même manière, ce n’est que quelques mois plus tard que le variant Gamma (P.1) a été détecté chez quatre Brésiliens se rendant au Japon (Fujino et al., 2021) et a été responsable de la résurgence des infections à Manaus (Faria et al., 2021; Sabino et al., 2021).

Le variant Delta (B.1.617.2) a été détecté pour la première fois en décembre 2020. Il est à l’origine de l’augmentation massive du nombre de cas en raison de sa contagiosité accrue et a provoqué une seconde vague d’infection en Inde (Brown et al., 2021; Cherian et al., 2021; Mlcochova et al., 2021).

Enfin, le variant Omicron (B.1.1.529), identifié en novembre 2021 et classé VOC par l’OMS, a remplacé le Delta dans le monde entier (“NICD.ac,” 2021; “Classification of Omicron (B.1.1.529),” 2022).

L’émergence des variants est donc préoccupante car elle peut affecter la transmissibilité du virus, la virulence et le taux de réinfection en échappant à la réponse immunitaire naturelle ou induite par la vaccination (Burki, 2021).

C) Efficacité de la vaccination sur les variants

L’apparition des VOCs et des VOIs a remis en question l’efficacité des vaccins. En quelques mois, de nombreuses études scientifiques ont évalué l’efficacité vaccinale sur les variants, et les données obtenues montraient d’abord des résultats encourageants. L’ensemble des différentes mutations apparues dans la protéine spike des différents variants (VOCs et VOIs) du SARS-CoV-2 est illustré en figure 21.

Les premiers rapports indiquaient que la substitution principale du variant alpha (N501Y), présente dans la région RBD de la protéine spike, n’empêchait pas la neutralisation du virus par les anticorps après vaccination (Rees-Spear et al., 2021; Xie et al., 2021). Notamment, Muik et al., ont utilisé des sérums de patients ayant reçu le vaccin Pfizer-BioNTech (BNT162b2) et ont montré une neutralisation similaire par les anticorps dans le cas d’une infection par le variant alpha ou le virus sauvage (Muik et al., 2022). Une autre étude avec le vaccin Novavax (NVX-CoV2373) a indiqué que celui-ci était encore très efficace pour neutraliser le variant alpha (Heath et al., 2021).

Cependant, la substitution E484K, retrouvée dans les variants bêta et gamma, a été identifiée dans de nombreuses études comme permettant d'échapper à la neutralisation par des sérums convalescents et des anticorps monoclonaux (Greaney et al., 2021; Weisblum et al., 2020).

Il s'avère donc que tous les vaccins ne protègent pas contre tous les variants. En effet, le vaccin AZD1222/ChAdOx1 de la société AstraZeneca présente une diminution de 86% de la neutralisation contre le variant beta (Madhi et al., 2021). En revanche, les vaccins ARNm-1273 (Moderna), BNT162b2 (Pfizer) et BBV152 (Covaxin) affichent une réduction d'environ 6-9% de la neutralisation contre le variant beta par rapport à la souche D614G (Abdool Karim and de Oliveira, 2021; Yadav et al., 2021).

Certaines mutations ont été identifiées comme étant cruciales dans l'échappement à la réponse immunitaire. Notamment la mutation K417N qui réduit la neutralisation des variants Gamma ou Beta par les anticorps (Wibmer et al., 2021; Dejnirattisai et al., 2021; D. Zhou et al., 2021).

Ainsi, si les vaccins ont largement contribué à diminuer la propagation du virus (Harris et al., 2021; Levine-Tiefenbrun et al., 2021), l'apparition des variants a remis en doute cette protection. Ce fut le cas avec le variant Delta pour lequel les vaccins BNT161b2, mRNA-1273 et AZD1222 étaient moins efficaces. Une diminution de la neutralisation par les anticorps, en particulier chez les personnes âgées, a été observée (Lopez Bernal et al., 2021; Nanduri et al., 2021).

En décembre 2021, l'analyse de la séquence du variant Omicron a montré la présence de plusieurs mutations déjà apparues chez les autres variants (figure 21). Ceci semble expliquer l'augmentation de l'affinité de Spike au récepteur ACE-2, permettant au virus d'infecter des cellules cibles plus rapidement (Kumar et al., 2022; Shin et al., 2022). De manière intéressante, l'équipe de Hui et al. a montré que le variant Omicron se répliquait plus vite dans les bronches humaines que la souche originale ou le variant Delta (Hui et al., 2022). En outre, le variant Omicron semble avoir une capacité à échapper à la réponse vaccinale plus développée que les précédents VOCs, notamment par le nombre important de mutations au sein de la protéine Spike. Il semblerait que seulement 20 à 24% des personnes vaccinées par BNT162b2 présenteraient des anticorps neutralisants détectables contre ce variant et les titres d'anticorps neutralisants trouvés étaient de 35,7 à 39,9% inférieurs à ceux du virus ancestral (Lu et al., 2022).

Finalement, le pourcentage de la population mondiale non vaccinée, notamment du fait de maladies chroniques, allergies, cancers, statut immunodéprimés, etc, reste encore trop élevé. De plus, les craintes de la population à l'égard de la vaccination sont toujours présentes. Le seuil d'immunité collective n'est donc pas atteint, favorisant l'apparition des variants et reculant la date

de la fin de la pandémie. Il reste donc encore beaucoup d'efforts à fournir afin de protéger toutes les catégories de la population mondiale.

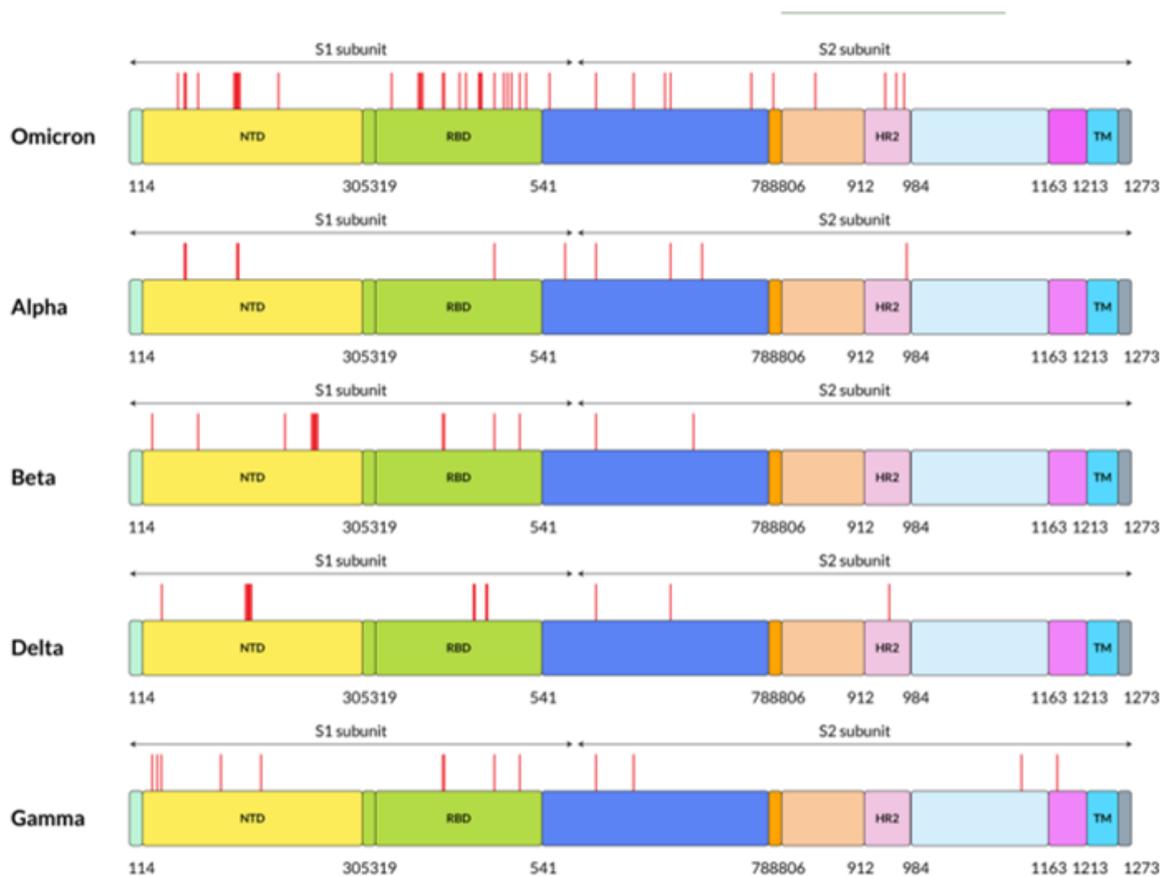


Figure 21 : Localisation des mutations de la protéine Spike dans le cas des différents variants VOCs (Alpha, Beta, Delta, Gamme et Omicron) de SARS-CoV-2. Les lignes rouges indiquent la localisation à une position spécifique d’une mutation. En rose, les domaines « heptapeptide repeat » ; TM : domaine transmembranaire ; NTD en jaune : domaine N-terminal et en vert le domaine RBD, domaine de liaison au récepteur (Araf, Y., et al, 2022).

D) Repositionnement d’antiviraux à action directe ou DAA (« direct-acting antivirals »)

Les antiviraux à action directe ou DAA sont développés pour ne cibler qu’une étape spécifique du cycle de vie d’un virus, en inhibant l’activité de la/des protéine(s) virale(s) impliquée(s). Le cycle du SARS-CoV-2 contient des étapes clés connues, notamment l’étape d’entrée (traitée dans la partie « HTA), la maturation des polyprotéines virales pp1a et pp1ab par les protéases virales, mais aussi l’étape de réplication avec la polymérase virale. Ces étapes sont répertoriées sur la figure 22 et discutées ci-dessous.

- Inhibiteurs de protéases virales : Une approche antivirale attractive consiste en l’inhibition de l’activité des protéases virales responsables des clivages des polyprotéines virales. L’un des exemples que l’on peut citer est la combinaison lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) utilisée pour le traitement de l’infection par le VIH (Magro et al., 2021), qui a aussi montré une

activité antivirale contre le SARS-CoV-1 en 2004 (Yamamoto et al., 2004). Le repositionnement du LPV/RTV dans le cas de la pandémie de COVID-19 a montré des résultats satisfaisants, une étude clinique ayant démontré que les patients traités ne succombaient pas et présentaient des symptômes moins graves grâce au traitement (Cao et al., 2020; Wang et al., 2020).

- Inhibiteurs de la réplication : il existe plusieurs analogues nucléosidiques et nucléotidiques chimiques qui inhibent la polymérase de plusieurs virus à ARN.
 - L'exemple le plus marquant est le Remdesivir (RDV), développé initialement contre le virus Ebola (EBOV) (Elfiky, 2020). Le RDV a montré une activité antivirale *in vitro* contre le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV (de Wit et al., 2020) et *in vivo* en réduisant la gravité de la maladie, la réplication virale et les lésions pulmonaires chez les souris (SARS-CoV-1) (Sheahan et al., 2017; Warren et al., 2016). Plus récemment, le RDV a démontré une inhibition puissante de la réplication du SARS-CoV-2 dans les cellules pulmonaires humaines et dans des cultures de cellules épithéliales primaires des voies respiratoires (Gordon et al., 2020; Sheahan et al., 2020; M. Wang et al., 2020). En outre, bien que des effets *in vivo* chez les primates non humains aient été démontrés, un essai clinique (NCT03719586) a révélé une mortalité plus élevée chez les patients traités par le RDV en comparaison à ceux traités par des anticorps monoclonaux. De plus, le RDV a présenté des effets modérés et peu concluants sur les patients atteints de cas sévères de COVID-19 (Beigel et al., 2020; Grein et al., 2020; Wang et al., 2020).
 - Le favipiravir, un analogue de guanine inhibant l'activité de la RNA polymérase virale, approuvé au Japon pour le traitement des infections par le virus influenza A, est également actif sur de nombreux virus à ARN de polarités positives et négatives (Flavivirus, Enterovirus, Alphavirus, Hantavirus) (Furuta et al., 2009; Sissoko et al., 2016). Au-delà des effets antiviraux démontrés *in vitro* (Tulbah and Lee, 2021), le favipiravir a récemment montré un effet *in vivo* sur la durée des hospitalisations en soins intensifs des patients COVID-19 (Abdulrahman et al., 2022; McMahon et al., 2022).
 - La ribavirine, un analogue nucléosidique initialement utilisée pour le traitement du VRS et dans le traitement contre le VHC (De Clercq and Li, 2016; Feld et al., 2017) est utilisée en Chine pour des cas de COVID-19, à une dose de 500mg, deux à trois fois

par jour par intraveineuse, éventuellement combinée à l'interféron (Wang et al., 2020).

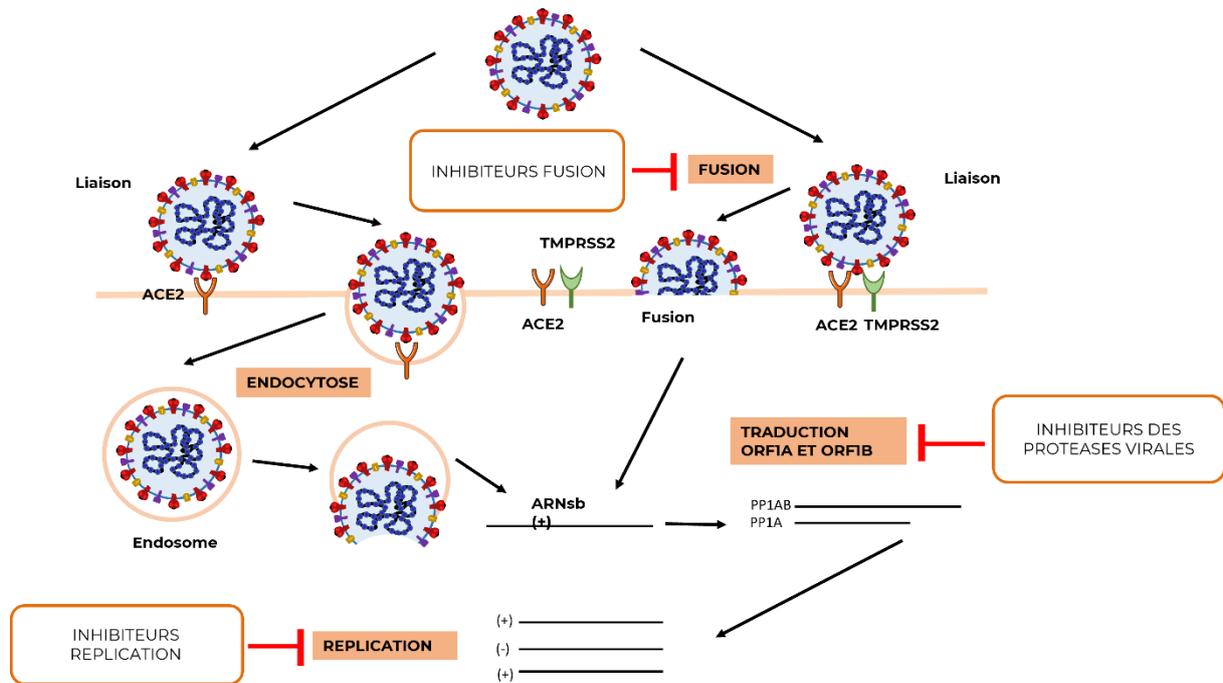


Figure 22 : Stratégies thérapeutiques ciblant le virus pour contrer l'infection par le SARS-CoV-2. Figure réalisée avec BioRender.

E) Repositionnement d'antiviraux ciblant l'hôte ou HTA (« host-targeting antivirals »)

Les antiviraux ciblant l'hôte, ou HTA (« Host-Targeting Antivirals »), sont des composés visant à inhiber les facteurs cellulaires nécessaires à l'infection (figure 23). Les cibles principales dans le cadre de cette stratégie sont les facteurs de l'hôte impliqués dans l'infectivité et/ou la pathogenèse associée (Kash, 2009). Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès, notamment dans le développement d'antagonistes de CCR5, le corécepteur du VIH dans les thérapies antirétrovirales (Reeves and Piefer, 2005). On peut citer l'étude de Cameron, et al. sur le traitement par un antagoniste de la voie CXCL10 ayant permis une réduction de la mortalité et de la sévérité des symptômes dans un modèle animal infecté par le virus Influenza H5N1 (Cameron et al., 2008; Kash et al., 2004).

Dans le cas de SARS-CoV-1, cette stratégie thérapeutique a montré des résultats *in vitro* sur des cellules épithéliales bronchiques humaines, avec un inhibiteur connu de sérine protéase (TMPRSS2) le camostat mésylate (Kawase et al., 2012). Il était donc intéressant de tester cette

stratégie pour contrer l'infection par le SARS-CoV-2. Bien que les résultats *in vitro* soient prometteurs (Saul and Einav, 2020; Uno, 2020), peu d'essais cliniques ont montré des résultats significatifs (NCT04353284 ; NCT04583592).

Pour finir, l'utilisation du plasma de patients convalescents (PC) s'est révélée prometteuse et a été approuvée par la « FDA » dans le traitement de la COVID-19 (Tanne, 2020; Y. Wang et al., 2021). En effet, le PC de patients guéris récemment du SARS-CoV-2 contient de nombreux anticorps neutralisants ayant un potentiel pour bloquer l'infection chez un nouvel hôte et surtout faciliter la clairance virale. Cependant, les effets bénéfiques de ce traitement sont fondés sur la nature du plasma prélevé et la standardisation des protocoles de prélèvements et/ou de titration des anticorps sont encore très hétérogènes (Izda et al., 2021; Martinez, 2020; Peng et al., 2021). En contrepartie, l'utilisation d'anticorps synthétiques, incluant les anticorps monoclonaux (« Mab, monoclonal antibody ») pourrait être une solution adéquate : ils sont plus spécifiques, homogènes et peuvent être produits en grande quantité. Ils peuvent être obtenus de plusieurs manières, à partir de PC, de souris transgéniques et de clones de cellules B (Jiang et al., 2020). Aujourd'hui, le nombre d'études concernant les anticorps neutralisants a augmenté, et cette approche fait l'objet de nombreux essais cliniques.

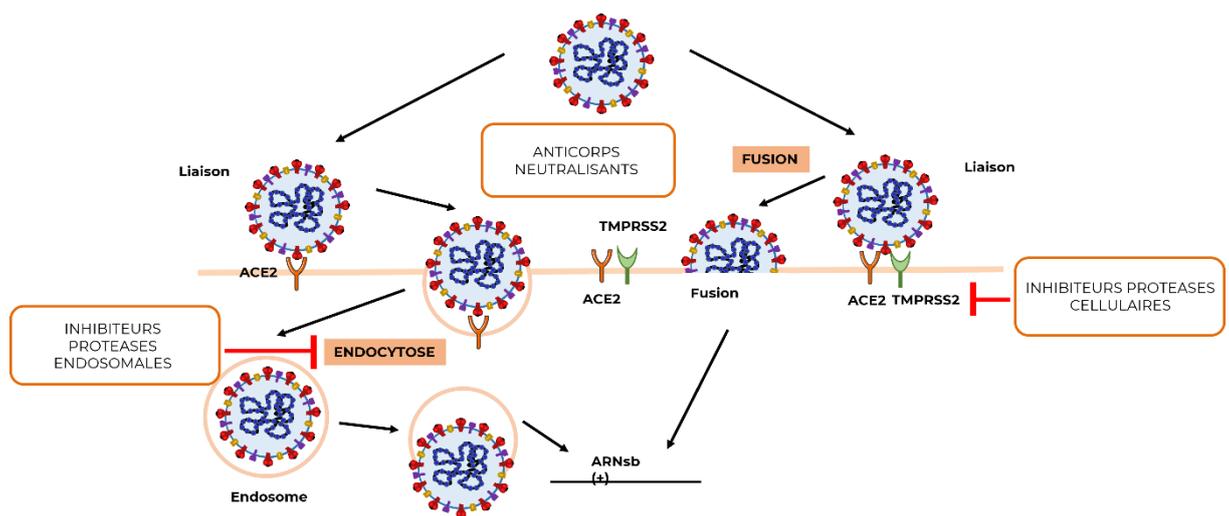


Figure 23 : Stratégies thérapeutiques ciblant l'hôte pour contrer l'infection par le SARS-CoV-2. Figure réalisée via BioRender.

L'ensemble des molécules à potentiel thérapeutique pour lutter contre l'infection par le SARS-CoV-2 est résumé dans le tableau 6.

Nom	Utilisation	Pays approuvé	Cible SARS-CoV-2	Essai clinique	Références
Umifenovir (Arbidol)	Traitements virus grippaux A et B	Chine et Russie	Inhibiteur de fusion	NCT04350684	Lian et al., 2020 Wang et al., 2020 Zhu et al., 2020
EK1C4	/	/	Inhibiteur de fusion	/	Xia et al., 2021
Remdesivir	Traitement contre EBOV	USA, Japon	Inhibiteur de réplication	NCT04431453 NCT04713176	Elfiky et al., 2020 Farne et al., 2020
Favipiravir	Traitement des virus grippaux	Japon	Inhibiteur de réplication	NCT04336904 NCT04358549 NCT04402203	Farne et al., 2020 Jean et al., 2020
Ribavirine	Traitement VRS et VHC	Chine (COVID-19)	Inhibiteur de réplication	NCT04828564 NCT04494399	Wang et al., 2020 Pandey et al., 2020
Tenofovir	Traitement HBV et VIH	Europe, USA	Inhibiteur de réplication	NCT04712357 NCT04890626	DeJong et al., 2021
Galidesivir	Traitement VHC et Filovirus	Europe	Inhibiteur de réplication	NCT03891420	Elfiki et al., 2020 Taylor et al., 2021
Sofosbuvir	Traitement VHC	Europe	Inhibiteur de réplication	NCT04497649 NCT04460443	Roosbeh et al., 2021 Nourian and Khalili, 2020 Chan et al., 2021
Molnupiravir	Traitement grippe et VHC	USA	Inhibiteur réplication	NCT05459532 NCT04575584	Wen et al., 2022 Jayk Bernal et al., 2022 Pourkarim et al., 2022
Ebselen	Traitement des troubles bipolaires, AVC	USA	Inhibiteur protéase virale	NCT04484025 NCT04483973	Weglarz-Tomczak et al., 2021
Lopinavir / Ritonavir	Traitement VIH	Europe, USA	Inhibiteur protéase virale	NCT04307693 NCT04738045	Cao et al., 2020 Deng et al., 2020
Darunavir / Cobicistat	Traitement VIH	Europe	Inhibiteur protéase virale	NCT04252274 NCT04425382	Elmekaty et al., 2022 Chen et al., 2020
Ritonavir / Nirmatrelvir	Traitement COVID-19	Europe, USA	Inhibiteur protéase virale	NCT05387369 NCT05532852 NCT05386433	Mahase, 2021 Wen et al., 2022 Najjar-Debbiny et al., 2022
Camostat mesylate	Traitement des pancréatites chroniques	Japon, Corée du Sud	Inhibiteur protéase cellulaire	NCT04353284 NCT04583592	Saul and Einav, 2020 Uno, 2020
Nafamostat mesylate	Traitement des pancréatites, anticoagulants	Japon	Inhibiteur protéase cellulaire	NCT04418128 NCT04352400	Shrimp et al., 2020

Tableau 6 : Repositionnement de molécules pour lutter contre la pandémie de COVID-19.

IV) Repositionnement thérapeutique de la desloratadine dans le cadre de la pandémie SARS-CoV-2

Le développement de nouvelles molécules pour limiter l'infection par le SARS-CoV-2 reste une option, car cette stratégie n'est pas assez rapide dans le cadre d'une telle émergence virale globale. Le repositionnement de molécules déjà approuvées et mises sur le marché dans le cadre du traitement de diverses autres infections semble donc être la meilleure option thérapeutique dans la lutte contre le SARS-CoV-2.

Au CHU de Psychiatrie et Neurosciences de l'hôpital Saint-Anne à Paris, il a été observé une incidence moins élevée de patients symptomatiques au COVID-19 (4%) en comparaison avec le

personnel de l'hôpital (14% chez les médecins et les infirmières) (Plaze et al., 2020; Salje et al., 2020). Cette observation a été le point de départ de nombreuses hypothèses concernant une action prophylactique des traitements prescrits en hôpital psychiatrique contre le SARS-CoV-2 (Javelot et al., 2020; Villoutreix et al., 2020).

Cette hypothèse coïncidait avec les effets antiviraux d'une classe de composés aromatiques dérivés de la phénothiazine : la chlorpromazine (CPZ). Depuis 1952, cette molécule est utilisée pour le traitement des troubles psychiatriques, notamment pour des patients schizophrènes (Bower, 1954; Hollister et al., 1955). Par la suite, les propriétés antivirales *in vitro* de cette molécule ont largement été démontrées pour une grande diversité de virus à ARN ou ADN : le virus influenza (Krizanová et al., 1982), le VIH (Hewlett et al., 1997), le virus JC (« John Cunningham Virus »), appartenant à la famille des *Polyomaviridae* (Pho et al., 2000), le virus de l'encéphalite japonaise, appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Nawa et al., 2003), le VHC (Blanchard et al., 2006) et les alphavirus (Pohjala et al., 2011).

De plus, l'activité anti-coronavirus (SARS-CoV et MERS-CoV) *in vitro* de la CPZ a été démontrée dans plusieurs études (Cong et al., 2018; de Wilde et al., 2014; Dyllal et al., 2014). Finalement, il a été montré que la CPZ affectait la voie d'endocytose clathrine-dépendante *via* son interaction avec les dynamines (Daniel et al., 2015; Wang et al., 1993). De manière intéressante, le mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant est essentiel dans la voie d'entrée (« late pathway ») des coronavirus (Burkard et al., 2014), renforçant l'intérêt thérapeutique de ce type de molécules.

La CPZ est une drogue cationique amphiphile (CAD « Cationic Amphiphilic Drug »), grande famille de molécules incluant des antipsychotiques, des antidépresseurs, des antiarythmiques. On notera que l'hydroxychloroquine est un CAD. Cette molécule a démontré une activité anti-coronavirus *in vitro* (Gao et al., 2020; Liu et al., 2020; M. Wang et al., 2020). Bien que le mécanisme exact d'action de la chloroquine ne soit pas connu, l'élévation du pH lysosomal semble jouer un rôle clé (Liu et al., 2020).

L'ensemble de ces données suggère que des agents cationiques amphiphiles pourraient jouer un rôle antiviral dans les infections virales par leur capacité à s'accumuler dans les lysosomes et à perturber la voie d'endocytose clathrine-dépendante (Blaess et al., 2020; Plaze et al., 2020).

A) Les agents lysosomotropiques

Le concept de lysosomotropisme a été introduit pour la première fois par De Duve en 1974 et définit les composés capables de s'accumuler dans les lysosomes (de Duve et al., 1974). Au niveau chimique, la plupart des médicaments qui présentent des propriétés lysosomotropes contiennent des éléments cationiques appartenant à des groupes amines primaires, secondaires ou tertiaires (Marceau et al., 2012).

Les agents lysosomotropiques inhibent la maturation endosomale, perturbent le trafic endo-lysosomal et leurs effets présentent un intérêt particulier dans le contexte d'infections virales (Blaess et al., 2020; Norinder and Munic Kos, 2019). Ils possèdent tous des caractéristiques physico-chimiques similaires, à savoir une structure composée d'un cycle aromatique hydrophobe suivi d'une chaîne latérale hydrophile conférant le caractère ionisable à la molécule. L'accumulation de ces composés à l'intérieur des endosomes (Figure 24) engendre une altération réversible des compartiments cellulaires, à savoir l'augmentation du volume des organelles, l'accumulation de diverses espèces lipidiques telles que le cholestérol, la sphingomyéline, la phosphatidylsérine ou encore la phosphatidylcholine (Anderson and Borlak, 2006; Kornhuber et al., 2010).

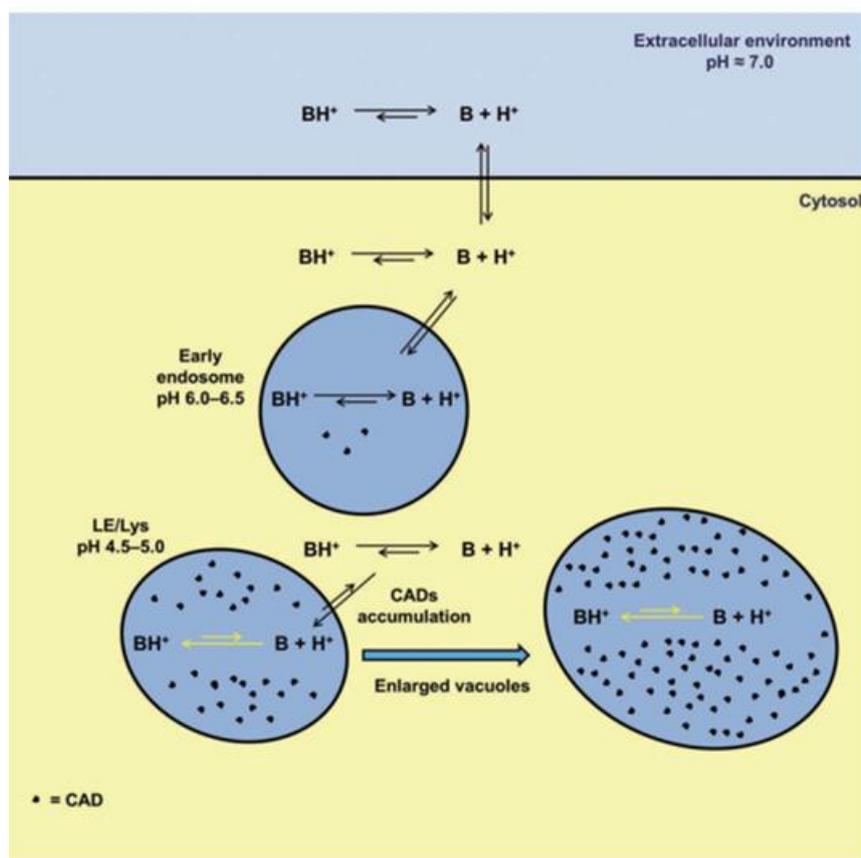


Figure 24 : Accumulation de molécules cationiques amphiphiles dans les endosomes/lysosomes. Les CADs sont des bases faibles (B) et peuvent s'accumuler dans les compartiments intracellulaires acides, les membranes lysosomales sont moins perméables aux bases protonées chargées (BH^+) par rapport à la forme non chargée neutre. Cette accumulation des

CADs dans les endosomes tardifs / lysosomes (LE/Lys) induit la création de larges vacuoles. Figure tirée de l'article (Salata et al., 2017).

B) Fonctionnement des CADs

Plus de 50 CADs ont été identifiés pour induire la phospholipidose, c'est-à-dire l'accumulation excessive de phospholipides dans les tissus (Tummino et al., 2021). Ce phénomène résulterait de l'interaction directe des CADs avec les phospholipides membranaires, entraînant une différence de pH et affectant la perméabilité membranaire au niveau des endosomes, ainsi que certaines activités enzymatiques (Baritussio et al., 2001; Chatelain et al., 1985; Mitterreiter et al., 2010).

L'une des cibles principales des CADs est la sphingomyélinase acide (ASM), enzyme lysosomale qui en réponse à certains stimuli est transloquée à la membrane cellulaire où elle catalyse l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphorylcholine. Ces dernières participent dans la formation de plateformes lipidiques (« lipid rafts ») utilisées lors des mécanismes d'entrée virale. Dans des conditions physiologiques, l'ASM est ancrée à la membrane interne du lysosome, ce qui empêche sa dégradation par des protéases. Les FIASMAS (« Functional Inhibitor of Acid Sphingomyelinase »), qui sont des CADs, ont des propriétés lipophiles et sont capables de diffuser de manière passive, ou *via* un transporteur ABCB1 localisé à la membrane du lysosome (Figure 25). Cependant, tous les CADs n'interagissent pas avec l'ASM. L'exemple le plus concret étant la chloroquine (Bigler et al., 2007; Salata et al., 2017).

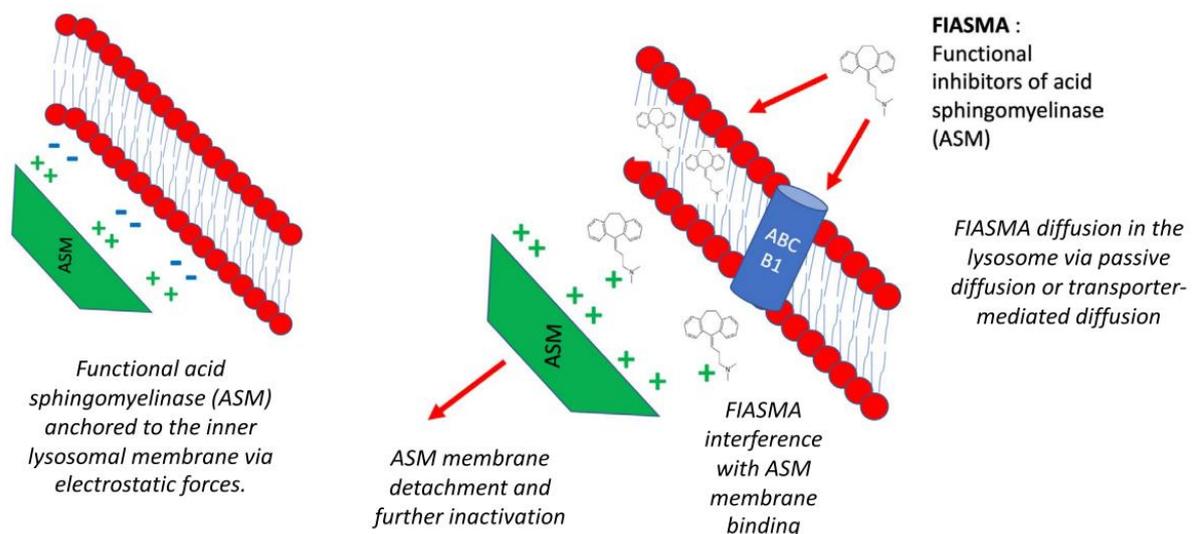


Figure 25 : Mécanisme d'action des inhibiteurs fonctionnels de la sphingomyélinase acide (FIASMA). A gauche du schéma : en condition physiologique, l'ASM est ancrée à la membrane interne du lysosome par des forces électrostatiques, protégeant l'ASM de la dégradation protéolytique. A droite du schéma : les FIASMAS, qui sont des médicaments cationiques amphiphiles, diffusent dans le lysosome en utilisant le transporteur ABCB1 situé à la membrane lysosomale. Dans l'environnement intra-lysosomal, les médicaments deviennent protonés et augmentent le pH. Ce phénomène entraîne le détachement de l'ASM de la membrane interne du lysosome et sa dégradation par protéolyse. Schéma tiré de l'article (Le Corre and Loas, 2021).

C) Rôle des CADs dans les infections virales

Les programmes récents de repositionnement thérapeutique dans le cas d'épidémies/pandémies ou de caractérisation d'infections virales ont montré que plusieurs CADs présentaient des propriétés antivirales. Les principaux CADs approuvés par la FDA avec une activité antivirale démontrée sont présentés dans le tableau 7 (liste non exhaustive).

L'ensemble des données de la littérature a montré que la dérégulation de la voie endosomale et de l'homéostasie des lipides médiée par l'accumulation des CADs dans les lysosomes et les endosomes affectent plusieurs activités cellulaires, telles que la macro et/ou micropinocytose, l'organisation des systèmes d'invagination de la membrane et le transport vésiculaire de matériel (Chapuy-Regaud et al., 2013; Osman et al., 2016; Pakkanen et al., 2009; Piccoli et al., 2011; Wang et al., 1993). Ainsi, les CADs présentent des effets pléiotropes dans les cellules en ciblant plusieurs voies cellulaires dont certaines sont importantes pour la réplication virale (Mercer and Helenius, 2012).

Afin de pénétrer dans les cellules, de nombreux virus nécessitent les fonctionnalités d'enzymes telles que l'ASM et les cathepsines. L'ASM est notamment essentielle pour l'entrée du virus Ebola et le virus de la rougeole (MV « Measles Virus ») dans la cellule cible (Avota et al., 2011; Miller et al., 2012). De plus, il a déjà été montré que des lipides tels que le cholestérol pouvaient jouer un rôle dans l'entrée virale, la réplication et le bourgeonnement/la sécrétion de nouvelles particules virales (Pattanakitakul et al., 2010; Roth and Whittaker, 2011; Yang et al., 2016).

Ainsi certains CADs présentent des activités antivirales (Tableau 7) et sont aussi utilisés dans un large éventail de maladies humaines.

- Les antiarythmiques tels que l'amiodarone, le vérapamil ou encore le bepridil, des inhibiteurs de canaux ioniques, ont démontré un effet antiviral sur l'entrée des Filovirus (Ebola) (Gehring et al., 2014; Johansen et al., 2015; Salata et al., 2015), mais aussi sur le SARS-CoV-1 et le VHC (Cheng et al., 2013; Stadler et al., 2008).
- Dès le début de la pandémie de SARS-CoV-2, la chloroquine, antipaludique utilisé contre le parasite Plasmodium, a été mise en avant pour son potentiel antiviral. Des études précédentes ont montré une inhibition de plusieurs virus *in vitro* : le VIH, le SARS-CoV, le MERS-CoV, HCoV-OC43, les alphavirus, Ebola, le virus de la Dengue, les virus grippaux...

(Brouwers et al., 2008; de Wilde et al., 2014; Dyll et al., 2014; Ferraris et al., 2015; Kaptein and Neyts, 2016; Keyaerts et al., 2009; Wang et al., 2015; Yan et al., 2013).

- La chlorpromazine (CPZ), un des premiers médicaments psychotropes qui s'est révélé efficace contre la schizophrénie, a démontré son effet antiviral contre les virus Ebola, le MERS-CoV et les adénovirus (Bhattacharyya et al., 2010; de Wilde et al., 2014; Diaconu et al., 2010; Dyll et al., 2014). Enfin, l'observation de l'incidence plus faible des patients en service psychiatrique suggère que la CPZ pourrait avoir un effet antiviral contre le SARS-CoV-2 (étude ReCoVery) (Plaze et al., 2021, 2020).

En conclusion, l'évaluation du repositionnement thérapeutique des CADs en culture cellulaire puis dans un modèle animal semble nécessaire avant de proposer un essai clinique chez les patients humains infectés par le SARS-CoV-2. L'avantage non négligeable de l'étude de ces molécules provient de leur utilisation à long terme sur un nombre important de patients : leur profil pharmacologique et de toxicité est donc bien connu. Le repositionnement de ces drogues, surtout dans le cas d'émergence ou réémergence virale, constitue une approche thérapeutique intéressante. Cette méthode a déjà été utilisée dans le cas de l'épidémie d'Ebola en 2013, menant à la mise en place d'un essai clinique en quelques mois (NCT02307591) (Dyll et al., 2014; Salata et al., 2017, 2015).

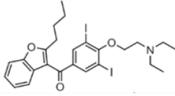
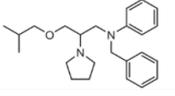
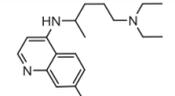
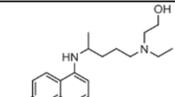
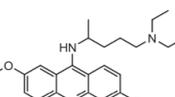
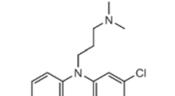
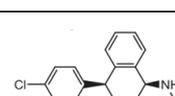
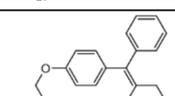
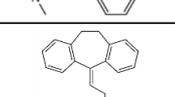
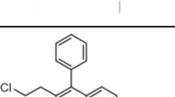
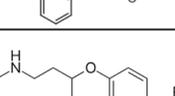
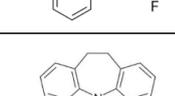
NOM DES CADs	STRUCTURE MOLECULAIRE	ACTIVITE ANTIVIRALE	UTILISATION MEDICALE	REFERENCES
Amiodarone		Filovirus Virus Ebola VHC SARS-CoV	Antiarythmique de classe III	Cehring et al., 2014 Salata et al., 2015 Stadler et al., 2008 Cheng et al., 2013
Bepridil		Virus Ebola	Antagoniste des canaux calciques	Johansen et al., 2015
Chloroquine		Filovirus HCoV-OC43 KSHV MERS-CoV SARS-CoV SARS-CoV-2	Antipaludique (traitement de la malaria)	Akpovwa, 2016 Savarino et al., 2003 Liu et al., 2020 Askarian et al., 2022
Hydroxychloroquine		Virus de la Dengue de type 2 KHSV SARS-coV-2	Traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux	
Quinacrine		Dengue de type 2 Virus Zika Ebola virus	Anti-protozoaire	Johansen et al., 2015 Balasubramanian et al., 2017
Chlorpromazine		CCHFV MERS-CoV SARS-CoV SARS-CoV-2	Anti-psychotique	Daniel et al., 2015 Ferraris et al., 2015 De Wilde et al., 2014 Dyall et al., 2014 Plaze et al., 2021, 2020
Sertraline		Virus Ebola Rhinovirus	Antidépresseur	Johansen et al., 2015
Tamoxifène		SARS-CoV MERS-CoV	Modulateur sélectif des récepteurs des oestrogènes	Dyall et al., 2014 De Wilde et al., 2014
Amitriptyline		SARS-CoV-2 Virus Ebola Rhinovirus	Antidépresseur, inhibiteur non sélectif de la recapture de la monoamine	Grassmé et al., 2005
Torémifène		Virus Ebola MERS-CoV SARS-CoV	Inhibiteur compétitif du récepteur des œstrogènes	Johansen et al., 2015 De Wilde et al., 2014 Dyall et al., 2014
Fluoxetine		SARS-CoV-2	Antidépresseur, inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine	Hoertel et al., 2021
Imipramine		Virus Ebola	Antidépresseur, inhibiteur non sélectif de la recapture de la monoamine.	Carette et al., 2011

Tableau 7 : Liste des principaux « CADs » ayant une activité antivirale connue sur plusieurs virus de familles différentes.

Objectifs & problématiques

Au cours de cette thèse, nous avons étudié l'interaction hôte-virus entre le SARS-CoV-2 et les cellules épithéliales nasales des voies respiratoires humaines, qui constituent le site de primo-infection chez un nouvel hôte (Zhou et al., 2020; N. Zhu et al., 2020). En collaboration avec l'équipe du Pr. Bruno Louis (Eq. 13, IMRB), des cellules épithéliales nasales humaines (CENHs) ont été différenciées à partir de polypectomies (Coste et al., 2000), c'est-à-dire après chirurgie endo-nasale, chez des patients atteints de polypose. Les CENHs cultivées à l'interface air-liquide produisent du mucus au pôle apical, qui contient des quantités élevées de petites vésicules extracellulaires (mu-sEVs « small extracellular vesicles »).

Dans le contexte de la pandémie de SARS-CoV-2, les objectifs de la première partie de la Thèse ont été de :

- Caractériser les sEVs et IEVs produites dans le mucus par des CENHs de plusieurs patients,
- Évaluer l'effet des mu-sEVs sur l'infection par le SARS-CoV-2,
- Étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués.

La seconde partie de la Thèse s'est focalisée sur le repositionnement thérapeutique de molécules CADs, « FDA-approved », pour répondre à la pandémie de SARS-CoV-2. En collaboration avec le Pr. Jamain et le Pr. Vaugeois. Nos objectifs étaient de :

- 1) Évaluer l'effet antiviral des composés CADs,
- 2) Caractériser l'effet anti-coronavirus d'un CAD, la desloratadine (DSD),
- 3) Caractériser la relation structure/activité,
- 4) Déterminer l'étape du cycle viral ciblée par la DSD,
- 5) Évaluer l'activité antivirale de la DSD dans des cellules épithéliales nasales humaines.

Matériel et méthodes

I) Culture cellulaire

a) Lignées cellulaires

Les cellules VERO-E6 (ATCC, CRL-1586), lignée cellulaire de rein de singe vert Africain, ainsi que des fibroblastes issus de poumon de fœtus humain MRC-5 (ATCC, CCL-171) ont été maintenues dans du milieu de culture *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM ; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) supplémenté avec 50 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,1 µg/mL de fungizone (ThermoFischer Scientific).

Les cellules Calu-3 isolées de cancer de poumon humain (ATCC, HTB-55), les cellules HRT-18 (ATCC-CCL-244) isolées du gros intestin d'un patient atteint d'adénocarcinome et les cellules VCaP (« vertebral-cancer of the prostate cells », ATCC Manassasn Virginia, USA) ont été maintenues dans le même milieu DMEM supplémenté respectivement en acides aminés non essentiels (NEAA, ThermoFischer Scientific) ou 10% de bicarbonate de sodium (Gibco™) ou 2 nM de DHT (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA).

b) Cultures primaires - Cellules épithéliales nasales humaines (CENH)

Les cellules primaires épithéliales nasales humaines (CENHs) ont été obtenues à partir de déchets chirurgicaux provenant de polypectomies nasales ou éthmoïdectomies de patients atteints de rhino-sinusite chronique.

Les patients ont été inclus de manière prospective, en accord avec le Comité de Protection des Personnes (IDF X 2016-01-01) et après accord de participation. La technique de mise en culture primaire des CENHs a été mise en place par l'équipe 13 de l'IMRB (Pr. B. Louis). Cette méthode permet d'obtenir un épithélium pluristratifié, cilié et sécrétoire dont les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles sont proches de celles observées *in vivo*.

Le protocole de culture des CENHs comprend 5 étapes clés :

- 1) Transport du bloc jusqu'au laboratoire : après résection chirurgicale, les polypes sont placés dans un milieu de transport (milieu de base avec double dose d'antibiotiques) et conservés à 4°C pour éviter toute détérioration du tissu.

- 2) Dissociation cellulaire : les polypes sont ensuite isolés par aspiration de leur milieu de transport et rincés dans un milieu tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies) contenant du DTT (5 nM; dithiothéitol, Sigma) permettant l'élimination du mucus et des caillots de sang. S'ensuit une digestion enzymatique de 18H à 4°C dans du milieu de base contenant une protéase (Pronase 0,1% ; Sigma).
- 3) Mise en culture : après digestion enzymatique, le milieu d'ensemencement (milieu de base supplémenté de 5% de SVF et de 1% d'acides aminés non essentiels) est ajouté, volume à volume, afin d'inhiber les effets de la pronase. Les cellules dissociées sont récupérées par filtration et centrifugation à 1500 tr/min pendant 7 minutes. Le surnageant n'est pas conservé, seul le culot cellulaire contient les cellules qui vont être dissociées par l'action de Trypsine-EDTA Solution 10X (Life Technologies). L'inactivation de la trypsine se fait par l'ajout du même volume de milieu d'ensemencement. Les cellules sont centrifugées puis comptées sur cellule de Malassez pour être ensemencées sur des filtres de 1 cm² (pores de 0,4 µm) montés dans des inserts Transwell (Costar) en plaques 12 puits. Avant tout ensemencement, chaque Transwell a été recouvert d'une couche de collagène IV déposée par sédimentation (10 à 20 µg par cm²). Après comptage, 1 million de cellules sont ensemencées à la surface apicale du filtre. Ces cellules sont maintenues dans un milieu de nutrition de base additionné d'Ultrosor-G (Pall France) à 2%, un substitut de SVF. Au pôle basal, 1 mL de milieu de nutrition est ajouté.
- 4) Mise en interface : après 24H de culture en immersion, le milieu de culture est aspiré, éliminant ainsi les cellules non adhérentes à l'insert, et les cellules adhérentes sont lavées avec du PBS.
- 5) Entretien : le milieu de nutrition de base est remplacé par du milieu de nutrition PneumaCult™-ALI (StemCell Technologies, Canada) et les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO₂. Quotidiennement, les cellules sont observées au microscope pour suivre la formation de l'épithélium nasal. Toutes les 48H, le milieu de nutrition est changé du côté basal. La différenciation en épithélium cilié et sécrétoire s'effectue en 21 jours et cet épithélium peut être cultivé jusqu'à 3 mois. Afin de suivre la confluence et la perméabilité de l'épithélium, l'utilisation de l'EVOM (« Epithelial Volt/Ohm Meter »), permettant le calcul de la résistance trans-épithéliale en Ohms, est nécessaire.

c) Modèles d'infection

SARS-CoV-2 (souche Wuhan - M80)

Un échantillon de virus obtenu à partir d'un écouvillon nasopharyngé de patient prélevé à l'hôpital Henri Mondor en mars 2020, a été utilisé pour infecter des cellules VERO-E6 dans du milieu DMEM supplémenté (2% de SVF, 100 µg/mL streptomycine, 50 UI/mL pénicilline et 0,1 µg/mL fungizone) pendant 4H, sous agitation à 37°C, en laboratoire de confinement L3. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS, puis du milieu de culture a été ajouté. Trois jours plus tard, le surnageant contenant le virus SARS-CoV-2 a servi pour réinfecter de nouvelles cellules jusqu'à l'obtention d'un stock final de 250 mL de virus ($\sim 2,04 \times 10^4$ TCID₅₀/mL).

SARS-CoV-2 (variant Alpha)

Le même protocole a été utilisé pour amplifier le variant Alpha du virus SARS-CoV-2, à partir d'un échantillon de patient de l'Hôpital Henri Mondor, en utilisant des cellules Calu-3 pour la constitution d'un stock de virus ($\sim 1 \times 10^4$ TCID₅₀/mL).

Amplification des souches HCoV-229E et HCoV-OC43

La souche HCoV-229E a été fournie par le Pr. Astrid Vabret (CHU Caen, France), la souche HCoV-OC43 a été fournie par l'ATCC (VR-1558). La souche HCoV-229E a été amplifiée en cellules MRC5 (RD-Biotech, Besançon, France) à 36 doublements et la souche HCoV-OC43 en cellules HRT-18 (ATCC, CCL-244). Le même protocole a été utilisé pour les deux souches. Les cellules correspondantes ont étéensemencées dans des flasques T75 (75 cm³). Lorsque la culture a atteint 90% de confluence, les cellules ont été infectées avec 5 mL de virus (stock antérieur du laboratoire) dilués au 1/2 dans du DMEM supplémenté avec 2% de SVF, 100 µg/mL de streptomycine, 50 UI/mL de pénicilline et 0,1µg/mL de fungizone, pendant 4H à 35°C, 5% de CO₂, sous agitation. Après 4H, le même volume d'infection a été ajouté au milieu. Au bout de 72H, 90% des cellules avaient été lysées et le surnageant contenant le virus a été récupéré, centrifugé 5 min à 300g pour éliminer les débris cellulaires. Les 10 mL finaux récupérés ont ensuite été utilisés pour réinfecter de nouvelles cellules jusqu'à atteindre un stock de 250 mL de virus ($\sim 2,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL pour le HCoV-229E ; $\sim 1,0 \times 10^6$ TCID₅₀/mL pour le HCoV-OC43).

Les stocks viraux ont tous été aliquotés et placés dans des congélateurs à -80°C pour conservation à long terme.

II) Biologie moléculaire

a) Extraction d'ARN

Extraction d'ARN à partir de surnageants de culture

Les surnageants de culture ont été récupérés et lysés dans 560 µL de tampon AVL. Pour purifier l'ARN viral sécrété au cours des différentes infections, nous avons utilisé le kit QIAmp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) selon les recommandations du fournisseur.

Extraction d'ARN intracellulaire

Afin de purifier l'ARN viral produit dans les cellules infectées, le kit RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) a été utilisé après une lyse préalable des cellules dans 350 µL de tampon RLT. Pour les études concernant le repositionnement thérapeutique des CADs, le kit "SV96 Total RNA isolation System" (Promega) a été utilisé selon le protocole indiqué par le fournisseur.

b) RT-qPCR

L'étape de transcription inverse des ARN viraux et cellulaires a été réalisée avec le kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription kit" (ThermoFischer Scientific). Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus ont été analysés par PCR quantitative en temps réel avec des amorces spécifiques de chaque virus étudié (tableau 8) avec le kit TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), selon les recommandations du fournisseur.

Le kit Promega (GoTaq^R Probe 1-Step RT-qPCR, A6121, Promega) a également été utilisé. Les RT-qPCR ont été effectués avec l'appareil QuantStudio 5 Real-Time PCR system (ThermoFischer Scientific). La réplication virale du SARS-CoV-2 a été quantifiée par la méthode des DDCT. Tous les échantillons d'ARN intracellulaires ont été normalisés avec les endogènes GAPDH ou 18S.

VIRUS	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sonde FAM
SARS-CoV-2	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'	3'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-5'	5'-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ-1-3'
HCoV-229E	5'-CGCAAGAATTCAGAACCAGAG-3'	5'-GGGAAGTCAGGTTCTTCAACAA-3'	5'-FAM-CCACACTTCAATCAAAAAGTCCCAAAT-TAMRA-3'
HCoV-OC43	5'-GTGGTTTTGCTGTTTATGTTAAGT-3'	5'-AGATATTATTTCTCAACAATGCGG-3'	5'-FAM-AATTACCGACTGCCATCAACCCAA-TAMRA-3'

Tableau 8 : Amorces et sondes utilisées pour la RT-qPCR

III) Biochimie

a) Western-blot

Les échantillons cellulaires sont lysés dans un tampon EZ Buffer contenant 20 mM de Tris-HCL, 100 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 0,5% de NP40 et 10% de glycérol. Les lysats protéiques ainsi obtenus sont mélangés avec du tampon de charge (4X Applied Biosystem), avec ou sans agents réducteurs en fonction des anticorps utilisés (Tableau 2). Avant dépôt des échantillons sur des gels NuPage 4-12% Bis-Tris gel (ThermoFischer Scientific), les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 10 minutes. Une migration de 1H30 à 130V, dans du tampon SDS MES Running Buffer (ThermoFischer Scientific) est alors réalisée, puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (ThermoFischer Scientific) pendant 1H en milieu liquide dans du tampon de transfert (25 mM Tris Base, 192 mM Glycine, 20% éthanol pur RPE) 1X à 4°C à 0,3 A. Par la suite, la membrane est saturée avec une solution de 5% de sérumalbumine bovine (BSA, Euromedex, France). Enfin, la membrane est incubée la nuit à 4°C, sous agitation, en présence d'un anticorps primaire (tableau 9), puis rincée avec du TBS 1X (Tris Buffered Saline) supplémenté de 0,1% de Tween. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps secondaires pendant 1H à température ambiante (tableau 10), puis lavée 3 fois au TBS 1X 0,1% Tween avant d'être incubée avec le « ECL Select Western Blotting Detection Reagent, Amersham » (GE Healthcare). La membrane est enfin révélée avec une caméra ImageQuant Las4000 (GE Healthcare).

b) Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées dans des « Labtek Permanox » de 8 puits (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis). Chaque puits estensemencé avec 30 000 cellules VERO-E6 puis infecté à M.O.I (Multiplicity Of Infection - Multiplicité d'infection) de 1 pendant 24H. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS +/- (avec Ca²⁺ et Mg²⁺) et fixées au Paraformaldéhyde 4% (PFA, ThermoFischer Scientific) pendant 10 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Après trois lavages au PBS +/-, les « labtek » sont perméabilisées et saturées avec une solution 5% de BSA Fraction V,

10 mg/mL, Triton X-114 0,3%, dans du PBS +/+, à 37°C en chambre humide pendant 1H. Après 3 lavages au PBS +/+, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, après 5 lavages au PBS +/+, l'anticorps secondaire est mis au contact des cellules pendant 1H, en chambre humide à 37°C. Enfin, après lavages au PBS +/+, les cellules sont incubées avec du DAPI puis rincées et enfin montées entre lames et lamelles avec du Fluoromount-G (ThermoFischer Scientific). Les cellules ont été observées avec un microscope à fluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Protéine détectée	Référence	Espèce	Dilution
ARN double brin	Scicons J2	Souris	1/400
SARS-CoV-2 N	Genetex 135357	Lapin	1/1000
S1 Spike SARS-CoV-2	ThermoFisher Scientific PA5-81795	Lapin	1/1000
TMPRSS2	Abcam 109131	Lapin	1/1000
ACE-2	Abcam 15348	Lapin	1/1000
TSG101	Abcam Ab83	Souris	1/1000
CD63	Abcam 59479	Souris	1/1000
CD81	Abcam 79559	Souris	1/1000
CD9	Abcam 92726	Lapin	1/1000
Alix	Abcam 117600	Souris	1/1000
Alpha-tubuline	Abcam 24610	Souris	1/1000

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western-Blot et en Immunofluorescence

Espèce reconnue	Référence	Dilution	Espèce
Lapin-HRP	ThermoFischer	1/10000	Chèvre
Souris-HRP	ThermoFischer	1/10000	Chèvre
Souris AlexaFluor 488	ThermoFischer	1/400	Chèvre
Lapin AlexaFluor 594	ThermoFischer	1/400	Chèvre

Tableau 10 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western-Blot et immunofluorescence

c) Immunohistochimie sur CENH

Après infection des CENHs, les puits contenant l'épithélium nasal sont lavés au PBS +/- et fixés avec du paraformaldéhyde 10% pendant 12 heures. Chaque membrane est ensuite découpée afin de dégager l'épithélium de son support, puis plongée dans du Formol dans une cassette. Les

épithéliums sont envoyés au service d'anatomopathologie de l'Hôpital Henri Mondor où ils sont inclus en paraffine puis découpés en portions de 4 µm d'épaisseur.

Chaque lame obtenue peut servir pour effectuer une immunohistochimie. Les échantillons sont déparaffinés dans des bains successifs de xylène puis d'éthanol, réhydratés dans de l'eau, et traités avec une solution « Antigen Retrieval » (« citrate buffer (Vektor) »). Enfin, les épithéliums peuvent être saturés à l'aide d'une solution de BSA à 5%, et le même protocole que pour l'immunofluorescence est suivi.

d) Test de cytotoxicité

Afin d'évaluer la toxicité des composés utilisés, des cellules VERO-E6 ont étéensemencées en plaques 96 puits à hauteur de 5000 cellules par puits et mises en culture pendant 24H. Les molécules d'intérêt sont ensuite mises au contact des cellules, en gamme de concentrations, pendant 48H, afin de mimer la durée des traitements sans infection. La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant un test MTS (« [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] »). Cette méthode colorimétrique réunit deux composés, le tétrazolium et le méthosulfate de phénazine (« PMS, phenazine methosulfate »), qui ensemble produisent le Formazan. Après lecture de l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, la quantité de formazan est proportionnelle au nombre de cellules vivantes en culture.

IV) Caractérisation de l'activité antivirale de molécules CADs « FDA-approved »

a) Screening des « CADs »

Des cellules VERO-E6 ont étéensemencées dans des plaques 48 puits à raison de 30 000 cellules par puits pendant 24H. Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont infectées par le virus M80 - SARS-CoV-2 à une M.O.I de 0,2, pendant 2H en présence de 10µM de composés. Après 48H d'infection, l'ARN du SARS-CoV-2 est extrait des cellules et du surnageant et quantifié par RT-qPCR en utilisant la technologie Taqman. La quantité d'ARN relative du SARS-CoV-

2 est déterminée en fonction des concentrations des composés. Les graphiques ont été réalisés grâce au logiciel SigmaPlot v11 software.

Le même protocole a été utilisé en ce qui concerne les infections par les virus HCoV-229E (MOI de 0,5) en cellules MRC5 et le virus HCoV-OC43 (MOI de 0,5) en cellules HRT-18. L'ARN viral a été extrait des cellules et quantifié par RT-qPCR après 24H d'infection.

b) Gamme de concentrations de « CADs »

RT-qPCR

Des cellules VERO-E6 ont étéensemencées à hauteur de 30 000 cellules par puits dans des plaques de 48 puits pendant 24H. Puis, les cellules ont été infectées à une MOI de 0,2 pendant 2H en présence de concentrations croissantes de composés. Les ARN ont été extraits du surnageant et des cellules puis l'ARN viral a été quantifié par RT-qPCR 48H post-infection.

Immunofluorescence

En suivant le protocole d'immunofluorescence détaillé ci-dessus, des cellules VERO-E6 ont été infectées par la souche M80 du SARS-CoV-2 à une MOI de 1 pendant 24H en présence de concentrations croissantes de composés CADs.

c) Expérience de temps d'ajout (« time-of-addition assay »)

Des cellules VERO-E6 ont étéensemencées 24H avant infection à raison de 30 000 cellules par puits dans une plaque de 48 puits. Les composés d'intérêt ont été ajoutés à des concentrations de 5 ou 10 μ M, 3H avant, pendant l'infection, ou 3H, 6H ou 9 H post-infection. L'effet antiviral a été mesuré 48H post-infection par RT-qPCR.

d) Test d'entrée (« entry assay »)

Des cellules VERO-E6 ont étéensemencées à hauteur de 30 000 cellules par puits dans des « Labtek Permanox » 24H avant infection. Le composé a été ajouté au moment de l'infection et laissé pendant 2H ou durant la totalité de l'expérience (9H). L'effet antiviral a été mesuré par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'ARN double-brin du virus. La

quantification du nombre de cellules infectées par rapport au nombre total de cellules a été calculée à partir de photos prises au microscope électronique Zeiss, sur 5 champs différents contenant approximativement le même nombre de cellules par puits.

e) Infection de CENHs par le SARS-CoV-2

Après 4 semaines de culture, les cellules épithéliales nasales primaires peuvent être infectées. Pour cela, la souche M80 du SARS-CoV-2 a été diluée au 1/10e et 20 µL de virus a été ajouté sur le pôle apical de l'épithélium goutte à goutte. L'épithélium a été infecté pendant 4H, en l'absence ou en présence de composés déposés aux pôles apical et basal, puis lavé avec du PBS -/. Afin d'évaluer la cinétique d'infection de cet épithélium, le pôle apical a été lavé toutes les 24H avec 200µL de PBS -/ pour récupérer la production virale. Ces surnageants sont ensuite lysés, les ARN extraits et l'ARN viral spécifiquement quantifié par RT-qPCR à différents points de cette cinétique.

V) Rôle proviral des petites vésicules extracellulaires de CENHs dans l'infection à SARS-CoV-2

a) Préparation des petites vésicules extracellulaires dérivées de CENHs

La préparation des vésicules a été réalisée en collaboration avec l'équipe 13 (TrepCa), adaptée d'une étude précédente (Ludwig et al., 2018). Dans notre étude, la purification des petites vésicules extracellulaires de VCaP a été effectuée par centrifugation différentielle du milieu de culture et utilisation de PEG (Polyéthylène Glycol), et par centrifugation différentielle pour les sEVs issues du mucus des CENHs.

Pour les vésicules issues des cellules de cancer de la prostate (VCaP), environ 1,5 L de milieu a été collecté et centrifugé deux fois à 2000 x g pendant 20 minutes. Après centrifugation, 10% de PEG 6000 et 75 mM de NaCl sont ajoutés aux surnageants. Après incubation à 4°C toute la nuit, les échantillons sont centrifugés de nouveau à 2000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots, contenant les vésicules, sont récupérés et dissous dans 0,9% de NaCl toute la nuit, puis centrifugés à 16,500 g pendant 20 minutes à 4°C. Par la suite, les surnageants sont collectés et centrifugés à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4°C. Afin d'éliminer les résidus de PEG, les sEVs sont rincées une

fois avec 0,9% de NaCl et centrifugées de nouveau à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4°C pour être finalement resuspendues dans 0,9% de NaCl.

La préparation des sEVs produites dans le mucus de cellules épithéliales nasales humaines a été réalisée à partir d'environ 5 mL d'échantillon provenant de patients distincts. Les échantillons biologiques ont été centrifugés à 2000 x g pendant 20 minutes à 4°C, puis les surnageants obtenus ont été de nouveau centrifugés à 16 500 x g pendant 20 minutes à 4°C. Après élimination du culot, les surnageants sont ultracentrifugés à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4°C. Les culots contenant les vésicules sont rincés avec du NaCl 0,9% et centrifugés à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4°C. Tous les échantillons de vésicules sont ensuite conservés à -20°C à court terme ou -80°C pour le long terme.

b) Microscopie électronique à transmission : caractérisation morphologique des mu-sEVs

Afin d'observer la morphologie des sEVs sécrétées dans le mucus par des CENHs, un échantillon dilué au 1/50 dans du PBS a été analysé par microscopie électronique à transmission, en collaboration avec l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), CNRS UMR7182. Les échantillons (3 µL) sont préparés et déposés sur des grilles en cuivre, séchés à température ambiante puis colorés avec 1% d'acétate d'uranyle. La morphologie des vésicules a été étudiée par microscopie électronique à transmission (Tecnai F20 Microscope, FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA).

c) Mesure de la taille et de la concentration des vésicules extracellulaires

La concentration et la taille des vésicules a été mesurée grâce à la technologie TRPS (« Tunable Resistive Pulse Sensing ») en collaboration avec l'équipe TrePCa, en utilisant l'instrument Gold qNano (Izon Science, Medford, Massachusetts) permettant de mesurer les propriétés de nanoparticules suspendues dans des électrolytes, à l'aide du logiciel « Izon Control Suite » (software version V3.4.2.44).

Les vésicules provenant des VCaP ont été analysées en utilisant des nanopores NP150, étirés 47,5 mm sous un voltage de 0,7 mV à une pression de 7-10 mbar, quant aux vésicules provenant du mucus de CENH, les nanopores NP150 sont étirés sur 51 mm sous un voltage de 0,48 mV et une pression de 5 mbar. La calibration a été effectuée en utilisant des billes de polystyrène carboxylées. Chaque échantillon de vésicules contenant un minimum de 500 particules a été

compté en triplicata, et les datas collectées ont été analysées en suivant les instructions du fabricant.

Résultats

A) Rôle proviral des petites vésicules extracellulaires dérivées de cellules épithéliales humaines respiratoires dans l'infection par le SARS-CoV-2

En collaboration avec l'équipe du Pr Vacherot, nous avons émis l'hypothèse de la présence de vésicules extracellulaires au niveau du site de primo-infection du SARS-CoV-2 qui pourraient jouer un rôle dans le cycle de vie de ce virus. Le but principal de ce travail a donc été de caractériser la composition des sEVs produites au pôle apical de l'épithélium nasal humain et d'évaluer leur(s) rôle(s) potentiel(s) dans l'infection par le SARS-CoV-2.

En collaboration avec l'équipe du Pr. B. Louis (équipe 13, IMRB) composée de chirurgiens ORL, nous avons obtenu des cellules épithéliales nasales primaires humaines (CENHs) provenant de polypectomies issues de chirurgie endo-nasale de plusieurs patients (Bequignon et al., 2019; Coste et al., 2000).

Le mucus produit au niveau de l'épithélium nasal humain constitue la première barrière de défense de l'organisme contre le SARS-CoV-2. Afin d'évaluer le rôle du mucus dans l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons infecté les CENHs (avec ou sans mucus) avec 20 μ L d'inoculum de SARS-CoV-2 ($\sim 2,04 \times 10^4$ TCID₅₀/mL). Nous avons observé une diminution de la réplication virale 72H après infection (figure 1A). Ces résultats suggèrent que le mucus contient des éléments favorisant l'infection de CENHs par SARS-CoV-2.

Afin de démontrer la présence des EVs dans le mucus, nous avons effectué une purification par ultracentrifugation différentielle. En moyenne, des particules d'un diamètre de 150 nm correspondant à la taille des petites VEs (mu-sEVs) et de forme discoïde ont été trouvées. La caractérisation de ces vésicules par Western-Blot a montré la présence de plusieurs marqueurs vésiculaires : CD9 à la surface membranaire des vésicules, TSG101 (« Tumor Susceptibility Gene 101 protein ») et Alix (« ALG-2-interacting protein X »), ainsi que des facteurs d'entrée du SARS-CoV-2 : ACE2 et TMPRSS2. Ces facteurs indiquent que les CENH produisent du mucus contenant des vésicules extracellulaires portant ACE2 et TMPRSS2.

L'évaluation de l'effet des EVs sur l'infection a montré un rôle proviral important des mu-sEVs à des concentrations physiologiques. Les résultats ont montré que le niveau de production d'ARN du SARS-CoV-2 le plus élevé est observé lorsque les CENHs ont été infectées par des particules virales pré incubées avec des mu-sEVs, en présence du mucus de la cellule réceptrice (Figure 2B).

En raison des quantités limitées de mu-sEVs produites par les CENHs, une lignée cellulaire VCaP, exprimant des niveaux élevés de TMPRSS2, tant au niveau ARNm que protéines (F. Li et al., 2021), a été utilisée. La caractérisation complète de ces vésicules a été effectuée par Western-Blot et a montré la présence des marqueurs vésiculaires sur les VCaP-sEVs : CD9, CD81, CD63, TSG101, Alix et des facteurs d'entrée du SARS-CoV-2 (ACE2 et TMPRSS2 forme entière et forme clivée active) (figure S4B). De la même manière que les mu-sEVs, la production d'ARN du SARS-CoV-2 au pôle apical des CENHs est améliorée lorsque les particules virales sont pré-incubées avec les VCaP-sEVs. Afin d'élucider les mécanismes par lesquels les mu-sEVs facilitent l'infection par le SARS-CoV-2, nous avons donc choisi d'utiliser les VCaP-sEVs.

Nous avons testé *in vitro* différents modèles de lignées cellulaires pour leur infection par SARS-CoV-2, notamment les cellules Calu-3 (dans lequel le virus rentre préférentiellement par la fusion membranaire), les cellules VERO-E6 et A549 (dans lesquelles le virus rentre préférentiellement par la voie endosomale). Les résultats obtenus montrent que la pré-incubation de particules virales et de VCaP-sEVs favorise l'infection de cellule Calu-3 uniquement (figure 3A).

Afin d'évaluer si les VCaP-sEVs favorisent l'étape d'entrée du SARS-CoV-2, nous avons effectué une expérience de temps d'ajout (figure S5). Les résultats ont montré une amélioration de l'infection lorsque les VCaP-sEVs sont pré-incubées avec le virus ou sont ajoutées au moment de l'infection, mais pas lorsqu'elles ont été ajoutées 2H après infection. Ces résultats indiquent que les VCaP-sEVs facilitent une étape précoce du cycle viral, probablement l'entrée.

Afin de déterminer si l'intégrité des protéines de surface est nécessaire pour que les VCaP-sEVs exercent leur fonction provirale, des particules de SARS-CoV-2 ont été incubées avec des VCaP-sEVs intactes ou préalablement traitées à la protéinase K (PK). Ce traitement a montré que l'intégrité des protéines des sEVs accessibles en surface, y compris ACE2, est obligatoire pour que les vésicules exercent leur effet proviral dans les cellules permissives.

Nous avons montré en cellule Calu-3 que l'inhibition de TMPRSS2 cellulaire par le camostat (10 µM) réduisait l'infection par SARS-CoV-2 indépendamment de la pré incubation du virus avec

les VCaP-sEVs. Ceci suggère donc un rôle essentiel de TMPRSS2 cellulaire pour l'entrée virale dans nos conditions expérimentales.

Pour mieux comprendre le rôle de l'activité vésiculaire de TMPRSS2 pendant l'infection par le SARS-CoV-2, une analyse par western-blot de la dynamique des clivages de la protéine spike à différents temps après incubation avec les VCaP-sEVs en l'absence ou en présence de camostat mésylate (100 μ M), a été réalisée (figure 5B). La pré-incubation des VCaP-sEVs avec le virus engendre un clivage de spike au niveau du site S1/S2 qui est inhibé par le camostat mésylate. De la même manière, cette expérience a été réalisée avec les mu-sEVs incubées avec la souche ancestrale (Wuhan) et la souche alpha du SARS-CoV-2 et a révélé un clivage efficace de Spike en S1/S2, démontrant le rôle de TMPRSS2 vésiculaire dans l'activation du virus.

L'ensemble de ce travail a permis la publication d'un article dans « Journal of Extracellular Vesicles ».

Proviral role of human respiratory epithelial cell-derived small extracellular vesicles in SARS-CoV-2 infection

François Berry¹ | Margot Morin-Dewaele¹ | Amene Majidipur² | Thibaud Jamet² |
Sophie Bartier^{3,4,5,6} | Eva Ignjatovic¹ | Donatella Toniutti¹ | Jeanne Gaspar Lopes² |
Pascale Soyeux-Porte² | Pascale Maillé^{1,7} | Carolina Saldana^{2,8} | Rozenn Brillet¹ |
Nazim Ahnou¹ | Laurent Softic¹ | Benoit Couturaud⁹ | Éric Huet² |
Abdelhakim Ahmed-Belkacem¹ | Slim Fourati^{1,10} | Bruno Louis⁶ | André Coste^{3,4,5,6} |
Émilie Béquignon^{3,4,5,6} | Alexandre de la Taille^{2,11} | Damien Destouches² |
Francis Vacherot² | Jean-Michel Pawlotsky^{1,10} | Virginie Firlej² | Patrice Bruscella¹

¹Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, Team "Viruses, Hepatology, Cancer", Univ Paris Est Creteil, Créteil, France

²Team "Therapeutic Resistance in Prostate Cancer" (TRePCa), Univ Paris Est Creteil, Créteil, France

³Department of ENT and Cervico-Facial Surgery, AP-HP, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France

⁴Department of ENT and Cervico-Facial Surgery, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

⁵Department of Pulmonology, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

⁶Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, CNRS EMR 7000, Team "Biomechanics and Respiratory System", Univ Paris Est Creteil, Créteil, France

⁷Department of Pathology, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

⁸Department of Oncology, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

⁹Institute of Chemistry and Materials (ICMPE), Univ Paris Est Creteil, CNRS UMR7182, Créteil, France

¹⁰Department of Virology, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

¹¹Department of Urology, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, Créteil, France

Correspondence

Patrice Bruscella, Team "Viruses, Hepatology, Cancer", Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Hôpital Henri Mondor, 1 rue Gustave Eiffel, 94010 Créteil, France.
Email: patrice.bruscella@inserm.fr

François Berry and Margot Morin-Dewaele participated equally.

Francis Vacherot, Jean-Michel Pawlotsky, Virginie Firlej, and Patrice Bruscella participated equally.

Funding information

"UFR Santé-UPEC" cross-teams COVID-19 grant

Abstract

Small Extracellular Vesicles (sEVs) are 50–200 nm in diameter vesicles delimited by a lipid bilayer, formed within the endosomal network or derived from the plasma membrane. They are secreted in various biological fluids, including airway nasal mucus. The goal of this work was to understand the role of sEVs present in the mucus (mu-sEVs) produced by human nasal epithelial cells (HNECs) in SARS-CoV-2 infection. We show that uninfected HNECs produce mu-sEVs containing SARS-CoV-2 receptor ACE2 and activated protease TMPRSS2. mu-sEVs cleave prefusion viral Spike proteins at the S1/S2 boundary, resulting in higher proportions of prefusion S proteins exposing their receptor binding domain in an 'open' conformation, thereby facilitating receptor binding at the cell surface. We show that the role of nasal mu-sEVs is to complete prefusion Spike priming performed by intracellular furin during viral egress from infected cells. This effect is mediated by vesicular TMPRSS2 activity, rendering SARS-CoV-2 virions prone to entry into target cells using the 'early', TMPRSS2-dependent pathway instead of the 'late', cathepsin-dependent route. These results

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Extracellular Vesicles* published by Wiley Periodicals, LLC on behalf of the International Society for Extracellular Vesicles.

indicate that prefusion Spike priming by mu-sEVs in the nasal cavity plays a role in viral tropism. They also show that nasal mucus does not protect from SARS-CoV-2 infection, but instead facilitates it.

KEYWORDS

human nasal epithelial cells, SARS-CoV-2, small extracellular vesicles, Spike prefusion priming, TMPRSS2

1 | INTRODUCTION

The emergence in December 2019 in Wuhan, Hubei province, China (Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020) and the rapid spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been responsible for a worldwide pandemic that created a global sanitary, economic, political, and social crisis. As of July 20, 2022, coronavirus disease 2019 (COVID-19) has been responsible for at least 569,898,918 cases and 6,392,173 deaths worldwide (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>).

The most common clinical presentation of COVID-19 includes fever, cough, shortness of breath and/or sputum production. COVID-19 may lead to respiratory failure and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Infected patients often report symptoms that suggest the involvement of organs outside of the respiratory tract, including signs of haematological, cardiovascular, renal, gastrointestinal, hepatobiliary, endocrinological, neurological, ophthalmological and/or dermatological involvement (Gupta et al., 2020). Loss of taste and smell has been considered as a frequent feature of COVID-19 (Menni et al., 2020), as a result of smell receptor alteration, as previously observed with other respiratory viruses (Hopkins et al., 2020). Nevertheless, this symptom has become rarer with more recently emerged viral variants. Thus, although the main site of SARS-CoV-2 infection remains the epithelial mucosa of the upper respiratory tract and the lungs, infection of other organs and the systemic consequences of dysregulated immune host responses indicate that COVID-19 is a systemic disease (Mehta et al., 2020; Synowiec et al., 2021).

SARS-CoV-2 entry into target cells has been well characterized. It is mediated by the viral Spike (S) protein, which belongs to the class I fusion protein family. The Spike protein ensures receptor binding and fusion of the viral lipid envelope with cellular membranes (Li, 2016; Perlman & Netland, 2009; Shang et al., 2020). The S protein is made of two subunits: (i) S1 which contains an N-terminal domain (NTD), the receptor-binding domain (RBD) and two subdomains (SD1 and SD2), and (ii) S2 which contains the fusion peptide (FP), a conserved motif principally composed of hydrophobic residues that triggers fusion after its insertion into host cell membranes, two heptad repeats (HR1 and HR2), the transmembrane domain (TM) and the cytoplasmic tail (CT) (Tang et al., 2020). SARS-CoV-2 S protein trimers bind the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor with high affinity (Hoffmann, Kleine-Weber et al., 2020; Wang et al., 2020; Yan et al., 2020; Zhou et al., 2020). Several possible conformations of the RBD have been described within the structure of the prefusion SARS-CoV-2 S protein. In the 'closed' conformation, the RBD is in a 'lying down' position, that is, it caps the top of the S2 subunit and is not accessible to ACE2 (Benton et al., 2020). In the 'open' conformation, the RBD changes its orientation so that the ACE2 interacting surface becomes fully exposed at the top of the Spike monomer (Wrobel et al., 2020). In vitro experiments have shown that the vast majority of SARS-CoV-2 RBD trimers is fully closed (i.e., three RBDs in 'closed' conformation) or partially open (one RBD in 'open' and two in 'closed' conformations) (Ke et al., 2020; Walls et al., 2020; Wrapp et al., 2020).

Structural rearrangements of the S protein, from the closed pre-fusion to the post-fusion form, require proteolytic cleavages by host proteases that contribute to viral tropism (Cai et al., 2020; Fuentes-Prior, 2021; Millet & Whittaker, 2015; Tang et al., 2020; White & Whittaker, 2016). The first cleavage separates the S1 subunit, responsible for receptor binding, from the S2 subunit that contains the fusion machinery, resulting in a non-covalent association between S1 and transmembrane-anchored S2. The second proteolytic cleavage occurs at the S2' site within the S2 subunit, exposing the hydrophobic FP that can be inserted into the host cell membrane. This leads to the formation of coiled-coil motifs by HR domains and, finally, to fusion of the viral and cellular membranes (Belouzard et al., 2012; Madu et al., 2009; Whittaker et al., 2021).

As described for SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 can be triggered to fuse either at the plasma membrane ('early pathway') or at the endosome membrane ('late pathway'), depending on the availability of host proteases in its target cells (Matsuyama et al., 2005). Type 2 transmembrane serine proteinase (TMPRSS2) has been shown to play a major role in SARS-CoV-2 entry, by cleaving the S protein at the S2' site (R815) (Bestle et al., 2020; Hoffmann, Kleine-Weber et al., 2020; Matsuyama et al., 2020). The SARS-CoV-2 Spike protein gene contains an insertion of 12 nucleotides at the S1/S2 boundary that creates a minimal proprotein convertase (PC) furin-like cleavage site (PRRAR₁SV) (Coutard et al., 2020). Furin cleavage at the S1/S2 site has been demonstrated, as well as less efficient viral entry in the presence of PC inhibitors (Bestle et al., 2020; Hoffmann, Kleine-Weber, & Pohlmann, 2020; Papa et al., 2021; Shang et al., 2020; Walls et al., 2020). The expression of furin in the trans-Golgi could result in a pre-activated state of the S protein ('open' RBD conformation of the prefusion S protein) in released virions (Shang et al., 2020; Wrobel et al., 2020).

Small Extracellular Vesicles (sEVs) are 50–200 nm in diameter vesicles delimited by a lipid bilayer, formed within the endosomal network or derived from the plasma membrane. They are secreted in various biological fluids, including airway nasal mucus

(Akers et al., 2013; Thery et al., 2018; Wu et al., 2015). The molecular composition of the sEVs varies according to their cellular origin. They consist of selected cellular components located inside the vesicles or associated with their membrane. sEVs usually contain membrane proteins known to cluster into microdomains at the plasma or endosome membranes, mRNAs or non-coding RNAs, and metabolites (Raposo & Stoorvogel, 2013; Zebrowska et al., 2019). sEVs are not only waste transporter. They are pivotal elements involved in intercellular communication, capable to transfer the aforementioned biomolecules from donor to recipient cells (Mathieu et al., 2019).

During the course of viral infections, viruses can hijack the sEV biogenesis system to favour viral particle secretion (Ramakrishnaiah et al., 2013). In addition, viruses can modify the sEV content in viral and host components to render healthy cells more susceptible to infection (Mack et al., 2000; Rozmyslowicz et al., 2003) or to modulate the immune response in favour of the pathogen or the host (Li et al., 2013; Schorey et al., 2015). Whether respiratory sEVs isolated from healthy cells contain ACE2 and TMPRSS2 and could therefore play a role during SARS-CoV-2 infection is unknown.

The goal of this work was to unravel the molecular composition of sEVs present in the mucus produced at the apical pole of human nasal epithelial cells (mu-sEVs) and to understand the role of mu-sEVs in priming the SARS-CoV-2 Spike protein and facilitating its entry through the 'early pathway', thereby favouring infection of TMPRSS2-expressing cells.

2 | RESULTS

2.1 | Human nasal epithelial cells in primary culture can be infected with SARS-CoV-2 and their infection is reduced by mucus removal

We used an original model of uninfected primary human nasal epithelial cells (HNECs) which, unlike immortalized cell lines, recapitulate the most important characteristics of in vivo human respiratory epithelia (Bequignon et al., 2019; Coste et al., 2000; Muller et al., 2013; Papon et al., 2002). Such HNECs, isolated from nasal polyps (NP), constitute a stable differentiated epithelium containing three major cell types (e.g., basal, goblet and ciliated cells) after more than 21 days of culture at the air-liquid interface (ALI) using a specific medium (Coste et al., 2000). When differentiated, HNECs exhibit morphological and functional characteristics that mimic the normal human nasal epithelium. Mucus, that constitutes the first barrier viruses encounter during infection, is notably produced by goblet cells at the apical pole of the epithelium (Harkema et al., 2006).

HNECs isolated from three different patients were infected at the apical pole of the epithelium with 20 μ l of SARS-CoV-2 inoculum ($\sim 2.04 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). As shown in Figure 1A, HNEC infection resulted in viral replication, as reflected by the production of intracellular SARS-CoV-2 RNA 72 h post-infection. SARS-CoV-2 RNA production was reduced by 8.5-fold when mucus produced by HNECs was removed (Figure 1A), suggesting that mucus contains components that favour viral infection. Mucus removal had no effect on HNEC vitality, as assessed by trans-epithelial electrical resistance (TEER) (Figure S1).

2.2 | Mucus produced by HNECs contains sEVs carrying host factors required for SARS-CoV-2 entry

The presence of extracellular vesicles produced by HNECs in the mucus was demonstrated by means of differential ultracentrifugation enrichment (Salem et al., 2020; Thery et al., 2006). Tunable resistive pulse sensing (TRPS) was used to estimate the amount of small (mu-sEVs) and large extracellular vesicles (mu-IEVs) produced by HNECs from 14 patients (Figure S2A). Mean concentrations of $3.3 \pm 1.2 \times 10^{10}$ mu-sEVs and $9.6 \pm 2.8 \times 10^7$ mu-IEVs per ALI insert were observed, respectively. Because of the large excess of mu-sEVs over mu-IEVs, we focused our study on the characterization of sEVs and their potential effect on SARS-CoV-2 infection.

As shown in Figure 1B, TRPS of mu-sEVs produced by HNECs from nine different patients revealed a mean peak particle size of approximately 155.9 ± 30.8 nm in diameter. Figure 1C shows the size and discoid morphology of mu-sEVs isolated from mucus generated by HNECs from two patients, as assessed by transmission electron microscopy (TEM). Finally, Figure 1D shows western blot analysis of mu-sEVs produced by HNECs from four different patients, demonstrating the presence of sEV membrane surface marker CD9 and packaged protein markers Tumour susceptibility gene 101 protein (TSG101) and ALG-2-interacting protein X (ALIX). Western blot analysis, performed on HNEC lysates, mu-sEVs and EV-deprived mucus (negative control) from two patients, showed the absence of EV markers in EV-deprived mucus compared to mu-sEVs and the absence of cytochrome C (mitochondrial marker) and calnexin (ER marker) in mu-sEVs compared to HNEC lysates (Figure S2B).

Because the presence of ACE2 and TMPRSS2 at the apical pole of HNEC ciliated cells has been demonstrated (Ahn et al., 2021), we looked for the presence of these SARS-CoV-2 entry factors in mu-sEVs. Western blot analysis demonstrated the presence of both full-length ACE2 (~ 100 kDa) and only the activated (cleaved) form of TMPRSS2 (~ 30 kDa) in mu-sEVs. These two SARS-CoV-2 entry factors were also detected in mu-IEVs (Figure S2C). Together, these findings indicate that HNECs produce mucus that contains sEVs, which themselves contain both ACE2 and TMPRSS2, the key SARS-CoV-2 cellular entry factors.

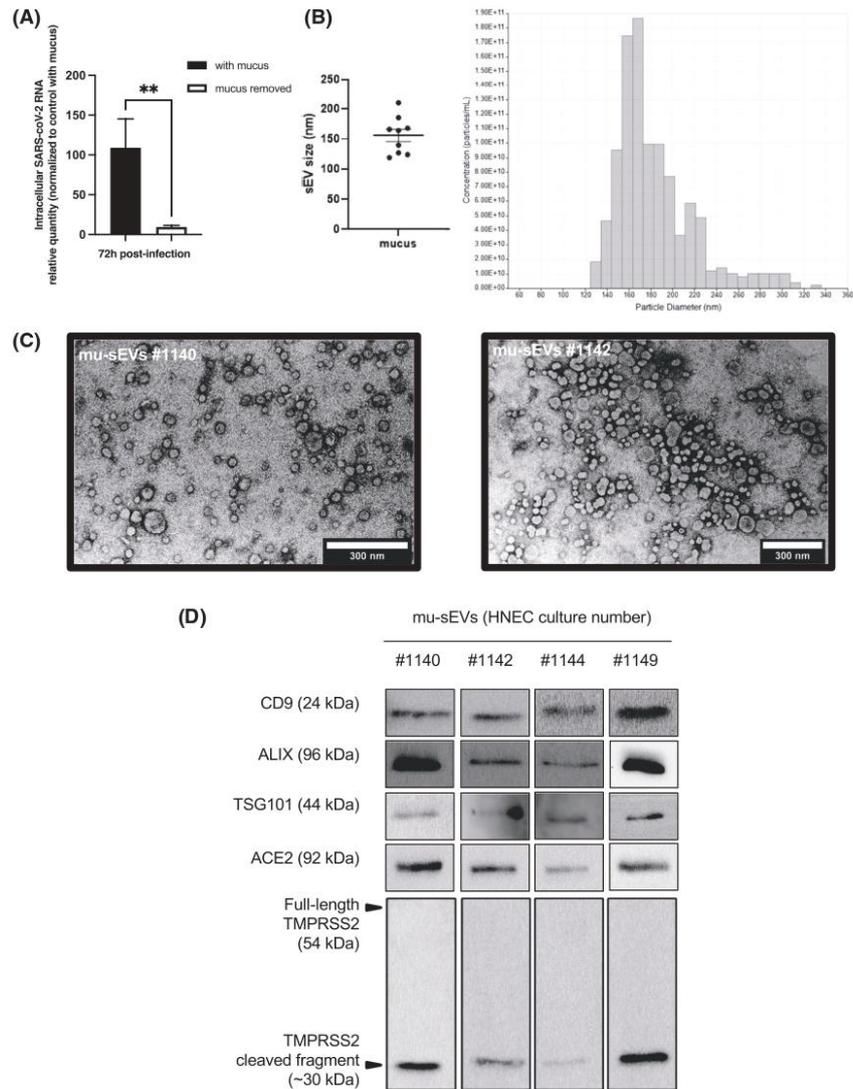


FIGURE 1 Effect of nasal mucus removal on SARS-CoV-2 infection of HNECs and characterization of mu-sEVs. (A) Intracellular RNA was extracted 72 h post-infection from HNECs isolated from three different patients, infected for 4 h with SARS-CoV-2 ($20 \mu\text{l}$ of viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^4$ TCID₅₀/ml) at the apical pole, in the presence or after removal of cell-produced mucus. SARS-CoV-2 RNA was quantified by RT-qPCR and the results were normalized to 18S rRNA, then to control with mucus ($= 100\%$). They are expressed as mean \pm SEM. $**p < 0.01$. (B) sEVs isolated from ~ 5 ml of mucus (mu-sEVs) produced by HNECs from nine different patients analysed by tunable resistive pulse sensing (TRPS). Left panel: TRPS results from nine mu-sEVs indicating a mean peak particle size of 155.9 ± 30.83 nm in diameter. Right panel: TRPS results obtained from one representative mucus. (C) mu-sEVs isolated from two patients adsorbed on copper grid, dried at room temperature, stained with uranyl acetate 1% and imaged by transmission electron microscopy. Scale bar: 300 nm. (D) Western blot analysis of CD9, ALIX, TSG101, ACE2 and full-length and cleaved TMPRSS2 proteins using the amount of 10^9 mu-sEVs isolated from four different patients

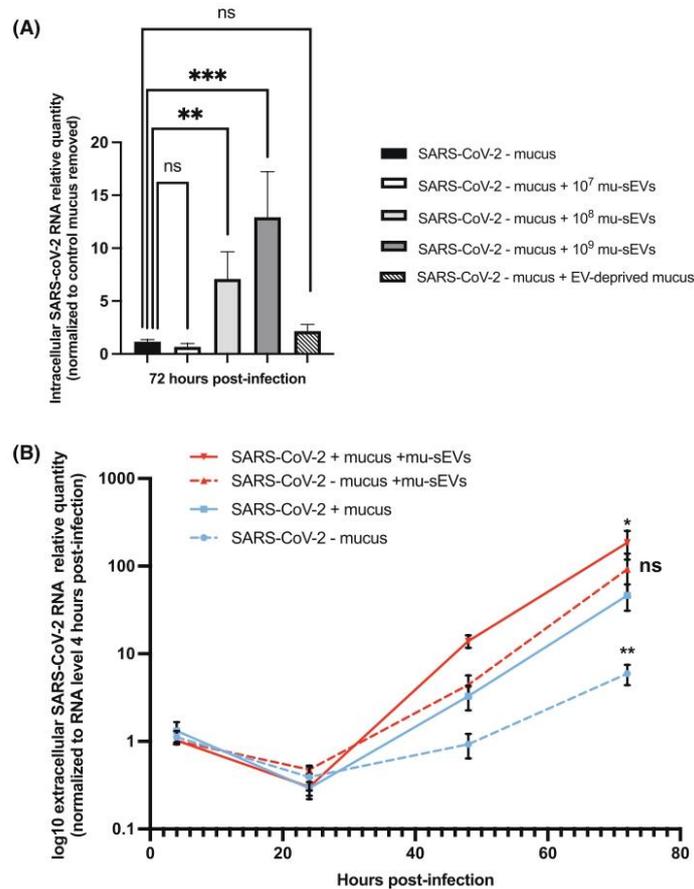


FIGURE 2 Effect of mu-sEVs and mucus-containing sEVs on HNEC infection by SARS-CoV-2. (A) Effect of preincubation of viral particles with different concentrations (10^7 – 10^9) of mu-sEVs or with EV-deprived mucus on SARS-CoV-2 infection ($10 \mu\text{l}$ of viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^5$ TCID₅₀/ml) at the apical pole of HNECs after removal of recipient cell mucus. Intracellular SARS-CoV-2 RNA was extracted 72 h post-infection and quantified by RT-qPCR. Results were normalized to 18S rRNA, then to mucus-free control and viral particle preincubation with PBS alone (black bar). They are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Dynamics of SARS-CoV-2 RNA production at the apical pole of HNECs, as assessed by RT-qPCR. Results were normalized to the viral RNA level 4 h post-infection for each condition and expressed as log₁₀ mean \pm SEM of two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test versus extracellular SARS-CoV-2 RNA levels in the presence of recipient cell mucus 72 h post-infection (blue line))

2.3 | mu-sEVs facilitate SARS-CoV-2 infection of HNECs

To evaluate the effect of mu-sEVs on SARS-CoV-2 infection, viral particles were incubated in the presence of increasing concentrations of mu-sEVs or EV-deprived mucus (negative control) generated by HNECs from two patients. Then, these viral particles were used to infect HNECs from a third, different patient after removal of recipient cell mucus. As shown in Figure 2A, a mu-sEV concentration-dependent augmentation of the amount of intracellular SARS-CoV-2 RNA was observed when mucus-free HNECs were infected with viral particles preincubated with mu-sEVs. The highest proviral effect was achieved with 10^9 mu-sEVs, a concentration within the range of physiological HNEC production per ALI insert. No proviral effect was observed when viral particles were preincubated with EV-deprived mucus (Figure 2A, hatched histogram).

To investigate the effect of mu-sEVs on virus production at the apical pole of HNECs, SARS-CoV-2 viral particles were preincubated with 10^9 mu-sEVs generated by HNECs from two patients. These viral particles were used to infect HNECs from a

third, different patient without or after removal of recipient cell mucus and virus production at the apical pole was monitored at different time points (Figure S3). The dynamics of SARS-CoV-2 RNA production after infection are shown in Figure 2B. The highest level of production was observed when HNECs with their mucus had been infected by viral particles preincubated with mu-sEVs (Figure 2B, red line). Mucus removal only slightly and non-significantly reduced viral production by cells infected with viruses preincubated with mu-sEVs, to a level similar to that in cells that kept their mucus and were infected with viruses that had not been preincubated with mu-sEVs (Figure 2B, dotted red line and blue line, respectively). Finally, viral production was significantly reduced when HNEC mucus had been removed and viruses had not been preincubated with mu-sEVs (Figure 2B, dotted blue line). Together, the results indicate that both mucus-containing sEVs and purified mu-sEVs facilitate SARS-CoV-2 infection of HNECs.

2.4 | TMPRSS2-containing VCaP-derived sEVs are a good model to study the mechanisms underlying the effect of mu-sEVs on SARS-CoV-2 infection

Due to the limited amounts of mu-sEVs produced by fully differentiated HNECs isolated from patients, we decided to use the *in vitro* model of sEVs isolated from immortalized cell lines to dissect the mechanisms underlying mu-sEVs effects on SARS-CoV-2 infection. We selected the VCaP cell line, which has been previously demonstrated to express high levels of TMPRSS2 at both mRNA and protein levels (Li et al., 2021). VCaP enrichment was performed as previously reported (Ludwig et al., 2018) and VCaP-sEVs produced in culture supernatants were characterized. Using TRPS technology, their mean peak particle size was approximately 154.6 ± 9.4 nm in diameter, comparable to that of mu-sEVs (Figure S4A). Western blot analysis demonstrated the presence of both VCaP-sEV markers (CD9, CD81, CD63, TSG101, ALIX) and SARS-CoV-2 entry factors (ACE2 and both full-length and activated TMPRSS2) (Figure S4B).

Similar to what had been observed with mu-sEVs, SARS-CoV-2 RNA production by HNECs was impaired by mucus removal, but it was restored when viral particles had been preincubated with VCaP-sEVs. A significant increase in SARS-CoV-2 RNA production was observed when recipient cell mucus was not removed while viral particles had been preincubated with VCaP-sEVs (Figure S3C). Based on these results, VCaP-sEVs were subsequently used as a relevant model to unravel the mechanisms by which mu-sEVs facilitate SARS-CoV-2 infection.

2.5 | TMPRSS2-expressing Calu-3 cells are a good *in vitro* model to study the mechanisms underlying the effect of mu-sEVs on SARS-CoV-2 infection

We tested different cellular models of SARS-CoV-2 infection, including Calu-3 cells (in which the virus preferentially uses the early TMPRSS2-dependent route of entry), VERO-E6 and A549 cells (in which the virus preferentially uses the late, endosomal cathepsin-dependent route of entry). Cells were infected at a final MOI of 0.1 and the intracellular amount of SARS-CoV-2 RNA was measured by RT-qPCR 48 h post-infection. Incubation of viral particles with VCaP-sEVs prior to infection resulted in a significant, approximately 13-fold increase in the intracellular amount of SARS-CoV-2 RNA in Calu-3 cells, whereas a significant decrease was observed in infected A549 and VERO-E6 cells (Figure 3A). This result indicates that VCaP-sEVs can play a dual role in SARS-CoV-2 infection, depending on the virus preferential cellular route of entry. As shown in Figure 3B, the proviral effect of VCaP-sEVs was confirmed with a SARS-CoV-2 Alpha variant strain in Calu-3 cells. Thus, Calu-3 cells, which express TMPRSS-2 and thereby mimic natural infection, were used for further experiments.

2.6 | sEVs favour SARS-CoV-2 entry into cells in the absence of fusion of their lipid envelopes

A time-of-addition experiment was performed to assess whether VCaP-sEVs favour SARS-CoV-2 entry into Calu-3 cells (Figure S5). Calu-3 cells were infected with SARS-CoV-2 at an MOI of one in the absence of VCaP-sEV exposure (control), 1 h after preincubation with VCaP-sEVs, with VCaP-sEVs added at the time of infection, and with VCaP-sEVs added 2 h post-infection (Figure S4). Total intracellular RNA extracted 24 h post-infection was quantified by RT-qPCR. As shown in Figure 3C, a significant increase in SARS-CoV-2 RNA quantity was detected when viral particles were preincubated with VCaP-sEVs or when VCaP-sEVs were added at the time of infection, but not when VCaP-sEVs were added 2 h post-infection. This result indicates that sEVs facilitate an early step of the SARS-CoV-2 life cycle, most likely viral entry.

To assess whether SARS-CoV-2 preincubation with VCaP-sEVs leads to fusion of their viral and vesicular membranes, respectively, SARS-CoV-2 viral particles, VCaP-sEVs and a mixture of both were immunoprecipitated overnight at 4°C by means of anti-CD9 antibodies paired with magnetic beads (Figure S6A). Western blot analysis with anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein and anti-CD9 sEVs membrane marker showed the presence of CD9 in eluted fractions from both VCaP-sEVs and VCaP-sEVs/SARS-CoV-2, but not in those from SARS-CoV-2 alone fractions. Furthermore, SARS-CoV-2 N protein was detected in

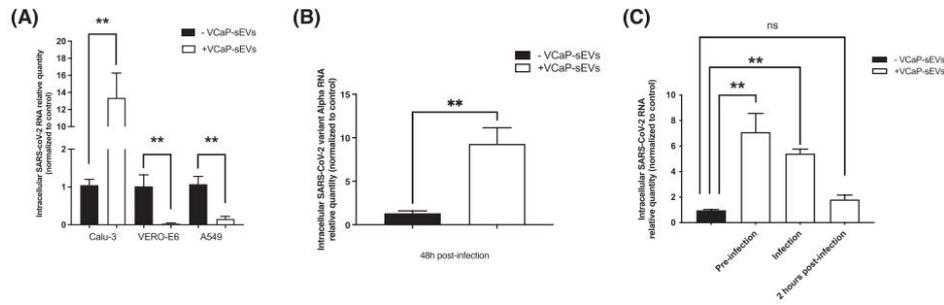


FIGURE 3 Proviral effect of VCaP-sEVs on SARS-CoV-2 infection in TMPRSS2-expressing cells. (A) Effect of VCaP-sEV preincubation on SARS-CoV-2 infection of TMPRSS2-expressing Calu-3 cells, and TMPRSS2-non-expressing VERO-E6 and A549 cells on intracellular viral RNA amounts assessed by RT-qPCR 48 h post-infection. Viral particles were incubated with 10^9 VCaP-sEVs or PBS at a final MOI of 0.1. Results were normalized to 18S rRNA or GAPDH mRNA, then to control without VCaP-sEVs incubation (black bars). Relative quantities are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments. (B) Effect of VCaP-sEV preincubation on SARS-CoV-2 variant Alpha infection of Calu-3 cells. (C) Time-of-addition experiment showing the effect of VCaP-sEV incubation prior to infection, at the time of infection or 2 h post-infection. ** $p < 0.01$

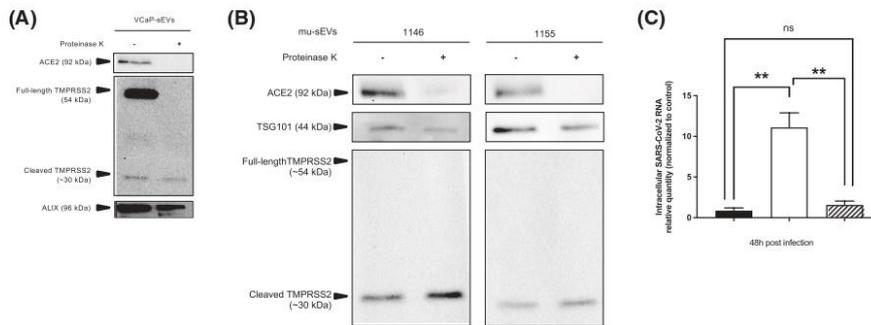


FIGURE 4 Role of sEV surface proteins in their proviral effect on SARS-CoV-2 infection. (A) Western blot analysis of ACE2, full-length and cleaved TMPRSS2 and ALIX protein content in VCaP-sEVs incubated in the absence or in the presence of proteinase K. (B) Western blot analysis of ACE2, full-length and cleaved TMPRSS2 and TSG101 protein content in mu-sEVs isolated from two patients, incubated in the absence or in the presence of proteinase K. (C) Effect of proteinase K (PK) treatment of VCaP-sEVs on their proviral effect on SARS-CoV-2 infection of Calu-3 cells. Intracellular viral RNA was quantified by RT-qPCR 48 h post-infection. Results were normalized to 18S rRNA, then to infection without VCaP-sEV preincubation (black bar). Relative quantities are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments. ** $p < 0.01$

the supernatant of samples containing viral particles, but it was absent from eluted fractions from all samples (Figure S6B). These results indicate that preincubation of SARS-CoV-2 with VCaP-sEVs does not lead to their fusion. Together, they suggest that VCaP-sEVs interact with SARS-CoV-2 particles without merging, and that this interaction facilitates viral entry into the TMPRSS2-expressing cell line Calu-3.

2.7 | The integrity of surface sEV proteins is required for their proviral effect on SARS-CoV-2 infection

To assess whether surface protein integrity is required for VCaP-sEVs to exert their proviral function, SARS-CoV-2 particles were incubated with intact or proteinase K (PK)-treated VCaP-sEVs. As shown by western blot analysis, PK treatment degraded vesicular ACE2, full-length TMPRSS2, but not the ~30 kDa activated TMPRSS2 fragment, probably because of its glycosylated status (Figure 4A). The luminal control ALIX protein remained detectable after PK treatment (Figure 4A). Similar results were obtained with PK-treated mu-sEVs generated by HNECs isolated from two distinct patients, using packaged sEV marker TSG101 (Figure 4B). Importantly, PK treatment of VCaP-sEVs abolished their proviral effect in Calu-3 cells after preincubation with

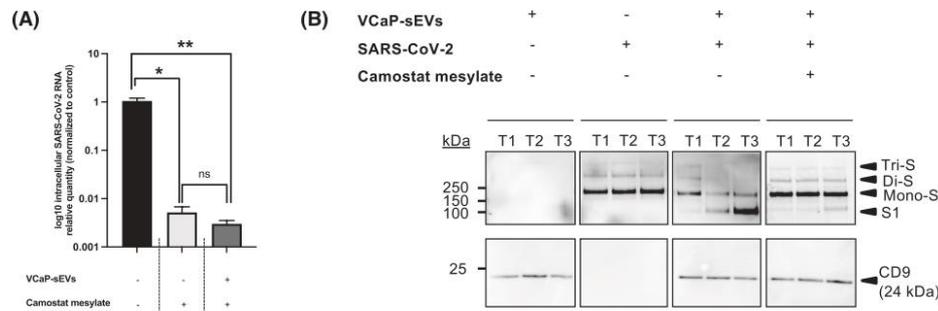


FIGURE 5 Role of TMPRSS2 in sEV proviral effect on SARS-CoV-2 infection of Calu-3 cells. (A) Effect of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesylate (10 μ M) on Calu-3 cell infection by SARS-CoV-2 viral particles preincubated or not with 10^9 VCaP-sEVs. Intracellular SARS-CoV-2 RNA was extracted 48 h post-infection and quantified by RT-qPCR. Results were normalized to 18S rRNA, then to control (black bar). They are expressed as mean \pm SEM of two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Time-course analysis of the effect of VCaP-sEVs on prefusion Spike protein priming and its inhibition by camostat mesylate. Western blot analyses of Spike (anti-S1 antibodies) and CD9 proteins were performed on SARS-CoV-2 viral particles (10 μ l of viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^5$ TCID₅₀/ml), on VCaP-sEVs (10^{10}), and on mixtures of both, in the absence or presence of camostat mesylate (100 μ M) at three time points: T1 (5 min à 37°C), T2 (1 h at 37°C) and T3 (overnight at 4°C). Tri-S, Di-S and Mono-S: uncleaved prefusion Spike trimer, dimer, and monomer, respectively. S1: cleaved prefusion Spike fragment at the S1/S2 boundary

SARS-CoV-2 (Figure 4C). Together, these results indicate that the integrity of surface-accessible sEV proteins, including ACE2, is mandatory for the vesicles to exert their proviral effect in permissive cells.

2.8 | Vesicular TMPRSS2 activates SARS-CoV-2 prefusion Spike protein but cellular TMPRSS2 remains required for cell entry

The capacity of VCaP-sEVs to promote SARS-CoV-2 infection despite inhibition of cellular TMPRSS2 activity by camostat mesylate was explored. SARS-CoV-2 viral particles were incubated in the absence or presence of 10^9 VCaP-sEVs prior to infection of Calu-3 cells at an MOI of 0.1. Camostat mesylate (10 μ M) was added or not at the time of infection and, when added, maintained until the end of the experiment. Intracellular SARS-CoV-2 RNA was quantified by RT-qPCR 48 h post-infection. As shown in Figure 5A, SARS-CoV-2 infection was significantly inhibited by camostat mesylate, regardless of prior preincubation with VCaP-sEVs (~ 193 fold-decrease without preincubation, ~ 333 fold-decrease with VCaP-sEV preincubation). This result suggests that cellular TMPRSS2 activity, which is required for the cleavage of cellular ACE2, remains necessary for viral entry in our experimental conditions.

To better understand the role of vesicular TMPRSS2 activity during SARS-CoV-2 infection, western blot analysis of the viral Spike protein was performed under non-reducing conditions. The dynamics of Spike processing were analysed at three time points, including T1 (5 min at 37°C), T2 (1 h at 37°C) and T3 (overnight at 4°C) post-incubation with VCaP-sEVs, in the absence or presence of camostat mesylate (100 μ M) (Figure 5B). In the absence of VCaP-sEV preincubation, uncleaved Spike prefusion trimers ($>> 250$ kDa, Tri-S), dimers (> 250 kDa, Di-S) and monomers (~ 170 kDa, mono-S) were detected at all time points. The absence of Spike cleavage at the S1/S2 boundary resulted from the fact that viral amplification had been performed in VERO-E6 cells, generating acquisition of the R685H mutation that prevents intracellular furin cleavage. After preincubation with VCaP-sEVs, SARS-CoV-2 Spike prefusion proteins were efficiently cleaved at the S1/S2 boundary, generating a fragment of ~ 100 kDa, detectable with an anti-S1 antibody at T2 and T3. This cleavage was inhibited by camostat mesylate, which restored the presence of uncleaved (Tri-S, Di-S and Mono-S) Spike prefusion proteins at T2 and T3. This result indicates that the cleavage was TMPRSS2-dependent. Thus, during preincubation of viral particles with VCaP-sEVs, vesicular TMPRSS2 activates SARS-CoV-2 mutated (R685H) prefusion Spike by promoting its cleavage at the S1/S2 boundary. Nevertheless, ACE2 cleavage by cellular TMPRSS2 remains mandatory for viral entry.

2.9 | mu-sEVs activate both SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant Alpha Spike proteins

In order to confirm the results obtained with the VCaP-sEV model on Spike protein processing, mu-sEVs isolated from HNECs from two distinct patients (10^{10} and 5×10^{10} mu-sEVs, respectively) were incubated with SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant

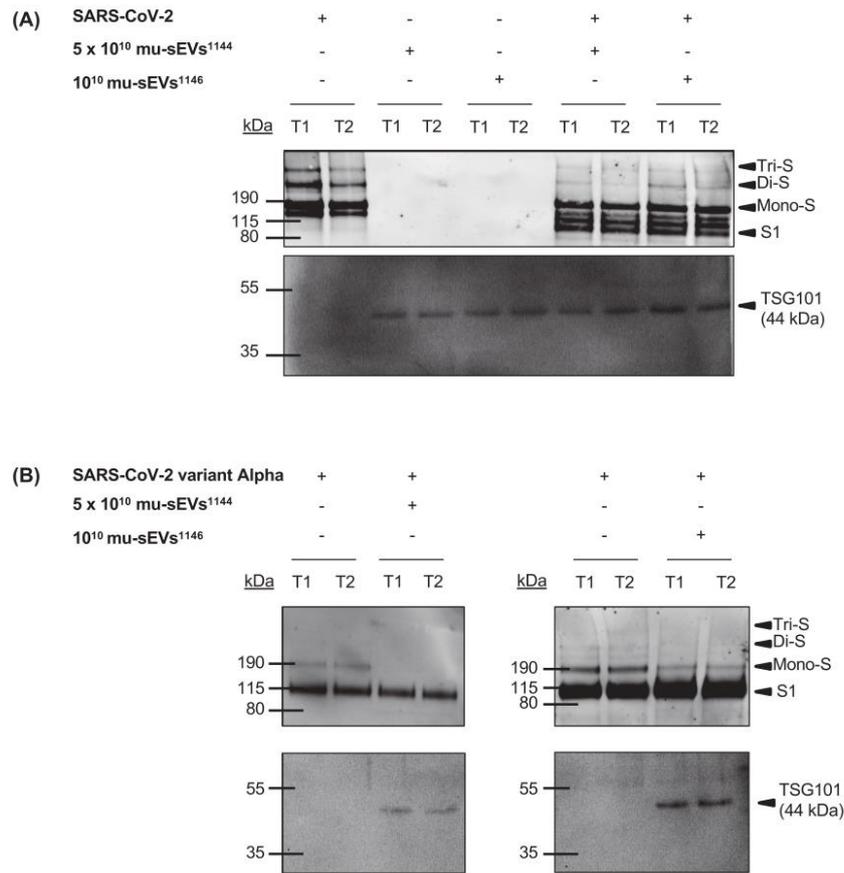


FIGURE 6 mu-sEV priming of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant Alpha prefusion Spike protein. Time-course analysis of the effect of mu-sEVs isolated from two patients (#1144 and #1146) on prefusion Spike protein priming from: (A) SARS-CoV-2, and (B) SARS-CoV-2 variant Alpha. Western blot analyses of Spike (anti-S1 antibodies) and TSG101 were performed on SARS-CoV-2 viral particles (10 μ l of viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^5$ TCID₅₀/ml) or SARS-CoV-2 variant Alpha viral particles (10 μ l of viral inoculum, $\sim 1 \times 10^4$ TCID₅₀/ml), on mu-sEVs from the two patients (10¹⁰ and 5 $\times 10^{10}$ mu-sEVs, respectively), and on mixtures of both at two time points: T1 (5 min at 37°C) and T2 (overnight at 4°C). Tri-S, Di-S and Mono-S: uncleaved prefusion Spike trimer, dimer, and monomer, respectively. S1: cleaved prefusion Spike fragment at the S1/S2 boundary

Alpha viral particles. Variant Alpha was used because, unlike our initial SARS-CoV-2 virus, it was propagated in Calu-3 cells and therefore contains the PRRAR furin-like cleavage site. The dynamics of Spike processing were analysed by means of western blot under non-reducing conditions at T1 (5 min at 37°C) and T2 (overnight at 4°C) (Figure 6). In the absence of mu-sEVs, uncleaved SARS-CoV-2 Spike prefusion oligomers (Tri-S, Di-S and Mono-S) were present at all time points, whereas in the case of SARS-CoV-2 variant Alpha, the uncleaved Spike prefusion monomer and the product of Spike prefusion cleavage at the S1/S2 boundary were predominant. Incubation of the original SARS-CoV-2 strain with mu-sEVs induced Spike prefusion oligomer cleavage at the S1/S2 boundary, generating cleavage product intermediates and a fragment of ~ 100 kDa detected with an anti-S1 antibody (Figure 6A). Incubation of SARS-CoV-2 variant Alpha with mu-sEVs induced cleavage of the uncleaved Spike prefusion monomer at the S1/S2 boundary (Figure 6B). For both SARS-CoV-2 viruses, mu-sEV-induced activation of the Spike prefusion proteins was observable at T1.

Together, these results demonstrate that, after short-term incubation, mu-sEVs activate Spike prefusion proteins from two different SARS-CoV-2 variants, including furin-preactivated ones, by promoting cleavage at the S1/S2 boundary.

3 | DISCUSSION

The first step of SARS-CoV-2 infection takes place in the upper airways, precisely in the nasal cavity, after airborne transmission by respiratory droplets. Airway mucus, which is principally produced by goblet cells, is theoretically the first barrier against infection. Under normal conditions, mucins and muco-ciliary clearance both participate in protecting the respiratory system from harmful external agents, including pathogens.

In the present study, we evaluated the effect of mucus secreted by HNECs on their infection by SARS-CoV-2. In an *ex vivo* assay, we showed that removal of the airway mucus reduces SARS-CoV-2 infection, while mu-sEVs isolated from different mucus exert a significant proviral effect. This effect is mu-sEV concentration-dependent, with a maximal effect obtained at mu-sEV concentrations in the range of physiological HNEC production. Interestingly, a significant but weaker proviral effect was observed when SARS-CoV-2 particles were preincubated with physiological amounts of mu-IEVs (Figure S7). Together, these results suggest that the mucus produced by HNECs contains EVs that favour SARS-CoV-2 infection at physiological concentrations. This proviral effect seems to be specific for sEVs contained in upper airway epithelial mucus; indeed, a recent study indicated that extracellular vesicles of salivary origin have no effect on SARS-CoV-2 infection (Conzelmann et al., 2020). The proviral effect of mu-sEVs, that contain both ACE2 and TMPRSS2, does not appear to be related to the transfer of the ACE2 receptor to HNEC cell surface (Figure S8), but instead to the cleavage of viral Spike prefusion proteins mediated by vesicular TMPRSS2, as shown in our experiments using concentrations of mu-sEVs comparable to those measured in HNEC-generated mucus.

To understand the mechanisms explaining that mucus sEVs facilitate SARS-CoV-2 infection of respiratory cells, we used a 3-component in vitro model highly relevant to the pathophysiological situation reflected by our experiments with HNECs. The model used: (i) two SARS-CoV-2 variant strains, including a variant derived from the original Wuhan strain and a SARS-CoV-2 variant Alpha strain, both originating from patients diagnosed in the laboratory of virology of our institution; (ii) sEVs produced by the TMPRSS2-expressing VCaP cell line, the size of which is comparable to that of mu-sEVs, that contain both ACE2 and full-length and activated TMPRSS2 in their membranes (Deng et al., 2021) and exert a proviral effect on HNEC infection by SARS-CoV-2; and (iii) the TMPRSS2-expressing, SARS-CoV-2 permissive lung carcinoma-derived Calu-3 cell line. This cell line is particularly relevant, because SARS-CoV-2 uses the 'early' TMPRSS2-dependent entry pathway to infect it (Koch et al., 2021) and sEVs had the same proviral effect as mu-sEVs in HNECs.

Other models were considered as less relevant because, in contrast with our observations with HNECs, mu-sEVs and infectious viruses, sEV preincubation reduced infection and subsequent replication instead of increasing them. This was the case in our experiments when using A549 and VERO-E6 cells, which express low levels of TMPRSS2 and therefore use the 'late' endosomal pathway for SARS-CoV-2 entry. Similarly, sEVs isolated from the kidney-derived 293FT cell line overexpressing ACE2 and TMPRSS2 (293FT-ACE2-TMPRSS2) reduced infection of the colon-derived Caco-2 cell line with a lentivirus expressing the SARS-CoV-2 Spike protein (SARS-CoV-2-S-pseudotyped lentivirus) (Cocozza et al., 2020). One should therefore remain careful when suggesting the use of sEVs as therapeutic tools against SARS-CoV-2 infection, because our results strongly suggest the opposite (proviral) effect in real infected patients.

Our study indicates that the effect of sEVs on SARS-CoV-2 infection is to favour the TMPRSS2-dependent entry pathway, at the expense of the 'late' endosomal entry route. Our time-of-addition experiments confirmed that sEVs favour entry into target cells. Interestingly, PK treatment of sEVs indicated that the integrity of surface-accessible vesicular proteins (including ACE2) is mandatory for their proviral effect. PK treatment may also alter the effect of vesicular tetraspanins, that have been suggested to operate in cell membranes by bringing ACE2 and TMPRSS2 closer (Earnest et al., 2017; Earnest et al., 2015; Hantak et al., 2019). Our results suggest that SARS-CoV-2 Spike protein and vesicular ACE2 interact when they are incubated together. However, we did not observe any fusion of viral and sEV membranes in vitro, suggesting that the interaction between vesicular ACE2 and viral particles is transient and that, once released, viruses display activated prefusion Spike proteins.

We demonstrated that both VCaP-sEV and mu-sEV vesicular TMPRSS2 cleaves SARS-CoV-2 prefusion Spike at the S1/S2 boundary, with better efficiency of mu-sEV vesicular TMPRSS2, detected as a cleaved (activated) fragment only. We also showed that, although incubation with vesicular TMPRSS2 induces SARS-CoV-2 Spike priming, cellular TMPRSS2 remains necessary for viral entry into Calu-3 cells, probably to perform cleavage at the S2' site which ultimately triggers fusion between viral and cellular membranes. Because the original SARS-CoV-2 strain used in our experiments had been propagated in VERO-E6 cells, an R685H mutation that prevents furin cleavage at the S1/S2 boundary was present (Lamers et al., 2021), explaining the lack of S1 cleavage fragment when SARS-CoV-2 virions were incubated without sEVs. Using a SARS-CoV-2 Alpha variant strain propagated in Calu-3 cells that contains the furin-like cleavage site, we confirmed the facilitating effect of sEVs on infection and the ability of mu-sEVs contained in airways mucus to induce Spike prefusion protein cleavage at the S1/S2 boundary.

In conclusion, our study shows that uninfected HNECs produce mucus that shelters sEVs containing both ACE2 and activated TMPRSS2. After binding SARS-CoV-2 viral particles, mu-sEVs have the capacity to cleave wild-type or R685H-mutated prefusion Spike proteins at the S1/S2 boundary, resulting in higher proportions of prefusion S proteins exposing their RBD in the 'open' conformation, therefore capable to bind the receptor at the cell surface. Our observations confirm that S proteins containing the PRRAR polybasic cleavage site are not entirely primed after their release from producer cells (Koch et al., 2021; Wrobel et al., 2020). Thus, the role of mu-sEVs produced by the nasal epithelium is to complete prefusion Spike priming

performed by intracellular furin during viral egress from infected cells. This is mediated by vesicular TMPRSS2 activity, with the goal to render SARS-CoV-2 virions prone to entry into target cells using the 'early', TMPRSS2-dependent pathway instead of the 'late', cathepsin-dependent route. These results strongly suggest that prefusion Spike priming by mu-sEVs produced in the nasal cavity plays a role in viral tropism. They also show that nasal mucus does not protect from SARS-CoV-2 infection, but instead facilitates it. It is now necessary to investigate the role of mu-sEVs produced by HNECs on the priming of fusion proteins from other coronaviruses and respiratory enveloped viruses.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Cell culture

VERO-E6 cells (African green monkey kidney cells, ATCC CRL-1856) and A549 cells (human tumorigenic lung epithelial cells, ATCC CCL-185) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 50 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.1 µg/ml amphotericin B (ThermoFischer Scientific) at 37°C with 5% CO₂. Calu-3 (ATCC, HTB-55) and VCaP cells (vertebral-cancer of the prostate cells, ATCC, Manassas, Virginia, USA) were cultured in the same medium supplemented with 1% non-essential amino acids (NEAA, ThermoFischer Scientific) or 2 nM DHT (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), respectively.

4.2 | Preparation of human nasal epithelial cells

Primary HNECs were obtained from patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps undergoing ethmoidectomy, as previously described (Coste et al., 2000). All patients gave informed consent and the study was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes IDF X 2016-01-01). All patients benefited from an earlier 24 h negative RT-qPCR for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swabs.

After surgical resection in the operating room, nasal polyps were immediately placed in DMEM/F-12 supplemented with antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2.5 g/ml amphotericin B, and 100 mg/ml gentamicin). For cellular dissociation, nasal polyps were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) containing 5 nM dithiothreitol (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) to eliminate mucus and blood. Enzymatic digestion was performed for 16 h at 4°C (0.1% [wt/vol] pronase [Sigma Aldrich] in culture medium). HNECs (10⁶ cells) were then plated in inserts (12-mm Costar Transwell, Sigma Aldrich) with 12-mm-diameter polycarbonate micropore membranes (pore size: 0.4 µm) coated with type IV collagen (Sigma Aldrich) and incubated at 37°C in 5% CO₂. For the first 24 h, the cells were incubated with 1 ml of DMEM/F-12-antibiotics with 2% Ultrosor G in the lower chamber and DMEM/F-12-antibiotics with 10% FCS in the insert. After 24 h, the medium at the surface was aspirated and cells were washed with PBS to eliminate non-adherent cells. The culture medium in the insert (Pneumacult-ALI, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) was removed to place the cells at the air-liquid interface (ALI). Cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂. The medium in the lower chamber was then changed every day. To assess cell viability, cells were observed daily with an optic microscope and trans-epithelial electrical resistance (TEER) was measured (Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter 3, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). As already reported, HNECs reach a stable differentiated state with the detection of ciliated, goblet, and basal cells at day 21 of culture in the ALI medium (Papon et al., 2002).

4.3 | Viruses

The SARS-CoV-2 strains used in this study were isolated from nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2-infected patients seen at Henri Mondor University Hospital, Créteil, France. SARS-CoV-2 viral stock was propagated in VERO-E6 cells, while SARS-CoV-2 variant Alpha viral stock was propagated in Calu-3 cells, using modified culture media with 2% FBS. The viral stocks were aliquoted and stored at -80°C. Viral titers were measured by means of RT-qPCR in VERO-E6 cells and expressed as TCID₅₀ per milliliter. VERO-E6 cells were seeded in sextuplicate in 48-well plates and incubated for 2 h with 10-fold serial dilutions of viral stocks. The infectious inoculum was then replaced by the culture medium and cells were incubated for 48 h before intracellular viral RNA assessment by RT-qPCR.

4.4 | sEV preparation

Preparation of VCaP-sEVs was adapted from a previous report (Ludwig et al., 2018). Briefly, ~1.5 L of conditioned VCaP medium was collected and centrifuged twice at 2000 x g for 20 min. The supernatants were then supplemented with 10% PEG6000 and

75 mM NaCl. After overnight incubation at 4°C, sEVs were centrifuged at 2000 x g for 20 min at 4°C. The pellets were dissolved in NaCl 0.9% overnight and centrifuged at 16,500 x g for 20 min at 4°C. The supernatants were then collected and centrifuged at 100,000 x g for 90 min at 4°C. The pellets containing VCaP-sEVs were rinsed one time with NaCl 0.9%, centrifuged at 100,000 x g for 90 min at 4°C and then resuspended in NaCl 0.9%.

m u-sEVs were prepared by differential centrifugation using mucus produced by HNECs isolated from distinct patients. Briefly, mucus was recovered by washing the apical pole of HNECs cultured at the ALI every 48 h with 200 μ l PBS per insert. After incubation for 5 min at room temperature, mucus-containing PBS was collected and placed at 4°C for short-term storage. The recovered biological samples (~5 ml) were centrifuged at 2000 x g for 20 min at 4°C. 2K supernatants were then centrifuged at 16,500 x g for 20 min at 4°C. The 16,5K pellets obtained corresponded to mu-IEVs. The 16,5K remaining supernatants were again ultracentrifuged at 100,000 x g for 90 min at 4°C. 100K supernatants, that correspond to EV-deprived mucus, were collected. 100K pellets containing mu-sEVs were rinsed with NaCl 0.9%, centrifuged at 100,000 x g for 90 min at 4°C and resuspended in NaCl 0.9%. All samples were stored at -20°C for short-term or -80°C for long-term conservation.

All relevant data from our experiments have been submitted to the EV-TRACK knowledgebase (EV-TRACK ID: EV220307) (Van Deun et al., 2017).

4.5 | Tunable resistive pulse sensing (TRPS)

The concentrations and sizes of EVs were measured by means of the TRPS technology, using the Gold qNano instrument (Izon Science, Medford, Massachusetts) and the Izon Control Suite software version V3.4.2.44 for analysis.

VCaP-sEV-containing samples were analysed using NP150 nanopores, stretched to 47.5 mm under 0.70 mV voltage and 7–10 mbar pressure. mu-sEV-containing samples were analysed using NP150 nanopores, stretched to 51 mm under 0.48 mV voltage and 5 mbar pressure. mu-IEV-containing samples were analysed using NP800 nanopores, stretched to 48 mm under 0.18 mV voltage and 7–10 mbar pressure. Calibrations were performed using CPC 200 or CPC 1000 carboxylated polystyrene beads. Each EV sample was processed with a minimum of 500 particle count in triplicate. Data were collected and analysed according to the manufacturer's instructions. The amount of vesicles per ALI insert was then estimated.

4.6 | Morphological characterization of sEVs by transmission electron microscopy (TEM)

sEVs isolated from mucus secreted by HNECs from two donor patients were diluted 1:50 in PBS for analysis. Samples (3 μ l) were deposited on copper grids, dried at room temperature and stained with uranyl acetate (1%). Morphology was investigated by transmission electron microscopy using a Tecnai F20 microscope (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA).

4.7 | Proteinase K treatment

An amount of 10^9 mu-sEVs or VCaP-sEVs was incubated in the absence or in the presence of proteinase K (20 μ g/ml) and 5 mM CaCl₂ for 30 min at 37°C under gentle agitation. Proteinase K activity was inhibited by adding 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) for 10 min at room temperature.

4.8 | SARS-CoV-2 infection

SARS-CoV-2 infection of HNECs isolated from uninfected patients was performed at their apical pole with 20 μ l of viral inoculum ($\sim 2.04 \times 10^4$ TCID₅₀/ml) for 4 h, in the presence or in the absence of mucus at 37°C with 5% CO₂. To remove the mucus from the apical pole of HNECs, the wells were rinsed with 200 μ l PBS two times 48 h prior to infection and two times at the time of infection. For Calu-3, VERO-E6 and A549 cell lines, 150,000, 75,000 and 75,000 cells, respectively, were seeded in 48-well plates 24 h prior to SARS-CoV-2 infection. Cells were infected at a final MOI of 0.1 for 2 h in DMEM 2% FBS at 37°C with 5% CO₂, with or without the addition of 10 μ M of the protease inhibitor camostat mesylate (Merck, Darmstadt, Germany). When indicated, viral particles were incubated under gentle agitation overnight at 4°C in the absence or in the presence of 10^9 VCaP-sEVs or mu-sEVs. After infection, HNECs were rinsed at the apical pole with 200 μ l PBS, while immortalized cell lines were washed and supplemented with fresh medium with or without the protease inhibitor. Supernatant and intracellular RNA were extracted at different time points post-infection, as indicated.

4.9 | Time-of-addition experiment

One hundred and fifty thousand Calu-3 cells were seeded in 48-well plates 24 h prior to SARS-CoV-2 infection at an MOI of 1. Culture medium or 10^9 VCaP-sEVs were incubated with viral particles 1 h prior to infection, at the time of infection, or 2 h post-infection. Cells were then washed and incubated with 10^9 VCaP-sEVs for 24 h before viral RNA quantification was performed in cellular extracts.

4.10 | Extraction and PCR amplification of supernatant and cellular viral RNAs

Extraction of SARS-CoV-2 RNA from the supernatant was performed by means of QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Intracellular viral RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). SARS-CoV-2 RNA was quantified with the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using specific primers (forward primer 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' and reverse primer 3'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-5') and qPCR probe (5'-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG[5']Fam[3']BHQ-1-3'). Quantitative PCR was performed with QuantStudio 5 Real-Time PCR system (ThermoFisher Scientific). SARS-CoV-2 RNA levels were quantified according to the $\Delta\Delta CT$ method and normalized to GAPDH mRNA or 18S rRNA for intracellular samples. SARS-CoV-2 RNA relative quantities were plotted against infection without extracellular vesicles.

4.11 | Western blot analysis

sEVs isolated from VCaP or from HNEC-produced mucus ($\sim 10^{10}$ sEVs) were incubated under gentle agitation in the absence or in the presence of 10 times-concentrated SARS-CoV-2 or SARS-CoV-2 variant Alpha particles ($\sim 2.04 \times 10^5$ TCID₅₀/ml and $\sim 10^4$ TCID₅₀/ml, respectively) using Amicon Ultra-4, PLTK, membrane Ultracel-PL, 30 kD (Merck). Three incubation conditions were used: T1 (5 min at 37°C), T2 (1 h at 37°C) and T3 (overnight at 4°C). When indicated, incubations were performed in the presence of 100 μ M camostat mesylate (Merck).

Samples were prepared in EZ buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP40 0.5%, Glycerol 10%) before denaturation at 95°C and migration on NuPage 4–12%, Bis-Tris gel (ThermoFisher Scientific). After transfer on a 0.45 μ m nitrocellulose membrane (ThermoFisher Scientific), blocking was done in 5% bovine serum albumine (BSA, Euromedex, Souffelweyersheim, France) or 5% nonfat dry milk for 1 h. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against the following proteins: SARS-CoV-2 nucleocapsid (#MA5-29981, ThermoFisher Scientific), SARS-CoV-2 Spike S1 subunit (#PA5-81795, ThermoFisher Scientific), TMPRSS2 (#109131, Abcam, Cambridge, UK), ACE2 (#15348, Abcam), TSG101 (#ab83, Abcam), CD9 (#92726, Abcam), ALIX (#117600, Abcam), CD81 (#79559, Abcam), CD63 (#59479, Abcam), Calnexin (#133615, Abcam), Cytochrome C (#133504, Abcam). Membranes were washed in TBS-tween before incubation for 1 h with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody. Immune complexes were detected by chemiluminescence with ECL select western blotting detection reagent (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK) using ImageQuant LAS 4000 software.

4.12 | VCaP-sEV immunoprecipitation

VCaP-sEVs (10^{10}) were incubated overnight at 4°C with 100 μ l of exosome-human CD9 isolation beads (#10620D, Invitrogen), in the absence or in the presence of SARS-CoV-2 viral particles ($\sim 2.04 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). All fractions were isolated using a magnetic separator and analysed by western blot using antibodies directed against CD9 or SARS-CoV-2 nucleocapsid.

4.13 | SARS-CoV-2 Spike sequence analysis

SARS-CoV-2 RNA was extracted and reverse transcribed as described above. Amplification of the target sequence was performed using the PCR advantage kit (ThermoFisher Scientific) and the following primers: 1850-Forward 5'-GCACAGAAGTCCCTGTTGCT-3' and 2833-Reverse 3'-GTGCACTTGCTGTGGAAGAA-5'. The BigDye Terminator kit (ThermoFisher Scientific) was used to prepare samples for Sanger sequencing using the following primers: 2293-Reverse 3'-GGTTTAATTGTGTACAAAACCTGCC-5' and 2691-Reverse 3'-TGGTATTTGTAATGCAGCACC-5'. Sequences were analysed with Chromas Lite software.

4.14 | Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM of two or three replicate experiments, as indicated. Comparisons were performed by means of the Mann-Whitney U-test using Prism software.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

François Berry: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Writing – original draft. Margot Morin-Dewaele: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Writing – original draft. Amene Majidipur: Formal analysis; Investigation. Thibaud Jamet: Investigation; Resources. Sophie Bartier: Resources; Writing – review & editing. Eva Ignjatovic: Formal analysis; Investigation. Donatella Toniutti: Formal analysis; Investigation. Jeanne Gaspar Lopes: Formal analysis; Investigation. Pascale Soyeux-Porte: Investigation; Resources. Pascale Maillé: Formal analysis; Investigation; Methodology. Carolina Saldana: Resources. Rozenn Brillet: Investigation; Resources. Nazim Ahnou: Investigation; Resources. Laurent Softic: Conceptualization; Investigation; Writing – review & editing. Benoit Couturaud: Formal analysis; Investigation; Methodology; Visualization. Hakim Ahmed-Belkacem: Conceptualization; Formal analysis; Validation; Writing – review & editing. Slim Fourati: Formal analysis; Resources. Bruno Louis: Resources; Writing – review & editing. André Coste: Resources; Writing – review & editing. Alexandre De La Taille: Conceptualization; Resources. Damien Destouches: Conceptualization; Supervision; Validation; Writing – review & editing. Francis Vacherot: Conceptualization; Formal analysis; Funding acquisition; Resources; Supervision; Validation; Visualization; Writing – review & editing. Jean-Michel Pawlotsky: Conceptualization; Supervision; Validation; Visualization; Writing – review & editing. Virginie Firlé: Conceptualization; Formal analysis; Funding acquisition; Resources; Supervision; Validation; Visualization; Writing – review & editing. Patrice Bruscella: Conceptualization; Formal analysis; Funding acquisition; Supervision; Validation; Visualization; Writing – original draft; Writing – review & editing.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by an ‘UFR Santé-UPEC’ cross-teams COVID-19 grant. The authors are grateful to the ‘Fondation pour la Recherche Médicale’ (FRM) for their financial support. We would also like to thank the technicians from the Department of Virology of Henri Mondor Hospital for their assistance with SARS-CoV-2 virus sampling and amplification.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest related to this study.

REFERENCES

- Ahn, J. H., Kim, J., Hong, S. P., Choi, S. Y., Yang, M. J., Ju, Y. S., Kim, Y. T., Kim, H. M., Rahman, M. T., Chung, M. K., Hong, S. D., Bae, H., Lee, C. -S., & Koh, G. Y. (2021). Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*, *131*, e148517.
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*, 1–11.
- Belouard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, *4*, 1011–1033.
- Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2020). Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, *588*, 327–330.
- Bequignon, E., Dhommee, C., Angely, C., Thomas, L., Bottier, M., Escudier, E., Isabey, D., Coste, A., Louis, B., Papon, J., & Gouilleux-Gruart, V. (2019). FcRn-dependent transcytosis of monoclonal antibody in human nasal epithelial cells in vitro: A prerequisite for a new delivery route for therapy? *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 1379.
- Bestle, D., Heindl, M. R., Limburg, H., Van Lam Van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., Harges, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H. -D., Garten, W., Steinmetzer, T., & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Science Alliance*, *3*, e202000786.
- Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M. Jr., Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, *369*, 1586–1592.
- Cocozza, F., Nevo, N., Piovesana, E., Lahaye, X., Buchrieser, J., Schwartz, O., Manel, N., Tkach, M., Thery, C., & Martin-Jaular, L. (2020). Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*, e12050.
- Conzelmann, C., Gross, R., Zou, M., Kruger, F., Gorgens, A., Gustafsson, M. O., El Andaloussi, S., Munch, J., & Muller, J. A. (2020). Salivary extracellular vesicles inhibit Zika virus but not SARS-CoV-2 infection. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*, 1808281.
- Coste, A., Brugel, L., Maitre, B., Boussat, S., Papon, J. F., Wingerstmann, L., Peynegre, R., & Escudier, E. (2000). Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *European Respiratory Journal*, *15*, 367–372.
- Coutard, B., Valle, C., De Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). 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.
- Deng, Q., Rasool, R. U., Russell, R. M., Natesan, R., & Asangani, I. A. (2021). Targeting androgen regulation of TMPRSS2 and ACE2 as a therapeutic strategy to combat COVID-19. *iScience*, *24*, 102254.
- Earnest, J. T., Hantak, M. P., Li, K., McCray, P. B. Jr., Perlman, S., & Gallagher, T. (2017). The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *Plos Pathogens*, *13*, e1006546.
- Earnest, J. T., Hantak, M. P., Park, J. -E., & Gallagher, T. (2015). Coronavirus and influenza virus proteolytic priming takes place in tetraspanin-enriched membrane microdomains. *Journal of Virology*, *89*, 6093–6104.

- Fuentes-Prior, P. (2021). Priming of SARS-CoV-2 S protein by several membrane-bound serine proteinases could explain enhanced viral infectivity and systemic COVID-19 infection. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100135.
- Gupta, A., Madhavan, M. V., Sehgal, K., Nair, N., Mahajan, S., Sehrawat, T. S., Bikdeli, B., Ahluwalia, N., Ausiello, J. C., Wan, E. Y., Freedberg, D. E., Kirtane, A. J., Parikh, S. A., Maurer, M. S., Nordvig, A. S., Accili, D., Bathon, J. M., Mohan, S., Bauer, K. A., ... Landry, D. W. (2020). Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nature Medicine*, *26*, 1017–1032.
- Hantak, M. P., Qing, E., Earnest, J. T., & Gallagher, T. (2019). Tetraspanins: Architects of viral entry and exit platforms. *Journal of Virology*, *93*, e01429–17.
- Harkema, J. R., Carey, S. A., & Wagner, J. G. (2006). The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic Pathology*, *34*, 252–269.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pohlmann, S. (2020a). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular Cell*, *78*, 779–784.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., & Nitsche, A. (2020b). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, *181*, 271–280 e8.
- Hopkins, C., Surda, P., Whitehead, E., & Kumar, B. N. (2020). Early recovery following new onset anosmia during the COVID-19 pandemic - An observational cohort study. *Journal of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, *49*, 26.
- Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., Mckean, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Lu, J. M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H. - G., Scheres, S. H. W., Bartenschlager, R., & Briggs, J. A. G. (2020). Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, *588*, 498–502.
- Koch, J., Uckey, Z. M., Doldan, P., Stanifer, M., Boulant, S., & Lozach, P. Y. (2021). TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO Journal*, *40*, e107821.
- Lamers, M. M., Mykytyn, A. Z., Breugem, T. I., Wang, Y., Wu, D. C., Riesebosch, S., Van Den Doel, P. B., Schipper, D., Besteiroer, T., Wu, N. C., & Haagmans, B. L. (2021). Human airway cells prevent SARS-CoV-2 multibasic cleavage site cell culture adaptation. *Elife*, *10*, e66815.
- Li, F. (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, *3*, 237–261.
- Li, F., Han, M., Dai, P., Xu, W., He, J., Tao, X., Wu, Y., Tong, X., Xia, X., Guo, W., Zhou, Y., Li, Y., Zhu, Y., Zhang, X., Liu, Z., Aji, R., Cai, X., Li, Y., Qu, D., ... Gao, D. (2021). Distinct mechanisms for TMPRSS2 expression explain organ-specific inhibition of SARS-CoV-2 infection by enzalutamide. *Nature Communication*, *12*, 866.
- Li, J., Liu, K., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, F., Yang, H., Liu, J., Pan, T., Chen, J., Wu, M., Zhou, X., & Yuan, Z. (2013). Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity. *Nature Immunology*, *14*, 793–803.
- Ludwig, A. K., De Miroschedji, K., Doepfner, T. R., Borger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., & Behrmann, E. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*, 1528109.
- Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P. J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V., & Schlondorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Medicine*, *6*, 769–775.
- Madu, I. G., Roth, S. L., Belouzard, S., & Whittaker, G. R. (2009). Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *Journal of Virology*, *83*, 7411–7421.
- Mathieu, M., Martin-Jaulat, L., Lavieau, G., & Thery, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, *21*, 9–17.
- Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., Nagata, N., Sekizuka, T., Katoh, H., Kato, F., Sakata, M., Tahara, M., Kutsuna, S., Ohmagari, N., Kuroda, M., Suzuki, T., Kageyama, T., & Takeda, M. (2020). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proceedings National Academy of Science United States of America*, *117*, 7001–7003.
- Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M., & Taguchi, F. (2005). Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proceedings National Academy of Science United States of America*, *102*, 12543–12547.
- Mehta, O. P., Bhandari, P., Raut, A., Kacimi, S. E. O., & Huy, N. T. (2020). Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive review of clinical presentation. *Frontiers in Public Health*, *8*, 582932.
- Menni, C., Valdes, A. M., Freidin, M. B., Sudre, C. H., Nguyen, L. H., Drew, D. A., Ganesh, S., Varsavsky, T., Cardoso, M. J., El-Sayed Moustafa, J. S., Visconti, A., Hysi, P., Bowyer, R. C. E., Mangino, M., Falchi, M., Wolf, J., Ourselin, S., Chan, A. T., Steves, C. J., & Spector, T. D. (2020). Real-time tracking of self-reported symptoms to predict potential COVID-19. *Nature Medicine*, *26*, 1037–1040.
- Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, *202*, 120–134.
- Muller, L., Brighton, L. E., Carson, J. L., Fischer, W. A. 2nd, & Jaspers, I. (2013). Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 50646.
- Papa, G., Mallery, D. L., Albecka, A., Welch, L. G., Cattin-Ortola, J., Luptak, J., Paul, D., McMahon, H. T., Goodfellow, I. G., Carter, A., Munro, S., & James, L. C. (2021). Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion. *PLoS Pathogens*, *17*, e1009246.
- Papon, J. F., Coste, A., Gendron, M. C., Cordonnier, C., Wingerstmann, L., Peynegre, R., & Escudier, E. (2002). HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope*, *112*, 2067–2075.
- Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *7*, 439–450.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, E., Pan, Q., De Ruiter, P. E., Willemsen, R., Demmers, J. A. A., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., Haagmans, B. L., Baumert, T. F., & Van Der Laan, L. J. W. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings National Academy of Science United States of America*, *110*, 13109–13113.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, *200*, 373–383.
- Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S. L., Conover, D. O., Poncz, M., Ratajczak, J., Gaulton, G. N., & Ratajczak, M. Z. (2003). Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids*, *17*, 33–42.
- Salem, I., Naranjo, N. M., Singh, A., DeRita, R., Krishn, S. R., Sirman, L. S., Quaglia, F., Duffy, A., Bowler, N., & Sayeed, A. (2020). Methods for extracellular vesicle isolation from cancer cells. *Cancer Drug Resistance*, *3*, 371–384.
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, *16*, 24–43.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings National Academy of Science United States of America*, *117*, 11727–11734.
- Synowicz, A., Szczepanski, A., Barreto-Duran, E., Lie, L. K., & Pyrc, K. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A systemic infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *34*, e00133–20.

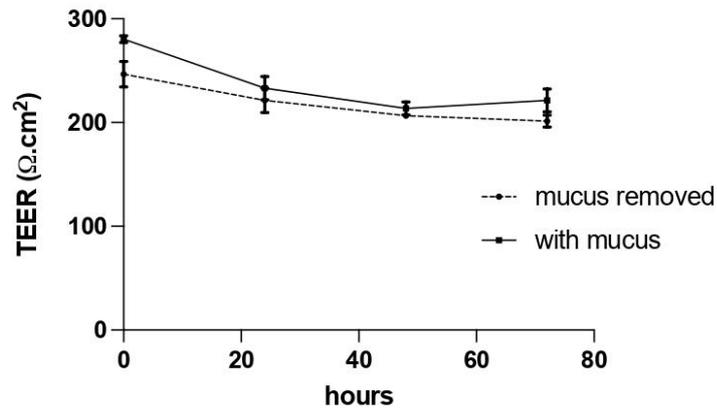
- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., & Daniel, S. (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research*, *178*, 104792.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*: 3.22.1-3.22.29.
- Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*, 1535750.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, O., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z. A., Baetens, T., Beghein, E., & Bertier, L. (2017). EV-TRACK: Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature Methods*, *14*, 228–232.
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, *181*, 281–292.e6.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K.-Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, *181*, 894–904.e9.
- White, J. M., & Whittaker, G. R. (2016). Fusion of enveloped viruses in endosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *17*, 593–614.
- Whittaker, G. R., Daniel, S., & Millet, J. K. (2021). Coronavirus entry: How we arrived at SARS-CoV-2. *Current Opinion in Virology*, *47*, 113–120.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, *367*, 1260–1263.
- Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2020). SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*, 763–767.
- Wu, G., Yang, G., Zhang, R., Xu, G., Zhang, L., Wen, W., Lu, J., Liu, J., & Yu, Y. (2015). Altered microRNA expression profiles of extracellular vesicles in nasal mucus from patients with allergic rhinitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *7*, 449–457.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, *367*, 1444–1448.
- Zebrowska, A., Skowronek, A., Wójcikowska, A., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2019). Metabolome of exosomes: Focus on vesicles released by cancer cells and present in human body fluids. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 3461.
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*, 270–273.
- 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. *New England Journal of Medicine*, *382*, 727–733.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

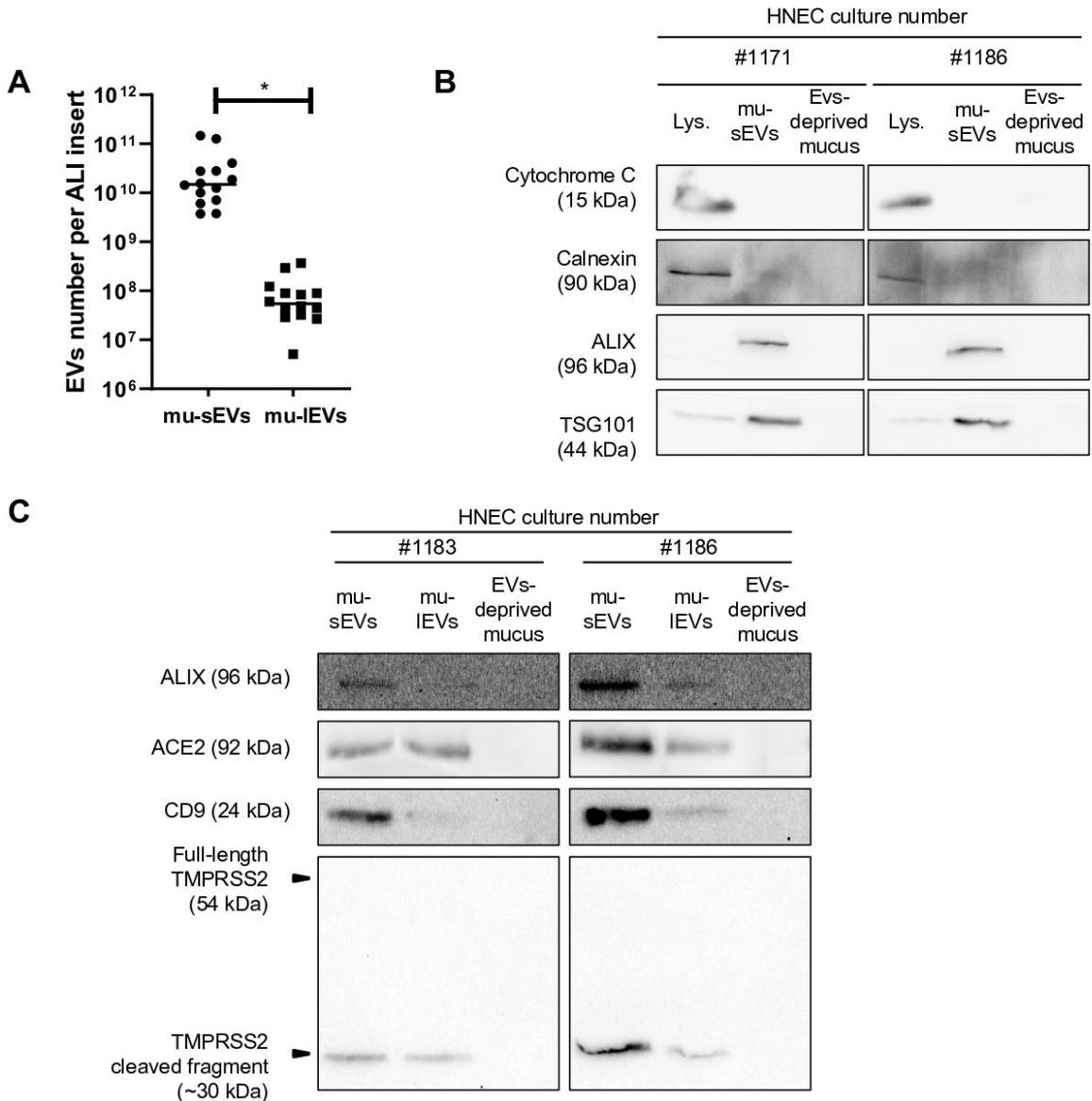
How to cite this article: Berry, F., Morin-Dewaele, M., Majidipur, A., Jamet, T., Bartier, S., Ignjatovic, E., Toniutti, D., Gaspar Lopes, J., Soyeux-Porte, P., Maillé, P., Saldana, C., Brillet, R., Ahnou, N., Softic, L., Couturand, B., Huet, É., Ahmed-Belkacem, A., Fourati, S., Louis, B., ... Bruscella, P. (2022). Proviral role of human respiratory epithelial cell-derived small extracellular vesicles in SARS-CoV-2 infection. *Journal of Extracellular Vesicles*, *11*, e12269. <https://doi.org/10.1002/jev2.12269>

Supplementary Figure 1



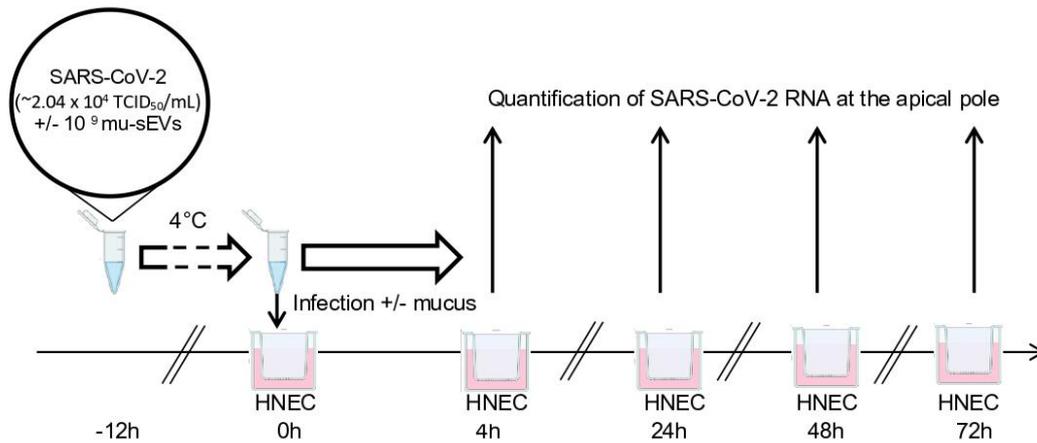
Supplementary Figure 1 legend. Effect of mucus removal on HNECs vitality. HNECs vitality as reflected by the trans-epithelial electrical resistance (TEER) measured in untreated or mucus-removed samples from two distinct patients, at different time-points.

Supplementary Figure 2



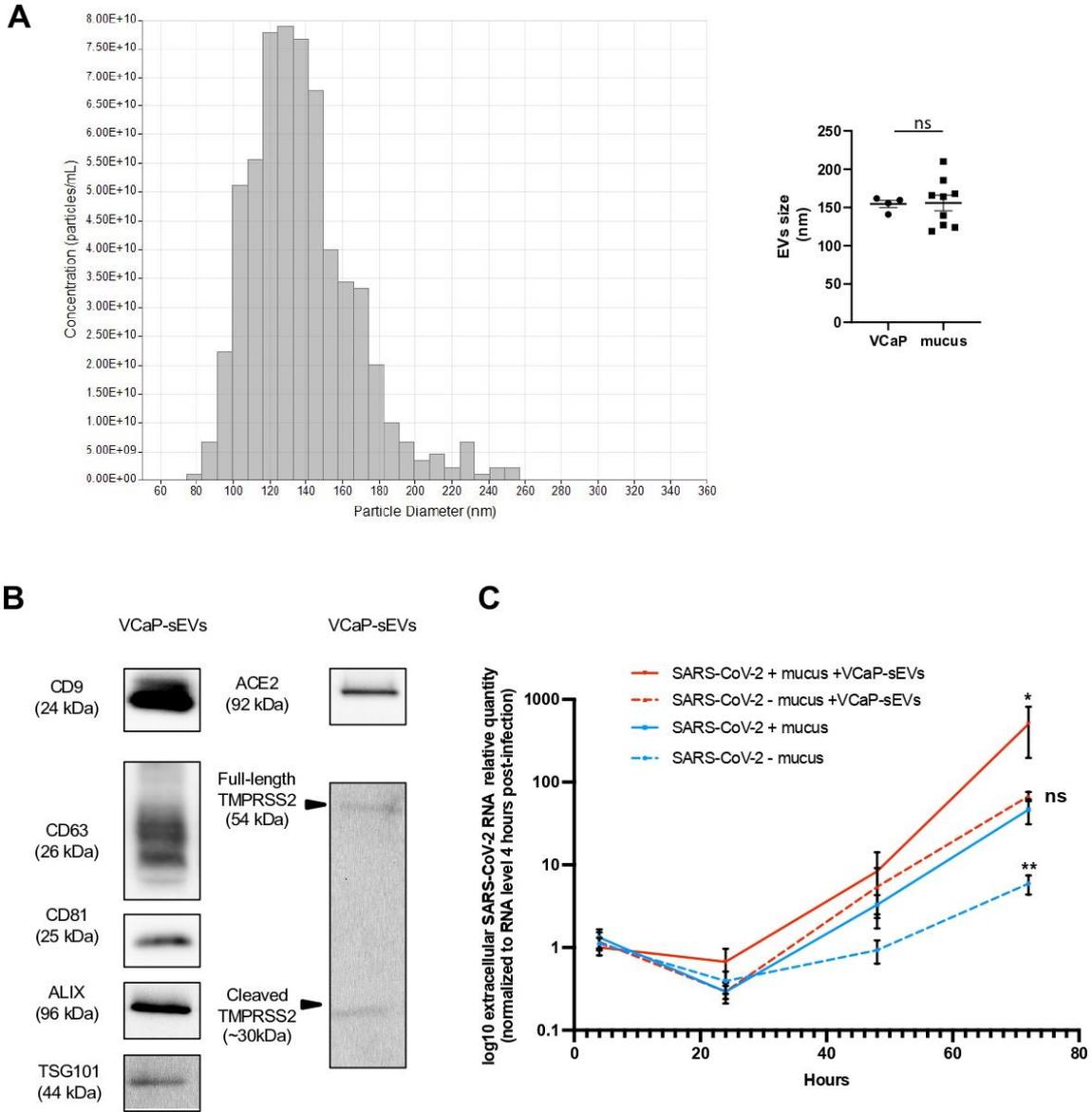
Supplementary Figure 2 legend. Characterization of EVs isolated from HNECs from distinct patients. (A) EVs produced by HNECs from 14 different patients analyzed by tunable resistive pulse sensing (TRPS) showing mean particles concentrations of $3.3 \pm 1.2 \times 10^{10}$ mu-sEVs (small extracellular vesicles) and $9.6 \pm 2.8 \times 10^7$ mu-IEVs (large extracellular vesicles) per ALI insert. **(B)** Western blot analysis of cytochrome C, Calnexin, ALIX and TSG101 using 10 μ g of protein of HNECs lysates, mu-sEVs and EVs-deprived mucus. **(C)** Western blot analysis of CD9, ALIX, ACE2 and full-length and cleaved TMPRSS2 using 5 μ g of protein of mu-sEVs, mu-IEVs and EVs-deprived mucus. * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 3



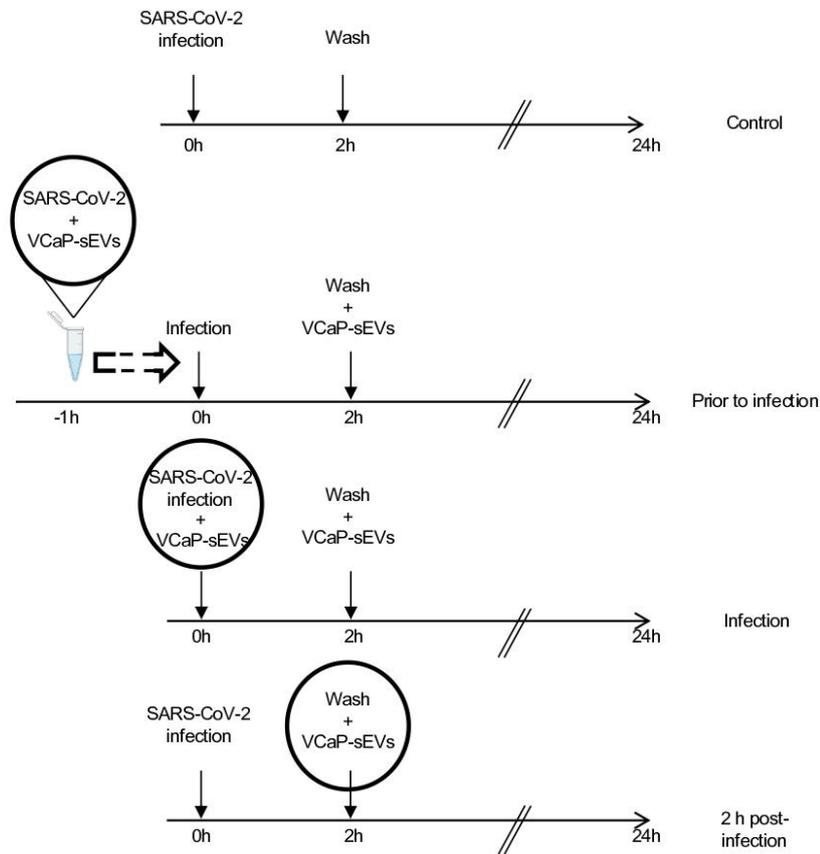
Supplementary Figure 3 legend. Effect of mu-sEVs and mucus-containing sEVs on HNEC infection by SARS-CoV-2: Experimental design. SARS-CoV-2 particles (10 μ L of viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^5$ TCID₅₀/mL) were incubated overnight at 4°C with 10^9 mu-sEVs from two different patients or with PBS in 100 μ L final volume. Infection (20 μ L of the mixture) was performed at the apical pole of HNECs isolated from a third, different, patient, in the presence or after removal of recipient cell mucus. Viral RNA was recovered at the apical pole at different time points post-infection and quantified.

Supplementary Figure 4



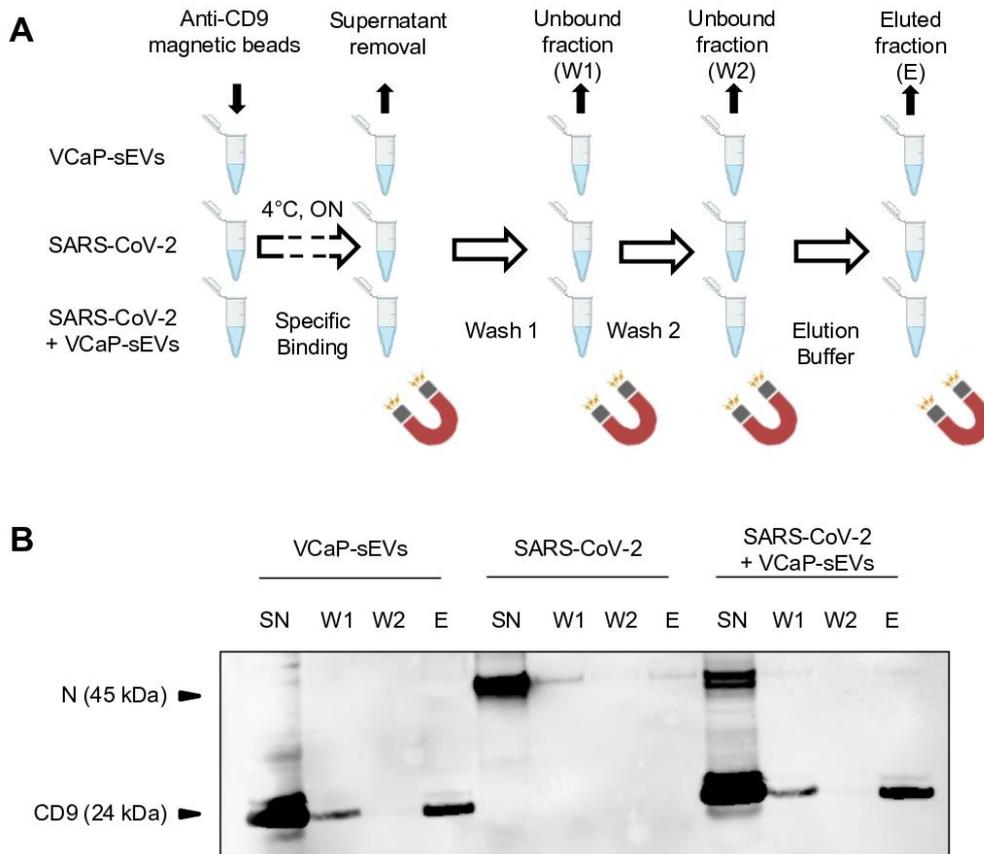
Supplementary Figure 4 legend. Characterization of VCaP-sEVs and effect on HNEC infection by SARS-CoV-2. (A) sEVs isolated from 4 independent VCaP cell cultures analyzed by tunable resistive pulse sensing (TRPS) showing a mean peak VCaP-sEV size of approximately ~150 nm in diameter. Left panel: histogram generated from one representative VCaP culture. Right panel: comparison of VCaP-sEV vs mu-sEV (mucus) sizes. **(B)** Western blot analysis of VCaP-sEV markers (CD9, CD63, CD81, ALIX, TSG101) and SARS-CoV-2 entry factors (ACE2 and TMPRSS2). **(C)** Dynamics of SARS-CoV-2 RNA production at the apical pole of HNECs isolated from two patients assessed by RT-qPCR. SARS-CoV-2 viral particles were preincubated with 10^9 VCaPs or PBS, overnight at 4°C, and HNECs infection in absence or presence of recipient cell mucus was performed as described in figure 2A. Results were normalized to the time-point 4 hours for each condition and expressed as log₁₀ mean ± SEM of two independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 (Mann-whitney U-test).

Supplementary Figure 5



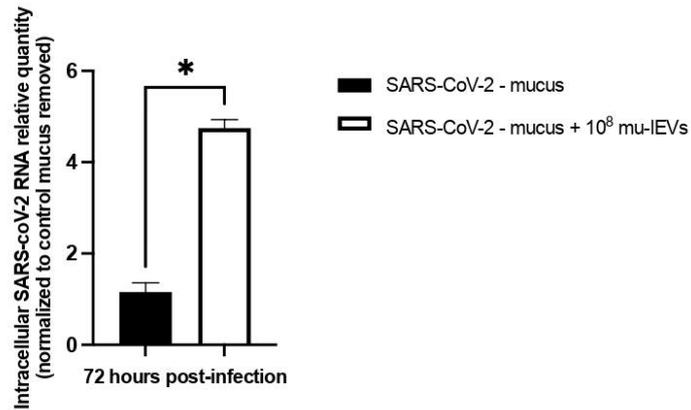
Supplementary Figure 5 legend. Design of time-of-addition experiments. Calu-3 cells were infected with SARS-CoV-2 virus not incubated with VcaP-sEVs (control) or incubated with VCaP-sEVs for 1 hour prior to infection, added at the time of infection or added 2 hours post-infection. Cells were washed 2 hours post-infection, and culture medium containing VCaP-sEVs was added. Infections were performed at a final MOI of 1 and 10^9 VCaP-sEVs were used. Intracellular RNA was extracted 24 hours post-infection and quantified by means of RT-qPCR.

Supplementary Figure 6



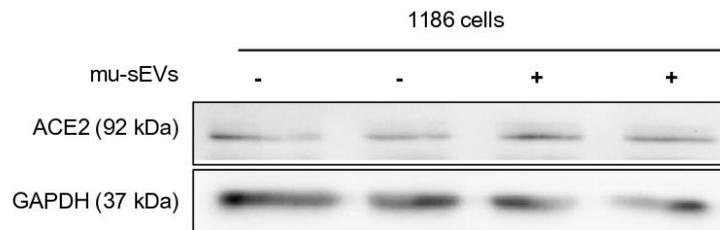
Supplementary Figure 6 legend. SARS-CoV-2/VCaP-sEV fusion assay. (A) Experimental Design. Exosome-human CD9 isolation beads (100 μ L) were incubated with 10^{10} VCaP-sEVs, SARS-CoV-2 viral particles (10 μ L viral inoculum, $\sim 2.04 \times 10^4$ TCID₅₀) or a mixture of both in PBS -/- (final volume 100 mL) at 4°C overnight (ON) on a rotating wheel. All samples were placed on a magnetic separator and supernatants (SN) were collected. Two washings (300 μ L PBS) were performed sequentially and collected using a magnetic separator (W1, W2). Finally, beads were resuspended in 50 μ L EZ buffer (E) before denaturation at 95°C and analysis by western blot. **(B)** Western blot analysis of CD9 and N proteins in all fractions collected in (A).

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7 legend. Effect of mu-IEVs on HNECs infection by SARS-CoV-2. Preincubations were performed under gentle agitation, overnight at 4°C, using SARS-CoV-2 viral particles (10 µL of viral inoculum, ~2.04 x 10⁵ TCID₅₀/mL) and PBS or 10⁸ mu-IEVs in 100 µL final volume. Infection was performed at the apical pole of HNECs, after removal of cell produced-mucus. Intracellular SARS-CoV-2 RNA was extracted 72 hours post-infection and was quantified by RT-qPCR. Results were normalized to 18S rRNA, then to control without mucus and viral particles preincubation with PBS (black bar). They are expressed as mean±SEM of two independent experiments. * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 8



Supplementary Figure 8 legend. Effect of mu-sEVs incubation on ACE2 expression in HNECs cells. Western blot analysis of ACE2 and GAPDH proteins in HNECs lysates, after incubation of HNECs with 10^9 mu-sEVs or PBS for 4 hours.

B) La desloratadine, composé cationique amphiphile approuvé par la « FDA », inhibe l'entrée du SARS-CoV-2 dans des cultures cellulaires et dans des cellules épithéliales nasales primaires humaines (CENHs)

Dans la littérature, plusieurs observations ont rapporté une incidence plus faible d'infections par le SARS-CoV-2 chez des patients suivis en psychiatrie. Le Pr. Jean-Marie Vaugeois, professeur de pharmacologie à l'université de Rouen, a émis l'hypothèse que les traitements utilisés en service psychiatrique pourraient protéger de l'infection par le SARS-CoV-2. Les molécules impliquées portent un groupement cationique amphiphile (« CADs, Cationic Amphiphilic Drugs ») qui serait responsable de cet effet antiviral, du fait de la capacité des CADs à s'accumuler dans les compartiments acides tels que les endosomes/lysosomes.

Les molécules testées ont été fournies par le Dr. Stéphane Jamain, psychiatre au CHU Henri Mondor à Créteil. Un criblage de 9 molécules approuvées par la FDA a été effectué en cellules VERO-E6 à 10 μ M. Parmi ces molécules, on retrouve trois antipsychotiques (chlorpromazine, aripiprazole et haloperidol), quatre antiallergiques (loratadine, desloratadine, terfenadine et clemastine), ainsi que deux antidépresseurs (imipramine et amitriptyline). Nous avons utilisé la carbamazépine, qui ne contient pas de groupement CAD, en contrôle négatif. Six composés sur neuf réduisent de plus de 100 fois l'ARN viral du SARS-CoV-2 (loratadine, desloratadine, chlorpromazine, arapiprazole, imipramine et amitriptyline). Une relation structure/activité a montré que ces composés possèdent tous un tricycle au niveau de leur structure moléculaire, qui porterait l'activité antivirale. En effet, un test d'inhibition avec la chlorpromazine sulfoxide, un composé ne dérivant que par l'ajout d'un groupement sulfoxide au niveau du tricycle, ne possède aucun effet antiviral.

Une gamme de concentrations ainsi qu'un test de toxicité sur les 6 CADs sélectionnés ont été réalisés. Les deux antidépresseurs possèdent une forte activité antivirale contre le virus, mais sont très toxiques à partir de 5 μ M, quant aux deux antipsychotiques, leurs activités antivirales restent modérées. L'utilisation des deux antihistaminiques a démontré une forte inhibition de l'ARN viral du SARS-CoV-2 à partir de 5 μ M avec peu de toxicité. Nous avons calculé les EC₅₀, c'est-à-dire la concentration à laquelle nous obtenons 50% d'inhibition et calculé les index thérapeutiques de la loratadine et desloratadine (22,5 et 23,5 respectivement).

Afin de déterminer l'étape du cycle viral ciblée par la desloratadine, un test de temps d'ajout a été réalisé en cellules VERO-E6. Nous avons observé une diminution de l'ARN viral lorsque le CAD est ajouté 3h après l'infection par le SARS-CoV-2, suggérant que la desloratadine cible une étape précoce du cycle viral. Afin de vérifier la voie d'entrée ciblée par la desloratadine, nous avons

infecté des cellules VERO-E6 dépourvues de la protéase cellulaire TMPRSS2 et des cellules Calu-3, TMPRSS2 (+), en présence d'inhibiteur spécifique de la voie de fusion à la membrane (camostat mésylate) ou de la voie endosomale (E64D ou aloxistatin). Dans les cellules VERO-E6, l'E64D comme la desloratadine sont capables d'inhiber l'ARN viral de plus de 100 fois, tandis que le camostat mésylate n'a aucun effet. En cellules Calu-3, seul le camostat mésylate a un effet antiviral contre le SARS-CoV-2, indiquant bien que la desloratadine cible plutôt la voie endosomale comme l'E64D. En outre, en utilisant des cellules MRC5 et HRT-18, respectivement permissives à l'infection par le HCoV-229E et le HCoV-OC43, la DSD a montré un effet antiviral dès 5 μ M suggérant un effet pan-coronavirus de la molécule.

Enfin, un modèle de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) mis en place par l'équipe du Pr. B. Louis à partir de polyposes nasales récupérées chirurgicalement a été utilisé pour l'infection par le SARS-CoV-2 en présence de desloratadine ou de camostat mésylate (respectivement 5 μ M et 10 μ M). Un effet modeste de la desloratadine est observé avec une réduction de 5 à 10 fois de l'ARN viral en comparaison au camostat mésylate. Ces résultats suggèrent la présence des deux voies d'entrée du SARS-CoV-2 au sein de l'épithélium nasal, avec une entrée préférentiellement par la voie de fusion à la membrane, TMPRSS2-dépendante.

L'ensemble de ce travail a permis la publication d'un article dans Scientific Reports intitulé « Desloratadine, an FDA-approved cationic amphiphilic drug, inhibits SARS-CoV-2 infection in cell culture and primary human nasal epithelial cells by blocking viral entry ».



OPEN Desloratadine, an FDA-approved cationic amphiphilic drug, inhibits SARS-CoV-2 infection in cell culture and primary human nasal epithelial cells by blocking viral entry

Margot Morin-Dewaele^{1,11}, Sophie Bartier^{1,2,3,4,11}, François Berry^{1,11}, Rozenn Brillet¹, Dennis Salomón López-Molina¹, Công Trung Nguyễn^{1,5}, Pascale Maille⁵, Kevin Sereno⁵, Quentin Nevers⁶, Laurent Softic⁷, Jean-Marie Vaugeois⁸, Bruno Louis^{1,4}, Emilie Bequignon^{1,2,3,4}, Patrice Bruscella⁹, André Coste^{1,2,3,4}, Jean-Michel Pawlowsky^{10,11}, Stéphane Jamain^{1,10,11} & Abdelhakim Ahmed-Belkacem^{1,11}✉

The 2019 global coronavirus (COVID-19) pandemic has brought the world to a grinding halt, highlighting the urgent need for therapeutic and preventive solutions to slow the spread of emerging viruses. The objective of this study was to assess the anti-SARS-CoV-2 effectiveness of 8 FDA-approved cationic amphiphilic drugs (CADs). SARS-CoV-2-infected Vero cells, Calu-3 cells and primary Human Nasal Epithelial Cells (HNEC) were used to investigate the effects of CADs and revealed their antiviral mode of action. Among the CADs tested, desloratadine, a commonly used antiallergic, well-tolerated with no major side effects, potentially reduced the production of SARS-CoV-2 RNA in Vero-E6 cells. Interestingly, desloratadine was also effective against HCoV-229E and HCoV-OC43 showing that it possessed broad-spectrum anti-coronavirus activity. Investigation of its mode of action revealed that it targeted an early step of virus lifecycle and blocked SARS-CoV-2 entry through the endosomal pathway. Finally, the *ex vivo* kinetic of the antiviral effect of desloratadine was evaluated on primary Human Nasal Epithelial Cells (HNEC), showing a significant delay of viral RNA production with a maximal reduction reached after 72 h of treatment. Thus, this treatment could provide a substantial contribution to prophylaxis and systemic therapy of COVID-19 or other coronaviruses infections and requires further studies.

Coronaviruses are a group of enveloped positive-sense RNA viruses. Until recently, most human infections were caused by four human coronaviruses (HCoV) inducing benign respiratory tract diseases, including HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 and HKU1. In the last two decades, three zoonotic coronaviruses capable to induce severe lung disease with moderate to high lethality rates have emerged in human populations. The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) emerged in 2003 in China and caused a self-limiting outbreak¹. In 2012, the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) emerged in Saudi Arabia. This virus is rarely transmitted between humans, but has a very high lethality rate². Lastly, the SARS-CoV-2, a hitherto unknown member of the *Orthocoronavirinae* subfamily, emerged in december 2019 in China and rapidly spread

¹Univ Paris Est Créteil, INSERM U955, IMRB, Créteil, France. ²Service d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, 94000 Créteil, France. ³Service d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, 94000 Créteil, France. ⁴CNRS, ERL 7000, 94000 Créteil, France. ⁵Department of Pathology, University Hospital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France. ⁶Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-Sur-Yvette, France. ⁷Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, 75014 PARIS, France. ⁸Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 Rouen, France. ⁹Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Université Paris-Est, Créteil, France. ¹⁰Translational Neuropsychiatry, Fondation FondaMental, 94010 Créteil, France. ¹¹These authors contributed equally: Margot Morin-Dewaele, Sophie Bartier, François Berry, Jean-Michel Pawlowsky, Stéphane Jamain and Abdelhakim Ahmed-Belkacem. ✉email: Hakim.ahmed-belkacem@inserm.fr

worldwide, causing the still-ongoing Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic³. As of November 3, 2021, the World Health Organization reported a total of 248,466,602 cases of SARS-CoV-2 infection, and 5,032,252 deaths (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>). Vaccine development has been successful in preventing severe disease and mortality in Western countries. However, this protection strategy raises concerns about the difficulty of vaccinating the entire global population, particularly in developing countries, and the high mutation frequencies of the SARS-CoV-2 proteins targeted by the vaccines. At the beginning of the pandemic, only nonspecific treatments were available, but recently, in addition to Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir, two oral antivirals targeting the viral polymerase and the main protease of SARS-CoV-2, respectively, received emergency use approval from the U. S. Food and Drug Administration for the treatment of mild-to-moderate COVID-19. Nevertheless, Molnupiravir and Nirmatrelvir present some issues regarding potential toxicity in children and pregnant women and potential drug-drug interactions, respectively, precluding their use in some at-risk patients. Therefore, there is a need to develop other oral drugs that do not have the limitations of these drugs for more widespread use.

Coronaviruses have demonstrated their high capacity to cross species barriers from animal reservoirs to human populations. A large number of coronaviruses have been identified to share this capacity, notably SARS-like viruses circulating in Chinese bat populations^{4,5}. Therefore, they represent an ongoing threat to the global public health and economy, highlighting the urgent need for the development of active broad-spectrum antiviral drugs that can be used in the context of various viral emergences, without having to wait for the availability of specifically designed antiviral drugs.

Cationic amphiphilic drugs (CADs) include hundreds of FDA-approved agents used to treat a broad spectrum of common diseases, including psychiatric disorders, allergies, heart diseases and infections⁶. CADs are characterized by a hydrophobic aromatic ring or ring system and a hydrophilic side chain containing an ionizable amine functional group⁷. CADs are lysosomotropic drugs as they accumulate into acidic compartments, such as late endosomes/lysosomes, leading to an impairment of lysosomal functions^{8–10}. Because the endosome/lysosome is considered as a key cell organelle involved in virus entry and egress, CADs have gained increasing attention as candidate drugs for repurposing^{11–14}. SARS-CoV-2 entry requires cleavage of the Spike envelope glycoprotein (S) by host cell proteases. Depending on cell protease availability, cleavage can occur at the cell surface mediated by Transmembrane Serine Protease 2 (TMPRSS2)¹⁵ or be catalyzed by endosome-residing proteases Cathepsins L and B (CatL and CatB)^{16,17}. Both pathways have been shown to contribute to SARS-CoV-2 infection *in vitro*, depending on the cellular model used and its natural equipment¹⁵.

In this study, we explored the effect of 8 FDA-approved CADs on SARS-CoV-2 replication *in vitro* in Vero-E6 cells. Among them, desloratadine, a commonly used antiallergic compound¹⁸, was highly effective in reducing SARS-CoV-2 RNA production in Vero-E6 cells. Further characterization of desloratadine antiviral properties included evaluation of its anti-coronavirus spectrum, identification of its target viral step and investigation of its antiviral mechanism of action, was performed. Finally, we used an *ex vivo* model of infection with SARS-CoV-2, primary Human Nasal Epithelial Cells (HNECs) from different donors, to measure the antiviral efficacy of desloratadine. Our results suggest that repurposing of desloratadine could be proposed in SARS-CoV-2 infection and early after the future emergence of new coronaviruses, with well-known, limited and easily manageable side effects and therefore requires further *in vivo* investigations.

Materials and methods

Cells and viruses. Vero-E6 cells (ATCC CRL-1586) and MRC-5 cells (ATCC, CCL-171) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 50 IU/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 10% of fetal bovine serum (FBS) and 0.1 µg/mL of fungizone (ThermoFischer Scientific). Calu-3 cells (ATCC, HTB-55) and HRT18 cells (ATCC, CCL-244) were maintained in the same media supplemented with non-essential amino acids (ThermoFischer Scientific) and 10% of sodium bicarbonate (Gibco[®]), respectively. Primary HNECs were obtained from nasal polyps (NP) from patients with chronic rhinosinusitis undergoing ethmoidectomy, as previously described¹⁹ and cultivated at the air-liquid interface (ALI). HNECs reach a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture²⁰.

Primary HNECs from a pool of 14 different healthy donors were obtained commercially from Epihelix (Epihelix Sarl, Geneva, Switzerland) and cultured in MucilAir[™] culture medium (Epihelix Sarl, Geneva, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 (variant of origin D614G) was isolated from nasopharyngeal swabs of a symptomatic patient infected during the first French epidemic wave and amplified by passages in Vero-E- cells. HCoV-229E and OC-43 strains were kindly provided by Pr. Astrid Vabret (University of Caen, Caen, France).

Compounds. Compounds were obtained from ThermoFisher Scientific (amitriptyline hydrochloride, carbamazepine) and Sigma-Aldrich (chlorpromazine hydrochloride, chlorpromazine sulfoxide, clemastine fumarate salt, desloratadine, haloperidol, imipramine hydrochloride, loratadine, remdesivir, terfenadine, camostat mesylate and E64D). All compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO was 0.01% for all experiments.

Assessment of antiviral activity. Vero-E6 cells and Calu3 cells were infected for 2 h with SARS-CoV-2 at a Multiplicity Of Infection (MOI) of 0.2 and 0.5 in the presence or in the absence of the tested compounds. After 48 h, SARS-CoV-2 RNA was extracted from cells or cell supernatants and quantified by RT-qPCR using Taqman technology. SARS-CoV-2 RNA relative quantities were plotted against compound concentrations and fitted with a four-parameter logistic curve with SigmaPlot v11 software. The effective concentrations 50% (EC₅₀)

were determined from the curves. MRC5 cells and HRT-18 cells were infected at an MOI of 0.5 for 2 h with HCoV-229E and HCoV-OC43, respectively. After 24 h, viral RNA was extracted from cells using QIAamp Viral RNA Mini kit[™] (Qiagen) and quantified by RT-qPCR. The data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with values for all samples normalized to the value for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for intracellular samples.

Immunofluorescence staining. Immunofluorescence staining of Vero-E6 cells was performed using an antibody directed against double-stranded RNA (dsRNA), as previously described²¹. Infected cells were quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Time-of-addition assay. Vero-E6 cells were seeded in a 48-well plate at a density of 7.5×10^4 cells/well and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. Cells were infected with SARS-CoV-2 for 2 h at an MOI of 1. Ten μM of the indicated compound was added 2 h prior to infection, at the time of infection or 3, 6, 9 or 12 h post-infection and SARS-CoV-2 RNA production was measured 24 h post-infection by means of RT-qPCR.

Effect of the compounds on the time course of HNEC infection. Twenty μL of SARS-CoV-2 inoculum with a Median Tissue Culture Infectious Dose of 5×10^3 /mL (TCID₅₀) was added at the apical pole of the epithelium in the presence of various concentrations of the compounds. After 4 h, the viral inoculum was removed and cells were washed with 200 μL of PBS before addition of 20 μL of the different concentrations of compounds. To collect viral RNA produced, the apical pole of the epithelium was washed with 200 μL of PBS for 10 min and SARS-CoV-2 RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini kit[™] (Qiagen) and measured 4, 24, 48, 72, and 96 h post-infection by RT-qPCR. Epithelial integrity was assessed by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) at the same time using an EVOM volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Immunohistochemistry staining of HNECs. After 4 weeks of culture, HNEC epithelia were removed from transwells and fixed in 10% formalin for 12 h. Each membrane was embedded vertically into a paraffin block. Paraffin-embedded blocks were then cut into 4 μm-thick slides. Sections were deparaffinised, rehydrated and treated for antigen retrieval with citrate buffer. After blocking for 1 h using BSA 5%, sections were incubated with primary antibodies targeting SARS-CoV-2 nucleoprotein (Genetex 135357) or α-tubuline (Abcam 24610) and secondary antibody (Alexa Fluor) for 90 min at room temperature.

Statistical analyses. The experiments were performed in triplicate. Data are expressed as mean ± SEM or percentages. Statistical differences between the means of two datasets were assessed by means of the Mann-Whitney U-test using Graphpad Prism software. Asterisks indicate p-values as *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, NS not significantly different.

Results

In vitro screening of FDA-approved CAD effectiveness against SARS-CoV-2 RNA production. Eight FDA-approved CADs (Supplementary Fig. 1) were tested for their ability to reduce intracellular and extracellular SARS-CoV-2 RNA production at a fixed dose of 10 μM in Vero-E6 cells (Fig. 1). Carbamazepine²² and remdesivir were used as negative and positive controls, respectively. Carbamazepine shares a chemical scaffold similar to that of some of the compounds tested, but it is not a CAD because it does not contain an ionizable amine. Remdesivir is an RNA-dependent RNA polymerase inhibitor that has been reported to potently inhibit SARS-CoV-2 replication *in vitro*²³.

Five CADs with distinct pharmacological targets significantly reduced SARS-CoV-2 RNA production (>2-log reduction) in both Vero-E6 cell extracts and supernatants, suggesting that their antiviral effect was not related to their main pharmacological target, but rather to their common physicochemical properties. Three CADs displayed intermediate antiviral effectiveness, with viral RNA level reductions ranging from 1- to 2-log at 10 μM. As expected, carbamazepine had no effect on SARS-CoV-2 RNA production, whereas remdesivir potently inhibited it.

Structure–activity relationship analysis revealed that the 5 most potent compounds all contained a tricyclic ring skeleton (Supplementary Fig. 1), which thus appears to be an important chemical determinant for CAD antiviral activity. To confirm this hypothesis, we evaluated the effect of chlorpromazine sulfoxide, which differs from chlorpromazine only by the addition of a sulfoxide moiety on the tricyclic ring. The antiviral potency of chlorpromazine sulfoxide was drastically reduced as compared to that of chlorpromazine (Fig. 1), confirming that the modification of the tricyclic ring was detrimental to the compound's antiviral effectiveness.

Together, these results strongly suggest that tricyclic CADs are a class of compounds with antiviral activity against SARS-CoV-2, that provide a promising scaffold for the development of antiviral compounds.

Characterization of CAD *in vitro* anti-SARS-CoV-2 activity. The anti-SARS-CoV-2 effectiveness and the cytotoxicity of increasing concentrations of the 5 most potent compounds identified in the previous step were measured in Vero-E6 cells (Fig. 2). All compounds induced a dose-dependent decrease of SARS-CoV-2 RNA production. The antihistaminic compounds desloratadine and loratadine were the most potent ones, with EC₅₀s of 0.7 ± 0.4 μM and 0.9 ± 0.3 μM, respectively. These two compounds were not cytotoxic at their effective concentrations with CC₅₀s of 15.5 ± 1.1 and 19.9 ± 4.5 μM and therapeutic indexes of 23.3 and 22.5, respectively

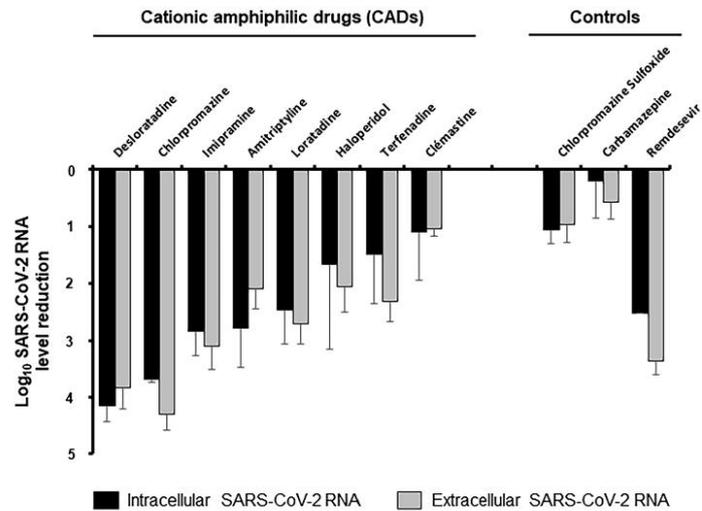


Figure 1. Antiviral effect of 10 μM of FDA-approved CADs on SARS-CoV-2 RNA production in Vero-E6 cells. Vero-E6 cells were treated with a fixed dose of 10 μM of the different CADs and infected with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.2. Forty-eight hours post-infection, viral RNA was extracted from cells and cell supernatants and quantified by RT-qPCR. Intracellular (black bar) and extracellular (grey bar) SARS-CoV-2 RNA log decreases are shown related to untreated controls. Each bar represents the mean \pm SD of at least two independent experiments performed in triplicate.

(Table 1). Loratadine and desloratadine inhibited SARS-CoV-2 RNA extracellular production up to a maximum of 2265-fold and 6673-fold, respectively. Desloratadine was selected for further antiviral characterization.

Spectrum of desloratadine antiviral activity against different coronaviruses. The effect of desloratadine on SARS-CoV-2 infection was measured in Vero-E6 cells by means of immunofluorescence using an antibody directed against double-stranded RNAs. A dose-dependent decrease of the number of SARS-CoV-2 infected cells was observed (Fig. 3A) and quantified (Fig. 3B). The EC_{50} of desloratadine on SARS-CoV-2 infection was $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$.

In order to characterize the spectrum of antiviral effectiveness of desloratadine, its effect on RNA production from two other benign coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, was measured by RT-qPCR in MRC5 and HRT-18 cells, respectively (Fig. 3C,D). Desloratadine induced a dose-dependent decrease of viral RNA production in both models. These results indicate that desloratadine carries broad-spectrum antiviral effectiveness against coronaviruses, suggesting a common mechanism of action against this viral family.

Identification of the SARS-CoV-2 lifecycle step targeted by desloratadine. Using 10 μM for each drug, a time-of-addition assay was performed in Vero-E6 cells as described in Fig. 4A. Aloxiastatin (E64D), a cell-permeable and irreversible broad-spectrum cysteine protease inhibitor known to block coronavirus life-cycles at the entry step, was used as a control. Both desloratadine and E64D antiviral effects were drastically impaired when the compounds were added 3 h post-infection (Fig. 4B). This result indicated that desloratadine does not block the SARS-CoV-2 lifecycle at a post-entry step.

To confirm that desloratadine targets an early step of the SARS-CoV-2 lifecycle, we compared its antiviral effect at 10 μM when added during vs after the first 2 h of infection, as described in Fig. 4C. The amount of SARS-CoV-2-infected cells was reduced only when desloratadine was present during the first 2 h of infection (Figs. 4D). A similar result was obtained with the control entry inhibitor E64D used at 10 μM . Quantification of immunofluorescence staining showed that both desloratadine and E64D lost more than 50% of their antiviral effectiveness when added more than 2 h after infection (Fig. 4E). These results demonstrate that desloratadine targets the entry step of SARS-CoV-2 lifecycle in Vero-E6 cells.

Identification of the SARS-CoV-2 entry mode targeted by desloratadine. Depending on the availability of host proteases capable to prime the spike protein, SARS-CoV-2 can deliver its RNA into its target cells through fusion of its envelope either with the plasma membrane or the endosome membrane. Therefore, the effect of 10 μM of desloratadine was evaluated in Vero-E6 and in Calu-3 cells, cell lines in which SARS-CoV-2 has been described to mainly fuse at the endosome membrane level and at the plasma membrane level,

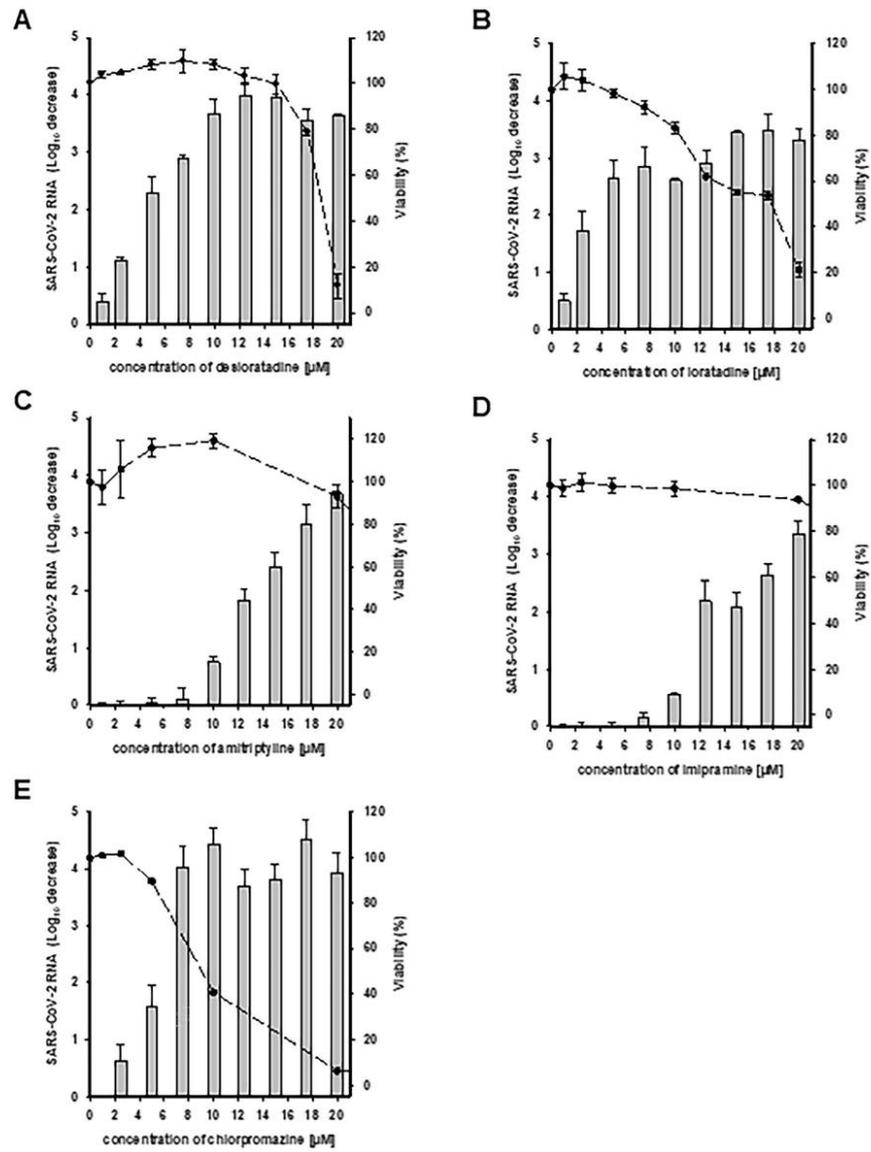


Figure 2. Assessment of the dose-dependent antiviral effectiveness of CADs against SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. Vero-E6 cells were infected with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.2 in the presence of increasing concentrations of: (A) desloratadine, (B) loratadine, (C) amitriptyline, (D) imipramine and (E) chlorpromazine. The reduction of the extracellular production of SARS-CoV-2 RNA (grey bars) was quantified by RT-qPCR and expressed relative to the untreated control. Vero-E6 viability (black points) was monitored by MTS assay. Each bar and point represents the mean \pm SD of at least two independent experiments performed in triplicate.

	EC ₅₀ of SARS-CoV-2 RNA production inhibition (μM)	CC ₅₀ in Vero-E6 cells (μM)	Therapeutic index
Loratadine	0.7 ± 0.4	15.5 ± 1.1	23.3
Desloratadine	0.9 ± 0.3	19.9 ± 4.5	22.5
Amitriptyline	8.8 ± 1.4	25.2 ± 1.7	2.9
Imipramine	8.1 ± 0.4	32.8 ± 1.0	4.1
Chlorpromazine	3.6 ± 1.2	8.7 ± 0.2	2.4

Table 1. EC₅₀s, CC₅₀s and therapeutic indexes of the 5 most potent CADs tested.

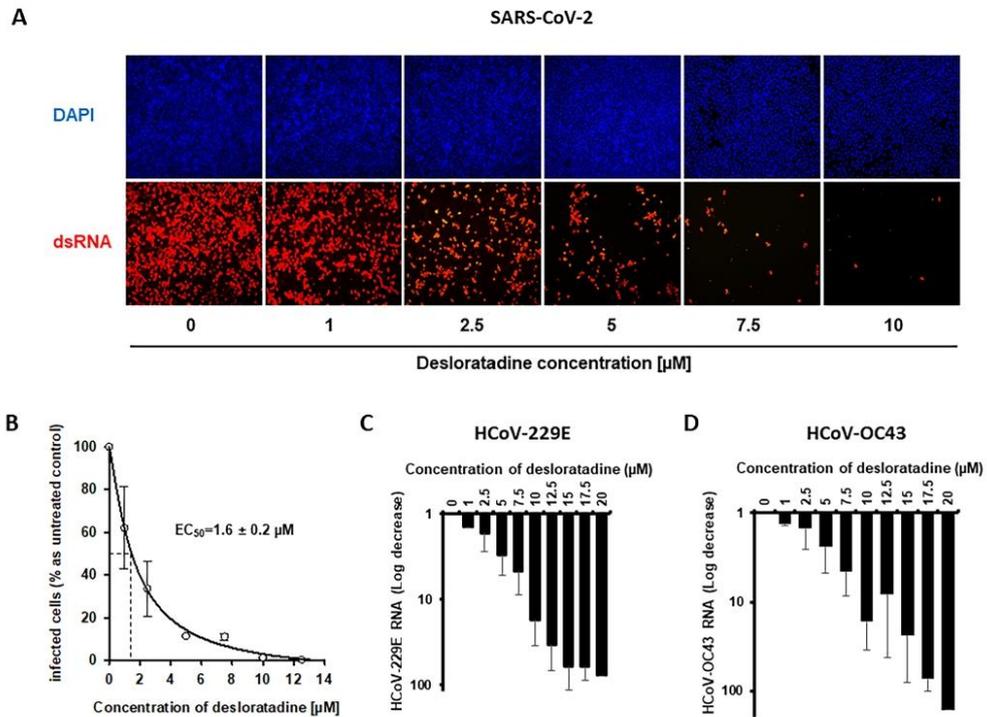


Figure 3. Assessment of desloratadine antiviral activity against SARS-CoV-2, HCoV-229E and HCoV-OC43. Vero-E6, MRC-5 and HRT-18 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2), HCoV-229E (MOI = 0.5) and HCoV-OC43 (MOI = 0.5), respectively, and treated with increasing concentrations of desloratadine. (A) SARS-CoV-2 infection of Vero-E6 cells monitored by immunofluorescence with an antibody directed against double stranded RNA (dsRNA). (B) SARS-CoV-2-infected Vero-E6 cells quantified by image J software. Effect of increasing concentrations of desloratadine on HCoV-229 (C) and HCoV-OC43 (D) viral RNA production in MRC-5 and HRT-18 cell supernatants, respectively, quantified by RT-qPCR.

respectively²⁴ (Fig. 4F). 10 μM of E64D and camostat were used as controls. E64D alters viral fusion at the endosome membrane through inhibition of the endosome-resident cysteine proteases cathepsins, whereas camostat alters viral fusion at the plasma membrane by inhibiting the cell surface serine protease TMPRSS2. As expected, camostat significantly inhibited SARS-CoV-2 infection in Calu-3 cells, whereas it was less effective in Vero-E6 cells. Conversely, E64D effectively reduced SARS-CoV-2 infection in Vero-E6 cells, whereas no significant inhibition was observed in Calu-3 cells with this compound. The effect of desloratadine was similar to that of E64D, i.e. potently inhibitory against SARS-CoV-2 infection in Vero-E6 cells, but not in Calu-3 cells. These findings indicate that desloratadine blocks SARS-CoV-2 entry via the endosomal route.

Assessment of desloratadine anti-SARS-CoV-2 activity in primary human nasal epithelial cells (HNEC). SARS-CoV-2 infection was monitored by immunohistochemistry staining using an antibody

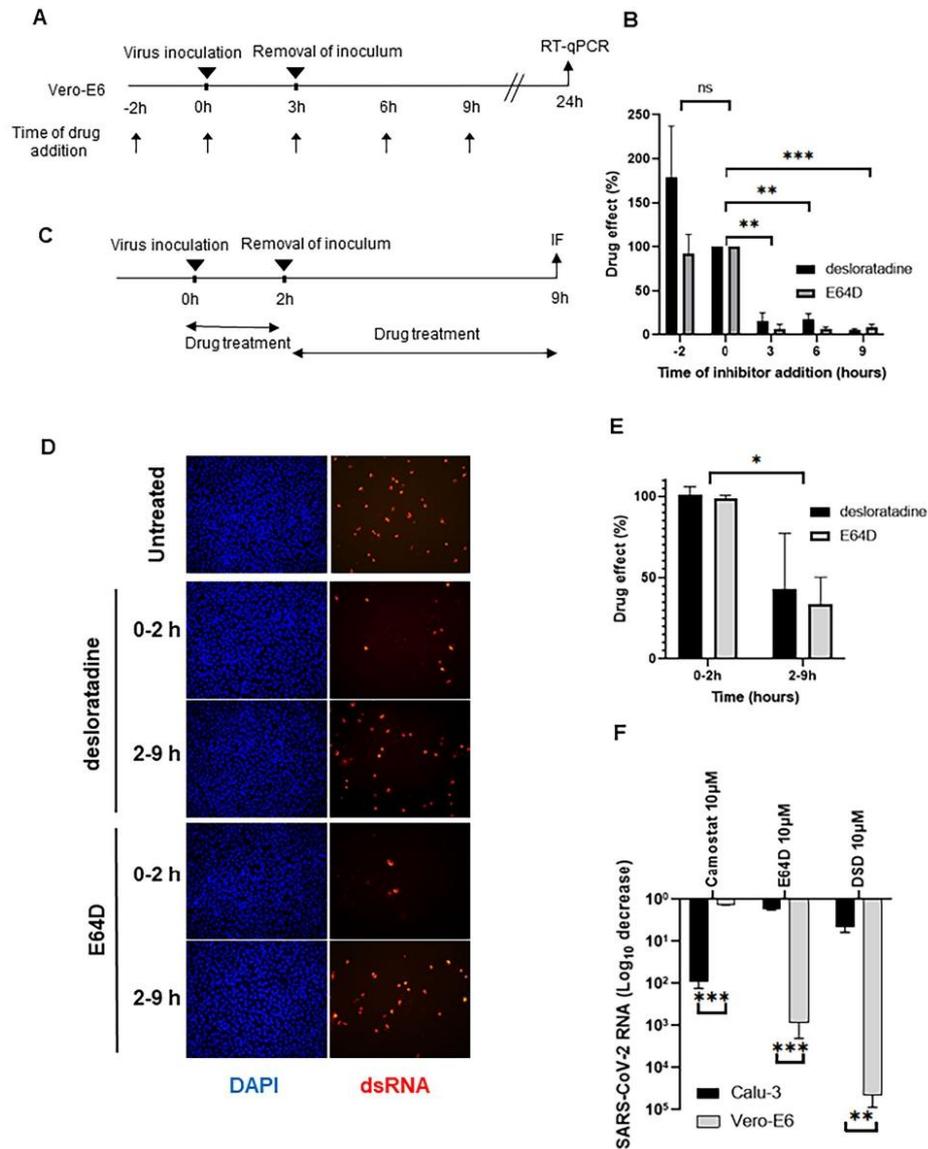


Figure 4. Desloratadine inhibition of SARS-CoV-2 infection at an early step of the viral lifecycle. (A) Design of the time-of-drug addition assay in Vero-E6 cells. (B) Results of the time-of-drug addition assay using 10 µM of desloratadine (black bar) or 10 µM of E64D (grey bar), expressed as the percent effect of the drug at each time point relative to its effect when added at the time of infection, considered as 100%. (C) Design of the entry assay using desloratadine and E64D. 10 µM of the indicated drugs were added either during the first 2 h of infection or after removal of the inoculum between the 2nd and the 9th hours. (D) Cells infected at different time points studied by immunofluorescence using an antibody directed against double-stranded RNA (dsRNA). (E) Quantification of immunofluorescence in cells infected at different time points. The percent effect of 10 µM of desloratadine (black bars) and 10 µM of E64D (grey bars) is shown relative to its effect when the drugs were added between 0 and 2 h, considered as 100%. (F) Effect of 10 µM of desloratadine, camostat and E64D on SARS-CoV-2 RNA production in Vero-E6 (grey bars) and TMPRSS2-expressing Calu-3 cells (black bars), as assessed by RT-qPCR.

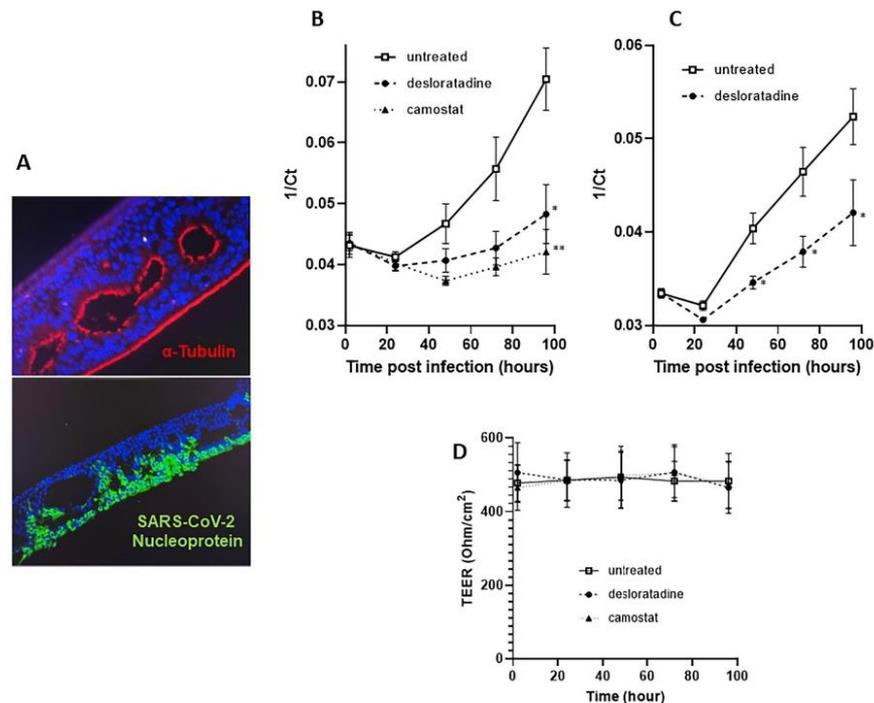


Figure 5. SARS-CoV-2 infection and effect of desloratadine and camostat on SARS-CoV-2 RNA production in primary HNECs. (A) Representative images of cross-sectional views of primary human nasal epithelium ciliated cells expressing α -tubulin (red) and the SARS-CoV-2 nucleoprotein (green). Nuclei were stained with DAPI. (B) Effect of desloratadine and camostat on dynamics of SARS-CoV-2 RNA production at the apical side of HNECs from three different patients. Results were expressed as the mean of the 1/Ct values \pm SEM of the three patients. (C) Effect of desloratadine on dynamics of SARS-CoV-2 RNA production at the apical side of HNECs from a healthy donor pool. Results were expressed as the mean of the 1/Ct values \pm SEM of two independent experiments. Epithelial integrity was monitored by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) at all-time points for all three patients. Each point represents the average TEER for the three patients untreated, treated with 5 μ M desloratadine, treated with 10 μ M camostat (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test versus 1/Ct values of untreated cells).

directed against the viral nucleoprotein (Fig. 5A). SARS-CoV-2 nucleoprotein expression was restricted to the apical side of the nasal epithelium, while ciliated cells which express tubulin were the main targets of infection.

The dynamics of the antiviral effect of 5 μ M desloratadine was evaluated both on HNECs obtained from 3 independent patients or from a pool of healthy donor (Fig. 5B,C, respectively). The effect of 10 μ M camostat (Fig. 5B) was also evaluated as a control in HNECs obtained from the same 3 independent patients. The nasal epithelium was infected with SARS-CoV-2 at its apical pole. After removal of the inoculum, virus production at the apical pole was monitored 4, 24, 48, 72, and 96 h post-infection. Epithelium integrity was assessed by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) at all-time points (Fig. 5D). In samples derived from the three patients, delayed virus production was observed with camostat and desloratadine without epithelium alteration, indicating that SARS-CoV-2 infection is inhibited by both drugs. Camostat induced a more pronounced and rapid delay of viral RNA production than desloratadine. Desloratadine effect was confirmed with HNEC obtained from a healthy donor pool (Fig. 5B). Overall, these results suggest that both cysteine protease inhibitors, such as camostat, and lysosomotropic agents, such as desloratadine, can be used to limit SARS-CoV-2 infection of human nasal epithelium cells.

Discussion

Coronaviruses are enveloped single-stranded positive RNA viruses that represent a serious threat to public health. Indeed, although often asymptomatic or associated with moderate symptoms, SARS-CoV-2 infection can evolve into life-threatening pneumonia and systemic disease²⁵. Vaccines have made it possible to slow the course of the SARS-CoV-2 pandemic. Nevertheless, the availability of therapeutic strategies using readily available drugs

could be useful to prevent the onset of complications and the need for oxygen therapy in some patients, especially in non-vaccinated individuals and in the case of propagation of vaccine-escape variants, while representing an efficacious tool to prevent the emergence of new coronaviruses in the future.

Coronavirus entry into host cells is an important determinant of viral infectivity, tropism and pathogenesis and represents therefore an interesting target for antiviral therapy. After binding to their receptor, coronaviruses deliver their nucleocapsid into the host cell by fusion of their envelope with the host cell membrane. Cleavage of spike proteins by host cell proteases is essential for this fusion process to happen²⁶. It has been shown that SARS-CoV and SARS-CoV-2 preferentially use the cell surface serine protease TMPRSS2 for priming and entry. Nevertheless, the endosome-resident cysteine proteases cathepsin can also be used as alternatives for this process^{15,16,27}. Recently, Zhao et al. reported the crucial role of CatL in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice¹⁷. Thus, depending on the host protease recruited, SARS-CoV-2 can fuse directly with the plasma membrane or enter cells by endocytosis and fuse with the endosome membrane to deliver its nucleocapsid.

Camostat and nafamostat, two broad-spectrum serine protease inhibitors, clinically approved for other applications in Japan, have been shown to block SARS-CoV-2 fusion at the plasma membrane¹⁵. E64D, a broad-spectrum cysteine protease inhibitor, has been reported to inhibit SARS-CoV-2 pseudovirion entry through the endosomal pathway. Furthermore, a synergistic effect of combined camostat and E64D results in a complete blockade of SARS-CoV-2 entry into cells^{28–30}. Although it has been shown that, in human airway epithelial cells, coronaviruses generally use surface proteases for entry^{31–33}, it appears to be relevant to target both pathways to make sure that a complete blockade of SARS-CoV-2 entry is achieved.

CADs are a large group of drugs with common structural features, including a hydrophobic ring and a hydrophilic side chain containing an ionizable amine. CADs chemical properties lead to their accumulation in acidic intracellular compartments, such as endosomes and lysosomes. The unprotonated neutral CADs are rather hydrophobic and can readily diffuse through the limiting membrane of acidic organelles. In an acidic environment, the basic amine groups of CADs are protonated³⁴. The drugs are then trapped inside the lysosomes, leading to their several 100-fold accumulation^{35,36}. This uptake mechanism, called lysosomotropism, induces various physiological and morphological alterations of the endolysosomal compartment, which are reversible after treatment discontinuation. Thus, CADs, which include numerous drugs FDA-approved for a wide range of human diseases⁶, could represent a valuable group of repurposed compounds against coronaviruses in general, and notably against SARS-CoV-2.

In the present study, the hypothesis that lysosomotropic compounds could have antiviral activity against SARS-CoV-2 has been tested in Vero-E6 cells with 8 FDA-approved CADs. Five of these CADs, including 2 antiallergics (loratadine and desloratadine), 1 antipsychotic (chlorpromazine) and 2 antidepressants (imipramine and amitriptyline) significantly reduced SARS-CoV-2 RNA production. These results suggest that the antiviral activity of these CADs is related to their lysosomotropic activity rather than to their respective pharmacological targets, a result in keeping with recent observations³⁷. In our screening, loratadine and its metabolite desloratadine were the most potent SARS-CoV-2 inhibitors. Both compounds are second-generation FDA-approved antihistaminics that are widely used to treat symptoms associated with seasonal respiratory allergies, urticaria, angioedema or atopic dermatitis.

Cell lines commonly used to perform viral assays exhibit varying levels of TMPRSS2 and cathepsin B/L expression, resulting in the selection by the virus of a preferential entry route. SARS-CoV-2 enters Vero-E6 cells, which do not express high levels of TMPRSS2, via the endosomal pathway. In contrast, SARS-CoV-2 enters Calu-3 cells, which express TMPRSS2, via plasma membrane fusion²⁴. In our experiments, desloratadine targeted an early step of the SARS-CoV-2 lifecycle in Vero-E6 cells, whereas it was ineffective in Calu-3 cells, suggesting that desloratadine blocks the endosomal entry route. Because they are lysosomotropic drugs, CADs could indirectly affect the activity of endosome/lysosome-resident enzymes required for the viral lifecycle. Interestingly, it was recently reported that functional inhibition of acid sphingomyelinase, an inner membrane-anchored lysosomal glycoprotein, by the lysosomotropic antidepressant amitriptyline prevented the uptake of SARS-CoV-2 by epithelial cells³⁸.

Immortalized cell cultures offer a simple and cost-effective platform for the investigation of cell biology mechanisms. However, this model suffers from important caveats as far as therapeutic relevance is concerned. We therefore investigated desloratadine antiviral effectiveness in the more relevant primary HNEC polarized culture model, organized, like in the nasal cavity, with an apical side oriented towards the air and a basal side towards the culture medium, therefore mimicking the in vivo conditions. SARS-CoV-2 infection is thought to begin in the nasal epithelium³⁹, which expresses high levels of ACE2 receptors⁴⁰. Recently, nasal multiciliated epithelial cells have been shown to be the primary targets of SARS-CoV-2 replication in early-stage COVID-19. Therefore, targeting nasal ciliated cells during the early steps of the SARS-CoV-2 lifecycle may be an appropriate strategy to overcome SARS-CoV-2 propagation, which is transmitted by respiratory aerosols or droplets. Kinetic evaluation of the antiviral properties of camostat and desloratadine in infected HNECs revealed that both drugs reduce SARS-CoV-2 RNA production at the apical pole, indicating that both cysteine protease inhibitors and lysosomotropic agents slow down SARS-CoV-2 replication. However, a more pronounced effect was observed with camostat than with desloratadine, suggesting that SARS-CoV-2 enters HNECs preferentially through TMPRSS2 priming. Recently, Tummino et al. evaluated the antiviral effectiveness of the CADs amiodarone and sertraline in a murine model of COVID-19 and observed no significant effect on lung viral titers. However, cellular hallmarks of phospholipidosis were also not observed, suggesting that the lack of antiviral effect in mice lungs could have been related to the absence of lung lysosomal disorders induced by amiodarone and sertraline in their model. Neither sertraline nor amiodarone possess a tricyclic ring, shown in the present study to be a crucial determinant of CADs antiviral activity.

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, a potential antiviral effect of lysosomotropic agents has been supported by clinical observations in patients receiving CAD-containing treatments. Indeed, several psychiatric

hospitals over the world have observed a lower prevalence of symptomatic infections in psychiatric patients, putting forward the hypothesis of a protective effect of psychotropic treatments^{41,42}. Chlorpromazine, a phenothiazine derivative widely used in clinical practice for the treatment of acute and chronic psychoses, was found to have antiviral activity against SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells and human A549-ACE2 cells⁴³. Nevertheless, chlorpromazine would be inappropriate for systemic prophylaxis of infection in healthy individuals. Fluvoxamine is another approved drug with a molecular structure suggesting lysosomotropism that has been recently tested in a randomized preliminary clinical trial showing a statistically significant reduction of the likelihood of COVID-19 clinical deterioration in patients receiving the compound. No fluvoxamine-treated patients met criteria for clinical deterioration as defined in the study, whereas 8.3% of patients taking placebo met this end point⁴⁴. Hydroxychloroquine, a drug approved for the treatment of malaria, has also been shown to be active in vitro against coronaviruses, including SARS-CoV-2¹¹, but little efficacy has been observed in subsequent clinical trials. The disappointing results of the CAD hydroxychloroquine contrast with the encouraging clinical data of chlorpromazine and fluvoxamine. Although all of them have lysosomotropism in common, they differ in their drug profile, which could explain their different effectiveness. Interestingly, chlorpromazine, fluvoxamine and desloratadine are all functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA), and an association has been reported between FIASMA treatment and a reduced risk of intubation or death in individuals hospitalized for severe COVID-19⁴⁵. Antidepressant exposure was also associated with a reduced incidence of emergency department visitation or hospital admission among SARS-CoV-2 positive patients⁴⁶. An antihistaminic drug such as desloratadine, that has a lysosomotropic effect and inhibits the generation and release of inflammatory mediators and cytokines¹⁸, would have a clear advantage, compared to antipsychotics and antidepressants, in antiviral therapy. Thus, whether desloratadine could provide a substantial contribution to prophylaxis and systemic therapy of COVID-19 must now be explored in randomized clinical trials.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 12 January 2022; Accepted: 28 November 2022

Published online: 06 December 2022

References

1. Drosten, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**(20), 1967–1976 (2003).
2. Pollack, M. P. *et al.* Latest outbreak news from ProMED-mail: Novel coronavirus—Middle east. *Int. J. Infect. Dis.* **17**(2), e143–e144 (2013).
3. Zhu, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**(8), 727–733 (2020).
4. Menachery, V. D. *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* **21**(12), 1508–1513 (2015).
5. Edwards, C. E. *et al.* Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**(43), 26915–26925 (2020).
6. Kornhuber, J. *et al.* Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): A novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol. Biochem.* **26**(1), 9–20 (2010).
7. Vaugeois, J. M. Psychotropics drugs with cationic amphiphilic properties may afford some protection against SARS-CoV-2: A mechanistic hypothesis. *Psychiatry Res.* **291**, 113220 (2020).
8. Funk, R. S. & Krise, J. P. Cationic amphiphilic drugs cause a marked expansion of apparent lysosomal volume: Implications for an intracellular distribution-based drug interaction. *Mol. Pharm.* **9**(5), 1384–1395 (2012).
9. Ashoor, R. *et al.* The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation. *PLoS ONE* **8**(11), e2481 (2013).
10. Nujic, K. *et al.* Impairment of lysosomal functions by azithromycin and chloroquine contributes to anti-inflammatory phenotype. *Cell Immunol.* **279**(1), 78–86 (2012).
11. Blaess, M. *et al.* COVID-19/SARS-CoV-2 infection: Lysosomes and lysosomotropism implicate new treatment strategies and personal risks. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(14), 4953 (2020).
12. Glebov, O. O. Understanding SARS-CoV-2 endocytosis for COVID-19 drug repurposing. *FEBS J.* **287**(17), 3664–3671 (2020).
13. Schloer, S. *et al.* Targeting the endolysosomal host-SARS-CoV-2 interface by clinically licensed functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) including the antidepressant fluoxetine. *Emerg. Microbes Infect.* **9**(1), 2245–2255 (2020).
14. Norinder, U. *et al.* Existing highly accumulating lysosomotropic drugs with potential for repurposing to target COVID-19. *Biomed. Pharmacother.* **130**, 110582 (2020).
15. 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**(2), 271–280e8 (2020).
16. Ou, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **11**(1), 1620 (2020).
17. Zhao, M. M. *et al.* Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**(1), 134 (2021).
18. Agrawal, D. K. Pharmacology and clinical efficacy of desloratadine as an anti-allergic and anti-inflammatory drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**(3), 547–560 (2001).
19. Coste, A. *et al.* Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur. Respir. J.* **15**(2), 367–372 (2000).
20. Papon, J. E. *et al.* HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope* **112**(11), 2067–2075 (2002).
21. Softic, L. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 infection by the cyclophilin inhibitor alisporivir (Debio 025). *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**(7), e00876–e920 (2020).
22. Okuma, T. & Kishimoto, A. A history of investigation on the mood stabilizing effect of carbamazepine in Japan. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **52**(1), 3–12 (1998).
23. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **30**(3), 269–271 (2020).

24. Koch, J. *et al.* TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO J.* **40**(16), e107821 (2021).
25. Yang, X. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* **8**(5), 475–481 (2020).
26. Matsuyama, S. *et al.* Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J. Virol.* **84**(24), 12658–12664 (2010).
27. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**(21), 11727–11734 (2020).
28. Wang, X. *et al.* Broad-spectrum coronavirus fusion inhibitors to combat COVID-19 and other emerging coronavirus diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(11), 3843 (2020).
29. Padmanabhan, P., Desikan, R. & Dixit, N. M. Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS Comput. Biol.* **16**(12), e1008461 (2020).
30. Yu, F., *et al.* Glycopeptide Antibiotic Teicoplanin Inhibits Cell Entry of SARS-CoV-2 by Suppressing the Proteolytic Activity of Cathepsin L. *Front Microbiol.* **13**, 884034 (2022).
31. Bertram, S. *et al.* TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J. Virol.* **87**(11), 6150–6160 (2013).
32. Shirato, K., Kawase, M. & Matsuyama, S. Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry. *Virology* **517**, 9–15 (2018).
33. Kleine-Weber, H. *et al.* Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. *Sci. Rep.* **8**(1), 16597 (2018).
34. Halliwell, W. H. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicol. Pathol.* **25**(1), 53–60 (1997).
35. de Duve, C. *et al.* Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* **23**(18), 2495–2531 (1974).
36. Trapp, S. *et al.* Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *Eur. Biophys. J.* **37**(8), 1317–1328 (2008).
37. Tummino, T. A. *et al.* Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2. *Science* **373**(6554), 541–547 (2021).
38. Carpintero, A. *et al.* Pharmacological inhibition of acid sphingomyelinase prevents uptake of SARS-CoV-2 by epithelial cells. *Cell Rep. Med.* **1**(8), 100142 (2020).
39. Ahn, J.H., *et al.* Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J. Clin. Invest.* **131**(13), e148517. <https://doi.org/10.1172/JCI148517> (2021).
40. Sungnak, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat. Med.* **26**(5), 681–687 (2020).
41. Plaze, M. *et al.* Repurposing chlorpromazine to treat COVID-19: The reCoVery study. *Encephale* **46**(3), 169–172 (2020).
42. Hoertel, N. *et al.* Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: Results from an observational study. *Mol. Psychiatry* **26**(9), 5199–5212 (2021).
43. Plaze, M. *et al.* Inhibition of the replication of SARS-CoV-2 in human cells by the FDA-approved drug chlorpromazine. *Int. J. Antimicrob. Agents* **57**(3), 106274 (2021).
44. Lenz, E. J. *et al.* Fluvoxamine vs placebo and clinical deterioration in outpatients with symptomatic COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA* **324**(22), 2292–2300 (2020).
45. Hoertel, N. *et al.* Association between FIASMA and reduced risk of intubation or death in individuals hospitalized for severe COVID-19: An observational multicenter study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **110**(6), 1498–1511 (2021).
46. Fritz, B. A. *et al.* Association between antidepressant use and ED or hospital visits in outpatients with SARS-CoV-2. *Transl. Psychiatry* **12**(1), 341 (2022).

Author contributions

M.M.-D.: acquisition, analysis, and interpretation of data; participation in the drafting of the manuscript. S.B.: contribution to the experimental design of experiments on primary nasal epithelial cells and acquisition, analysis, and interpretation of data, participation in the drafting of the manuscript. F.B.: acquisition, analysis, and interpretation of data. R.B. and D.L.-M.: acquisition and analysis of data. C.T.N., P.M., K.S.: acquisition, analysis, and interpretation of histologic data. Q.N., L.S., J.-M.V., B.L., J.-M.P., A.C.: critical revision of the manuscript. E.B.: contribution to the experimental design of primary nasal epithelial, critical revision of the manuscript. P.B.: data analysis and interpretation, critical revision of the manuscript. S.J., A.A.-B.: study supervision; analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Funding

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche médicale” (FRM), grant “ANR Flash Covid 19”.

Competing interests

J.-M.P. has served as an advisor and/or speaker for Abbvie, Gilead, Merck, Regulus, Assembly Biosciences, Arbutus and Memo Therapeutics. A.C. has participated in advisory boards for ALK, GSK and Sanofi. The rest of the authors have no competing interest.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25399-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.A.-B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

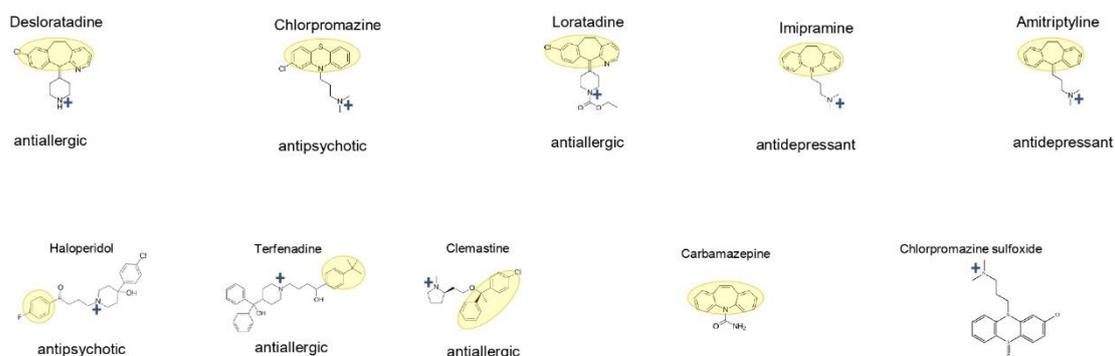
Title

Desloratadine, an FDA-approved cationic amphiphilic drug, inhibits SARS-CoV-2 infection in cell culture and primary human nasal epithelial cells by blocking viral entry

Authors

Margot Morin-Dewaele^{1*}, Sophie Bartier^{1,2,3,4*}, François Berry^{1*}, Rozenn Brillet¹, Dennis Salomón López-Molina¹, Công Trung Nguyễn^{1,5}, Pascale Maille⁵, Kevin Sereno⁵, Quentin Nevers⁶, Laurent Softic⁷, Jean-Marie Vaugeois⁸, Bruno Louis^{1,4}, Emilie Bequignon^{1,2,3,4}, Patrice Bruscella¹, André Coste^{1,2,3,4}, Jean-Michel Pawlotsky^{1,9#}, Stéphane Jamain^{1,10#} and Abdelhakim Ahmed-Belkacem^{1#5}

Supplementary Figure 1. Chemical structures of CADs



Discussion

A l'heure actuelle, le monde connaît de nombreuses crises sanitaires dues à l'émergence ou la réémergence de virus pathogènes. La recherche d'antiviraux et de vaccins pour limiter les infections et l'apparition de nouvelles pathologies a considérablement amélioré l'espérance et la qualité de vie des patients. On peut prendre l'exemple de la maladie du SIDA causée par le VIH qui est aujourd'hui contrôlée ou encore le succès thérapeutique obtenu dans la lutte contre l'infection par le VHC. L'émergence des coronavirus à risque pandémique a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et a stimulé la recherche d'antiviraux à large spectre, capables d'inhiber plusieurs virus de la même famille, voire plusieurs familles virales. Dans ce contexte, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'infection par les coronavirus sont devenus une priorité absolue.

Le SARS-CoV-2 est un virus respiratoire transmis par voie aérienne, principalement par les gouttelettes respiratoires (Gupta et al., 2020; Trypsteen et al., 2020). Capable d'infecter les voies respiratoires hautes et basses, la première barrière que ce virus rencontre dans la cavité nasale est le mucus (Cone, 2009; Fahy and Dickey, 2010). Bien que ce dernier participe à l'élimination des pathogènes *via* la clairance mucociliaire et les mucines, il n'en reste pas moins perméable à l'entrée du SARS-CoV-2. L'épithélium nasal est composé de trois types cellulaires : les cellules basales, les cellules en gobelet et les cellules ciliées (Cone, 2009; Manna et al., 2022; Sungnak et al., 2020a; Ziegler et al., 2020). Ces deux dernières expriment ACE2 et TMPRSS2 et correspondent probablement au site initial d'infection, avec entrée virale principalement par fusion membranaire.

Au sein du laboratoire, notre travail a consisté en l'étude de l'environnement de la cavité nasale, et plus précisément du mucus qui constitue la première barrière rencontrée par le SARS-CoV-2. Pour cela, en collaboration avec l'équipe du Pr. B. Louis, nous avons utilisé des cellules épithéliales nasales humaines (CENHs) provenant de patients atteints de polyposes et opérés au Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil dans le service du Pr Coste. Au bout de 28 jours de culture, les cellules, en interface air-liquide, forment un épithélium pluristratifié répondant aux caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium nasal humain, ce qui en fait un modèle biologiquement relevant (Bequignon et al., 2019; Coste et al., 2000).

Entrée du SARS-CoV-2

Comme dans le cas du SARS-CoV-1, le SARS-CoV-2 peut rentrer de deux manières dans la cellule cible : (i) par la voie de fusion à la membrane plasmique, dite « early », nécessitant des clivages de Spike par TMPRSS2 ; et (ii) par la voie endosomale, dite « late », nécessitant des clivages de Spike par les cathépsines B/L. Ces deux voies d'entrée dépendent de la disponibilité des protéases cellulaires à la surface des cellules cibles et déterminent le tropisme du virus (Hoffmann et al., 2020; Jackson et al., 2022).

L'existence d'un motif minimal de clivage (R-R-A-R₆₈₅) par la furine, à la charnière entre les sous-unités S1/S2 de la protéine spike (Coutard et al., 2020), a constitué une découverte majeure dans la compréhension des mécanismes d'entrée de SARS-CoV-2. La présence de ce site furine pourrait expliquer le tropisme accru et la transmission plus élevée du SARS-CoV-2 par rapport au SARS-CoV-1 (Coutard et al., 2020; Walls et al., 2020). En effet, l'expression de la furine au niveau du trans-Golgi pourrait permettre un clivage intracellulaire de Spike au site S1/S2 et la pré-activation de la protéine S (conformation RBD ouverte) au niveau des virions libérés (Shang et al., 2020; Wrobel et al., 2020). Cette première étape de clivage dans la région charnière S1/S2 est suivie d'un second clivage protéolytique, effectué cette fois par la protéase cellulaire TMPRSS2 au niveau du site S2' (K815), retrouvé dans le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV-1 (Bestle et al., 2020; Coutard et al., 2020). Toutefois, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus général concernant l'importance du clivage par la furine dans l'entrée virale et dans la propagation du SARS-CoV-2. En effet, des expériences *in vitro* ont démontré que les mutants SARS-CoV-2 qui ne possèdent pas le site de clivage à la furine peuvent pénétrer des lignées cellulaires humaines, de singes ou encore de hamsters (Walls et al., 2020), suggérant un rôle non-essentiel dans l'entrée virale *in vivo*. Cependant, la perte de ce site de clivage se caractérise également par une diminution de la formation de syncytia. Le clivage en S1/S2 furine-dépendant pourrait ainsi jouer un rôle, non essentiel, d'accélérateur de l'infection et favoriser la propagation du virus *via* la fusion cellule-cellule (Xing et al., 2020).

L'entrée du SARS-CoV-2 est donc dépendante de l'activité de différentes protéases cellulaires favorisant l'infection et la propagation du virus au sein de l'organisme. Cependant, tous les facteurs cellulaires impliqués ne sont probablement pas encore identifiés.

Récemment, Sanda et al. ont détecté, par spectrométrie de masse, la présence de O-glycanes à proximité du site de clivage à la furine et leur rôle potentiel dans ce clivage fait actuellement débat (Sanda et al., 2021; Thaingtamtanha and Baeurle, 2022).

De nouveaux résultats récents suggèrent l'existence d'une autre voie d'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules humaines impliquant l'interaction de la protéine Spike avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ activée, avec une affinité comparable à celle retrouvée pour ACE2 (Liu et al., 2022). Ceci pourrait expliquer l'infection par SARS-CoV-2 de différents organes, notamment dans les cellules ne possédant pas ACE-2 dans un modèle de souris (Sun et al., 2020), de poumons humains (Puray-Chavez et al., 2021), de cerveau humain (Andrews et al., 2022) et de tissus de patients COVID-19 (Caccuri et al., 2021). L'hypothèse fournie par les auteurs est que l'infection par le SARS-CoV-2, dépendante de ACE2, induirait dans un second temps une réaction inflammatoire et la libération de cytokines dans le système respiratoire. À leur tour, des signaux cellulaires sont déclenchés par ces cytokines, activant les intégrines sur de nombreuses cellules, en particulier celles qui ne possèdent pas ACE2, permettant ainsi l'entrée et la réplication du SARS-CoV-2.

De manière intéressante, d'autres protéases facilitant l'entrée virale ont été mises en évidence récemment. Les métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 facilitent cette étape (Jocher et al., 2022). Dans les cellules pulmonaires, ADAM17 potentialise l'infection du virus et ADAM10 est nécessaire à la formation de syncytia, comme observé dans les cellules pulmonaires de patients atteints de COVID19 (Jocher et al., 2022). De plus, ces deux métalloprotéases sont capables de cliver Spike au site S2'.

Enfin, des facteurs de coagulations tels que Xa et la thrombine peuvent aussi favoriser le clivage de spike pour permettre l'entrée du SARS-CoV-2 dans des organoïdes pulmonaires humains (Kastenhuber et al., 2022).

L'ensemble de ces données suggère que d'autres protéases, non identifiées à ce jour, pourraient également être impliquées dans les mécanismes d'infection par SARS-CoV-2.

La première partie de cette thèse a consisté en l'étude du rôle de l'épithélium respiratoire nasal, et plus particulièrement du mucus sécrété par les CENHs, qui contient des vésicules extracellulaires, dans l'infection par SARS-CoV-2.

Nous avons montré que les exosomes/petites vésicules extracellulaires (sEVs) dans le mucus (mu-sEVs) produit par des CENHs contenaient ACE2 et TMPRSS2 sous sa forme active, participaient au « priming » de la protéine Spike possédant -ou non- le site de clivage à la furine, et

favorisaient l'infection des cellules épithéliales nasales par le SARS-Cov-2. Ces résultats suggèrent un rôle proviral des mu-sEVs. Plusieurs hypothèses se dégagent de ces résultats. D'une part, les mu-sEVs pourraient interagir de manière directe avec les particules virales de SARS-CoV-2, d'autres coronavirus voire d'autres virus respiratoires dont le site de primo-infection est l'épithélium respiratoire nasal, et pourraient améliorer la capacité infectieuse de ces derniers : c'est l'hypothèse de la pré-activation ("priming") extracellulaire. D'autre part, un rôle encore inexploré des sEVs pourrait provenir de leur action sur divers types cellulaires. En effet, en transférant leur contenu dans des cellules réceptrices, ces vésicules pourraient moduler la permissivité à l'infection ou jouer un rôle sur la pathogénicité viro-induite.

La pré-activation (« priming ») extracellulaire du virus par les mu-sEVs

L'utilisation d'un modèle d'infection *in vitro* (VERO-E6, A549 et Calu-3) et de sEVs isolées de VCaP (VCaP-sEVs) contenant ACE2 et TMPRSS2 sous sa forme active nous a permis de mettre en évidence les mécanismes qui sous-tendent les effets des mu-sEVs sur l'infection par le SARS-CoV-2.

En premier lieu, l'intégrité des protéines ACE2 et TMPRSS2 -activées- à la membrane des mu-sEVs est essentielle pour observer un effet proviral. Deuxièmement, l'activité de TMPRSS2 cellulaire reste nécessaire pour observer l'infection, indépendamment de la pré-incubation avec les VCaP-sEVs. Dans un modèle d'infection *in vitro*, l'effet proviral médié par la pré-incubation des VCaP-sEVs et des particules virales est observé dans des cellules Calu-3, exprimant TMPRSS2 et non dans des cellules VERO-E6 ou A549 (TMPRSS2⁻) dans lesquelles le virus utilise principalement la voie d'entrée endosomale. Enfin, dans un modèle d'infection *ex vivo* (CENHs), l'incubation des VCaP-sEVs ou des mu-sEVs avec le virus induit le clivage de Spike au site S1/S2 (« priming ») et favorise l'infection. Ces résultats démontrent que ACE2 et TMPRSS2 vésiculaires participent significativement à un « priming » extracellulaire de la protéine Spike du SARS-CoV-2, au niveau de l'épithélium respiratoire nasal. A ce titre, il est donc possible d'imaginer que les mu-sEVs favorisent l'infection de cellules adjacentes ou plus éloignées, exprimant ACE2 et TMPRSS2 (figure 26).

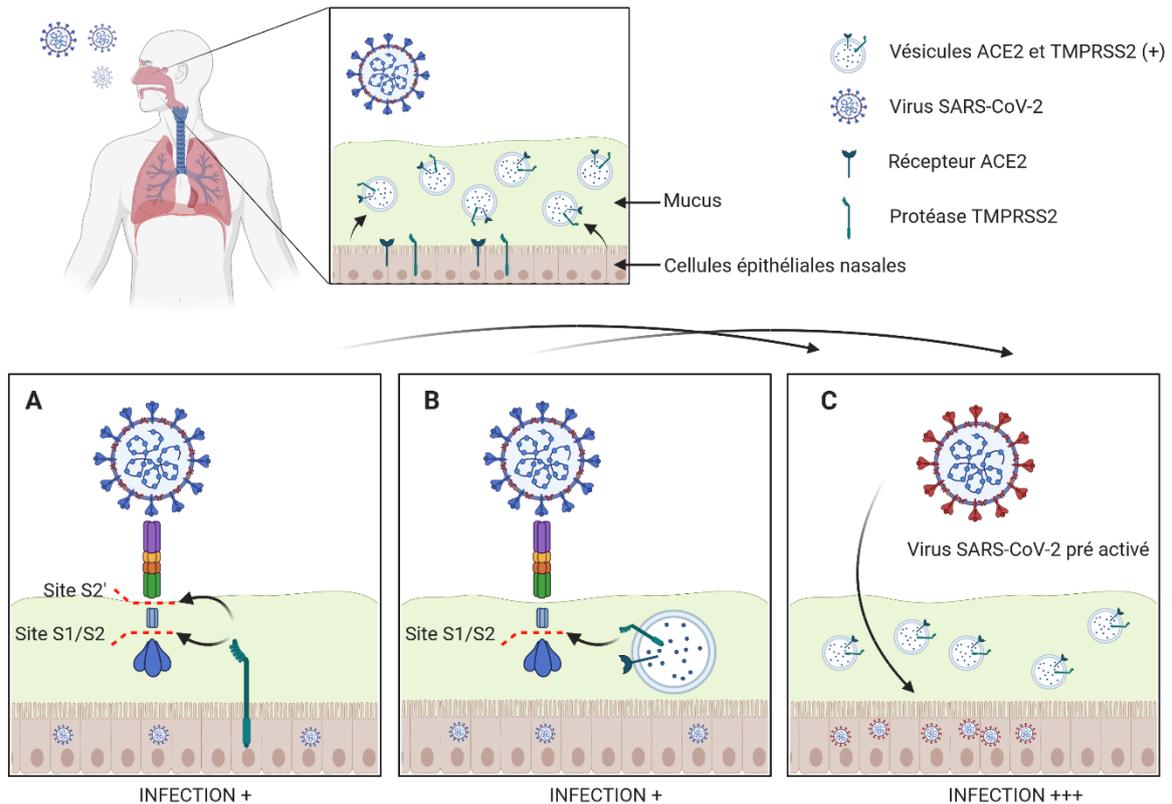


Figure 26 : Mécanisme de pré-activation du virus par les sEVs produites dans le mucus de l'environnement nasal. (A) Dans des conditions sans vésicules, Spike est clivé par TMPRSS2 au site S2', entraînant l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules épithéliales nasales humaines. (B) En présence de sEVs, le TMPRSS2 vésiculaire est capable d'induire le clivage de spike au site S1/S2 permettant un changement de conformation de la protéine S suivi d'une entrée du virus dans les cellules cibles. (C) Le virus pré-activé par la protéase TMPRSS2 cellulaire (A) ou par TMPRSS2 vésiculaire (B), permet une augmentation de l'infectivité du virus.

Ces résultats contrastent avec l'étude récente de Kim et collaborateurs, qui ont suggéré un effet antiviral des sEVs sécrétées par des cellules HEK-293T, transfectées pour exprimer ACE2 (Kim et al., 2022). De manière similaire, l'étude de Coccozza et collaborateurs utilisant un modèle de cellules HEK-293FT transfectées pour exprimer ACE2 et TMPRSS2, montre un effet antiviral des sEVs produites (Coccozza et al., 2020). De manière intéressante, l'étude de Tey et collaborateurs a montré que les sEVs enrichies en ACE2 pourraient accroître l'infectivité du SARS-CoV-2 de manière beaucoup plus efficace que les virus seuls. Ces données concordent avec l'hypothèse du mécanisme de la modulation de la permissivité cellulaire. Les sEVs comprenant ACE2 représenteraient un « cheval de Troie » permettant au virus de pénétrer dans les cellules hôtes (Tey et al., 2022).

Ainsi nos résultats démontrent les limites d'utilisation de lignées cellulaires productrices de sEVs, immortalisées et transfectées pour exprimer des facteurs de l'hôte.

En effet, les sEVs sécrétées par un type cellulaire/tissulaire particulier peuvent présenter un tropisme spécifique. Par exemple, les sEVs issues d'oligodendrocytes précurseurs et matures

sont internalisées par la microglie, mais pas par les neurones, ni les astrocytes ou les autres oligodendrocytes (Fitzner et al., 2011). De plus, l'adressage des sEVs peut être dépendant de la présence de protéines de la matrice extracellulaire enveloppant les sEVs lors de leur sécrétion (van Niel et al., 2022).

L'existence d'une affinité spécifique entre sEVs et types cellulaires souligne la nécessité d'utiliser des modèles pertinents dans l'étude du rôle de sEVs lors d'infections virales. En particulier, l'utilisation de sEVs produites par des lignées immortalisées transfectées ne permet pas d'adresser les propriétés spécifiques des sEVs présentes dans les voies respiratoires supérieures, et pourrait conduire à l'observation d'effets ne correspondant pas à des mécanismes physiologiques. Ces modèles (HEK-293T et HEK-293FT) semblent donc peu pertinents, tant au niveau du type cellulaire ne reflétant pas le site de primo-infection du SARS-CoV-2 qu'à celui de la nature des sEVs produites qui pourraient présenter une affinité altérée selon les types cellulaires ciblés.

Dans ce contexte, l'utilisation par notre laboratoire d'un modèle de CENHs de patients humains apparaît plus pertinente. En effet, les mu-sEVs issues de ce modèle proviennent de types cellulaires qui sont les premiers en contact avec le SARS-CoV-2 dans les événements d'infection, et partagent une même composition membranaire (protéique et lipidique) que les cellules constituant ce site de primo-infection.

La capacité des sEVs issues de CENHs à être internalisées par différents types cellulaires de l'organisme sera néanmoins cruciale dans la détermination de leur rôle sur (i) les mécanismes d'infection à distance, (ii) voire sur la pathologie associée à l'infection.

Nos résultats constituent donc la preuve de concept que les sEVs naturellement produites par des cellules épithéliales nasales humaines non-infectées pourraient jouer un rôle important dans le cycle de vie du SARS-CoV-2 et potentiellement pour d'autres coronavirus ou d'autres virus respiratoires.

En effet, au regard de l'ensemble de ces résultats, la question s'est posée quant au rôle des sEVs issues de CENHs pour d'autres coronavirus. Des études préliminaires ont montré que les mu-sEVs seraient capables de cliver la protéine Spike du HCoV-OC43 au niveau de la région charnière S1/S2, participant potentiellement au « priming » extracellulaire de cette protéine. Le rôle des mu-sEVs dans l'infection par d'autres coronavirus / virus respiratoires est en développement au laboratoire.

Rôle(s) potentiel(s) des sEVs dans la permissivité des cellules ciblées par SARS-CoV-2 et dans la pathogénicité viro-induite.

Les sEVs produites par des cellules épithéliales nasales humaines non-infectées ou au cours de l'infection pourraient rejoindre des tissus éloignés *via* le sang, la lymphe ou le système nerveux. En effet, les sEVs, actrices essentielles de la communication intercellulaires, sont présentes dans de nombreux fluides et liquides biologiques (Ibrahim and Marbán, 2016) et sont capables d'être internalisées au niveau de cellules avoisinantes ou à distance (Thakur et al., 2014; van Niel et al., 2022; Zhang and Yu, 2019). Ainsi, les sEVs sécrétées par l'épithélium respiratoire nasal au pôle apical et/ou basolatéral, pourraient libérer leur contenu, dont ACE2 et TMPRSS2, dans des types cellulaires particuliers de l'épithélium respiratoire ou d'autres organes, rendant ces cellules permissives à l'infection par le SARS-CoV-2. Cette hypothèse pourrait expliquer le caractère systémique de l'infection par SARS-CoV-2, et notamment l'infection de types cellulaires n'exprimant pas ACE2 et/ou TMPRSS2 (figure 27).

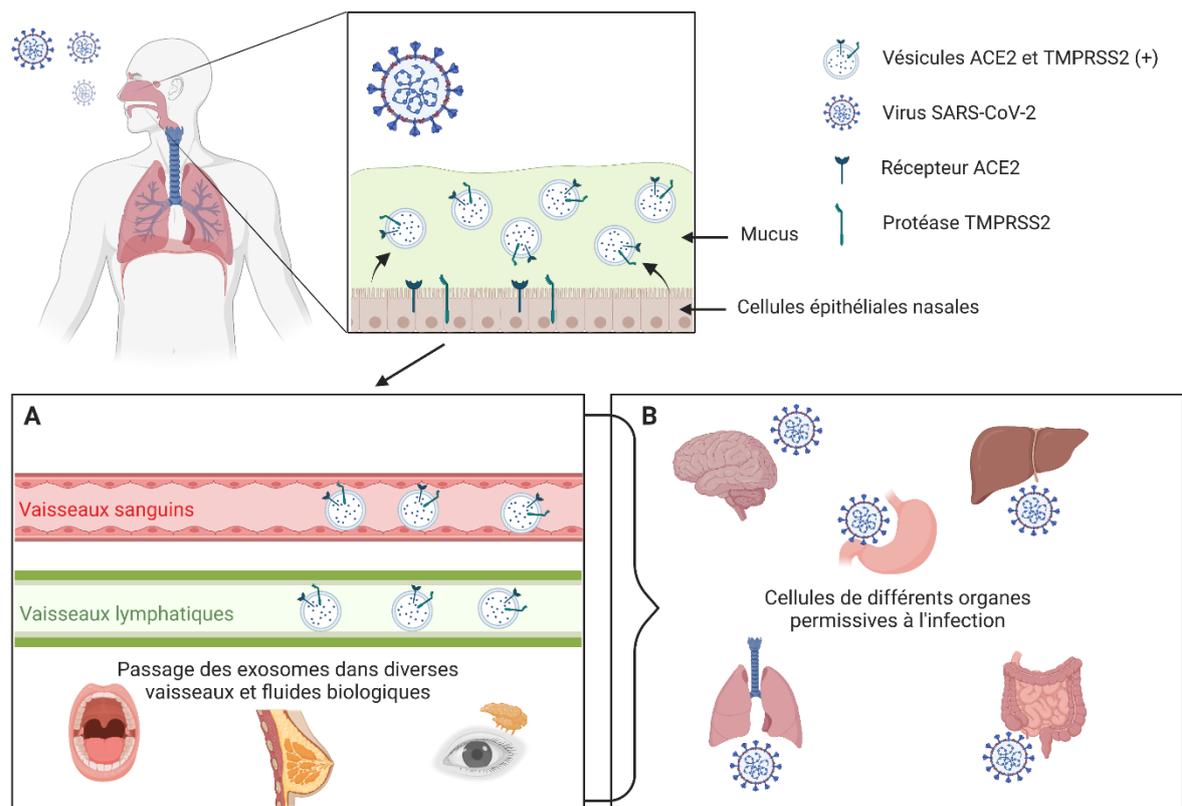


Figure 26 : Mécanisme schématique de la modulation de la permissivité cellulaire par les sEVs portant ACE2 et TMPRSS2. (A) Les sEVs portant ACE2 et TMPRSS2 peuvent être transportées *via* différents fluides biologiques, notamment le sang et la lymphe. (B) les sEVs peuvent ainsi délivrer leur matériel dans les cellules de différents organes les rendant permissives à l'infection par le SARS-CoV-2.

Il est également important de considérer l'hypothèse selon laquelle la composition en facteurs cellulaires et/ou viraux des sEVs pourrait être modifiée au cours d'infections virales. Les conséquences peuvent être de moduler : (i) la susceptibilité de cellules réceptrices pour l'infection (Mack et al., 2000, Rozmyslowicz et al., 2003) ou (ii) la réponse immunitaire en faveur du pathogène ou de l'hôte (Li et al., 2013, Schorey et al., 2015).

Ainsi, l'utilisation du modèle CENHs en interface air-liquide pourrait permettre la purification de mu-sEVs produites au cours de l'infection, au pôle apical et basolatéral, leur caractérisation en terme de composition (« NGS », spectrométrie de masse), de concentration, de diamètre, de morphologie et leur potentiel rôle au niveau de l'infection virale ou de la dérégulation de la réponse immunitaire (production accrue de cytokines pro-inflammatoires (orage cytokinique) (Biyang Hu et al., 2021)). Dans ce contexte, l'exploration de la composition et du rôle de sEVs produites par l'épithélium respiratoire alvéolaire (pulmonaire) est également en cours au laboratoire.

Dans une seconde partie de ma thèse, le repositionnement thérapeutique de molécules « FDA-approved » dans le cadre de la lutte contre la pandémie de SARS-CoV-2 a été évalué. Les résultats produits ont permis la soumission d'un article publié dans *Scientific Reports*.

Modèles cellulaires

Le choix de la lignée cellulaire utilisée dans le cadre de criblages d'antiviraux, mais aussi pour la production de stock de virus entier, est de première importance. En effet, pour le criblage des molécules anti-SARS-CoV-2 « FDA-approved », nous avons d'abord utilisé la lignée cellulaire VERO-E6, n'exprimant pas la protéase cellulaire TMPRSS2. De plus, le virus utilisé pour notre étude a lui aussi été d'abord produit en VERO-E6 (virus M80) et a donc perdu le site de clivage à la furine.

Ainsi, les criblages que nous avons réalisés ont permis d'identifier des antiviraux affectant particulièrement l'étape d'entrée du SARS-CoV-2 par la voie endosomale.

Par la suite, les cellules Calu-3 –décrites comme un bon modèle d'étude et d'amplification de virus SARS-CoV-2 entier (Chu et al., 2020)- et les modèles de culture en interface air-liquide (CENHs) ou d'organoïdes ont été implémentés au laboratoire. Ces systèmes sont prometteurs pour l'évaluation d'antiviraux mais présentent des limites, dont la durée de différenciation, un risque supérieur de contaminations, une quantité variable de matériel et enfin une certaine hétérogénéité inter-patients. Ceci pourrait être résolu en utilisant un système reconstitué

d'épithélium nasal humain provenant de 14 donneurs différents (Epithelix MucilAir™). Ce système a été utilisé dans l'article publié et les résultats ont été très concluants.

Inhibition de l'entrée du virus par la DSD

Il a été montré que le SARS-CoV-2 pouvait rentrer par deux voies différentes dans les cellules : la voie de fusion à la membrane dite « early pathway » et la voie endosomale dite « late pathway ». Les clivages protéolytiques de Spike sont essentiels pour l'entrée virale et sont réalisés par différentes protéases cellulaires (Hoffmann et al., 2020; Ou et al., 2020; Shang et al., 2020). Pour la voie de fusion à la membrane plasmique, il a été montré que TMPRSS2, une sérine protéase, était essentielle, alors que pour la voie endosomale, les protéases à cystéines (cathepsine endosomale L) sont impliquées (M.-M. Zhao et al., 2021).

Des molécules bloquant spécifiquement ces voies d'entrée sont connues dans la littérature. En premier lieu, on trouve le camostat mésylate (utilisé comme contrôle dans nos expériences), inhibiteur puissant des sérines protéases, donc de la voie de fusion à la membrane plasmique (Breining et al., 2021). Cette molécule est utilisée dans le traitement de certains cancers et infections virales au Japon et en Corée du Sud.

Ensuite, l'E64D (aloxistatine), inhibiteur des cystéines protéases, qui inhibe la voie endosomale et possède une activité anti-SARS-CoV-2 (Yousefi et al., 2021). En outre, on peut noter qu'un effet synergique de l'association de ces deux molécules (camostat et E64D), entraîne un blocage complet de l'infection (Padmanabhan et al., 2020; Wang et al., 2020).

Nos résultats suggèrent que la desloratadine (DSD) bloquerait la voie endosomale, puisque celle-ci n'a pas d'effet dans les cellules Calu-3 qui sont TMPRSS2 (+). Dans le modèle CENHs, la DSD présente un effet modeste contre le SARS-CoV-2 en comparaison au camostat mésylate (5-10 fois d'inhibition avec la DSD à 5 µM et plus de 100 fois avec le camostat mésylate à 10 µM). Ces résultats suggèrent la présence des deux voies d'entrée du virus au sein de l'épithélium nasal, avec une préférence pour la voie de fusion à la membrane (TMPRSS2 dépendante). En conclusion, le SARS-CoV-2 (variant ancestral) utilise préférentiellement la voie d'entrée par fusion à la membrane plasmique, ce qui expliquerait l'effet modeste de la desloratadine dans ce type cellulaire. Il serait donc intéressant de combiner la DSD, inhibitrice de la voie endosomale, avec le camostat mésylate dans les CENHs. Cette association pourrait induire un effet synergique et semble pertinente pour bloquer complètement l'entrée du SARS-CoV-2 au site de primo-infection.

De manière intéressante, l'apparition du variant Omicron a suggéré de nombreuses hypothèses quant à son infectivité. Aujourd'hui encore, il n'existe pas de données concrètes à ce sujet. Cependant, trois articles actuellement sur Biorxiv et en révision ont montré des résultats

cohérents. Les principales conclusions de Meng et collaborateurs (utilisant des pseudovirus) sont que le variant Omicron se réplique de manière moins efficace dans les organoïdes pulmonaires et les cellules épithéliales pulmonaires par rapport au variant Delta ou à la souche ancestrale (Meng et al., 2022). En outre, deux autres équipes ont montré un nombre de copies virales significativement plus faible après une infection par Omicron dans les cellules pulmonaires par rapport aux variants Delta et Wuhan (Peacock et al., 2022; Willett et al., 2022). Enfin, les trois études suggèrent qu'Omicron possède une capacité réduite à former des syncytia, résultant d'une diminution de l'entrée du variant par la voie de fusion à la membrane en favorisant l'entrée endosomale. Au vu de nos résultats sur la voie d'entrée ciblée par la DSD, il serait intéressant de tester cet antihistaminique sur le variant Omicron.

Repositionnement des CADs

Les virus, comme les parasites intracellulaires, exploitent les composants cellulaires pour permettre l'entrée virale, la réplication du génome et l'assemblage/relargage des particules virales hors de la cellule. Ainsi, des molécules antivirales ciblant les fonctions de l'hôte essentielles pour l'infection par de multiples virus en l'absence de toxicité sont des candidats intéressants pour le développement de stratégies thérapeutiques antivirales à large spectre. En particulier, l'identification de molécules déjà commercialisées, approuvées pour leur utilisation chez l'humain et actives contre plusieurs virus, pourrait accélérer la mise en place d'essais cliniques dans le cas d'émergences virales dues à des virus hautement pathogènes (Bekerman and Einav, 2015).

L'hypothèse de départ selon laquelle les traitements donnés aux patients en service psychiatrique pourraient protéger de l'infection par le SARS-CoV-2 nous a poussé à évaluer l'effet de molécules « FDA-approved », comprenant un groupement cationique amphiphile responsable de la perturbation de la voie endosomale. Ces CADs s'accumulent dans les endosomes/lysosomes et se retrouvent piégés à l'intérieur (de Duve et al., 1974; Marceau et al., 2012; Tummino et al., 2021), ce qui entraîne une augmentation du volume lysosomal et une altération de diverses voies biologiques (Salata et al., 2017). Dans la littérature et en médecine, de nombreux CADs sont utilisés pour traiter une grande variété de maladies humaines, et leur repositionnement thérapeutique dans le cadre de l'émergence du SARS-CoV-2 peut être très rapide (Blaess et al., 2021; Norinder and Munic Kos, 2019).

Le repositionnement de la desloratadine dans le cas de l'infection par SARS-CoV-2 est prometteur *in vitro*. De plus, cet antihistaminique présente plusieurs avantages : être très bien toléré dans la population avec de légers effets secondaires en fonction des personnes traitées et

une faible toxicité cellulaire (Devillier et al., 2008; Nakamura et al., 2019). Récemment, un autre antihistaminique a aussi montré des effets anti-SARS-CoV-2 robustes *in vitro* : l’Azélastine qui présente une forte affinité pour le récepteur ACE-2 et empêche le SARS-CoV-2 de pénétrer dans des cellules HEK-293T-ACE2 (Ge et al., 2021a). Bien que l’Azélastine ne soit pas définie comme telle, Villoutreix et al. ont montré que cet antihistaminique appartient à la famille des CADs (Villoutreix et al., 2021). Cependant, son mécanisme d’action n’est pas de perturber la voie endosomale comme il est montré pour la desloratadine dans notre étude. En outre, d’autres études ont révélé que la doxépine et la desloratadine inhibent l’entrée de SARS-CoV-2 en se liant à ACE2 (Ge et al., 2021b; Hou et al., 2021). Bien que ces résultats soient prometteurs, nos résultats diffèrent du fait de l’approche de criblage utilisé.

La desloratadine, modulatrice de l’inflammation dans les CENH ?

En tant qu’antihistaminique, la DSD possède de nombreuses propriétés anti-inflammatoires (Agrawal, 2004). Comme dit précédemment, l’infection par le SARS-CoV-2 peut devenir extrêmement dangereuse, notamment pour les personnes immunodéprimées et âgées, et peut engendrer un orage cytokinique pouvant amener le patient en soins intensifs. Il serait donc intéressant de voir si la DSD est capable de bloquer la production de cytokines pro-inflammatoires en analysant le milieu basal produit par des CENHs au cours de l’infection, et traitées ou non-traitées avec la DSD. L’ensemble de ces données fait de la DSD un composé attractif pour le repositionnement de médicament dans le cadre de cette pandémie.

La desloratadine en spray nasal ?

La DSD est un antihistaminique de seconde génération utilisé sous la forme de comprimés. L’Azélastine, quant à elle, existe sous forme de spray nasal (Ge et al., 2021a). Au regard des données actuelles sur le site initial de l’infection par le SARS-CoV-2, à savoir, la cavité nasale, il serait intéressant de tester un spray nasal de DSD *in vivo* sur des souris. L’aspect localisé du médicament pourrait être un point positif pour les patients ne souffrant pas d’allergies spécifiques et qui n’ont pas besoin d’anti histaminique de façon quotidienne.

Annexes

A) Repositionnement de l'Alisporivir dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2

Au début de la pandémie de SARS-CoV-2, le laboratoire a mobilisé ses efforts sur le repositionnement thérapeutique de l'Alisporivir (ALV).

Initialement, l'ALV est un médicament utilisé dans le traitement des hépatites C. Connu aussi en tant qu'inhibiteur des cyclophilines, cette molécule a montré un effet antiviral *in vitro* contre différents coronavirus : le SARS-CoV, le MERS-CoV et le HCoV-229E. L'ALV est arrivé en phase III d'essai clinique mais a été stoppé en raison de 5 cas de pancréatites dont une mortelle, survenues au cours de son association à l'interféron et la ribavirine.

L'étude de repositionnement de cette molécule a débuté par un criblage en concentrations croissantes d'ALV en cellules VERO-E6 infectées par la souche ancestrale du SARS-CoV-2, isolée d'un patient à l'hôpital Henri Mondor à Créteil. La chloroquine (CQ) a été utilisée en contrôle positif et la production d'ARN viral déterminée par RT-qPCR. Les résultats ont permis de mettre en évidence une activité antivirale dose-dépendante *in vitro* et de calculer des EC₅₀, correspondant à la concentration à partir de laquelle nous obtenons 50% d'inhibition de l'infection. De plus, nous avons montré que l'ALV n'est pas toxique à des concentrations inférieures à 20 µM, au même titre que la chloroquine. Ces données nous ont permis de calculer un index thérapeutique >43 pour l'ALV et >57 pour la CQ.

Afin de valider ces observations, des expériences d'immunofluorescence en présence de concentrations croissantes d'ALV ont été réalisées. L'ARN viral a été marqué à l'aide d'un anticorps anti double-brin. Les données obtenues ont permis de mettre en évidence un effet antiviral significatif avec une inhibition de 50% de la production d'ARN à 1 µM et de 100% à 10 µM d'ALV.

Enfin, pour déterminer l'étape du cycle viral ciblé par l'ALV, une expérience de temps d'ajout a été réalisée avec la chloroquine comme contrôle de l'inhibition de la voie endosomale. Alors que la chloroquine perd son activité antivirale après 3H post-infection, l'ALV conserve son activité jusqu'à 6H post-infection. Nous en avons conclu que l'ALV cible une étape post-entrée du cycle de vie de SARS-CoV-2. Ces données ont été confirmées par un test d'entrée.

L'ensemble de ces résultats a permis d'initier un essai clinique de Phase II à l'hôpital Henri Mondor.



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

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

^aResearch Team "Viruses, Hepatology, Cancer," Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, Créteil, France

^bDepartment of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

ABSTRACT Cyclophilins play a key role in the life cycle of coronaviruses. Alisporivir (Debio 025) is a nonimmunosuppressive analogue of cyclosporine with potent cyclophilin inhibition properties. Alisporivir reduced SARS-CoV-2 RNA production in a dose-dependent manner in Vero E6 cells, with a 50% effective concentration (EC₅₀) of 0.46 ± 0.04 μM. Alisporivir inhibited a postentry step of the SARS-CoV-2 life cycle. These results justify rapidly conducting a proof-of-concept phase 2 trial with alisporivir in patients with SARS-CoV-2 infection.

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

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

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

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

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

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

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

Address correspondence to Jean-Michel Pawlotsky, jean-michel.pawlotsky@aphp.fr.

Received 3 May 2020

Accepted 4 May 2020

Accepted manuscript posted online 6 May 2020

Published 23 June 2020

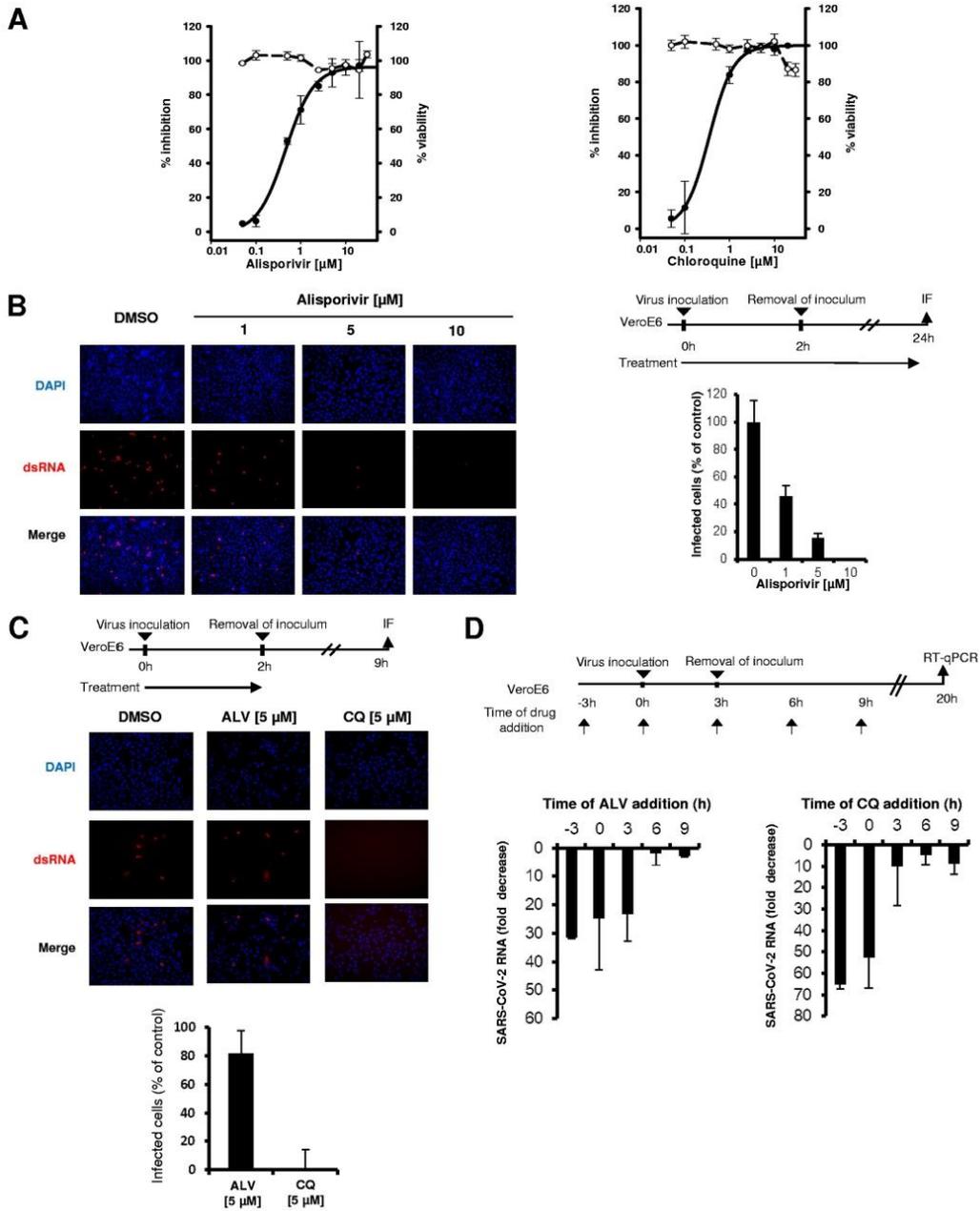


FIG 1 Antiviral activity of alisporivir against SARS-CoV-2. The means \pm standard deviations from 2 experiments performed in triplicate are shown. (A) Vero E6 cells were infected for 2 h with a SARS-CoV-2 clinical isolate at an MOI of 0.02 in the presence of increasing concentrations of alisporivir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

replication of HCoV-229E, HCoV-NL63, MHV, SARS-CoV, and MERS-CoV at low-micromolar concentrations without cytotoxic effect (1, 10, 11).

The goal of this study was to assess the antiviral properties of alisporivir against SARS-CoV-2, with the objective of generating the preclinical proof of concept of antiviral effectiveness required to start a clinical trial in patients with COVID-19.

The antiviral effectiveness of increasing concentrations of alisporivir was measured in Vero E6 cells infected with a clinical isolate of SARS-CoV-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.02 (Fig. 1A). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a negative control, while chloroquine was used as a positive control of antiviral inhibition. The compounds were added at the beginning of infection, and viral RNA was extracted from supernatants at 48 h postinfection and quantified by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). Alisporivir reduced SARS-CoV-2 RNA production in a dose-dependent manner: the 50% effective concentration (EC_{50}) was $0.46 \pm 0.04 \mu\text{M}$, and the EC_{90} was $3.10 \pm 1.40 \mu\text{M}$. The maximum viral RNA reduction was $2 \log_{10}$ at $5 \mu\text{M}$. For comparison, the EC_{50} of chloroquine was $0.35 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (Fig. 1A). Neither alisporivir nor chloroquine was cytotoxic at the effective concentration, with 50% cytotoxic concentrations (CC_{50} s) of $>20 \mu\text{M}$ and therapeutic indexes of >43 and >57 , respectively.

We confirmed the anti-SARS-CoV-2 effectiveness of alisporivir by immunofluorescence. Vero E6 cells were infected at an MOI of 0.4 for 2 h in the presence of increasing concentrations of alisporivir. After virus removal, infected cells were incubated for 24 h in the presence of alisporivir and immunostained with an anti-double-stranded-RNA (dsRNA) antibody. Alisporivir reduced the number of SARS-CoV-2-infected cells in a dose-dependent manner, and complete inhibition was attained at $10 \mu\text{M}$ (Fig. 1B). Chloroquine also inhibited SARS-CoV-2 in this assay (data not shown).

The next experiment was aimed at identifying the step of the SARS-CoV-2 life cycle targeted by alisporivir. Chloroquine, which inhibits endosome-mediated viral entry, was used as a control. Vero E6 cells were infected at an MOI of 0.4 for 2 h in the presence of $5 \mu\text{M}$ alisporivir or chloroquine. After virus removal, cells were incubated for 7 h in the absence of the compounds, fixed, and immunostained with the anti-dsRNA antibody. No infected cells were detected in the presence of $5 \mu\text{M}$ chloroquine, confirming that chloroquine prevents SARS-CoV-2 entry into Vero E6 cells. In contrast, alisporivir did not inhibit SARS-CoV-2 entry into Vero E6 cells (Fig. 1C). This result was confirmed by a time-of-addition experiment showing that, in contrast to that of chloroquine, the effect of alisporivir was preserved when the compound was added 3 h postinfection. The antiviral effect of alisporivir was abolished when the compound was added 6 h postinfection (Fig. 1D). These results suggest that alisporivir inhibits a postentry step of the SARS-CoV-2 life cycle.

Taken together, our results demonstrate that the nonimmunosuppressive macrocyclic cyclophilin inhibitor alisporivir (Debio 025) exhibits strong, dose-dependent antiviral properties against SARS-CoV-2 *in vitro*. Alisporivir inhibits a postentry step of the SARS-CoV-2 life cycle through mechanisms that remain to be unraveled. These results justify rapidly conducting a proof-of-concept phase 2 trial to assess the antiviral properties and the effect of alisporivir on COVID-19 clinical outcomes in infected patients.

Alisporivir has been shown to be well tolerated when administered as a monotherapy (12). Preclinical pharmacology data indicate that, after oral administration, alisporivir is widely distributed in the whole body, including the lungs, and that its EC_{90} against SARS-CoV-2 in Vero E6 cells is clinically achievable in patients. In addition, because alisporivir inhibits all cellular cyclophilins, it also blocks mitochondrial cyclo-

FIG 1 Legend (Continued)

antibodies in the presence of increasing concentrations of alisporivir. Infected cells were quantified using ImageJ software. (C) Effect of $5 \mu\text{M}$ alisporivir and $5 \mu\text{M}$ chloroquine on SARS-CoV-2 entry into Vero E6 cells, assessed by immunofluorescence using anti-dsRNA antibodies. (D) Time-of-addition experiments with alisporivir and chloroquine. Vero E6 cells were infected with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.05 for 3 h; $10 \mu\text{M}$ alisporivir or $10 \mu\text{M}$ chloroquine was added at different time points and maintained until 20 h postinfection. SARS-CoV-2 RNA was quantified in cell supernatants by RT-qPCR. ALV, alisporivir; CQ, chloroquine.

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

Alisporivir was kindly provided by Debiopharm, Lausanne, Switzerland.

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

REFERENCES

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

Références bibliographiques

- Abdool Karim, S.S., de Oliveira, T., 2021. New SARS-CoV-2 Variants - Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. *N Engl J Med* 384, 1866–1868. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2100362>
- Abdulrahman, B., Mady, Ahmed, Odat, M.A., Tayar, A.A., Rana, M.A., Alharthy, A., Alhazmi, A., Abdelmoaty, A.S., Hafeez, M.M., Kuhail, A., Noor, A.M., Haddad, M., Mady, Anas, Ali, N., Mhawish, H., Aletreby, W., 2022. Favipiravir Efficacy And Safety For The Treatment Of Severe Coronavirus Disease 2019: A Retrospective Study. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 34, 397–402. <https://doi.org/10.55519/JAMC-03-10305>
- Abedi, G.R., Prill, M.M., Langley, G.E., Wikswow, M.E., Weinberg, G.A., Curns, A.T., Schneider, E., 2016. Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998-2010. *J Pediatric Infect Dis Soc* 5, 7–13. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu047>
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 179, 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Agrawal, D.K., 2004. Anti-inflammatory properties of desloratadine. *Clin Exp Allergy* 34, 1342–1348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02026.x>
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., Chen, C.C., 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Akpovwa, H., 2016. 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* 34, 191–196. <https://doi.org/10.1002/cbf.3182>
- Ali, S.A., Huang, M.-B., Campbell, P.E., Roth, W.W., Campbell, T., Khan, M., Newman, G., Villinger, F., Powell, M.D., Bond, V.C., 2010. Genetic characterization of HIV type 1 Nef-induced vesicle secretion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26, 173–192. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0068>
- Alsaadi, E.A.J., Neuman, B.W., Jones, I.M., 2020. Identification of a Membrane Binding Peptide in the Envelope Protein of MHV Coronavirus. *Viruses* 12, E1054. <https://doi.org/10.3390/v12091054>
- Anderson, N., Borlak, J., 2006. Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Lett* 580, 5533–5540. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.061>
- Andréoletti, L., Renois, F., Jacques, J., Lévêque, N., 2009. [Human enteroviruses and respiratory infections]. *Med Sci (Paris)* 25, 921–930. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092511921>
- Andrews, M.G., Mukhtar, T., Eze, U.C., Simoneau, C.R., Ross, J., Parikshak, N., Wang, S., Zhou, L., Koontz, M., Velmeshev, D., Siebert, C.-V., Gemenes, K.M., Tabata, T., Perez, Y., Wang, L., Mostajo-Radji, M.A., de Majo, M., Donohue, K.C., Shin, D., Salma, J., Pollen, A.A., Nowakowski, T.J., Ullian, E., Kumar, G.R., Winkler, E.A., Crouch, E.E., Ott, M., Kriegstein, A.R., 2022. Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2122236119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122236119>
- Arenaccio, C., Anticoli, S., Manfredi, F., Chiozzini, C., Olivetta, E., Federico, M., 2015. Latent HIV-1 is activated by exosomes from cells infected with either replication-competent or defective HIV-1. *Retrovirology* 12, 87. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0216-y>
- Ariza, M.E., Rivailler, P., Glaser, R., Chen, M., Williams, M.V., 2013. Epstein-Barr virus encoded dUTPase containing exosomes modulate innate and adaptive immune responses in human dendritic cells and peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 8, e69827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069827>
- Askarian, F., Firoozi, Z., Ebadollahi-Natanzi, A., Bahrami, S., Rahimi, H.-R., 2022. A review on the pharmacokinetic properties and toxicity considerations for chloroquine and

- hydroxychloroquine to potentially treat coronavirus patients. *Toxicol Res* 38, 137–148. <https://doi.org/10.1007/s43188-021-00101-5>
- Avota, E., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., 2011. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog* 7, e1001290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001290>
- Baden, L.R., El Sahly, H.M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S.A., Roupheal, N., Creech, C.B., McGettigan, J., Khetan, S., Segall, N., Solis, J., Brosz, A., Fierro, C., Schwartz, H., Neuzil, K., Corey, L., Gilbert, P., Janes, H., Follmann, D., Marovich, M., Mascola, J., Polakowski, L., Ledgerwood, J., Graham, B.S., Bennett, H., Pajon, R., Knightly, C., Leav, B., Deng, W., Zhou, H., Han, S., Ivarsson, M., Miller, J., Zaks, T., COVE Study Group, 2021. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 384, 403–416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., David, G., 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14, 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A.A., Bhattacharjee, A.K., Padmanabhan, R., 2017. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Res* 137, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.015>
- Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L., Martini, M., 2017. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg* 58, E9–E12.
- Baritussio, A., Marzini, S., Agostini, M., Alberti, A., Cimenti, C., Bruttomesso, D., Manzato, E., Quaglino, D., Pettenazzo, A., 2001. Amiodarone inhibits lung degradation of SP-A and perturbs the distribution of lysosomal enzymes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1189–L1199. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.5.L1189>
- Barrett, J.R., Belij-Rammerstorfer, S., Dold, C., Ewer, K.J., Folegatti, P.M., Gilbride, C., Halkerston, R., Hill, J., Jenkin, D., Stockdale, L., Verheul, M.K., Aley, P.K., Angus, B., Bellamy, D., Berrie, E., Bibi, S., Bittaye, M., Carroll, M.W., Cavell, B., Clutterbuck, E.A., Edwards, N., Flaxman, A., Fuskova, M., Gorringer, A., Hallis, B., Kerridge, S., Lawrie, A.M., Linder, A., Liu, X., Madhavan, M., Makinson, R., Mellors, J., Minassian, A., Moore, M., Mujadidi, Y., Plested, E., Poulton, I., Ramasamy, M.N., Robinson, H., Rollier, C.S., Song, R., Snape, M.D., Tarrant, R., Taylor, S., Thomas, K.M., Voysey, M., Watson, M.E.E., Wright, D., Douglas, A.D., Green, C.M., Hill, A.V.S., Lambe, T., Gilbert, S., Pollard, A.J., Oxford COVID Vaccine Trial Group, 2021. Author Correction: Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. *Nat Med* 27, 1113. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01372-z>
- Bayer, A., Lennemann, N.J., Ouyang, Y., Sadovsky, E., Sheridan, M.A., Roberts, R.M., Coyne, C.B., Sadovsky, Y., 2018. Chromosome 19 microRNAs exert antiviral activity independent from type III interferon signaling. *Placenta* 61, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.11.004>
- Beigel, J.H., Tomashek, K.M., Dodd, L.E., Mehta, A.K., Zingman, B.S., Kalil, A.C., Hohmann, E., Chu, H.Y., Luetkemeyer, A., Kline, S., Lopez de Castilla, D., Finberg, R.W., Dierberg, K., Tapon, V., Hsieh, L., Patterson, T.F., Paredes, R., Sweeney, D.A., Short, W.R., Touloumi, G., Lye, D.C., Ohmagari, N., Oh, M.-D., Ruiz-Palacios, G.M., Benfield, T., Fätkenheuer, G., Kortepeter, M.G., Atmar, R.L., Creech, C.B., Lundgren, J., Babiker, A.G., Pett, S., Neaton, J.D., Burgess, T.H., Bonnett, T., Green, M., Makowski, M., Osinusi, A., Nayak, S., Lane, H.C., ACTT-1 Study Group Members, 2020. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med* 383, 1813–1826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>
- Bekerman, E., Einav, S., 2015. Infectious disease. Combating emerging viral threats. *Science* 348, 282–283. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3778>

- Belouzard, S., Chu, V.C., Whittaker, G.R., 2009. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5871–5876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106>
- Belouzard, S., Madu, I., Whittaker, G.R., 2010. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *J Biol Chem* 285, 22758–22763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103275>
- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
- Benton, D.J., Wrobel, A.G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S.R., Rosenthal, P.B., Skehel, J.J., Gamblin, S.J., 2020. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature* 588, 327–330. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2772-0>
- Benvenuto, D., Angeletti, S., Giovanetti, M., Bianchi, M., Pascarella, S., Cauda, R., Ciccozzi, M., Cassone, A., 2020. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *J Infect* 81, e24–e27. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.058>
- Bequignon, E., Dhommée, C., Angely, C., Thomas, L., Bottier, M., Escudier, E., Isabey, D., Coste, A., Louis, B., Papon, J.-F., Gouilleux-Gruart, V., 2019. FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal Antibody in Human Nasal Epithelial Cells In Vitro: A Prerequisite for a New Delivery Route for Therapy? *Int J Mol Sci* 20, E1379. <https://doi.org/10.3390/ijms20061379>
- Berckmans, R.J., Sturk, A., van Tienen, L.M., Schaap, M.C.L., Nieuwland, R., 2011. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* 117, 3172–3180. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290460>
- Bestle, D., Heindl, M.R., Limburg, H., Van Lam van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D.A., Hards, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H.-D., Garten, W., Steinmetzer, T., Böttcher-Friebertshäuser, E., 2020. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance* 3, e202000786. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000786>
- Bhattacharyya, S., Warfield, K.L., Ruthel, G., Bavari, S., Aman, M.J., Hope, T.J., 2010. Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology* 401, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.015>
- Bieniasz, P.D., 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.044>
- Bigler, L., Spirli, C., Fiorotto, R., Pettenazzo, A., Duner, E., Baritussio, A., Follath, F., Ha, H.R., 2007. Synthesis and cytotoxicity properties of amiodarone analogues. *Eur J Med Chem* 42, 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.12.031>
- Biró, E., Sturk-Maquelin, K.N., Vogel, G.M.T., Meuleman, D.G., Smit, M.J., Hack, C.E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2003. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 1, 2561–2568. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00456.x>
- Blaess, M., Kaiser, L., Sauer, M., Csuk, R., Deigner, H.-P., 2020. COVID-19/SARS-CoV-2 Infection: Lysosomes and Lysosomotropism Implicate New Treatment Strategies and Personal Risks. *Int J Mol Sci* 21, E4953. <https://doi.org/10.3390/ijms21144953>
- Blaess, M., Kaiser, L., Sommerfeld, O., Csuk, R., Deigner, H.-P., 2021. Drugs, Metabolites, and Lung Accumulating Small Lysosomotropic Molecules: Multiple Targeting Impedes SARS-CoV-2 Infection and Progress to COVID-19. *IJMS* 22, 1797. <https://doi.org/10.3390/ijms22041797>
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouillé, Y., 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964–6972. <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-06>
- Bobossi Serengbe, G., Gody, J.-C., Fioboy, R., Nakoune, E., 2015. Étiologie virale des infections respiratoires aiguës de l'enfant à Bangui. *Arch Pediatr* 22, 324–325. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2014.11.005>

- Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E.J., Canard, B., Decroly, E., 2010. In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog* 6, e1000863. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000863>
- Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., Decroly, E., 2012. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9372–9377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201130109>
- Bower, W.H., 1954. Chlorpromazine in psychiatric illness. *N Engl J Med* 251, 689–692. <https://doi.org/10.1056/NEJM195410212511703>
- Breining, P., Frølund, A.L., Højen, J.F., Gunst, J.D., Staerke, N.B., Saedder, E., Cases-Thomas, M., Little, P., Nielsen, L.P., Søgaard, O.S., Kjolby, M., 2021. Camostat mesylate against SARS-CoV-2 and COVID-19-Rationale, dosing and safety. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 128, 204–212. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13533>
- Brouwers, J., Vermeire, K., Schols, D., Augustijns, P., 2008. Development and in vitro evaluation of chloroquine gels as microbicides against HIV-1 infection. *Virology* 378, 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.005>
- Brown, C.M., Vostok, J., Johnson, H., Burns, M., Gharpure, R., Sami, S., Sabo, R.T., Hall, N., Foreman, A., Schubert, P.L., Gallagher, G.R., Fink, T., Madoff, L.C., Gabriel, S.B., MacInnis, B., Park, D.J., Siddle, K.J., Harik, V., Arvidson, D., Brock-Fisher, T., Dunn, M., Kearns, A., Laney, A.S., 2021. Outbreak of SARS-CoV-2 Infections, Including COVID-19 Vaccine Breakthrough Infections, Associated with Large Public Gatherings - Barnstable County, Massachusetts, July 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70, 1059–1062. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7031e2>
- Bruce, E.A., Digard, P., Stuart, A.D., 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol* 84, 5848–5859. <https://doi.org/10.1128/JVI.00307-10>
- Bukong, T.N., Momen-Heravi, F., Kodys, K., Bala, S., Szabo, G., 2014. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog* 10, e1004424. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004424>
- Burkard, C., Verheije, M.H., Wicht, O., van Kasteren, S.I., van Kuppeveld, F.J., Haagmans, B.L., Pelkmans, L., Rottier, P.J.M., Bosch, B.J., de Haan, C.A.M., 2014. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog* 10, e1004502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- Burki, T., 2021. Understanding variants of SARS-CoV-2. *Lancet* 397, 462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00298-1)
- Caccuri, F., Bugatti, A., Zani, A., De Palma, A., Di Silvestre, D., Manocha, E., Filippini, F., Messali, S., Chioldelli, P., Campisi, G., Fiorentini, S., Facchetti, F., Mauri, P., Caruso, A., 2021. SARS-CoV-2 Infection Remodels the Phenotype and Promotes Angiogenesis of Primary Human Lung Endothelial Cells. *Microorganisms* 9, 1438. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071438>
- Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S.M., Walsh, R.M., Rawson, S., Rits-Volloch, S., Chen, B., 2020. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 369, 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>
- Cameron, C.M., Cameron, M.J., Bermejo-Martin, J.F., Ran, L., Xu, L., Turner, P.V., Ran, R., Danesh, A., Fang, Y., Chan, P.-K.M., Mytle, N., Sullivan, T.J., Collins, T.L., Johnson, M.G., Medina, J.C., Rowe, T., Kelvin, D.J., 2008. Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets. *J Virol* 82, 11308–11317. <https://doi.org/10.1128/JVI.00691-08>
- Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L.D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., van der Meer, F., Kallio, K., Kaya, T., Anastasina, M., Smura, T., Levanov, L., Szivovics, L., Tobi, A., Kallio-Kokko, H., Österlund, P., Joensuu, M., Meunier, F.A., Butcher, S.J., Winkler, M.S., Mollenhauer, B., Helenius, A., Gokce, O., Teesalu, T., Hepojoki, J., Vapalahti, O., Stadelmann, C., Balistreri, G., Simons, M., 2020. Neuropilin-1

- facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 370, 856–860.
<https://doi.org/10.1126/science.abd2985>
- 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, 1787–1799. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001282>
- Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., Meng, X., 2021. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci* 30, 1114–1130. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
- Caobi, A., Nair, M., Raymond, A.D., 2020. Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Viral Infections in Humans. *Viruses* 12, E1200. <https://doi.org/10.3390/v12101200>
- Caputo, I., Carocchia, B., Frasson, I., Poggio, E., Zamberlan, S., Morpurgo, M., Seccia, T.M., Cali, T., Brini, M., Richter, S.N., Rossi, G.P., 2022. Angiotensin II Promotes SARS-CoV-2 Infection via Upregulation of ACE2 in Human Bronchial Cells. *Int J Mol Sci* 23, 5125. <https://doi.org/10.3390/ijms23095125>
- Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A.I., Kranzusch, P.J., Griffin, A.M., Ruthel, G., Dal Cin, P., Dye, J.M., Whelan, S.P., Chandran, K., Brummelkamp, T.R., 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477, 340–343. <https://doi.org/10.1038/nature10348>
- Carlson, C.R., Asfaha, J.B., Ghent, C.M., Howard, C.J., Hartooni, N., Safari, M., Frankel, A.D., Morgan, D.O., 2020. Phosphoregulation of Phase Separation by the SARS-CoV-2 N Protein Suggests a Biophysical Basis for its Dual Functions. *Mol Cell* 80, 1092-1103.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.025>
- Caruso, S., Poon, I.K.H., 2018. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol* 9, 1486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01486>
- Chahar, H.S., Corsello, T., Kudlicki, A.S., Komaravelli, N., Casola, A., 2018. Respiratory Syncytial Virus Infection Changes Cargo Composition of Exosome Released from Airway Epithelial Cells. *Sci Rep* 8, 387. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18672-5>
- Chan, H.-T., Chao, C.-M., Lai, C.-C., 2021. Sofosbuvir/daclatasvir in the treatment of COVID-19 infection: A meta-analysis. *J Infect* 82, e34–e35. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.12.021>
- Chan, J.F.W., Chan, K.-H., Kao, R.Y.T., To, K.K.W., Zheng, B.-J., Li, C.P.Y., Li, P.T.W., Dai, J., Mok, F.K.Y., Chen, H., Hayden, F.G., Yuen, K.-Y., 2013. Broad-spectrum antivirals for the emerging Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Infect* 67, 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.029>
- Chang, C., Hou, M.-H., Chang, C.-F., Hsiao, C.-D., Huang, T., 2014. The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions. *Antiviral Res* 103, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.12.009>
- Chang, C., Sue, S.-C., Yu, T., Hsieh, C.-M., Tsai, C.-K., Chiang, Y.-C., Lee, S., Hsiao, H., Wu, W.-J., Chang, W.-L., Lin, C.-H., Huang, T., 2006. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci* 13, 59–72. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9035-9>
- Chapuy-Regaud, S., Subra, C., Requena, M., de Medina, P., Amara, S., Delton-Vandenbroucke, I., Payre, B., Cazabat, M., Carriere, F., Izopet, J., Poirot, M., Record, M., 2013. Progesterone and a phospholipase inhibitor increase the endosomal bis(monoacylglycero)phosphate content and block HIV viral particle intercellular transmission. *Biochimie* 95, 1677–1688. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.019>

- Chatelain, P., Laruel, R., Gillard, M., 1985. Effect of amiodarone on membrane fluidity and Na⁺/K⁺ ATPase activity in rat-brain synaptic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 148–154. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(85\)91415-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(85)91415-9)
- Chelli, J., Bellazreg, F., Aouem, A., Hattab, Z., Mesmia, H., Lasfar, N.B., Hachfi, W., Masmoudi, T., Chakroun, M., Letaief, A., 2016. Causes de décès des patients infectés par le VIH dans le Centre tunisien. *Pan Afr Med J* 25, 105. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.105.9748>
- Chen, C., Skog, J., Hsu, C.-H., Lessard, R.T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B.S., Breakefield, X.O., Toner, M., Irimia, D., 2010. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 10, 505–511. <https://doi.org/10.1039/b916199f>
- Chen, J., Liu, J., Chen, Z., Peng, H., Zhu, C., Feng, D., Zhang, S., Zhao, P., Zhang, X., Xu, J., 2022. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Potentiates SARS-CoV-2 Infection by Antagonizing Type I Interferon Induction and Its Down-Stream Signaling Pathway. *mSphere* 7, e0021122. <https://doi.org/10.1128/msphere.00211-22>
- Chen, J., Xia, L., Liu, L., Xu, Q., Ling, Y., Huang, D., Huang, W., Song, S., Xu, S., Shen, Y., Lu, H., 2020. Antiviral Activity and Safety of Darunavir/Cobicistat for the Treatment of COVID-19. *Open Forum Infect Dis* 7, ofaa241. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa241>
- Chen, Y., Su, C., Ke, M., Jin, X., Xu, L., Zhang, Z., Wu, A., Sun, Y., Yang, Z., Tien, P., Ahola, T., Liang, Y., Liu, X., Guo, D., 2011. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog* 7, e1002294. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002294>
- Cheng, V.C.C., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Yuen, K.Y., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev* 20, 660–694. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-07>
- Cheng, Y.-L., Lan, Keng-Hsueh, Lee, W.-P., Tseng, S.-H., Hung, L.-R., Lin, H.-C., Lee, F.-Y., Lee, S.-D., Lan, Keng-Hsin, 2013. Amiodarone inhibits the entry and assembly steps of hepatitis C virus life cycle. *Clin Sci (Lond)* 125, 439–448. <https://doi.org/10.1042/CS20120594>
- Cherian, S., Potdar, V., Jadhav, S., Yadav, P., Gupta, N., Das, M., Rakshit, P., Singh, S., Abraham, P., Panda, S., Team, N., 2021. SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms* 9, 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071542>
- Chu, H., Chan, J.F.-W., Yuen, T.T.-T., Shuai, H., Yuan, S., Wang, Y., Hu, B., Yip, C.C.-Y., Tsang, J.O.-L., Huang, X., Chai, Y., Yang, D., Hou, Y., Chik, K.K.-H., Zhang, X., Fung, A.Y.-F., Tsoi, H.-W., Cai, J.-P., Chan, W.-M., Ip, J.D., Chu, A.W.-H., Zhou, J., Lung, D.C., Kok, K.-H., To, K.K.-W., Tsang, O.T.-Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2020. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* 1, e14–e23. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
- Chua, R.L., Lukassen, S., Trump, S., Hennig, B.P., Wendisch, D., Pott, F., Debnath, O., Thürmann, L., Kurth, F., Völker, M.T., Kazmierski, J., Timmermann, B., Twardziok, S., Schneider, S., Machleidt, F., Müller-Redetzky, H., Maier, M., Krannich, A., Schmidt, S., Balzer, F., Liebig, J., Loske, J., Suttrop, N., Eils, J., Ishaque, N., Liebert, U.G., von Kalle, C., Hocke, A., Witzenrath, M., Goffinet, C., Drosten, C., Laudi, S., Lehmann, I., Conrad, C., Sander, L.-E., Eils, R., 2020. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol* 38, 970–979. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0602-4>
- Cocozza, F., Névo, N., Piovesana, E., Lahaye, X., Buchrieser, J., Schwartz, O., Manel, N., Tkach, M., Théry, C., Martin-Jaular, L., 2020. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J Extracell Vesicles* 10, e12050. <https://doi.org/10.1002/jev2.12050>

- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Cone, R.A., 2009. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008>
- Cong, Y., Hart, B.J., Gross, R., Zhou, H., Frieman, M., Bollinger, L., Wada, J., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Dyall, J., Holbrook, M.R., 2018. MERS-CoV pathogenesis and antiviral efficacy of licensed drugs in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *PLoS One* 13, e0194868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194868>
- Cornillez-Ty, C.T., Liao, L., Yates, J.R., Kuhn, P., Buchmeier, M.J., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol* 83, 10314–10318. <https://doi.org/10.1128/JVI.00842-09>
- Corsello, T., Qu, Y., Ivanciuc, T., Garofalo, R.P., Casola, A., 2022. Antiviral activity of extracellular vesicles derived from respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *Front Immunol* 13, 886701. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.886701>
- Cosset, F.-L., Dreux, M., 2014. HCV transmission by hepatic exosomes establishes a productive infection. *J Hepatol* 60, 674–675. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.015>
- Coste, A., Brugel, L., Maître, B., Boussat, S., Papon, J.F., Wingerstmann, L., Peynègre, R., Escudier, E., 2000. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J* 15, 367–372. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b24.x>
- Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N.G., Decroly, E., 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 176, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
- Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Daniel, J.A., Chau, N., Abdel-Hamid, M.K., Hu, L., von Kleist, L., Whiting, A., Krishnan, S., Maamary, P., Joseph, S.R., Simpson, F., Haucke, V., McCluskey, A., Robinson, P.J., 2015. Phenothiazine-derived antipsychotic drugs inhibit dynamin and clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 16, 635–654. <https://doi.org/10.1111/tra.12272>
- De Clercq, E., Li, G., 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev* 29, 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- de Duve, C., de Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F., 1974. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 23, 2495–2531. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90174-9)
- de Haan, C.A.M., Volders, H., Koetzner, C.A., Masters, P.S., Rottier, P.J.M., 2002. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol* 76, 12491–12502. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12491-12502.2002>
- de Wilde, A.H., Jochmans, D., Posthuma, C.C., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van Nieuwkoop, S., Bestebroer, T.M., van den Hoogen, B.G., Neyts, J., Snijder, E.J., 2014. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4875–4884. <https://doi.org/10.1128/AAC.03011-14>
- de Wit, E., Feldmann, F., Cronin, J., Jordan, R., Okumura, A., Thomas, T., Scott, D., Cihlar, T., Feldmann, H., 2020. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>
- Decroly, E., Debarnot, C., Ferron, F., Bouvet, M., Coutard, B., Imbert, I., Gluais, L., Papageorgiou, N., Sharff, A., Bricogne, G., Ortiz-Lombardia, M., Lescar, J., Canard, B., 2011. Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap

- 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog* 7, e1002059.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002059>
- Dejnirattisai, W., Zhou, D., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A.J., Ginn, H.M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H.M.E., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Walter, T.S., Skelly, D., Costa Clemens, S.A., Naveca, F.G., Nascimento, V., Nascimento, F., Fernandes da Costa, C., Resende, P.C., Pauvolid-Correa, A., Siqueira, M.M., Dold, C., Levin, R., Dong, T., Pollard, A.J., Knight, J.C., Crook, D., Lambe, T., Clutterbuck, E., Bibi, S., Flaxman, A., Bittaye, M., Belij-Rammerstorfer, S., Gilbert, S.C., Carroll, M.W., Klenerman, P., Barnes, E., Dunachie, S.J., Paterson, N.G., Williams, M.A., Hall, D.R., Hulswit, R.J.G., Bowden, T.A., Fry, E.E., Mongkolsapaya, J., Ren, J., Stuart, D.I., Srean, G.R., 2021. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell* 184, 2939-2954.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.055>
- DeJong, C., Spinelli, M.A., Okochi, H., Gandhi, M., 2021. Tenofovir-based PrEP for COVID-19: an untapped opportunity? *AIDS* 35, 1509–1511.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002877>
- Delorme-Axford, E., Donker, R.B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D.B., Sarkar, S.N., Morelli, A.E., Sadovsky, Y., Coyne, C.B., 2013. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12048–12053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>
- Deng, L., Li, C., Zeng, Q., Liu, X., Li, X., Zhang, H., Hong, Z., Xia, J., 2020. Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against Corona Virus Disease 2019: A retrospective cohort study. *J Infect* 81, e1–e5.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.002>
- Deng, X., Hackbart, M., Mettelman, R.C., O'Brien, A., Mielech, A.M., Yi, G., Kao, C.C., Baker, S.C., 2017. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E4251–E4260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618310114>
- Devillier, P., Roche, N., Faisy, C., 2008. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of desloratadine, fexofenadine and levocetirizine : a comparative review. *Clin Pharmacokinet* 47, 217–230. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847040-00001>
- Diaconu, I., Cerullo, V., Escutenaire, S., Kanerva, A., Bauerschmitz, G.J., Hernandez-Alcoceba, R., Pesonen, S., Hemminki, A., 2010. Human adenovirus replication in immunocompetent Syrian hamsters can be attenuated with chlorpromazine or cidofovir. *J Gene Med* 12, 435–445. <https://doi.org/10.1002/jgm.1453>
- Dobson, A.P., Carper, E.R., 1996. Infectious Diseases and Human Population History: Throughout history the establishment of disease has been a side effect of the growth of civilization. *BioScience* 46, 115–126. <https://doi.org/10.2307/1312814>
- Domachowske, J.B., Anderson, E.J., Goldstein, M., 2021. The Future of Respiratory Syncytial Virus Disease Prevention and Treatment. *Infect Dis Ther* 10, 47–60.
<https://doi.org/10.1007/s40121-020-00383-6>
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, E1-9.
<https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8, E727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Dreyer, F., Baur, A., 2016. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol* 1448, 201–216. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3753-0_15
- D'Souza-Schorey, C., Schorey, J.S., 2018. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. *Essays Biochem* 62, 125–133.
<https://doi.org/10.1042/EBC20170078>

- Dukers, D.F., Meij, P., Vervoort, M.B., Vos, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J., Bloemena, E., Middeldorp, J.M., 2000. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165, 663–670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.663>
- Dwivedy, A., Mariadasse, R., Ahmad, M., Chakraborty, S., Kar, D., Tiwari, S., Bhattacharyya, S., Sonar, S., Mani, S., Tailor, P., Majumdar, T., Jeyakanthan, J., Biswal, B.K., 2021. Characterization of the NiRAN domain from RNA-dependent RNA polymerase provides insights into a potential therapeutic target against SARS-CoV-2. *PLoS Comput Biol* 17, e1009384. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009384>
- Dyall, J., Coleman, C.M., Hart, B.J., Venkataraman, T., Holbrook, M.R., Kindrachuk, J., Johnson, R.F., Olinger, G.G., Jahrling, P.B., Laidlaw, M., Johansen, L.M., Lear-Rooney, C.M., Glass, P.J., Hensley, L.E., Frieman, M.B., 2014. Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4885–4893. <https://doi.org/10.1128/AAC.03036-14>
- Earnest, J.T., Hantak, M.P., Li, K., McCray, P.B., Perlman, S., Gallagher, T., 2017. The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS Pathog* 13, e1006546. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006546>
- ECDC [WWW Document], 2022. . European Centre for Disease Prevention and Control. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (accessed 11.17.22).
- Edwards, K.M., Zhu, Y., Griffin, M.R., Weinberg, G.A., Hall, C.B., Szilagyi, P.G., Staat, M.A., Iwane, M., Prill, M.M., Williams, J.V., New Vaccine Surveillance Network, 2013. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med* 368, 633–643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204630>
- El Omari, K., Li, S., Kotecha, A., Walter, T.S., Bignon, E.A., Harlos, K., Somerharju, P., De Haas, F., Clare, D.K., Molin, M., Hurtado, F., Li, M., Grimes, J.M., Bamford, D.H., Tischler, N.D., Huiskonen, J.T., Stuart, D.I., Roine, E., 2019. The structure of a prokaryotic viral envelope protein expands the landscape of membrane fusion proteins. *Nat Commun* 10, 846. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08728-7>
- Elfiky, A.A., 2020. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci* 253, 117592. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117592>
- Ella, R., Reddy, S., Jogdand, H., Sarangi, V., Ganneru, B., Prasad, S., Das, D., Raju, D., Praturi, U., Sapkal, G., Yadav, P., Reddy, P., Verma, S., Singh, C., Redkar, S.V., Gillurkar, C.S., Kushwaha, J.S., Mohapatra, S., Bhate, A., Rai, S., Panda, S., Abraham, P., Gupta, N., Ella, K., Bhargava, B., Vadrevu, K.M., 2021. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double-blind, randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3-month follow-up of a double-blind, randomised phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 21, 950–961. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00070-0)
- Elmekaty, E.Z.I., Alibrahim, R., Hassanin, R., Eltaib, S., Elsayed, A., Rustom, F., Mohamed Ibrahim, M.I., Abu Khattab, M., Al Soub, H., Al Maslamani, M., Al-Khal, A., 2022. Darunavir-cobicistat versus lopinavir-ritonavir in the treatment of COVID-19 infection (DOLCI): A multicenter observational study. *PLoS One* 17, e0267884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267884>
- El-Shennawy, L., Hoffmann, A.D., Dashzeveg, N.K., McAndrews, K.M., Mehl, P.J., Cornish, D., Yu, Z., Tokars, V.L., Nicolaescu, V., Tomatsidou, A., Mao, C., Felicelli, C.J., Tsai, C.-F., Ostiguien, C., Jia, Y., Li, L., Furlong, K., Wysocki, J., Luo, X., Ruivo, C.F., Batlle, D., Hope, T.J., Shen, Y., Chae, Y.K., Zhang, H., LeBleu, V.S., Shi, T., Swaminathan, S., Luo, Y., Missiakas, D., Randall, G.C., Demonbreun, A.R., Ison, M.G., Kalluri, R., Fang, D., Liu, H., 2022. Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2. *Nat Commun* 13, 405. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27893-2>

- Fahy, J.V., Dickey, B.F., 2010. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 363, 2233–2247. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>
- Faria, N.R., Mellan, T.A., Whittaker, C., Claro, I.M., Candido, D. da S., Mishra, S., Crispim, M.A.E., Sales, F.C.S., Hawryluk, I., McCrone, J.T., Hulswit, R.J.G., Franco, L.A.M., Ramundo, M.S., de Jesus, J.G., Andrade, P.S., Coletti, T.M., Ferreira, G.M., Silva, C.A.M., Manuli, E.R., Pereira, R.H.M., Peixoto, P.S., Kraemer, M.U.G., Gaburo, N., Camilo, C. da C., Hoeltgebaum, H., Souza, W.M., Rocha, E.C., de Souza, L.M., de Pinho, M.C., Araujo, L.J.T., Malta, F.S.V., de Lima, A.B., Silva, J. do P., Zauli, D.A.G., Ferreira, A.C. de S., Schnekenberg, R.P., Laydon, D.J., Walker, P.G.T., Schlüter, H.M., Dos Santos, A.L.P., Vidal, M.S., Del Caro, V.S., Filho, R.M.F., Dos Santos, H.M., Aguiar, R.S., Proença-Modena, J.L., Nelson, B., Hay, J.A., Monod, M., Miscouridou, X., Coupland, H., Sonabend, R., Vollmer, M., Gandy, A., Prete, C.A., Nascimento, V.H., Suchard, M.A., Bowden, T.A., Pond, S.L.K., Wu, C.-H., Ratmann, O., Ferguson, N.M., Dye, C., Loman, N.J., Lemey, P., Rambaut, A., Fraiji, N.A., Carvalho, M. do P.S.S., Pybus, O.G., Flaxman, S., Bhatt, S., Sabino, E.C., 2021. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372, 815–821. <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>
- Farne, H., Kumar, K., Ritchie, A.I., Finney, L.J., Johnston, S.L., Singanayagam, A., 2020. Repurposing Existing Drugs for the Treatment of COVID-19. *Ann Am Thorac Soc* 17, 1186–1194. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202005-566FR>
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., Sadoul, R., 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31, 642–648. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.12.003>
- Fehr, A.R., Perlman, S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Feld, J.J., Jacobson, I.M., Sulkowski, M.S., Poordad, F., Tatch, F., Pawlotsky, J.-M., 2017. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver Int* 37, 5–18. <https://doi.org/10.1111/liv.13212>
- Fendrick, A.M., Monto, A.S., Nightengale, B., Sarnes, M., 2003. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med* 163, 487–494. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.4.487>
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.-H., Walker, C., Lanford, R.E., Lemon, S.M., 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496, 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature12029>
- Fenollar, F., Mediannikov, O., 2018. Emerging infectious diseases in Africa in the 21st century. *New Microbes New Infect* 26, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.09.004>
- Fernández-Blanco, J.A., Fakih, D., Arike, L., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Martínez-Abad, B., Skansebo, E., Jackson, S., Root, J., Singh, D., McCrae, C., Evans, C.M., Åstrand, A., Ermund, A., Hansson, G.C., 2018. Attached stratified mucus separates bacteria from the epithelial cells in COPD lungs. *JCI Insight* 3, 120994. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120994>
- Fernández-Llama, P., Khositseth, S., Gonzales, P.A., Star, R.A., Pisitkun, T., Knepper, M.A., 2010. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int* 77, 736–742. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.550>
- Ferraris, O., Moroso, M., Pernet, O., Emonet, S., Ferrier Rembert, A., Paranhos-Baccalà, G., Peyrefitte, C.N., 2015. Evaluation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in vitro inhibition by chloroquine and chlorpromazine, two FDA approved molecules. *Antiviral Res* 118, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.005>
- Finkel, Y., Mizrahi, O., Nachshon, A., Weingarten-Gabbay, S., Morgenstern, D., Yahalom-Ronen, Y., Tamir, H., Achdout, H., Stein, D., Israeli, O., Beth-Din, A., Melamed, S., Weiss, S., Israely, T., Paran, N., Schwartz, M., Stern-Ginossar, N., 2021. The coding

- capacity of SARS-CoV-2. *Nature* 589, 125–130. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2739-1>
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., Simons, M., 2011. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science* 124, 447–458. <https://doi.org/10.1242/jcs.074088>
- Flanagan, J., Middeldorp, J., Sculley, T., 2003. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol* 84, 1871–1879. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18944-0>
- Flanagan, K.L., Best, E., Crawford, N.W., Giles, M., Koirala, A., Macartney, K., Russell, F., Teh, B.W., Wen, S.C., 2020. Progress and Pitfalls in the Quest for Effective SARS-CoV-2 (COVID-19) Vaccines. *Front Immunol* 11, 579250. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579250>
- Flanagan, K.L., MacIntyre, C.R., McIntyre, P.B., Nelson, M.R., 2021. SARS-CoV-2 Vaccines: Where Are We Now? *J Allergy Clin Immunol Pract* 9, 3535–3543. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.07.016>
- Foulongne, V., Segondy, M., 2009. [Human bocavirus (HBoV)]. *Pathol Biol (Paris)* 57, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.01.001>
- Freytmuth, F., Vabret, A., Dina, J., Cuvillon-Nimal, D., Lubin, C., Vaudecrane, A., Guillois, B., Gouarin, S., Petitjean, J., Lafaix-Delaire, F., Brouard, J., 2010. [Bronchiolitis viruses]. *Arch Pediatr* 17, 1192–1201. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2010.05.006>
- Freytmuth, F., Vabret, A., Legrand, L., Dina, J., Gouarin, S., Cuvillon-Nimal, D., Brouard, J., 2009. [Human metapneumovirus]. *Pathol Biol (Paris)* 57, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.005>
- Fujino, T., Nomoto, H., Kutsuna, S., Ujiie, M., Suzuki, T., Sato, R., Fujimoto, T., Kuroda, M., Wakita, T., Ohmagari, N., 2021. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg Infect Dis* 27. <https://doi.org/10.3201/eid2704.210138>
- Fung, S.-Y., Siu, K.-L., Lin, H., Chan, C.-P., Yeung, M.L., Jin, D.-Y., 2022. SARS-CoV-2 NSP13 helicase suppresses interferon signaling by perturbing JAK1 phosphorylation of STAT1. *Cell Biosci* 12, 36. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00770-1>
- Furuta, Y., Takahashi, K., Shiraki, K., Sakamoto, K., Smee, D.F., Barnard, D.L., Gowen, B.B., Julander, J.G., Morrey, J.D., 2009. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 82, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.02.198>
- Gao, J., Tian, Z., Yang, X., 2020. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci Trends* 14, 72–73. <https://doi.org/10.5582/bst.2020.01047>
- Gao, X., Qin, B., Chen, P., Zhu, K., Hou, P., Wojdyla, J.A., Wang, M., Cui, S., 2021. Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. *Acta Pharm Sin B* 11, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.08.014>
- Garcia-Beltran, W.F., Lam, E.C., St Denis, K., Nitido, A.D., Garcia, Z.H., Hauser, B.M., Feldman, J., Pavlovic, M.N., Gregory, D.J., Poznansky, M.C., Sigal, A., Schmidt, A.G., Iafrate, A.J., Naranbhai, V., Balazs, A.B., 2021. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell* 184, 2372-2383.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.013>
- Gaunt, E.R., Hardie, A., Claas, E.C.J., Simmonds, P., Templeton, K.E., 2010. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 48, 2940–2947. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
- Ge, S., Lu, J., Hou, Y., Lv, Y., Wang, C., He, H., 2021a. Azelastine inhibits viropexis of SARS-CoV-2 spike pseudovirus by binding to SARS-CoV-2 entry receptor ACE2. *Virology* 560, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.05.009>
- Ge, S., Wang, X., Hou, Y., Lv, Y., Wang, C., He, H., 2021b. Repositioning of histamine H1 receptor antagonist: Doxepin inhibits viropexis of SARS-CoV-2 Spike pseudovirus by

- blocking ACE2. *Eur J Pharmacol* 896, 173897. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173897>
- Gehring, G., Rohrmann, K., Atenchong, N., Mittler, E., Becker, S., Dahlmann, F., Pöhlmann, S., Vondran, F.W.R., David, S., Manns, M.P., Ciesek, S., von Hahn, T., 2014. The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry. *J Antimicrob Chemother* 69, 2123–2131. <https://doi.org/10.1093/jac/dku091>
- Giersing, B.K., Karron, R.A., Vekemans, J., Kaslow, D.C., Moorthy, V.S., 2019. Meeting report: WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccine development, Geneva, 25-26 April 2016. *Vaccine* 37, 7355–7362. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.068>
- Gordon, C.J., Tchesnokov, E.P., Woolner, E., Perry, J.K., Feng, J.Y., Porter, D.P., Götte, M., 2020. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013679>
- Gould, S.J., Booth, A.M., Hildreth, J.E.K., 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10592–10597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831413100>
- Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E., 2005. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem* 280, 26256–26262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500835200>
- Gray, G.C., Goswami, P.R., Malasig, M.D., Hawksworth, A.W., Trump, D.H., Ryan, M.A., Schnurr, D.P., 2000. Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. For the Adenovirus Surveillance Group. *Clin Infect Dis* 31, 663–670. <https://doi.org/10.1086/313999>
- Greaney, A.J., Loes, A.N., Crawford, K.H.D., Starr, T.N., Malone, K.D., Chu, H.Y., Bloom, J.D., 2021. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* 29, 463-476.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.003>
- Greene, W.C., 2007. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1, S94-102. <https://doi.org/10.1002/eji.200737441>
- Grein, J., Ohmagari, N., Shin, D., Diaz, G., Asperges, E., Castagna, A., Feldt, T., Green, G., Green, M.L., Lescure, F.-X., Nicastri, E., Oda, R., Yo, K., Quiros-Roldan, E., Studemeister, A., Redinski, J., Ahmed, S., Bernetti, J., Chelliah, D., Chen, D., Chihara, S., Cohen, S.H., Cunningham, J., D'Arminio Monforte, A., Ismail, S., Kato, H., Lapadula, G., L'Her, E., Maeno, T., Majumder, S., Massari, M., Mora-Rillo, M., Mutoh, Y., Nguyen, D., Verweij, E., Zoufaly, A., Osinusi, A.O., DeZure, A., Zhao, Y., Zhong, L., Chokkalingam, A., Elboudwarej, E., Telep, L., Timbs, L., Henne, I., Sellers, S., Cao, H., Tan, S.K., Winterbourne, L., Desai, P., Mera, R., Gaggar, A., Myers, R.P., Brainard, D.M., Childs, R., Flanigan, T., 2020. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 382, 2327–2336. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>
- Gribble, J., Stevens, L.J., Agostini, M.L., Anderson-Daniels, J., Chappell, J.D., Lu, X., Puijssers, A.J., Routh, A.L., Denison, M.R., 2021. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. *PLoS Pathog* 17, e1009226. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009226>
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276–278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Gupta, A., Madhavan, M.V., Sehgal, K., Nair, N., Mahajan, S., Sehrawat, T.S., Bikdeli, B., Ahluwalia, N., Ausiello, J.C., Wan, E.Y., Freedberg, D.E., Kirtane, A.J., Parikh, S.A., Maurer, M.S., Nordvig, A.S., Accili, D., Bathon, J.M., Mohan, S., Bauer, K.A., Leon, M.B., Krumholz, H.M., Uriel, N., Mehra, M.R., Elkind, M.S.V., Stone, G.W., Schwartz, A., Ho, D.D., Bilezikian, J.P., Landry, D.W., 2020. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* 26, 1017–1032. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>

- Gupta, M., Azumaya, C.M., Moritz, M., Pourmal, S., Diallo, A., Merz, G.E., Jang, G., Bouhaddou, M., Fossati, A., Brilot, A.F., Diwanji, D., Hernandez, E., Herrera, N., Kratochvil, H.T., Lam, V.L., Li, F., Li, Y., Nguyen, H.C., Nowotny, C., Owens, T.W., Peters, J.K., Rizo, A.N., Schulze-Gahmen, U., Smith, A.M., Young, I.D., Yu, Z., Asarnow, D., Billesbølle, C., Campbell, M.G., Chen, J., Chen, K.-H., Chio, U.S., Dickinson, M.S., Doan, L., Jin, M., Kim, K., Li, J., Li, Y.-L., Linossi, E., Liu, Y., Lo, M., Lopez, J., Lopez, K.E., Mancino, A., Moss, F.R., Paul, M.D., Pawar, K.I., Pelin, A., Pospiech, T.H., Puchades, C., Remesh, S.G., Safari, M., Schaefer, K., Sun, M., Tabios, M.C., Thwin, A.C., Titus, E.W., Trenker, R., Tse, E., Tsui, T.K.M., Wang, F., Zhang, K., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, F., Zhou, Y., Zuliani-Alvarez, L., QCRG Structural Biology Consortium, Agard, D.A., Cheng, Y., Fraser, J.S., Jura, N., Kortemme, T., Manglik, A., Southworth, D.R., Stroud, R.M., Swaney, D.L., Krogan, N.J., Frost, A., Rosenberg, O.S., Verba, K.A., 2021. CryoEM and AI reveal a structure of SARS-CoV-2 Nsp2, a multifunctional protein involved in key host processes. *bioRxiv* 2021.05.10.443524. <https://doi.org/10.1101/2021.05.10.443524>
- Gutzeit, C., Nagy, N., Gentile, M., Lyberg, K., Gumz, J., Vallhov, H., Puga, I., Klein, E., Gabriellsson, S., Cerutti, A., Scheynius, A., 2014. Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J Immunol* 192, 5852–5862. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302068>
- Han, Z., Liu, X., Chen, X., Zhou, X., Du, T., Roizman, B., Zhou, G., 2016. miR-H28 and miR-H29 expressed late in productive infection are exported and restrict HSV-1 replication and spread in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E894-901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525674113>
- Hanson, P.I., Cashikar, A., 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 337–362. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>
- Harris, R.J., Hall, J.A., Zaidi, A., Andrews, N.J., Dunbar, J.K., Dabrera, G., 2021. Effect of Vaccination on Household Transmission of SARS-CoV-2 in England. *N Engl J Med* 385, 759–760. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2107717>
- Harrison, A.G., Lin, T., Wang, P., 2020. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* 41, 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Hayden, F.G., 2004. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol* 14, 17–31. <https://doi.org/10.1002/rmv.406>
- Heath, P.T., Galiza, E.P., Baxter, D.N., Boffito, M., Browne, D., Burns, F., Chadwick, D.R., Clark, R., Cosgrove, C., Galloway, J., Goodman, A.L., Heer, A., Higham, A., Iyengar, S., Jamal, A., Jeanes, C., Kalra, P.A., Kyriakidou, C., McAuley, D.F., Meyrick, A., Minassian, A.M., Minton, J., Moore, P., Munsoor, I., Nicholls, H., Osanlou, O., Packham, J., Pretswell, C.H., San Francisco Ramos, A., Saralaya, D., Sheridan, R.P., Smith, R., Soiza, R.L., Swift, P.A., Thomson, E.C., Turner, J., Viljoen, M.E., Albert, G., Cho, I., Dubovsky, F., Glenn, G., Rivers, J., Robertson, A., Smith, K., Toback, S., 2019nCoV-302 Study Group, 2021. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 385, 1172–1183. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
- Henrickson, K.J., 2003. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16, 242–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>
- Hewlett, I., Lee, S., Molnar, J., Foldeak, S., Pine, P.S., Weaver, J.L., Aszalos, A., 1997. Inhibition of HIV infection of H9 cells by chlorpromazine derivatives. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 15, 16–20. <https://doi.org/10.1097/00042560-199705010-00003>
- Hillen, H.S., Kobic, G., Farnung, L., Dienemann, C., Tegunov, D., Cramer, P., 2020. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature* 584, 154–156. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>
- Hoertel, N., Sánchez-Rico, M., Vernet, R., Beeker, N., Jannot, A.-S., Neuraz, A., Salamanca, E., Paris, N., Daniel, C., Gramfort, A., Lemaitre, G., Bernaux, M., Bellamine, A.,

- Lemogne, C., Airagnes, G., Burgun, A., Limosin, F., AP-HP / Universities / INSERM COVID-19 Research Collaboration and AP-HP COVID CDR Initiative, 2021. Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: results from an observational study. *Mol Psychiatry* 26, 5199–5212. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01021-4>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hollister, L.E., Jones, K.P., Brownfield, B., Johnson, F., 1955. Chlorpromazine alone and with reserpine; use in the treatment of mental diseases. *Calif Med* 83, 218–221.
- Hou, Y., Ge, S., Li, X., Wang, C., He, H., He, L., 2021. Testing of the inhibitory effects of loratadine and desloratadine on SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus viropexis. *Chem Biol Interact* 338, 109420. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109420>
- Hu, Ben, Guo, H., Zhou, P., Shi, Z.-L., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, Biying, Huang, S., Yin, L., 2021. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol* 93, 250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
- Hu, Q., He, L., Zhang, Y., 2021. Community Transmission via Indirect Media-To-Person Route: A Missing Link in the Rapid Spread of COVID-19. *Front Public Health* 9, 687937. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.687937>
- Hui, K.P.Y., Ho, J.C.W., Cheung, M.-C., Ng, K.-C., Ching, R.H.H., Lai, K.-L., Kam, T.T., Gu, H., Sit, K.-Y., Hsin, M.K.Y., Au, T.W.K., Poon, L.L.M., Peiris, M., Nicholls, J.M., Chan, M.C.W., 2022. SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature* 603, 715–720. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04479-6>
- Ibrahim, A., Marbán, E., 2016. Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology. *Annu Rev Physiol* 78, 67–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-104929>
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M.A., Fukamizu, A., Hui, C.-C., Hein, L., Uhlir, S., Slutsky, A.S., Jiang, C., Penninger, J.M., 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
- Izda, V., Jeffries, M.A., Sawalha, A.H., 2021. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. *Clin Immunol* 222, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108634>
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jacobs, S.E., Lamson, D.M., St George, K., Walsh, T.J., 2013. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 26, 135–162. <https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12>
- Jain, S., Self, W.H., Wunderink, R.G., Fakhran, S., Balk, R., Bramley, A.M., Reed, C., Grijalva, C.G., Anderson, E.J., Courtney, D.M., Chappell, J.D., Qi, C., Hart, E.M., Carroll, F., Trabue, C., Donnelly, H.K., Williams, D.J., Zhu, Y., Arnold, S.R., Ampofo, K., Waterer, G.W., Levine, M., Lindstrom, S., Winchell, J.M., Katz, J.M., Erdman, D., Schneider, E., Hicks, L.A., McCullers, J.A., Pavia, A.T., Edwards, K.M., Finelli, L., CDC EPIC Study Team, 2015. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med* 373, 415–427. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>
- Janssen, W.J., Stefanski, A.L., Bochner, B.S., Evans, C.M., 2016. Control of lung defence by mucins and macrophages: ancient defence mechanisms with modern functions. *Eur Respir J* 48, 1201–1214. <https://doi.org/10.1183/13993003.00120-2015>
- Javelot, H., Petriguet, J., Addiego, F., Briet, J., Solis, M., El-Hage, W., Hingray, C., Weiner, L., 2020. Towards a pharmacochemical hypothesis of the prophylaxis of SARS-CoV-

- 2 by psychoactive substances. *Med Hypotheses* 144, 110025. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110025>
- Jayk Bernal, A., Gomes da Silva, M.M., Musungaie, D.B., Kovalchuk, E., Gonzalez, A., Delos Reyes, V., Martín-Quirós, A., Caraco, Y., Williams-Diaz, A., Brown, M.L., Du, J., Pedley, A., Assaid, C., Strizki, J., Grobler, J.A., Shamsuddin, H.H., Tipping, R., Wan, H., Paschke, A., Butterson, J.R., Johnson, M.G., De Anda, C., MOVE-OUT Study Group, 2022. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med* 386, 509–520. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044>
- Jean, S.-S., Lee, P.-I., Hsueh, P.-R., 2020. Treatment options for COVID-19: The reality and challenges. *J Microbiol Immunol Infect* 53, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.034>
- Jiang, S., Zhang, X., Yang, Y., Hotez, P.J., Du, L., 2020. Neutralizing antibodies for the treatment of COVID-19. *Nat Biomed Eng* 4, 1134–1139. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00660-2>
- Jocher, G., Grass, V., Tschirner, S.K., Riepler, L., Breimann, S., Kaya, T., Oelsner, M., Hamad, M.S., Hofmann, L.I., Blobel, C.P., Schmidt-Weber, C.B., Gokce, O., Jakwerth, C.A., Trimpert, J., Kimpel, J., Pichlmair, A., Lichtenthaler, S.F., 2022. ADAM10 and ADAM17 promote SARS-CoV-2 cell entry and spike protein-mediated lung cell fusion. *EMBO Rep* 23, e54305. <https://doi.org/10.15252/embr.202154305>
- Johansen, L.M., DeWald, L.E., Shoemaker, C.J., Hoffstrom, B.G., Lear-Rooney, C.M., Stossel, A., Nelson, E., Delos, S.E., Simmons, J.A., Grenier, J.M., Pierce, L.T., Pajouhesh, H., Lehár, J., Hensley, L.E., Glass, P.J., White, J.M., Olinger, G.G., 2015. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med* 7, 290ra89. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5597>
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412–9420.
- Joseph, J.S., Saikatendu, K.S., Subramanian, V., Neuman, B.W., Buchmeier, M.J., Stevens, R.C., Kuhn, P., 2007. Crystal structure of a monomeric form of severe acute respiratory syndrome coronavirus endonuclease nsp15 suggests a role for hexamerization as an allosteric switch. *J Virol* 81, 6700–6708. <https://doi.org/10.1128/JVI.02817-06>
- Ju, Y., Bai, H., Ren, L., Zhang, L., 2021. The Role of Exosome and the ESCRT Pathway on Enveloped Virus Infection. *Int J Mol Sci* 22, 9060. <https://doi.org/10.3390/ijms22169060>
- Kalamvoki, M., Du, T., Roizman, B., 2014. Cells infected with herpes simplex virus 1 export to uninfected cells exosomes containing STING, viral mRNAs, and microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4991–4996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419338111>
- Kalluri, R., LeBleu, V.S., 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367, eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kang, J.-S., 2020. The potential of exosomes as theragnostics in various clinical situations. *Exosomes* 467–486. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816053-4.00020-1>
- Kapoor, N.R., Chadha, R., Kumar, S., Choedon, T., Reddy, V.S., Kumar, V., 2017. The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein. *Virus Res* 240, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.009>
- Kaptein, S.J., Neyts, J., 2016. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. *Curr Opin Pharmacol* 30, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.06.002>
- Kash, J.C., 2009. Applications of high-throughput genomics to antiviral research: evasion of antiviral responses and activation of inflammation during fulminant RNA virus infection. *Antiviral Res* 83, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.04.004>
- Kash, J.C., Basler, C.F., García-Sastre, A., Carter, V., Billharz, R., Swayne, D.E., Przygodzki, R.M., Taubenberger, J.K., Katze, M.G., Tumpey, T.M., 2004. Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza

- viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol* 78, 9499–9511. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9499-9511.2004>
- Kastenhuber, E.R., Mercadante, M., Nilsson-Payant, B., Johnson, J.L., Jaimes, J.A., Muecksch, F., Weisblum, Y., Bram, Y., Chandar, V., Whittaker, G.R., tenOever, B.R., Schwartz, R.E., Cantley, L., 2022. Coagulation factors directly cleave SARS-CoV-2 spike and enhance viral entry. *Elife* 11, e77444. <https://doi.org/10.7554/eLife.77444>
- Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F., Matsuyama, S., 2012. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol* 86, 6537–6545. <https://doi.org/10.1128/JVI.00094-12>
- Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C.J., Cerikan, B., Lu, J.M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H.-G., Scheres, S.H.W., Bartenschlager, R., Briggs, J.A.G., 2020. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 588, 498–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- Keech, C., Albert, G., Cho, I., Robertson, A., Reed, P., Neal, S., Plested, J.S., Zhu, M., Cloney-Clark, S., Zhou, H., Smith, G., Patel, N., Frieman, M.B., Haupt, R.E., Logue, J., McGrath, M., Weston, S., Piedra, P.A., Desai, C., Callahan, K., Lewis, M., Price-Abbott, P., Formica, N., Shinde, V., Fries, L., Lickliter, J.D., Griffin, P., Wilkinson, B., Glenn, G.M., 2020. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med* 383, 2320–2332. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920>
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquère, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., Busson, P., 2006. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-283>
- Kesebir, D., Vazquez, M., Weibel, C., Shapiro, E.D., Ferguson, D., Landry, M.L., Kahn, J.S., 2006. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 194, 1276–1282. <https://doi.org/10.1086/508213>
- Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O'Neal, W., Pickles, R.J., Sheehan, J.K., 2009. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 23, 1858–1868. <https://doi.org/10.1096/fj.08-119131>
- Keyaerts, E., Li, S., Vijgen, L., Rysman, E., Verbeeck, J., Van Ranst, M., Maes, P., 2009. Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3416–3421. <https://doi.org/10.1128/AAC.01509-08>
- Khatua, A.K., Taylor, H.E., Hildreth, J.E.K., Popik, W., 2009. Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J Virol* 83, 512–521. <https://doi.org/10.1128/JVI.01658-08>
- Khetsuriani, N., Lamonte, A., Oberste, M.S., Pallansch, M., 2006. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr Infect Dis J* 25, 889–893. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000237798.07462.32>
- Killerby, M.E., Biggs, H.M., Haynes, A., Dahl, R.M., Mustaquim, D., Gerber, S.I., Watson, J.T., 2018. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. *J Clin Virol* 101, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.019>
- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J.W., Kim, V.N., Chang, H., 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914-921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kim, H.K., Cho, J., Kim, E., Kim, J., Yang, J.-S., Kim, K.-C., Lee, J.-Y., Shin, Y., Palomera, L.F., Park, J., Baek, S.H., Bae, H.-G., Cho, Y., Han, J., Sul, J.H., Lee, J., Park, J.H.,

- Cho, Y.W., Lee, W., Jo, D.-G., 2022. Engineered small extracellular vesicles displaying ACE2 variants on the surface protect against SARS-CoV-2 infection. *J Extracell Vesicles* 11, e12179. <https://doi.org/10.1002/jev2.12179>
- Kindler, E., Gil-Cruz, C., Spanier, J., Li, Y., Wilhelm, J., Rabouw, H.H., Züst, R., Hwang, M., V'kovski, P., Stalder, H., Marti, S., Habjan, M., Cervantes-Barragan, L., Elliot, R., Karl, N., Gaughan, C., van Kuppeveld, F.J.M., Silverman, R.H., Keller, M., Ludewig, B., Bergmann, C.C., Ziebuhr, J., Weiss, S.R., Kalinke, U., Thiel, V., 2017. Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication. *PLoS Pathog* 13, e1006195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006195>
- Kishimoto, M., Uemura, K., Sanaki, T., Sato, A., Hall, W.W., Kariwa, H., Orba, Y., Sawa, H., Sasaki, M., 2021. TMPRSS11D and TMPRSS13 Activate the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses* 13, 384. <https://doi.org/10.3390/v13030384>
- Klemm, T., Ebert, G., Calleja, D.J., Allison, C.C., Richardson, L.W., Bernardini, J.P., Lu, B.G., Kuchel, N.W., Grohmann, C., Shibata, Y., Gan, Z.Y., Cooney, J.P., Doerflinger, M., Au, A.E., Blackmore, T.R., van der Heden van Noort, G.J., Geurink, P.P., Ovaa, H., Newman, J., Riboldi-Tunncliffe, A., Czabotar, P.E., Mitchell, J.P., Feltham, R., Lechtenberg, B.C., Lowes, K.N., Dewson, G., Pellegrini, M., Lessene, G., Komander, D., 2020. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J* 39, e106275. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106275>
- Korber, B., Fischer, W.M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E.E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K.M., Parker, M.D., Partridge, D.G., Evans, C.M., Freeman, T.M., de Silva, T.I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal, C., Perez, L.G., Tang, H., Moon-Walker, A., Whelan, S.P., LaBranche, C.C., Saphire, E.O., Montefiori, D.C., 2020. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 182, 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., Gulbins, E., 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* 26, 9–20. <https://doi.org/10.1159/000315101>
- Kouwaki, T., Fukushima, Y., Daito, T., Sanada, T., Yamamoto, N., Mifsud, E.J., Leong, C.R., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Seya, T., Oshiumi, H., 2016. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol* 7, 335. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00335>
- Krishnamachary, B., Cook, C., Kumar, A., Spikes, L., Chalise, P., Dhillon, N.K., 2021. Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity. *J Extracell Vesicles* 10, e12117. <https://doi.org/10.1002/jev2.12117>
- Krizanová, O., Ciampor, F., Veber, P., 1982. Influence of chlorpromazine on the replication of influenza virus in chick embryo cells. *Acta Virol* 26, 209–216.
- Kuate, S., Cinatl, J., Doerr, H.W., Uberla, K., 2007. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology* 362, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.011>
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A.S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., Penninger, J.M., 2005. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 11, 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
- Kumar, A., Singh, R., Kaur, J., Pandey, S., Sharma, V., Thakur, L., Sati, S., Mani, S., Asthana, S., Sharma, T.K., Chaudhuri, S., Bhattacharyya, S., Kumar, N., 2021. Wuhan to World: The COVID-19 Pandemic. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 596201. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.596201>

- Kumar, S., Karuppanan, K., Subramaniam, G., 2022. Omicron (BA.1) and sub-variants (BA.1.1, BA.2, and BA.3) of SARS-CoV-2 spike infectivity and pathogenicity: A comparative sequence and structural-based computational assessment. *J Med Virol* 94, 4780–4791. <https://doi.org/10.1002/jmv.27927>
- Kwon, Y., Nukala, S.B., Srivastava, S., Miyamoto, H., Ismail, N.I., Jousma, J., Rehman, J., Ong, S.-B., Lee, W.H., Ong, S.-G., 2020. Detection of viral RNA fragments in human iPSC cardiomyocytes following treatment with extracellular vesicles from SARS-CoV-2 coding sequence overexpressing lung epithelial cells. *Stem Cell Res Ther* 11, 514. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02033-7>
- Lässer, C., Alikhani, V.S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P.T., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötval, J., Valadi, H., 2011a. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>
- Lässer, C., O’Neil, S.E., Ekerljung, L., Ekström, K., Sjöstrand, M., Lötval, J., 2011b. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am J Rhinol Allergy* 25, 89–93. <https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3573>
- Lässer, C., O’Neil, S.E., Shelke, G.V., Sihlbom, C., Hansson, S.F., Gho, Y.S., Lundbäck, B., Lötval, J., 2016. Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J Transl Med* 14, 181. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0927-4>
- Law, A.H.Y., Lee, D.C.W., Cheung, B.K.W., Yim, H.C.H., Lau, A.S.Y., 2007. Role for nonstructural protein 1 of severe acute respiratory syndrome coronavirus in chemokine dysregulation. *J Virol* 81, 416–422. <https://doi.org/10.1128/JVI.02336-05>
- Le Corre, P., Loas, G., 2021. Repurposing functional inhibitors of acid sphingomyelinase (fiasmas): an opportunity against SARS-CoV-2 infection? *J Clin Pharm Ther* 46, 1213–1219. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13390>
- Le Mercier, P., Mariethoz, J., Lascano-Maillard, J., Bonnardel, F., Imbert, A., Ricard-Blum, S., Lisacek, F., 2019. A Bioinformatics View of Glycan-Virus Interactions. *Viruses* 11, E374. <https://doi.org/10.3390/v11040374>
- Lee, M.-S., Walker, R.E., Mendelman, P.M., 2005. Medical burden of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 infection among US children. Implications for design of vaccine trials. *Hum Vaccin* 1, 6–11. <https://doi.org/10.4161/hv.1.1.1424>
- Legros, V., Denolly, S., Vogrig, M., Boson, B., Siret, E., Rigail, J., Pillet, S., Grattard, F., Gonzalo, S., Verhoeven, P., Allatif, O., Berthelot, P., Pélissier, C., Thiery, G., Botelho-Nevers, E., Millet, G., Morel, J., Paul, S., Walzer, T., Cosset, F.-L., Bourlet, T., Pozzetto, B., 2021. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol* 18, 318–327. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00588-2>
- Lei, J., Kusov, Y., Hilgenfeld, R., 2018. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res* 149, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.001>
- Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., Wang, J., 2020a. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* 11, 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>
- Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., Wang, J., 2020b. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* 11, 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>
- Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotic, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y., Krogan, N.J., Plemenitas, A., Peterlin, B.M., 2010. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* 11, 110–122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01006.x>
- Levänen, B., Bhakta, N.R., Torregrosa Paredes, P., Barbeau, R., Hiltbrunner, S., Pollack, J.L., Sköld, C.M., Svartengren, M., Grunewald, J., Gabrielsson, S., Eklund, A.,

- Larsson, B.-M., Woodruff, P.G., Erle, D.J., Wheelock, Å.M., 2013. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 131, 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.039>
- Levine-Tiefenbrun, M., Yelin, I., Katz, R., Herzal, E., Golan, Z., Schreiber, L., Wolf, T., Nadler, V., Ben-Tov, A., Kuint, J., Gazit, S., Patalon, T., Chodick, G., Kishony, R., 2021. Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. *Nat Med* 27, 790–792. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01316-7>
- Li, F., Han, M., Dai, P., Xu, W., He, J., Tao, X., Wu, Y., Tong, X., Xia, X., Guo, W., Zhou, Y., Li, Yunguang, Zhu, Y., Zhang, X., Liu, Z., Aji, R., Cai, X., Li, Yutang, Qu, D., Chen, Y., Jiang, S., Wang, Q., Ji, H., Xie, Y., Sun, Y., Lu, L., Gao, D., 2021. Distinct mechanisms for TMPRSS2 expression explain organ-specific inhibition of SARS-CoV-2 infection by enzalutamide. *Nat Commun* 12, 866. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21171-x>
- Li, W., Qiao, J., You, Q., Zong, S., Peng, Q., Liu, Y., Hu, S., Liu, W., Li, S., Shu, X., Sun, B., 2021. SARS-CoV-2 Nsp5 Activates NF-κB Pathway by Upregulating SUMOylation of MAVS. *Front Immunol* 12, 750969. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750969>
- Li, X.C., Zhang, J., Zhuo, J.L., 2017. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacol Res* 125, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.005>
- Lian, N., Xie, H., Lin, S., Huang, J., Zhao, J., Lin, Q., 2020. Umifenovir treatment is not associated with improved outcomes in patients with coronavirus disease 2019: a retrospective study. *Clin Microbiol Infect* 26, 917–921. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.026>
- Lillehoj, E.P., Kato, K., Lu, W., Kim, K.C., 2013. Cellular and molecular biology of airway mucins. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 139–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00004-0>
- Lindenbergh, M.F.S., Stoorvogel, W., 2018. Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu Rev Immunol* 36, 435–459. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055700>
- Lion, T., 2014. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 27, 441–462. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>
- Liu, J., Cao, R., Xu, M., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., Li, Y., Hu, Z., Zhong, W., Wang, M., 2020. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* 6, 16. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>
- Liu, J., Li, Y., Liu, Q., Yao, Q., Wang, X., Zhang, H., Chen, R., Ren, L., Min, J., Deng, F., Yan, B., Liu, L., Hu, Z., Wang, M., Zhou, Y., 2021. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discov* 7, 17. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00249-2>
- Liu, J., Lu, F., Chen, Y., Plow, E., Qin, J., 2022. Integrin mediates cell entry of the SARS-CoV-2 virus independent of cellular receptor ACE2. *J Biol Chem* 298, 101710. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101710>
- Liu, Y.-M., Tseng, C.-H., Chen, Y.-C., Yu, W.-Y., Ho, M.-Y., Ho, C.-Y., Lai, M.M.C., Su, W.-C., 2019. Exosome-delivered and Y RNA-derived small RNA suppresses influenza virus replication. *J Biomed Sci* 26, 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0553-6>
- Logunov, D.Y., Dolzhikova, I.V., Shcheblyakov, D.V., Tukhvatulin, A.I., Zubkova, O.V., Dzharullaeva, A.S., Kovyrshina, A.V., Lubenets, N.L., Grousova, D.M., Erokhova, A.S., Botikov, A.G., Izhaeva, F.M., Popova, O., Ozharovskaya, T.A., Esmagambetov, I.B., Favorskaya, I.A., Zrelkin, D.I., Voronina, D.V., Shcherbinin, D.N., Semikhin, A.S., Simakova, Y.V., Tokarskaya, E.A., Egorova, D.A., Shmarov, M.M., Nikitenko, N.A., Gushchin, V.A., Smolyarchuk, E.A., Zyryanov, S.K., Borisevich, S.V., Naroditsky, B.S., Gintsburg, A.L., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group, 2021. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost

- COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 397, 671–681. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
- Longatti, A., 2015. The Dual Role of Exosomes in Hepatitis A and C Virus Transmission and Viral Immune Activation. *Viruses* 7, 6707–6715. <https://doi.org/10.3390/v7122967>
- Lopez Bernal, J., Andrews, N., Gower, C., Gallagher, E., Simmons, R., Thelwall, S., Stowe, J., Tessier, E., Groves, N., Dabrera, G., Myers, R., Campbell, C.N.J., Amirthalingam, G., Edmunds, M., Zambon, M., Brown, K.E., Hopkins, S., Chand, M., Ramsay, M., 2021. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med* 385, 585–594. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108891>
- Lu, L., Mok, B.W.Y., Chen, L.L., Chan, J.M.C., Tsang, O.T.Y., Lam, B.H.S., Chuang, V.W.M., Chu, A.W.H., Chan, W.M., Ip, J.D., Chan, B.P.C., Zhang, R., Yip, C.C.Y., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Jin, D.Y., Hung, I.F.N., Yuen, K.Y., Chen, H., To, K.K.W., 2022. Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. *Clin Infect Dis* 75, e822–e826. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
- Lu, X., Chen, Y., Bai, B., Hu, H., Tao, L., Yang, J., Chen, J., Chen, Z., Hu, Z., Wang, H., 2007. Immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus induced by virus-like particles in mice. *Immunology* 122, 496–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02676.x>
- Lubel, J., Garg, M., 2020. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Covid-19. *N Engl J Med* 382, e92. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2013707>
- Ludwig, A.-K., De Miroshedji, K., Doepfner, T.R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B.B., Jastrow, H., Kuhlmann, J.D., El Magraoui, F., Meyer, H.E., Hermann, D.M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., Horn, P.A., Giebel, B., 2018. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *J Extracell Vesicles* 7, 1528109. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>
- Ma, J., Chen, Y., Wu, W., Chen, Z., 2021. Structure and Function of N-Terminal Zinc Finger Domain of SARS-CoV-2 NSP2. *Virol Sin* 36, 1104–1112. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00431-6>
- Madhi, S.A., Baillie, V., Cutland, C.L., Voysey, M., Koen, A.L., Fairlie, L., Padayachee, S.D., Dheda, K., Barnabas, S.L., Bhorat, Q.E., Briner, C., Kwatra, G., Ahmed, K., Aley, P., Bhikha, S., Bhiman, J.N., Bhorat, A.E., du Plessis, J., Esmail, A., Groenewald, M., Horne, E., Hwa, S.-H., Jose, A., Lambe, T., Laubscher, M., Malahleha, M., Masenya, M., Masilela, M., McKenzie, S., Molapo, K., Moultrie, A., Oelofse, S., Patel, F., Pillay, S., Rhead, S., Rodel, H., Rossouw, L., Taoushanis, C., Tegally, H., Thombrayil, A., van Eck, S., Wibmer, C.K., Durham, N.M., Kelly, E.J., Villafana, T.L., Gilbert, S., Pollard, A.J., de Oliveira, T., Moore, P.L., Sigal, A., Izu, A., 2021. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *New England Journal of Medicine* 384, 1885–1898. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2102214>
- Magro, P., Zanella, I., Pescarolo, M., Castelli, F., Quiros-Roldan, E., 2021. Lopinavir/ritonavir: Repurposing an old drug for HIV infection in COVID-19 treatment. *Biomed J* 44, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.005>
- Mahase, E., 2021. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ* 375, n2713. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2713>
- Malone, B., Urakova, N., Snijder, E.J., Campbell, E.A., 2022. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 21–39. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
- Manna, V.J., Choi, H., Rotoli, S.M., Caradonna, S.J., 2022. The dynamic nature of the coronavirus receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in differentiating airway epithelia. *BBA Adv* 2, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2022.100044>
- Manning, A., Russell, V., Eastick, K., Leadbetter, G.H., Hallam, N., Templeton, K., Simmonds, P., 2006. Epidemiological profile and clinical associations of human

- bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 194, 1283–1290.
<https://doi.org/10.1086/508219>
- Mao, L., Wu, J., Shen, L., Yang, J., Chen, J., Xu, H., 2016. Enterovirus 71 transmission by exosomes establishes a productive infection in human neuroblastoma cells. *Virus Genes* 52, 189–194. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1292-3>
- Marceau, F., Bawolak, M.-T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., Gaudreault, R.C., Morissette, G., 2012. Cation trapping by cellular acidic compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 259, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.004>
- Martinez, M.A., 2020. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother* 64, e00399-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>
- Mathers, C.D., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., 2006. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001, in: Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T., Murray, C.J. (Eds.), *Global Burden of Disease and Risk Factors*. World Bank, Washington (DC).
- Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., Nagata, N., Sekizuka, T., Katoh, H., Kato, F., Sakata, M., Tahara, M., Kutsuna, S., Ohmagari, N., Kuroda, M., Suzuki, T., Kageyama, T., Takeda, M., 2020. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 7001–7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117>
- Matsuzawa, Y., Kimura, K., Ogawa, H., Tamura, K., 2022. Impact of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on COVID-19. *Hypertens Res* 45, 1147–1153.
<https://doi.org/10.1038/s41440-022-00922-3>
- McIntosh, K., 2002. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 346, 429–437. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011994>
- McMahon, J.H., Lau, J.S.Y., Coldham, A., Roney, J., Hagenauer, M., Price, S., Bryant, M., Garlick, J., Paterson, A., Lee, S.J., O'Bryan, J., Hearps, A., Tachedjian, G., Pinskiar, H., Phillips, C., Garrow, S., Pinskiar, N., Melvin, R., Blakeway, L., Wisniewski, J.A., Byers, S., Badoordeen, G.Z., Pereira, S., Pragastis, K., Trubiano, J.A., Chua, K.Y.L., Kainer, M., Molton, J.S., Gardiner, B.J., Pierce, A.B., Cheng, A., Rogers, B.A., Peleg, A.Y., 2022. Favipiravir in early symptomatic COVID-19, a randomised placebo-controlled trial. *EClinicalMedicine* 54, 101703.
<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101703>
- Meckes, D.G., Shair, K.H.Y., Marquitz, A.R., Kung, C.-P., Edwards, R.H., Raab-Traub, N., 2010. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20370–20375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014194107>
- Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I.A.T.M., Goonawardane, N., Saito, A., Kimura, I., Yamasoba, D., Gerber, P.P., Fatihi, S., Rathore, S., Zepeda, S.K., Papa, G., Kemp, S.A., Ikeda, T., Toyoda, M., Tan, T.S., Kuramochi, J., Mitsunaga, S., Ueno, T., Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Brevini, T., Mallery, D.L., Charles, O.J., CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration, Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Ecuador-COVID19 Consortium, Bowen, J.E., Joshi, A., Walls, A.C., Jackson, L., Martin, D., Smith, K.G.C., Bradley, J., Briggs, J.A.G., Choi, J., Madissoon, E., Meyer, K.B., Mlcochova, P., Ceron-Gutierrez, L., Doffinger, R., Teichmann, S.A., Fisher, A.J., Pizzuto, M.S., de Marco, A., Corti, D., Hosmillo, M., Lee, J.H., James, L.C., Thukral, L., Veessler, D., Sigal, A., Sampaziotis, F., Goodfellow, I.G., Matheson, N.J., Sato, K., Gupta, R.K., 2022. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature* 603, 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>
- Meng, B., Lever, A.M.L., 2021. The Interplay between ESCRT and Viral Factors in the Enveloped Virus Life Cycle. *Viruses* 13, 324. <https://doi.org/10.3390/v13020324>
- Mercado, N.B., Zahn, R., Wegmann, F., Loos, C., Chandrashekar, A., Yu, J., Liu, J., Peter, L., McMahan, K., Tostanoski, L.H., He, X., Martinez, D.R., Rutten, L., Bos, R., van Manen, D., Vellinga, J., Custers, J., Langedijk, J.P., Kwaks, T., Bakkers, M.J.G.,

- Zuijdgheest, D., Rosendahl Huber, S.K., Atyeo, C., Fischinger, S., Burke, J.S., Feldman, J., Hauser, B.M., Caradonna, T.M., Bondzie, E.A., Dagotto, G., Gebre, M.S., Hoffman, E., Jacob-Dolan, C., Kirilova, M., Li, Z., Lin, Z., Mahrokhian, S.H., Maxfield, L.F., Nampanya, F., Nityanandam, R., Nkolola, J.P., Patel, S., Ventura, J.D., Verrington, K., Wan, H., Pessaint, L., Van Ry, A., Blade, K., Strasbaugh, A., Cabus, M., Brown, R., Cook, A., Zouantchangadou, S., Teow, E., Andersen, H., Lewis, M.G., Cai, Y., Chen, B., Schmidt, A.G., Reeves, R.K., Baric, R.S., Lauffenburger, D.A., Alter, G., Stoffels, P., Mammen, M., Van Hoof, J., Schuitemaker, H., Barouch, D.H., 2020. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 586, 583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z>
- Mercer, J., Helenius, A., 2012. Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Curr Opin Microbiol* 15, 490–499. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.016>
- Meyerowitz, E.A., Richterman, A., Gandhi, R.T., Sax, P.E., 2021. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med* 174, 69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G., Martin, F., 2021. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biol* 18, 447–456. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1814556>
- Miknis, Z.J., Donaldson, E.F., Umland, T.C., Rimmer, R.A., Baric, R.S., Schultz, L.W., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J Virol* 83, 3007–3018. <https://doi.org/10.1128/JVI.01505-08>
- Miller, M.E., Adhikary, S., Kolokoltsov, A.A., Davey, R.A., 2012. Ebolavirus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection. *J Virol* 86, 7473–7483. <https://doi.org/10.1128/JVI.00136-12>
- Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J., 2006. Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>
- Mitterreiter, S., Page, R.M., Kamp, F., Hopson, J., Winkler, E., Ha, H.-R., Hamid, R., Herms, J., Mayer, T.U., Nelson, D.J., Steiner, H., Stahl, T., Zeitschel, U., Rossner, S., Haass, C., Lichtenthaler, S.F., 2010. Bepidil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. *J Neurosci* 30, 8974–8983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-10.2010>
- Mlcochova, P., Kemp, S.A., Dhar, M.S., Papa, G., Meng, B., Ferreira, I.A.T.M., Datir, R., Collier, D.A., Albecka, A., Singh, S., Pandey, R., Brown, J., Zhou, J., Goonawardane, N., Mishra, S., Whittaker, C., Mellan, T., Marwal, R., Datta, M., Sengupta, S., Ponnusamy, K., Radhakrishnan, V.S., Abdullahi, A., Charles, O., Chattopadhyay, P., Devi, P., Caputo, D., Peacock, T., Wattal, C., Goel, N., Satwik, A., Vaishya, R., Agarwal, M., Indian SARS-CoV-2 Genomics Consortium (INSACOG), Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration, Mavousian, A., Lee, J.H., Bassi, J., Silacci-Fegni, C., Saliba, C., Pinto, D., Irie, T., Yoshida, I., Hamilton, W.L., Sato, K., Bhatt, S., Flaxman, S., James, L.C., Corti, D., Piccoli, L., Barclay, W.S., Rakshit, P., Agrawal, A., Gupta, R.K., 2021. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* 599, 114–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>
- Morens, D.M., Daszak, P., Markel, H., Taubenberger, J.K., 2020. Pandemic COVID-19 Joins History's Pandemic Legion. *mBio* 11, e00812-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-20>
- Morens, D.M., Fauci, A.S., 2020. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell* 182, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>

- Morens, D.M., Taubenberger, J.K., Fauci, A.S., 2021. A Centenary Tale of Two Pandemics: The 1918 Influenza Pandemic and COVID-19, Part I. *Am J Public Health* 111, 1086–1094. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2021.306310>
- Morita, E., Sundquist, W.I., 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 395–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102350>
- Mortola, E., Roy, P., 2004. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Letters* 576, 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.009>
- Muik, A., Lui, B.G., Wallisch, A.-K., Bacher, M., Mühl, J., Reinholz, J., Ozhelvaci, O., Beckmann, N., Güimil Garcia, R. de la C., Poran, A., Shpyro, S., Finlayson, A., Cai, H., Yang, Q., Swanson, K.A., Türeci, Ö., Şahin, U., 2022. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron by BNT162b2 mRNA vaccine-elicited human sera. *Science* 375, 678–680. <https://doi.org/10.1126/science.abn7591>
- Musa, S.S., Bello, U.M., Zhao, S., Abdullahi, Z.U., Lawan, M.A., He, D., 2021. Vertical Transmission of SARS-CoV-2: A Systematic Review of Systematic Reviews. *Viruses* 13, 1877. <https://doi.org/10.3390/v13091877>
- Nair, H., Brooks, W.A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J.A., Madhi, S.A., Simmerman, J.M., Gordon, A., Sato, M., Howie, S., Krishnan, A., Ope, M., Lindblade, K.A., Carosone-Link, P., Lucero, M., Ochieng, W., Kamimoto, L., Dueger, E., Bhat, N., Vong, S., Theodoratou, E., Chittaganpitch, M., Chimah, O., Balmaseda, A., Buchy, P., Harris, E., Evans, V., Katayose, M., Gaur, B., O’Callaghan-Gordo, C., Goswami, D., Arvelo, W., Venter, M., Briese, T., Tokarz, R., Widdowson, M.-A., Mounts, A.W., Breiman, R.F., Feikin, D.R., Klugman, K.P., Olsen, S.J., Gessner, B.D., Wright, P.F., Rudan, I., Broor, S., Simões, E.A.F., Campbell, H., 2011. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 378, 1917–1930. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61051-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61051-9)
- Najjar-Debbiny, R., Gronich, N., Weber, G., Khoury, J., Amar, M., Stein, N., Goldstein, L.H., Saliba, W., 2022. Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe COVID-19 and Mortality in High Risk Patients. *Clin Infect Dis* ciac443. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac443>
- Nakamura, T., Hiraoka, K., Harada, R., Matsuzawa, T., Ishikawa, Y., Funaki, Y., Yoshikawa, T., Tashiro, M., Yanai, K., Okamura, N., 2019. Brain histamine H1 receptor occupancy after oral administration of desloratadine and loratadine. *Pharmacol Res Perspect* 7, e00499. <https://doi.org/10.1002/prp2.499>
- Nanduri, S., Pilishvili, T., Derado, G., Soe, M.M., Dollard, P., Wu, H., Li, Q., Bagchi, S., Dubendris, H., Link-Gelles, R., Jernigan, J.A., Budnitz, D., Bell, J., Benin, A., Shang, N., Edwards, J.R., Verani, J.R., Schrag, S.J., 2021. Effectiveness of Pfizer-BioNTech and Moderna Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Nursing Home Residents Before and During Widespread Circulation of the SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant - National Healthcare Safety Network, March 1-August 1, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70, 1163–1166. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7034e3>
- Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K.-I., Kurane, I., Akatsuka, T., 2003. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *J Gen Virol* 84, 1737–1741. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18883-0>
- Neuman, B.W., Adair, B.D., Yoshioka, C., Quispe, J.D., Orca, G., Kuhn, P., Milligan, R.A., Yeager, M., Buchmeier, M.J., 2006. Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *J Virol* 80, 7918–7928. <https://doi.org/10.1128/JVI.00645-06>
- Nextstrain [WWW Document], 2022. URL <https://nextstrain.org/> (accessed 11.22.22).
- Nguyen, D.H., Hildreth, J.E., 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74, 3264–3272. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3264-3272.2000>
- NICD.ac, 2021. . NICD. URL <https://www.nicd.ac.za/frequently-asked-questions-for-the-b-1-1-529-mutated-sars-cov-2-lineage-in-south-africa/> (accessed 11.17.22).

- Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Verdiá-Báguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodríguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog* 10, e1004077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>
- Norinder, U., Munic Kos, V., 2019. QSAR Models for Predicting Five Levels of Cellular Accumulation of Lysosomotropic Macrocycles. *Int J Mol Sci* 20, E5938. <https://doi.org/10.3390/ijms20235938>
- Nourian, A., Khalili, H., 2020. Sofosbuvir as a potential option for the treatment of COVID-19. *Acta Biomed* 91, 236–238. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i2.9609>
- Ogando, N.S., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Bredenbeek, P.J., Posthuma, C.C., Snijder, E.J., 2020. The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *J Virol* 94, e01246-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01246-20>
- Osman, S., Taylor, K.A., Allcock, N., Rainbow, R.D., Mahaut-Smith, M.P., 2016. Detachment of surface membrane invagination systems by cationic amphiphilic drugs. *Sci Rep* 6, 18536. <https://doi.org/10.1038/srep18536>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., Qian, Z., 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 11, 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
- Padmanabhan, P., Desikan, R., Dixit, N.M., 2020. Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS Comput Biol* 16, e1008461. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008461>
- Pakkanen, K., Salonen, E., Mäkelä, A.R., Oker-Blom, C., Vattulainen, I., Vuento, M., 2009. Desipramine induces disorder in cholesterol-rich membranes: implications for viral trafficking. *Phys Biol* 6, 046004. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/6/4/046004>
- Palacios, R., Patiño, E.G., de Oliveira Pirelli, R., Conde, M.T.R.P., Batista, A.P., Zeng, G., Xin, Q., Kallas, E.G., Flores, J., Ockenhouse, C.F., Gast, C., 2020. Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of treating Healthcare Professionals with the Adsorbed COVID-19 (Inactivated) Vaccine Manufactured by Sinovac - PROFISCOV: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* 21, 853. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04775-4>
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101, 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- Pandey, A., Nikam, A.N., Shreya, A.B., Mutalik, S.P., Gopalan, D., Kulkarni, S., Padya, B.S., Fernandes, G., Mutalik, S., Prassl, R., 2020. Potential therapeutic targets for combating SARS-CoV-2: Drug repurposing, clinical trials and recent advancements. *Life Sci* 256, 117883. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117883>
- Pattanakitsakul, S., Pongswai, J., Kanlaya, R., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., Thongboonkerd, V., 2010. Association of Alix with late endosomal lysobisphosphatidic acid is important for dengue virus infection in human endothelial cells. *J Proteome Res* 9, 4640–4648. <https://doi.org/10.1021/pr100357f>
- Peacock, T.P., Brown, J.C., Zhou, J., Thakur, N., Newman, J., Kugathasan, R., Sukhova, K., Kafrou, M., Bailey, D., Barclay, W.S., 2022. The SARS-CoV-2 variant, Omicron, shows rapid replication in human primary nasal epithelial cultures and efficiently uses the endosomal route of entry. <https://doi.org/10.1101/2021.12.31.474653>
- Pegtel, D.M., Peferoen, L., Amor, S., 2014. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0516>
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., Marsh, M., 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 12, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.004>

- Peng, H.T., Rhind, S.G., Beckett, A., 2021. Convalescent Plasma for the Prevention and Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Quantitative Analysis. *JMIR Public Health Surveill* 7, e25500. <https://doi.org/10.2196/25500>
- Peng, Q., Peng, R., Yuan, B., Zhao, J., Wang, M., Wang, X., Wang, Q., Sun, Y., Fan, Z., Qi, J., Gao, G.F., Shi, Y., 2020. Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2. *Cell Rep* 31, 107774. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107774>
- Pho, M.T., Ashok, A., Atwood, W.J., 2000. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 74, 2288–2292. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2288-2292.2000>
- Piccoli, E., Nadai, M., Caretta, C.M., Bergonzini, V., Del Vecchio, C., Ha, H.R., Bigler, L., Dal Zoppo, D., Faggini, E., Pettenazzo, A., Orlando, R., Salata, C., Calistri, A., Palù, G., Baritussio, A., 2011. Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype. *Biochem Pharmacol* 82, 1234–1249. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.090>
- Piret, J., Boivin, G., 2020. Pandemics Throughout History. *Front Microbiol* 11, 631736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.631736>
- Pizzato, M., Baraldi, C., Boscato Sopetto, G., Finozzi, D., Gentile, C., Gentile, M.D., Marconi, R., Paladino, D., Raoss, A., Riedmiller, I., Ur Rehman, H., Santini, A., Succetti, V., Volpini, L., 2022. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. *Frontiers in Virology* 1.
- Plante, J.A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B.A., Lokugamage, K.G., Zhang, X., Muruato, A.E., Zou, J., Fontes-Garfias, C.R., Mirchandani, D., Scharon, D., Bilello, J.P., Ku, Z., An, Z., Kalveram, B., Freiberg, A.N., Menachery, V.D., Xie, X., Plante, K.S., Weaver, S.C., Shi, P.-Y., 2021. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* 592, 116–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
- Plaze, M., Attali, D., Petit, A.-C., Blatzer, M., Simon-Loriere, E., Vinckier, F., Cachia, A., Chrétien, F., Gaillard, R., 2020. Repurposing chlorpromazine to treat COVID-19: The reCoVery study. *Encephale* 46, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2020.05.006>
- Plaze, M., Attali, D., Prot, M., Petit, A.-C., Blatzer, M., Vinckier, F., Levillayer, L., Chiaravalli, J., Perin-Dureau, F., Cachia, A., Friedlander, G., Chrétien, F., Simon-Loriere, E., Gaillard, R., 2021. Inhibition of the replication of SARS-CoV-2 in human cells by the FDA-approved drug chlorpromazine. *Int J Antimicrob Agents* 57, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106274>
- Pleet, M.L., Erickson, J., DeMarino, C., Barclay, R.A., Cowen, M., Lepene, B., Liang, J., Kuhn, J.H., Prugar, L., Stonier, S.W., Dye, J.M., Zhou, W., Liotta, L.A., Aman, M.J., Kashanchi, F., 2018. Ebola Virus VP40 Modulates Cell Cycle and Biogenesis of Extracellular Vesicles. *J Infect Dis* 218, S365–S387. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy472>
- Pleet, M.L., Mathiesen, A., DeMarino, C., Akpamagbo, Y.A., Barclay, R.A., Schwab, A., Iordanskiy, S., Sampey, G.C., Lepene, B., Nekhai, S., Aman, M.J., Kashanchi, F., 2016. Ebola VP40 in Exosomes Can Cause Immune Cell Dysfunction. *Front Microbiol* 7, 1765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01765>
- Pohjala, L., Utt, A., Varjak, M., Lulla, A., Merits, A., Ahola, T., Tammela, P., 2011. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. *PLoS One* 6, e28923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028923>
- Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K.A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W.V., Cooper, D., Frenck, R.W., Hammitt, L.L., Türeci, Ö., Nell, H., Schaefer, A., Ünal, S., Tresnan, D.B., Mather, S., Dormitzer, P.R., Şahin, U., Jansen, K.U., Gruber, W.C., C4591001 Clinical Trial Group, 2020. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 383, 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>

- Pollitzer, R., Organization, W.H., 1954. Plague. World Health Organization.
- Ponnusamy, R., Moll, R., Weimar, T., Mesters, J.R., Hilgenfeld, R., 2008. Variable oligomerization modes in coronavirus non-structural protein 9. *J Mol Biol* 383, 1081–1096. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.071>
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., Santambrogio, L., 2005. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol* 175, 2237–2243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2237>
- Pourkarim, F., Pourtaghi-Anvarian, S., Rezaee, H., 2022. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacol Res Perspect* 10, e00909. <https://doi.org/10.1002/prp2.909>
- Puray-Chavez, M., LaPak, K.M., Schrank, T.P., Elliott, J.L., Bhatt, D.P., Agajanian, M.J., Jasuja, R., Lawson, D.Q., Davis, K., Rothlauf, P.W., Liu, Z., Jo, H., Lee, N., Tenneti, K., Eschbach, J.E., Mugisha, C.S., Cousins, E.M., Cloer, E.W., Vuong, H.R., VanBlargan, L.A., Bailey, A.L., Gilchuk, P., Crowe, J.E., Diamond, M.S., Hayes, D.N., Whelan, S.P.J., Horani, A., Brody, S.L., Goldfarb, D., Major, M.B., Kutluay, S.B., 2021. Systematic analysis of SARS-CoV-2 infection of an ACE2-negative human airway cell. *Cell Reports* 36, 109364. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109364>
- Rajah, M.M., Bernier, A., Buchrieser, J., Schwartz, O., 2022. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *J Mol Biol* 434, 167280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167280>
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A.A., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H.W., Haagmans, B.L., Baumert, T.F., van der Laan, L.J.W., 2013. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13109–13113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>
- Rambaut, A., Holmes, E.C., O’Toole, Á., Hill, V., McCrone, J.T., Ruis, C., du Plessis, L., Pybus, O.G., 2020. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol* 5, 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Raoult, D., 2016. A Personal View of How Paleomicrobiology Aids Our Understanding of the Role of Lice in Plague Pandemics. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PoH-0001-2014>
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Raschetti, R., Vivanti, A.J., Vauloup-Fellous, C., Loi, B., Benachi, A., De Luca, D., 2020. Synthesis and systematic review of reported neonatal SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* 11, 5164. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18982-9>
- Ravindra, N.G., Alfajaro, M.M., Gasque, V., Habet, V., Wei, J., Filler, R.B., Huston, N.C., Wan, H., Szigeti-Buck, K., Wang, B., Wang, G., Montgomery, R.R., Eisenbarth, S.C., Williams, A., Pyle, A.M., Iwasaki, A., Horvath, T.L., Foxman, E.F., Pierce, R.W., van Dijk, D., Wilen, C.B., 2020. Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelium. *bioRxiv* 2020.05.06.081695. <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.081695>
- Rees-Spear, C., Muir, L., Griffith, S.A., Heaney, J., Aldon, Y., Snitselaar, J.L., Thomas, P., Graham, C., Seow, J., Lee, N., Rosa, A., Roustan, C., Houlihan, C.F., Sanders, R.W., Gupta, R.K., Cherepanov, P., Stauss, H.J., Nastouli, E., SAFER Investigators, Doores, K.J., van Gils, M.J., McCoy, L.E., 2021. The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Rep* 34, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108890>
- Reeves, J.D., Piefer, A.J., 2005. Emerging drug targets for antiretroviral therapy. *Drugs* 65, 1747–1766. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565130-00002>

- RILEY, J.C., 2010. Smallpox and American Indians Revisited. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 65, 445–477.
- Roingear, P., Eymieux, S., Burlaud-Gaillard, J., Hourieux, C., Patient, R., Blanchard, E., 2022. The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. *Cell Mol Life Sci* 79, 425. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04469-x>
- Roosbeh, F., Saeedi, M., Alizadeh-Navaei, R., Hedayatizadeh-Omran, A., Merat, S., Wentzel, H., Levi, J., Hill, A., Shamshirian, A., 2021. Sofosbuvir and daclatasvir for the treatment of COVID-19 outpatients: a double-blind, randomized controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 76, 753–757. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa501>
- Roth, S.L., Whittaker, G.R., 2011. Promotion of vesicular stomatitis virus fusion by the endosome-specific phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate (BMP). *FEBS Lett* 585, 865–869. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.015>
- Runz, S., Keller, S., Rupp, C., Stoock, A., Issa, Y., Koensgen, D., Mustea, A., Sehoul, J., Kristiansen, G., Altevogt, P., 2007. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol* 107, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.064>
- Russo, L.C., Tomasin, R., Matos, I.A., Manucci, A.C., Sowa, S.T., Dale, K., Caldecott, K.W., Lehtiö, L., Schechtman, D., Meotti, F.C., Bruni-Cardoso, A., Hoch, N.C., 2021. The SARS-CoV-2 Nsp3 macrodomain reverses PARP9/DTX3L-dependent ADP-ribosylation induced by interferon signaling. *J Biol Chem* 297, 101041. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101041>
- Sabino, E.C., Buss, L.F., Carvalho, M.P.S., Prete, C.A., Crispim, M.A.E., Fraiji, N.A., Pereira, R.H.M., Parag, K.V., da Silva Peixoto, P., Kraemer, M.U.G., Oikawa, M.K., Salomon, T., Cucunuba, Z.M., Castro, M.C., de Souza Santos, A.A., Nascimento, V.H., Pereira, H.S., Ferguson, N.M., Pybus, O.G., Kucharski, A., Busch, M.P., Dye, C., Faria, N.R., 2021. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet* 397, 452–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00183-5)
- Sakai, Y., Kawachi, K., Terada, Y., Omori, H., Matsuura, Y., Kamitani, W., 2017. Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology* 510, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.019>
- Salata, C., Baritussio, A., Munegato, D., Calistri, A., Ha, H.R., Bigler, L., Fabris, F., Parolin, C., Palù, G., Mirazimi, A., 2015. Amiodarone and metabolite MDEA inhibit Ebola virus infection by interfering with the viral entry process. *Pathog Dis* 73, ftv032. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv032>
- Salata, C., Calistri, A., Parolin, C., Baritussio, A., Palù, G., 2017. Antiviral activity of cationic amphiphilic drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 15, 483–492. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1305888>
- Salje, H., Tran Kiem, C., Lefrancq, N., Courtejoie, N., Bosetti, P., Paireau, J., Andronico, A., Hozé, N., Richet, J., Dubost, C.-L., Le Strat, Y., Lessler, J., Levy-Bruhl, D., Fontanet, A., Opatowski, L., Boelle, P.-Y., Cauchemez, S., 2020. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science* 369, 208–211. <https://doi.org/10.1126/science.abc3517>
- Sanda, M., Morrison, L., Goldman, R., 2021. N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Anal Chem* 93, 2003–2009. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03173>
- Saramago, M., Costa, V.G., Souza, C.S., Bárria, C., Domingues, S., Viegas, S.C., Lousa, D., Soares, C.M., Arraiano, C.M., Matos, R.G., 2022. The nsp15 Nuclease as a Good Target to Combat SARS-CoV-2: Mechanism of Action and Its Inactivation with FDA-Approved Drugs. *Microorganisms* 10, 342. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020342>
- Saul, S., Einav, S., 2020. Old Drugs for a New Virus: Repurposed Approaches for Combating COVID-19. *ACS Infect Dis* 6, 2304–2318. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00343>

- Savarino, A., Boelaert, J.R., Cassone, A., Majori, G., Cauda, R., 2003. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis* 3, 722–727. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00806-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00806-5)
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* 380, 499–506. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1899-0_79
- Schaefer, M.R., Wonderlich, E.R., Roeth, J.F., Leonard, J.A., Collins, K.L., 2008. HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog* 4, e1000131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000131>
- Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., Smith, V.L., 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 16, 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- Schorey, J.S., Harding, C.V., 2016. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J Clin Invest* 126, 1181–1189. <https://doi.org/10.1172/JCI81132>
- Schubert, K., Karousis, E.D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L.-A., Leibundgut, M., Thiel, V., Mühlemann, O., Ban, N., 2020. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* 27, 959–966. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0511-8>
- Schwab, A., Meyering, S.S., Lepene, B., Iordanskiy, S., van Hoek, M.L., Hakami, R.M., Kashanchi, F., 2015. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front Microbiol* 6, 1132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01132>
- Seidah, N.G., Abifadel, M., Prost, S., Boileau, C., Prat, A., 2012. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev* 69, 33–52. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012989>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F., 2020. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
- Shay, D.K., Holman, R.C., Newman, R.D., Liu, L.L., Stout, J.W., Anderson, L.J., 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 282, 1440–1446. <https://doi.org/10.1001/jama.282.15.1440>
- Sheahan, T.P., Sims, A.C., Graham, R.L., Menachery, V.D., Gralinski, L.E., Case, J.B., Leist, S.R., Pirc, K., Feng, J.Y., Trantcheva, I., Bannister, R., Park, Y., Babusis, D., Clarke, M.O., Mackman, R.L., Spahn, J.E., Palmiotti, C.A., Siegel, D., Ray, A.S., Cihlar, T., Jordan, R., Denison, M.R., Baric, R.S., 2017. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci Transl Med* 9, eaal3653. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653>
- Sheahan, T.P., Sims, A.C., Zhou, S., Graham, R.L., Pruijssers, A.J., Agostini, M.L., Leist, S.R., Schäfer, A., Dinno, K.H., Stevens, L.J., Chappell, J.D., Lu, X., Hughes, T.M., George, A.S., Hill, C.S., Montgomery, S.A., Brown, A.J., Bluemling, G.R., Natchus, M.G., Saindane, M., Kolykhalov, A.A., Painter, G., Harcourt, J., Tamin, A., Thornburg, N.J., Swanstrom, R., Denison, M.R., Baric, R.S., 2020. 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, eabb5883. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
- Shen, Q., Li, J., Zhang, Z., Guo, S., Wang, Q., An, X., Chang, H., 2022. COVID-19: systemic pathology and its implications for therapy. *Int J Biol Sci* 18, 386–408. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65911>
- Shi, T., McAllister, D.A., O'Brien, K.L., Simoes, E.A.F., Madhi, S.A., Gessner, B.D., Polack, F.P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., Alassani, I., Ali, A., Antonio, M., Awasthi, S., Awori, J.O., Azziz-Baumgartner, E., Baggett, H.C., Baillie, V.L., Balmaseda, A., Barahona, A., Basnet, S., Bassat, Q., Basualdo, W., Bigogo, G., Bont, L., Breiman, R.F., Brooks, W.A., Broor, S., Bruce, N., Bruden, D., Buchy, P., Campbell, S.,

- Carosone-Link, P., Chadha, M., Chipeta, J., Chou, M., Clara, W., Cohen, C., de Cuellar, E., Dang, D.-A., Dash-Yandag, B., Deloria-Knoll, M., Dherani, M., Eap, T., Ebruke, B.E., Echavarria, M., de Freitas Lázaro Emediato, C.C., Fasce, R.A., Feikin, D.R., Feng, L., Gentile, A., Gordon, A., Goswami, D., Goyet, S., Groome, M., Halasa, N., Hirve, S., Homaira, N., Howie, S.R.C., Jara, J., Jroundi, I., Kartasasmita, C.B., Khuri-Bulos, N., Kotloff, K.L., Krishnan, A., Libster, R., Lopez, O., Lucero, M.G., Lucion, F., Lupisan, S.P., Marcone, D.N., McCracken, J.P., Mejia, M., Moisi, J.C., Montgomery, J.M., Moore, D.P., Moraleda, C., Moyes, J., Munywoki, P., Mutyara, K., Nicol, M.P., Nokes, D.J., Nymadawa, P., da Costa Oliveira, M.T., Oshitani, H., Pandey, N., Paranhos-Baccalà, G., Phillips, L.N., Picot, V.S., Rahman, M., Rakoto-Andrianarivelo, M., Rasmussen, Z.A., Rath, B.A., Robinson, A., Romero, C., Russomando, G., Salimi, V., Sawatwong, P., Scheltema, N., Schweiger, B., Scott, J.A.G., Seidenberg, P., Shen, K., Singleton, R., Sotomayor, V., Strand, T.A., Sutanto, A., Sylla, M., Tapia, M.D., Thamthitawat, S., Thomas, E.D., Tokarz, R., Turner, C., Venter, M., Waicharoen, S., Wang, J., Watthanaworawit, W., Yoshida, L.-M., Yu, H., Zar, H.J., Campbell, H., Nair, H., RSV Global Epidemiology Network, 2017. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 390, 946–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
- Shieh, W.-J., 2022. Human adenovirus infections in pediatric population - An update on clinico-pathologic correlation. *Biomed J* 45, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.08.009>
- Shin, D.H., Smith, D.M., Choi, J.Y., 2022. SARS-CoV-2 Omicron Variant of Concern: Everything You Wanted to Know about Omicron but Were Afraid to Ask. *Yonsei Med J* 63, 977–983. <https://doi.org/10.3349/ymj.2022.0383>
- Shrimp, J.H., Kales, S.C., Sanderson, P.E., Simeonov, A., Shen, M., Hall, M.D., 2020. An Enzymatic TMPRSS2 Assay for Assessment of Clinical Candidates and Discovery of Inhibitors as Potential Treatment of COVID-19. *ACS Pharmacol Transl Sci* 3, 997–1007. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00106>
- Shurer, C.R., Kuo, J.C.-H., Roberts, L.M., Gandhi, J.G., Colville, M.J., Enoki, T.A., Pan, H., Su, J., Noble, J.M., Hollander, M.J., O'Donnell, J.P., Yin, R., Pedram, K., Möckl, L., Kourkoutis, L.F., Moerner, W.E., Bertozzi, C.R., Feigenson, G.W., Reesink, H.L., Paszek, M.J., 2019. Physical Principles of Membrane Shape Regulation by the Glycocalyx. *Cell* 177, 1757-1770.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.017>
- Silverman, J.M., Reiner, N.E., 2011. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>
- Sin, J., McIntyre, L., Stotland, A., Feuer, R., Gottlieb, R.A., 2017. Coxsackievirus B Escapes the Infected Cell in Ejected Mitophagosomes. *J Virol* 91, e01347-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01347-17>
- Sissoko, D., Laouenan, C., Folkesson, E., M'Lebing, A.-B., Beavogui, A.-H., Baize, S., Camara, A.-M., Maes, P., Shepherd, S., Danel, C., Carazo, S., Conde, M.N., Gala, J.-L., Colin, G., Savini, H., Bore, J.A., Le Marcis, F., Koundouno, Fara Raymond, Petitjean, F., Lamah, M.-C., Diederich, S., Tounkara, A., Poelart, G., Berbain, E., Dindart, J.-M., Duraffour, S., Lefevre, A., Leno, T., Peyrouset, O., Irengé, L., Bangoura, N., Palich, R., Hinzmann, J., Kraus, A., Barry, T.S., Berette, S., Bongono, A., Camara, M.S., Munoz, V.C., Doumbouya, L., Harouna, S., Kighoma, P.M., Koundouno, Fara Roger, Lolamou, R., Loua, C.M., Massala, V., Moumouni, K., Provost, C., Samake, N., Sekou, C., Soumah, A., Arnould, I., Komano, M.S., Gustin, L., Berutto, C., Camara, D., Camara, F.S., Colpaert, J., Delamou, L., Jansson, L., Kourouma, E., Loua, M., Malme, K., Manfrin, E., Maomou, A., Milinouno, A., Ombelet, S., Sidiboun, A.Y., Verreckt, I., Yombouno, P., Bocquin, A., Carbonnelle, C., Carmoi, T., Frange, P., Mely, S., Nguyen, V.-K., Pannetier, D., Taburet, A.-M., Treluyer, J.-M., Kolie, J., Moh, R., Gonzalez, M.C., Kuisma, E., Liedigk, B., Ngabo,

- D., Rudolf, M., Thom, R., Kerber, R., Gabriel, M., Di Caro, A., Wölfel, R., Badir, J., Bentahir, M., Deccache, Y., Dumont, C., Durant, J.-F., El Bakkouri, K., Uwamahoro, M.G., Smits, B., Toufik, N., Van Cauwenberghe, S., Ezzedine, K., D'Ortenzio, E., Pizarro, L., Etienne, A., Guedj, J., Fizet, A., de Sainte Fare, E.B., Murgue, B., Tran-Minh, T., Rapp, C., Piguët, P., Poncin, M., Draguez, B., Duverger, T.A., Barbe, S., Baret, G., Defourny, I., Carroll, M., Raoul, H., Augier, A., Eholie, S.P., Yazdanpanah, Y., Levy-Marchal, C., Antierrens, A., Van Herp, M., Günther, S., de Lamballerie, X., Keïta, S., Mentre, F., Anglaret, X., Malvy, D., JIKI Study Group, 2016. Correction: 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, e1002009. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002009>
- Smith, J.C., Sausville, E.L., Girish, V., Yuan, M.L., Vasudevan, A., John, K.M., Sheltzer, J.M., 2020. Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract. *Dev Cell* 53, 514-529.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.012>
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J.M., Gorbalenya, A.E., 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* 331, 991–1004. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00865-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00865-9)
- Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2015. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol* 2, 265–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055218>
- Stadler, K., Ha, H.R., Ciminale, V., Spirli, C., Saletti, G., Schiavon, M., Bruttomesso, D., Bigler, L., Follath, F., Pettenazzo, A., Baritussio, A., 2008. Amiodarone alters late endosomes and inhibits SARS coronavirus infection at a post-endosomal level. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 142–149. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0217OC>
- Stefanski, A.L., Martinez, N., Peterson, L.K., Callahan, T.J., Treacy, E., Luck, M., Friend, S.F., Hermes, A., Maltepe, E., Phang, T., Dragone, L.L., Winn, V.D., 2019. Murine trophoblast-derived and pregnancy-associated exosome-enriched extracellular vesicle microRNAs: Implications for placenta driven effects on maternal physiology. *PLoS One* 14, e0210675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210675>
- Street, J.M., Barran, P.E., Mackay, C.L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T.S., Chalmers, R.T.A., Webb, D.J., Dear, J.W., 2012. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-5>
- Subissi, L., Posthuma, C.C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Gorbalenya, A.E., Decroly, E., Snijder, E.J., Canard, B., Imbert, I., 2014. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3900-3909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323705111>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Record, M., 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 51, 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
- Sullivan, E., Sung, P.-Y., Wu, W., Berry, N., Kempster, S., Ferguson, D., Almond, N., Jones, I.M., Roy, P., 2022. SARS-CoV-2 Virus-like Particles Produced by a Single Recombinant Baculovirus Generate Anti-S Antibody and Protect against Variant Challenge. *Viruses* 14, 914. <https://doi.org/10.3390/v14050914>
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., Frenette, G., 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.005>
- Sun, S.-H., Chen, Q., Gu, H.-J., Yang, G., Wang, Y.-X., Huang, X.-Y., Liu, S.-S., Zhang, N.-N., Li, X.-F., Xiong, R., Guo, Y., Deng, Y.-Q., Huang, W.-J., Liu, Q., Liu, Q.-M., Shen, Y.-L., Zhou, Y., Yang, X., Zhao, T.-Y., Fan, C.-F., Zhou, Y.-S., Qin, C.-F., Wang, Y.-

- C., 2020. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 28, 124-133.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
- Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., HCA Lung Biological Network, 2020a. SARS-CoV-2 Entry Genes Are Most Highly Expressed in Nasal Goblet and Ciliated Cells within Human Airways. *ArXiv arXiv:2003.06122v1*.
- Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K.B., Yoshida, M., Barnes, J.L., HCA Lung Biological Network, 2020b. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 26, 681–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>
- Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L.L.M., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J.M., Stuart, D.I., 2004. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* 12, 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.01.016>
- Synowiec, A., Szczepański, A., Barreto-Duran, E., Lie, L.K., Pyrc, K., 2021. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clin Microbiol Rev* 34, e00133-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00133-20>
- Taghavi, S., Abdullah, S., Shaheen, F., Mueller, L., Gagen, B., Duchesne, J., Steele, C., Pociask, D., Kolls, J., Jackson-Weaver, O., 2022. Glycocalyx degradation and the endotheliopathy of viral infection. *PLoS One* 17, e0276232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276232>
- Tang, J.W., Tambyah, P.A., Hui, D.S., 2021. Emergence of a new SARS-CoV-2 variant in the UK. *J Infect* 82, e27–e28. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.12.024>
- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J.A., Whittaker, G.R., Daniel, S., 2020. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res* 178, 104792. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Tanne, J.H., 2020. Covid-19: FDA approves use of convalescent plasma to treat critically ill patients. *BMJ* 368, m1256. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1256>
- Taylor, R., Bowen, R., Demarest, J.F., DeSpirito, M., Hartwig, A., Bielefeldt-Ohmann, H., Walling, D.M., Mathis, A., Babu, Y.S., 2021. Activity of Galidesivir in a Hamster Model of SARS-CoV-2. *Viruses* 14, 8. <https://doi.org/10.3390/v14010008>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E.J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A.J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., Petruccione, F., Sigal, A., Hardie, D., Marais, G., Hsiao, N.-Y., Korsman, S., Davies, M.-A., Tyers, L., Mudau, I., York, D., Maslo, C., Goedhals, D., Abrahams, S., Laguda-Akingba, O., Alisoltani-Dehkordi, A., Godzik, A., Wibmer, C.K., Sewell, B.T., Lourenço, J., Alcantara, L.C.J., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S., Martin, D., Lessells, R.J., Bhiman, J.N., Williamson, C., de Oliveira, T., 2021. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592, 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Temmam, S., Vongphayloth, K., Baquero, E., Munier, S., Bonomi, M., Regnault, B., Douangboubpha, B., Karami, Y., Chrétien, D., Sanamxay, D., Xayaphet, V., Paphaphanh, P., Lacoste, V., Somlor, S., Lakeomany, K., Phommavanh, N., Pérot, P., Dehan, O., Amara, F., Donati, F., Bigot, T., Nilges, M., Rey, F.A., van der Werf, S., Brey, P.T., Eloit, M., 2022. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature* 604, 330–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>
- Tey, S.K., Lam, H., Wong, S.W.K., Zhao, H., To, K.K., Yam, J.W.P., 2022. ACE2-enriched extracellular vesicles enhance infectivity of live SARS-CoV-2 virus. *J Extracell Vesicles* 11, e12231. <https://doi.org/10.1002/jev2.12231>
- Thaingtamtanha, T., Baeurle, S.A., 2022. Study of protease-mediated processes initiating viral infection and cell-cell viral spreading of SARS-CoV-2. *J Mol Model* 28, 224. <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05206-8>

- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matej, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D., 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24, 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., Ayre, D.C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N.N., Baxter, A.A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A.C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F.E., Bosch, S., Boulanger, C.M., Breakefield, X., Breglio, A.M., Brennan, M.Á., Brigstock, D.R., Brisson, A., Broekman, M.L., Bromberg, J.F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A.H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E.I., Byrd, J.B., Camussi, G., Carter, D.R., Caruso, S., Chamley, L.W., Chang, Y.-T., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A.R., Clayton, A., Clerici, S.P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R.J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F.A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M.F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., de Candia, P., De Santana, E.F., De Wever, O., Del Portillo, H.A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L.C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A.P., Dominici, M., Dourado, M.R., Driedonks, T.A., Duarte, F.V., Duncan, H.M., Eichenberger, R.M., Ekström, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J.M., Fatima, F., Fish, J.E., Flores-Bellver, M., Förstner, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Gho, Y.S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D.C., Görgens, A., Gorski, S.M., Greening, D.W., Gross, J.C., Gualerzi, A., Gupta, G.N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszti, R.A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A.F., Hochberg, F.H., Hoffmann, K.F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A.G.-E., Ikezu, T., Inal, J.M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H.K., Jacobsen, S., Jay, S.M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S.M., Jones, J.C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S.-I., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E.T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K.P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D.J., Kornek, M., Kosanović, M.M., Kovács, Á.F., Krämer-Albers, E.-M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I.V., Kusuma, G.D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S.M., Languino, L.R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L.C., Lavieu, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M.-S., Lee, Y.X.F., Lemos, D.S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I.T., Liao, K., Libregts, S.F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S.K., Linē, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C.A., Lorenowicz, M.J., Lörlin, Á.M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M.C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T.R., Maas, S.L., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E.S., Martin-Jaular, L., Martinez, M.C., Martins, V.R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Mauerer, M., McGinnis, L.K., McVey, M.J., Meckes, D.G., Meehan, K.L., Mertens, I., Minciocchi, V.R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D.C., Myburgh, K.H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsum, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J.P., Nolte-'t Hoen, E.N., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loughlin, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L.A., Osteikoetxea, X., Østergaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D.M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M.W., Phinney, D.G., Pieters, B.C., Pink, R.C., Pisetsky, D.S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I.K., Powell, B.H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R.L., Raimondo, S., Rak, J.,

- Ramirez, M.I., Raposo, G., Rayyan, M.S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F.L., Robbins, P.D., Roberts, D.D., Rodrigues, S.C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K.M., Rughetti, A., Russell, A.E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J.A., Saul, M.J., Schiffelers, R.M., Schneider, R., Schøyen, T.H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G.V., Shetty, A.K., Shiba, K., Siljander, P.R.-M., Silva, A.M., Skowronek, A., Snyder, O.L., Soares, R.P., Sódar, B.W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P.D., Stoorvogel, W., Stott, S.L., Strasser, E.F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W.S., Tomasini, R., Torrecilhas, A.C., Tosar, J.P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B.W., van der Grein, S.G., Van Deun, J., van Herwijnen, M.J., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M.E., van Wijnen, A.J., Vasconcelos, M.H., Vechetti, I.J., Veit, T.D., Vella, L.J., Velot, É., Verweij, F.J., Vestad, B., Viñas, J.L., Visnovitz, T., Vukman, K.V., Wahlgren, J., Watson, D.C., Wauben, M.H., Weaver, A., Webber, J.P., Weber, V., Wehman, A.M., Weiss, D.J., Welsh, J.A., Wendt, S., Wheelock, A.M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J.-Y., Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A.R., Zickler, A.M., Zimmermann, P., Zivkovic, A.M., Zocco, D., Zuba-Surma, E.K., 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thèves, C., Crubézy, E., Biagini, P., 2016. History of Smallpox and Its Spread in Human Populations. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PoH-0004-2014>
- Thompson, W.W., Weintraub, E., Dhankhar, P., Cheng, P.-Y., Brammer, L., Meltzer, M.I., Bresee, J.S., Shay, D.K., 2009. Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods. *Influenza Other Respir Viruses* 3, 37–49. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00073.x>
- Thoms, M., Buschauer, R., Ameismeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hayn, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J.H., Stürzel, C.M., Fröhlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K.M.J., Beckmann, R., 2020. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* 369, 1249–1255. <https://doi.org/10.1126/science.abc8665>
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J., 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238–33243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
- Tortorici, M.A., Veasler, D., 2019. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res* 105, 93–116. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Troyer, Z., Alhusaini, N., Tabler, C.O., Sweet, T., de Carvalho, K.I.L., Schlatzer, D.M., Carias, L., King, C.L., Matreyek, K., Tilton, J.C., 2021. Extracellular vesicles carry SARS-CoV-2 spike protein and serve as decoys for neutralizing antibodies. *J Extracell Vesicles* 10, e12112. <https://doi.org/10.1002/jev2.12112>
- Trypsteen, W., Van Cleemput, J., Snippenberg, W. van, Gerlo, S., Vandekerckhove, L., 2020. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLoS Pathog* 16, e1009037. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009037>
- Tseng, Y.-T., Wang, S.-M., Huang, K.-J., Lee, A.I.-R., Chiang, C.-C., Wang, C.-T., 2010. Self-assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Membrane

- Protein *. *Journal of Biological Chemistry* 285, 12862–12872.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030270>
- Tulbah, A.S., Lee, W.-H., 2021. Physicochemical Characteristics and In Vitro Toxicity/Anti-SARS-CoV-2 Activity of Favipiravir Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). *Pharmaceuticals (Basel)* 14, 1059. <https://doi.org/10.3390/ph14101059>
- Tummino, T.A., Rezelj, V.V., Fischer, B., Fischer, A., O'Meara, M.J., Monel, B., Vallet, T., White, K.M., Zhang, Z., Alon, A., Schadt, H., O'Donnell, H.R., Lyu, J., Rosales, R., McGovern, B.L., Rathnasinghe, R., Jangra, S., Schotsaert, M., Galarneau, J.-R., Krogan, N.J., Urban, L., Shokat, K.M., Kruse, A.C., García-Sastre, A., Schwartz, O., Moretti, F., Vignuzzi, M., Pognan, F., Shoichet, B.K., 2021. Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2. *Science* 373, 541–547. <https://doi.org/10.1126/science.abi4708>
- Uno, Y., 2020. Camostat mesilate therapy for COVID-19. *Intern Emerg Med* 15, 1577–1578. <https://doi.org/10.1007/s11739-020-02345-9>
- Urata, S., Yasuda, J., 2012. Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. *Viruses* 4, 2049–2079. <https://doi.org/10.3390/v4102049>
- Urbanelli, L., Buratta, S., Tancini, B., Sagini, K., Delo, F., Porcellati, S., Emiliani, C., 2019. The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission. *Vaccines (Basel)* 7, E102. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030102>
- Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J., Freymuth, F., 2009. [Human coronaviruses]. *Pathol Biol (Paris)* 57, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.02.018>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van Niel, G., Carter, D.R.F., Clayton, A., Lambert, D.W., Raposo, G., Vader, P., 2022. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 369–382. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00460-3>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., Raposo, G., 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vandini, S., Biagi, C., Fischer, M., Lanari, M., 2019. Impact of Rhinovirus Infections in Children. *Viruses* 11, E521. <https://doi.org/10.3390/v11060521>
- Villoutreix, B.O., Beaune, P.H., Tamouza, R., Krishnamoorthy, R., Leboyer, M., 2020. Prevention of COVID-19 by drug repurposing: rationale from drugs prescribed for mental disorders. *Drug Discov Today* 25, 1287–1290. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.06.022>
- Villoutreix, B.O., Krishnamoorthy, R., Tamouza, R., Leboyer, M., Beaune, P., 2021. Chemoinformatic Analysis of Psychotropic and Antihistaminic Drugs in the Light of Experimental Anti-SARS-CoV-2 Activities. *Adv Appl Bioinform Chem* 14, 71–85. <https://doi.org/10.2147/AABC.S304649>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J.C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W.R., Laydon, D.J., Dabrera, G., O'Toole, Á., Amato, R., Ragonnet-Cronin, M., Harrison, I., Jackson, B., Ariani, C.V., Boyd, O., Loman, N.J., McCrone, J.T., Gonçalves, S., Jorgensen, D., Myers, R., Hill, V., Jackson, D.K., Gaythorpe, K., Groves, N., Sillitoe, J., Kwiatkowski, D.P., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium, Flaxman, S., Ratmann, O., Bhatt, S., Hopkins, S., Gandy, A., Rambaut, A., Ferguson, N.M., 2021.

- Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* 593, 266–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x>
- Walls, A., Tortorici, M.A., Bosch, B.-J., Frenz, B., Rottier, P.J.M., DiMaio, F., Rey, F.A., Veessler, D., 2016. Crucial steps in the structure determination of a coronavirus spike glycoprotein using cryo-electron microscopy. *Protein Sci* 26, 113–121. <https://doi.org/10.1002/pro.3048>
- Walls, A.C., Park, Y.-J., Tortorici, M.A., Wall, A., McGuire, A.T., Veessler, D., 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Walls, A.C., Tortorici, M.A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B.-J., Rey, F.A., Veessler, D., 2017. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 11157–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
- Wang, D., Li, Z., Liu, Y., 2020. An overview of the safety, clinical application and antiviral research of the COVID-19 therapeutics. *J Infect Public Health* 13, 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.004>
- Wang, L.-F., Lin, Y.-S., Huang, N.-C., Yu, C.-Y., Tsai, W.-L., Chen, J.-J., Kubota, T., Matsuoka, M., Chen, S.-R., Yang, C.-S., Lu, R.-W., Lin, Y.-L., Chang, T.-H., 2015. Hydroxychloroquine-inhibited dengue virus is associated with host defense machinery. *J Interferon Cytokine Res* 35, 143–156. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0038>
- Wang, L.H., Rothberg, K.G., Anderson, R.G., 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123, 1107–1117. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.5.1107>
- 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>
- Wang, W., Zhou, Z., Xiao, X., Tian, Z., Dong, X., Wang, C., Li, L., Ren, L., Lei, X., Xiang, Z., Wang, J., 2021. SARS-CoV-2 nsp12 attenuates type I interferon production by inhibiting IRF3 nuclear translocation. *Cell Mol Immunol* 18, 945–953. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00619-y>
- Wang, Xi, Cao, R., Zhang, H., Liu, J., Xu, M., Hu, H., Li, Y., Zhao, L., Li, W., Sun, X., Yang, X., Shi, Z., Deng, F., Hu, Z., Zhong, W., Wang, M., 2020. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov* 6, 28. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0169-8>
- Wang, X., Xia, S., Wang, Q., Xu, W., Li, W., Lu, L., Jiang, S., 2020. Broad-Spectrum Coronavirus Fusion Inhibitors to Combat COVID-19 and Other Emerging Coronavirus Diseases. *Int J Mol Sci* 21, E3843. <https://doi.org/10.3390/ijms21113843>
- Wang, Y., Huo, P., Dai, R., Lv, X., Yuan, S., Zhang, Y., Guo, Y., Li, R., Yu, Q., Zhu, K., 2021. Convalescent plasma may be a possible treatment for COVID-19: A systematic review. *Int Immunopharmacol* 91, 107262. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107262>
- Wang, Yeming, Zhang, D., Du, G., Du, R., Zhao, J., Jin, Y., Fu, S., Gao, L., Cheng, Z., Lu, Q., Hu, Y., Luo, G., Wang, K., Lu, Y., Li, H., Wang, S., Ruan, S., Yang, C., Mei, C., Wang, Yi, Ding, D., Wu, F., Tang, X., Ye, X., Ye, Y., Liu, B., Yang, J., Yin, W., Wang, A., Fan, G., Zhou, F., Liu, Z., Gu, X., Xu, J., Shang, L., Zhang, Y., Cao, L., Guo, T., Wan, Y., Qin, H., Jiang, Y., Jaki, T., Hayden, F.G., Horby, P.W., Cao, B., Wang, C., 2020. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 395, 1569–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31022-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
- Warren, T.K., Jordan, R., Lo, M.K., Ray, A.S., Mackman, R.L., Soloveva, V., Siegel, D., Perron, M., Bannister, R., Hui, H.C., Larson, N., Strickley, R., Wells, J., Stuthman, K.S., Van Tongeren, S.A., Garza, N.L., Donnelly, G., Shurtleff, A.C., Retterer, C.J., Gharaibeh, D., Zamani, R., Kenny, T., Eaton, B.P., Grimes, E., Welch, L.S., Gomba,

- L., Wilhelmsen, C.L., Nichols, D.K., Nuss, J.E., Nagle, E.R., Kugelman, J.R., Palacios, G., Doerffler, E., Neville, S., Carra, E., Clarke, M.O., Zhang, L., Lew, W., Ross, B., Wang, Q., Chun, K., Wolfe, L., Babusis, D., Park, Y., Stray, K.M., Trancheva, I., Feng, J.Y., Barauskas, O., Xu, Y., Wong, P., Braun, M.R., Flint, M., McMullan, L.K., Chen, S.-S., Fearn, R., Swaminathan, S., Mayers, D.L., Spiropoulou, C.F., Lee, W.A., Nichol, S.T., Cihlar, T., Bavari, S., 2016. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature* 531, 381–385. <https://doi.org/10.1038/nature17180>
- Wat, D., 2004. The common cold: a review of the literature. *Eur J Intern Med* 15, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2004.01.006>
- Weglarz-Tomczak, E., Tomczak, J.M., Talma, M., Burda-Grabowska, M., Giurg, M., Brul, S., 2021. Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2. *Sci Rep* 11, 3640. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83229-6>
- Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J.C., Muecksch, F., Rutkowska, M., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Luchsinger, L., Hillyer, C.D., Caskey, M., Robbiani, D.F., Rice, C.M., Nussenzweig, M.C., Hatziioannou, T., Bieniasz, P.D., 2020. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife* 9, e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>
- Wen, W., Chen, C., Tang, J., Wang, C., Zhou, M., Cheng, Y., Zhou, X., Wu, Q., Zhang, X., Feng, Z., Wang, M., Mao, Q., 2022. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. *Ann Med* 54, 516–523. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2034936>
- Whittaker, G.R., Daniel, S., Millet, J.K., 2021. Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2. *Curr Opin Virol* 47, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.006>
- WHO [WWW Document], 2022. URL [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (accessed 11.17.22).
- Wibmer, C.K., Ayres, F., Hermanus, T., Madzivhandila, M., Kgagudi, P., Oosthuysen, B., Lambson, B.E., de Oliveira, T., Vermeulen, M., van der Berg, K., Rossouw, T., Boswell, M., Ueckermann, V., Meiring, S., von Gottberg, A., Cohen, C., Morris, L., Bhiman, J.N., Moore, P.L., 2021. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med* 27, 622–625. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01285-x>
- Wiklander, O.P.B., Brennan, M.Á., Lötvall, J., Breakefield, X.O., El Andaloussi, S., 2019. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med* 11, eaav8521. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav8521>
- Willett, B.J., Grove, J., MacLean, O.A., Wilkie, C., Logan, N., Lorenzo, G.D., Furnon, W., Scott, S., Manali, M., Szemiel, A., Ashraf, S., Vink, E., Harvey, W.T., Davis, C., Orton, R., Hughes, J., Holland, P., Silva, V., Pascall, D., Puxty, K., Filipe, A. da S., Yebra, G., Shaaban, S., Holden, M.T.G., Pinto, R.M., Gunson, R., Templeton, K., Murcia, P.R., Patel, A.H., Consortium, T.C.-19 G.U. (COG-U., Haughney, J., Robertson, D.L., Palmarini, M., Ray, S., Thomson, E.C., 2022. The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism. <https://doi.org/10.1101/2022.01.03.21268111>
- Wong, N.A., Saier, M.H., 2021. The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 22, 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms22031308>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S., Goldsmith, J.A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B.S., McLellan, J.S., 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wrobel, A.G., Benton, D.J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S.R., Rosenthal, P.B., Skehel, J.J., Gamblin, S.J., 2020. Author Correction: SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike

- glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nat Struct Mol Biol* 27, 1001. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0509-2>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., Jiang, T., 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 27, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Wu, G., Yang, G., Zhang, R., Xu, G., Zhang, L., Wen, W., Lu, J., Liu, J., Yu, Y., 2015. Altered microRNA Expression Profiles of Extracellular Vesicles in Nasal Mucus From Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 7, 449–457. <https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.5.449>
- Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J.Y.-C., Wang, H., Menachery, V.D., Rajsbaum, R., Shi, P.-Y., 2020. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* 33, 108234. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>
- Xia, S., Lan, Q., Zhu, Y., Wang, C., Xu, W., Li, Y., Wang, L., Jiao, F., Zhou, J., Hua, C., Wang, Q., Cai, X., Wu, Y., Gao, J., Liu, H., Sun, G., Münch, J., Kirchhoff, F., Yuan, Z., Xie, Y., Sun, F., Jiang, S., Lu, L., 2021. Structural and functional basis for pan-CoV fusion inhibitors against SARS-CoV-2 and its variants with preclinical evaluation. *Signal Transduct Target Ther* 6, 288. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00712-2>
- Xie, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Zou, J., Fontes-Garfias, C.R., Xia, H., Swanson, K.A., Cutler, M., Cooper, D., Menachery, V.D., Weaver, S.C., Dormitzer, P.R., Shi, P.-Y., 2021. Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nat Med* 27, 620–621. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01270-4>
- Xing, Y., Li, X., Gao, X., Dong, Q., 2020. Natural Polymorphisms Are Present in the Furin Cleavage Site of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Front Genet* 11, 783. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00783>
- Xu, C., Wang, Yanxing, Liu, C., Zhang, C., Han, W., Hong, X., Wang, Yifan, Hong, Q., Wang, S., Zhao, Q., Wang, Yalei, Yang, Y., Chen, K., Zheng, W., Kong, L., Wang, F., Zuo, Q., Huang, Z., Cong, Y., 2021. Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. *Sci Adv* 7, eabe5575. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5575>
- Xu, X., Lou, Z., Ma, Y., Chen, X., Yang, Z., Tong, X., Zhao, Q., Xu, Y., Deng, H., Bartlam, M., Rao, Z., 2009. Crystal structure of the C-terminal cytoplasmic domain of non-structural protein 4 from mouse hepatitis virus A59. *PLoS One* 4, e6217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006217>
- Yadav, P.D., Sapkal, G.N., Ella, R., Sahay, R.R., Nyayanit, D.A., Patil, D.Y., Deshpande, G., Shete, A.M., Gupta, N., Mohan, V.K., Abraham, P., Panda, S., Bhargava, B., 2021. Neutralization of Beta and Delta variant with sera of COVID-19 recovered cases and vaccinees of inactivated COVID-19 vaccine BBV152/Covaxin. *J Travel Med* 28, taab104. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab104>
- Yamamoto, Norio, Yang, R., Yoshinaka, Y., Amari, S., Nakano, T., Cinatl, J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Hunsmann, G., Otaka, A., Tamamura, H., Fujii, N., Yamamoto, Naoki, 2004. HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.083>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., Zhou, Q., 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367, 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- Yan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, X., Xu, K.-F., Wei, Y., Jin, N., Jiang, C., 2013. Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model. *Cell Res* 23, 300–302. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.165>
- Yang, D., Leibowitz, J.L., 2015. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res* 206, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.025>

- Yang, S.-T., Kreuzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V., Tamm, L.K., 2016. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids* 199, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003>
- Yang, X.-H., Deng, W., Tong, Z., Liu, Y.-X., Zhang, L.-F., Zhu, H., Gao, H., Huang, L., Liu, Y.-L., Ma, C.-M., Xu, Y.-F., Ding, M.-X., Deng, H.-K., Qin, C., 2007. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Comp Med* 57, 450–459.
- Yousefi, H., Mashouri, L., Okpechi, S.C., Alahari, N., Alahari, S.K., 2021. Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 infection: A review describing drug mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 183, 114296. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114296>
- Yuen, C.-K., Lam, J.-Y., Wong, W.-M., Mak, L.-F., Wang, X., Chu, H., Cai, J.-P., Jin, D.-Y., To, K.K.-W., Chan, J.F.-W., Yuen, K.-Y., Kok, K.-H., 2020. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg Microbes Infect* 9, 1418–1428. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780953>
- Zakharova, L., Svetlova, M., Fomina, A.F., 2007. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol* 212, 174–181. <https://doi.org/10.1002/jcp.21013>
- Zambelli, V., Bellani, G., Borsa, R., Pozzi, F., Grassi, A., Scanziani, M., Castiglioni, V., Masson, S., Decio, A., Laffey, J.G., Latini, R., Pesenti, A., 2015. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Med Exp* 3, 44. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0044-3>
- Zhang, L., Yu, D., 2019. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1871, 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.04.004>
- Zhao, M.-M., Yang, W.-L., Yang, F.-Y., Zhang, L., Huang, W.-J., Hou, W., Fan, C.-F., Jin, R.-H., Feng, Y.-M., Wang, Y.-C., Yang, J.-K., 2021. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct Target Ther* 6, 134. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00558-8>
- Zhao, Y., Li, X., Zhang, W., Yu, L., Wang, Y., Deng, Z., Liu, M., Mo, S., Wang, R., Zhao, J., Liu, S., Hao, Y., Wang, X., Ji, T., Zhang, L., Wang, C., 2021. Trends in the biological functions and medical applications of extracellular vesicles and analogues. *Acta Pharm Sin B* 11, 2114–2135. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.012>
- Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y., Zuo, W., 2020. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med* 202, 756–759. <https://doi.org/10.1164/rccm.202001-0179LE>
- Zhou, B., Thao, T.T.N., Hoffmann, D., Taddeo, A., Ebert, N., Labroussaa, F., Pohlmann, A., King, J., Steiner, S., Kelly, J.N., Portmann, J., Halwe, N.J., Ulrich, L., Trüeb, B.S., Fan, X., Hoffmann, B., Wang, L., Thomann, L., Lin, X., Stalder, H., Pozzi, B., de Brot, S., Jiang, N., Cui, D., Hossain, J., Wilson, M.M., Keller, M.W., Stark, T.J., Barnes, J.R., Dijkman, R., Jores, J., Benarafa, C., Wentworth, D.E., Thiel, V., Beer, M., 2021. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* 592, 122–127. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03361-1>
- Zhou, D., Dejnirattisai, W., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A.J., Ginn, H.M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H.M.E., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., Paesen, G.C., Lopez-Camacho, C., Slon-Campos, J., Hallis, B., Coombes, N., Bewley, K., Charlton, S., Walter, T.S., Skelly, D., Lumley, S.F., Dold, C., Levin, R., Dong, T., Pollard, A.J., Knight, J.C., Crook, D., Lambe, T., Clutterbuck, E., Bibi, S., Flaxman, A., Bittaye, M., Belij-Rammerstorfer, S., Gilbert, S., James, W., Carroll, M.W., Klenerman, P., Barnes, E., Dunachie, S.J., Fry, E.E., Mongkolsapaya, J., Ren, J., Stuart, D.I., Screaton, G.R., 2021. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell* 184, 2348-2361.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>

- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q.-J., Deng, F., Liu, L.-L., Yan, B., Zhan, F.-X., Wang, Y.-Y., Xiao, G.-F., Shi, Z.-L., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, W., Woodson, M., Sherman, M.B., Neelakanta, G., Sultana, H., 2019. Exosomes mediate Zika virus transmission through SMPD3 neutral Sphingomyelinase in cortical neurons. *Emerg Microbes Infect* 8, 307–326. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188>
- 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., 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., Ho, D.D., 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594–597. <https://doi.org/10.1038/35400>
- Zhu, Z., Lu, Z., Xu, T., Chen, C., Yang, G., Zha, T., Lu, J., Xue, Y., 2020. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J Infect* 81, e21–e23. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060>
- Ziegler, C.G.K., Allon, S.J., Nyquist, S.K., Mbano, I.M., Miao, V.N., Tzouanas, C.N., Cao, Y., Yousif, A.S., Bals, J., Hauser, B.M., Feldman, J., Muus, C., Wadsworth, M.H., Kazer, S.W., Hughes, T.K., Doran, B., Gatter, G.J., Vukovic, M., Taliaferro, F., Mead, B.E., Guo, Z., Wang, J.P., Gras, D., Plaisant, M., Ansari, M., Angelidis, I., Adler, H., Sucre, J.M.S., Taylor, C.J., Lin, B., Waghray, A., Mitsialis, V., Dwyer, D.F., Buchheit, K.M., Boyce, J.A., Barrett, N.A., Laidlaw, T.M., Carroll, S.L., Colonna, L., Tkachev, V., Peterson, C.W., Yu, A., Zheng, H.B., Gideon, H.P., Winchell, C.G., Lin, P.L., Bingle, C.D., Snapper, S.B., Kropfski, J.A., Theis, F.J., Schiller, H.B., Zaragosi, L.-E., Barbry, P., Leslie, A., Kiem, H.-P., Flynn, J.L., Fortune, S.M., Berger, B., Finberg, R.W., Kean, L.S., Garber, M., Schmidt, A.G., Lingwood, D., Shalek, A.K., Ordovas-Montanes, J., HCA Lung Biological Network. Electronic address: lung-network@humancellatlas.org, HCA Lung Biological Network, 2020. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
- Zomer, A., Vendrig, T., Hopmans, E.S., van Eijndhoven, M., Middeldorp, J.M., Pegtel, D.M., 2010. Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Commun Integr Biol* 3, 447–450. <https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12339>
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J., Han, Z., 2020. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>

Résumé en français

Le SARS-CoV-2 ("Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2"), nouveau membre de la sous famille des *Orthocoronavirinae* responsable de la maladie COVID-19, a émergé en décembre 2019 en Chine et s'est rapidement propagé dans le monde, causant une pandémie. Des efforts considérables ont été déployés, notamment pour développer en un temps record des vaccins efficaces contre le SARS-CoV-2, mais aussi pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'infection. Cependant, l'émergence de nouveaux variants montre la fragilité d'un système uniquement fondé sur les vaccins et souligne la nécessité de traitements préventifs et curatifs.

Dans une première partie de la thèse, nous avons analysé le rôle des petites vésicules extracellulaires (sEVs, "small extracellular vesicles") produites au niveau de l'épithélium respiratoire nasal dans l'infection par le SARS-CoV-2. Les sEVs sont sécrétées dans de nombreux fluides biologiques incluant le mucus de l'épithélium respiratoire. Nous avons caractérisé les sEVs produites dans le mucus par des CENH (Cellules Epithéliales Nasales Humaines) (mu-sEVs) produisant du mucus contenant ces vésicules (mu-sEVs) et montré que ces dernières contenaient ACE2 et TMPRSS2, respectivement le récepteur et la protéase essentiels pour l'entrée virale. Les mu-sEVs sont capables de cliver la protéine virale Spike au site S1/S2 et, ainsi, de faciliter l'exposition des RBD ("Receptor Binding Domain"), favorisant l'attachement du virus au récepteur cellulaire. Ainsi, les mu-sEVs sont capables de compléter le « priming » de Spike effectué par la furine intracellulaire. Ce « priming » extracellulaire est dépendant de l'activité du TMPRSS2 à la surface des mu-sEVs, génère des virions pré-activés capables de pénétrer plus rapidement dans les cellules cibles par fusion membranaire, et suggère un rôle facilitateur du mucus dans l'infection.

Dans une seconde partie de la thèse, nous avons évalué l'activité antivirale des agents cationiques amphiphiles (CAD, "Cationic Amphiphilic Drugs"). Parmi 8 CADs testés, 5 possèdent une activité antivirale contre le SARS-CoV-2. La desloratadine (DSD), un CAD antihistaminique, entraîne une diminution de la production d'ARN viral dès 2H post-infection, suggérant l'inhibition d'une étape précoce du cycle viral de SARS-CoV-2, probablement l'entrée. De plus, la DSD est active sur d'autres coronavirus (HCoV-229E et HCoV-OC43), suggérant une activité antivirale pan-coronavirus. Enfin, nous avons évalué l'effet antiviral de la DSD, *ex vivo*, sur des cultures de CENHs et avons démontré une diminution de la production d'ARN viral du SARS-CoV-2. La desloratadine, molécule très bien tolérée au sein de la population, pourrait donc être une alternative thérapeutique intéressante dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2.