



HAL
open science

Développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les virus (ré)émergents et/ou négligés

Victoire Perraud

► **To cite this version:**

Victoire Perraud. Développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les virus (ré)émergents et/ou négligés. Virologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5158 . tel-04884593

HAL Id: tel-04884593

<https://theses.hal.science/tel-04884593v1>

Submitted on 13 Jan 2025

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.

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Institut Pasteur

Équipe Lyssavirus, Épidémiologie et Neuropathologie

Développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les virus (ré)émergents et/ou négligés

Par Victoire PERRAUD

Thèse de doctorat en Infectiologie

Dirigée par Florence LARROUS

Présentée et soutenue publiquement

le 6 décembre 2023

Devant un jury composé de :

Bruno COUTARD, Professeur des Universités (Aix-Marseille Université)	Rapporteur
Thomas GRUTTER, Directeur de Recherche (Université de Strasbourg)	Rapporteur
Sonia LONGHI, Directrice de Recherche (Aix-Marseille Université)	Examinatrice
Sandie MUNIER, Professeur des Universités (Université Paris Cité)	Examinatrice
Pierre-Jean CORRINGER, Directeur de Recherche (Université Paris Cité)	Membre invité du jury
Florence LARROUS, Ingénieur de Recherche (Université Paris Cité)	Directrice de thèse

À papa,

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de cette aventure et qui ont contribué à la réalisation de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Florence Larrous, pour son aide précieuse, son expertise et sa patience tout au long de ces trois années. Ses conseils éclairés et ses encouragements ont été essentiels pour mener à bien ce travail.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Bruno Coutard, Thomas Grutter, Sonia Longhi, Sandie Munier et Pierre-Jean Corringer. Leurs commentaires constructifs ont permis d'enrichir cette thèse.

Je souhaite aussi remercier le directeur de mon laboratoire, Hervé Bourhy, ainsi que Jean-Pierre Changeux à l'origine de mon financement. Leurs conseils et les ressources mises à ma disposition ont contribué à l'aboutissement de cette recherche.

Je remercie mes collègues de laboratoire, Guilherme, Lauriane, Victoria, Seonhee, Katherine, Laurent et Juliette, ainsi que mes anciens et nouveaux collègues de bureau, Julien, Malika, Flavio, Marilys et Anthony. Merci à eux pour leurs conseils avisés, leurs collaborations, leurs encouragements, leur soutien, leur amitié, leurs blagues (pas toujours drôle ^^) et leur bonne humeur. Un grand merci également aux « Dobby du labo » et aux membres du « bureau des conseils », du « commando poubelle », du « bureau de la flemme » et de la fameuse pause goûter, ils ou elles se reconnaîtront !

Un grand merci également à mes amis pour leur soutien tout au long de cette aventure. Anaïs, Adrien, Marilys et Juliette ont partagé avec moi les joies et les défis de la recherche. Leurs relectures, leurs encouragements et leur amitié m'ont apporté un soutien sans faille.

Je n'oublie pas de remercier ma famille pour leur soutien et leur encouragement constant. Mes parents et mes frères, Quentin et Alexandre, m'ont rappelé l'importance de persévérer et ne pas abandonner... « *Faire face* ».

Enfin, un dernier merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué de manière significative à cette thèse. Gabrielle Sessa et Ella Pernet qui ont fourni de judicieux commentaires dans leur relecture.

Merci à tous pour votre soutien et votre confiance. Cette thèse n'aurait pas été possible sans vous.

Résumé

Développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les virus (ré)émergents et/ou négligés

Les infections causées par les virus (ré)émergents et/ou négligés sont responsables de problèmes de santé publique majeurs. Les exemples de la COVID-19 et de la Rage illustrent les répercussions en santé publique de ces maladies qui sont responsables de nombreux décès dans le monde (6,9 millions de morts depuis le début de la pandémie de la COVID-19 et près 60 000 décès chaque année dans le cas de la Rage). Malgré l'existence de prophylaxies pré- ou post-exposition, il apparaît encore nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques contre ces infections virales. L'objectif de ce travail a donc été de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques vis-à-vis de ces infections afin (i) de moduler la cascade de réponses de l'hôte via l'activation de récepteurs cellulaires, comme les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ à l'acétylcholine ($\alpha 7nAChR$) et les récepteurs purinergiques de type P2X dans le cas du SARS-CoV-2 ; (ii) d'inhiber le cycle viral via des molécules qui ciblent le complexe de réplication dans le cas du RABV. Il a été montré que l'ivermectine (IVM), un modulateur de $\alpha 7nAChR$, réduisait les signes cliniques de l'infection par le SARS-CoV-2 chez le hamster. L'implication des $\alpha 7nAChR$ dans la modulation de la réponse de l'hôte au cours de l'infection a ainsi été étudiée tout d'abord dans un modèle *in vivo* utilisant des hamsters, mais également avec des modèles *in vitro* de lignées cellulaires épithéliales seules ou en co-culture avec des cellules de l'immunité. Dans un premier temps, chez l'animal, nous avons étudié les mécanismes de neuroinvasion et d'anosmie liés à l'infection par plusieurs variants d'intérêts. Nous avons ensuite testé l'effet de différents agonistes et antagonistes des récepteurs cholinergiques afin d'évaluer leurs rôles dans la mise en place de la réponse inflammatoire de l'hôte. Dans un second temps, l'implication des récepteurs purinergiques dans la modulation de la réponse inflammatoire liée à l'IVM a été explorée dans des modèles *in vitro* permettant des investigations sur les voies d'activation impliquées. Le criblage d'une banque de 30 000 composés chimiques avait été réalisé dans le cadre de l'infection par le virus de la Rage et avait permis d'identifier un composé actif contre le RABV mais également contre d'autres virus du genre *Lyssavirus* ou même de l'ordre des *Mononegavirales*. Ensuite, plus de 300 analogues chimiques de la molécule de départ avaient été produits pour arriver à l'obtention de deux molécules actives ayant une faible toxicité cellulaire et un fort pouvoir inhibiteur de l'infection. Il a été montré que ces molécules modulaient le cycle viral en ciblant le complexe de

réplication viral. Les mécanismes d'actions de ces molécules et leurs interactions avec les protéines virales ont été particulièrement étudiés au cours de ce travail, en utilisant deux approches. (1) L'identification des protéines virales et des domaines ciblés par ces molécules a été réalisée par le séquençage de mutants viraux échappant à l'action de ces molécules, et l'étude du rôle biologique des mutations observées par production de virus recombinants obtenus par génétique inverse. (2) L'identification des domaines et des résidus de la molécule impliquée dans les interactions avec les protéines virales a été en parallèle explorée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en condition *ex vivo*. Ces recherches, combinées à des approches *in silico* de modélisation par homologie et de « machine-learning » nous ont permis d'obtenir des modèles structuraux d'interaction. Ainsi, l'ensemble de ce travail nous a permis de mieux comprendre le rôle des récepteurs $\alpha 7nAChR$ et P2X dans la mise en place de la réponse inflammatoire au cours de l'infection par le SARS-CoV-2 ; mais également de caractériser les sites d'interactions entre les protéines du virus rabique et les molécules antivirales afin de permettre une optimisation de leur structure moléculaire pour les rendre plus actives.

Mots clefs

Thérapie – RABV – SARS-CoV-2 – *In vivo* – Récepteurs $\alpha 7nACh$ – Récepteurs P2X – Inflammation – Complexe de réplication viral – Échappement viral – Génétique Inverse

Abstract

Development of new therapeutic approaches against (re)emerging and neglected viruses

Infections caused by (re)emerging and/or neglected viruses are responsible for major public health problems. The examples of COVID-19 and Rabies illustrate the burden of these diseases on public health which are responsible for many deaths worldwide (6.9 million deaths since the beginning of the COVID-19 pandemic; and nearly 60,000 deaths each year in the case of Rabies). Despite the existence of pre- or post-exposure prophylaxis, it still appears necessary to develop new therapeutic approaches against these viral infections. The aim of this study was to develop new therapeutic strategies to control these infections in order to (i) modulate the host response cascade via the activation of cellular receptors, such as alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7nAChR$) and P2X-type purinergic receptors, in the case of SARS-CoV-2; (ii) inhibit the viral cycle via molecules that target the replication complex in the case of RABV. It has been shown that ivermectin (IVM), a modulator of $\alpha 7nAChR$, has reduced the clinical signs of SARS-CoV-2 infection in hamsters. The involvement of $\alpha 7nAChR$ in the modulation of the host response during infection was thus studied in an *in vivo* model using hamsters and then in *in vitro* models of epithelial cell lines alone or in co-culture with immune cells. First, we studied the mechanisms of neuroinvasion and anosmia in animals infected by several variants of interest. Then we tested the effect of different cholinergic receptor agonists and antagonists in order to evaluate their roles in the establishment of the host inflammatory response. Second, we explored the involvement of purinergic receptors in the modulation of the inflammatory response related to IVM in *in vitro* models. This led us to investigate the involved activation pathways. The screening of a chemical bank of 30,000 compounds had been carried out in the context of rabies virus infection and had enabled the identification of an active compound against RABV as well as against other viruses of the *Lyssavirus* genus or even of the *Mononegavirales* order. Then, more than 300 chemical analogues of the starting molecule had been produced to obtain two active molecules, showing low cellular toxicity and a strong inhibitory effect on the infection. These molecules were shown to modulate the viral cycle by targeting the viral replication complex. The mechanisms of action of these molecules and their interactions with viral proteins were particularly studied, using two approaches: (I) The identification of viral proteins and domains targeted by these molecules, was performed by sequencing viral mutants escaping the action of these molecules

and studying the biological role of the mutations, observed by producing recombinant viruses obtained by reverse genetics. (2) The identification of the domains and residues of the molecule involved in the interactions with viral proteins, was investigated in parallel by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in *ex vivo* conditions. It was combined with *in silico* approaches of homology modeling and machine-learning to obtain structural models of interaction. This study has given us a better understanding of the role of $\alpha 7nAChR$ and P2X receptors in the inflammatory response during SARS-CoV-2 infection. We also characterized the interaction sites between rabies virus proteins and antiviral molecules to refine their molecular structure to increase their activity.

Keywords

Therapy – RABV – SARS-CoV-2 – *In vivo* – $\alpha 7nAChR$ receptors – P2X receptors – Inflammation – Viral replication complex – Viral escape – Reverse genetics

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des abréviations.....	13
Introduction	18
I- Les virus (ré)-émergents et/ou négligés	18
A) Origine et apparition des épidémies	18
B) Causes et conséquences	19
C) Le SARS-CoV-2, un exemple de virus émergent.....	21
a. Épidémiologie et physiopathologie.....	21
b. Taxonomie.....	24
c. Morphologie	25
d. Génome viral.....	25
e. Protéines virales	26
f. Cycle viral	27
D) La rage, un exemple de virus négligé	29
a. Épidémiologie et physiopathologie.....	29
b. Taxonomie.....	32
c. Morphologie	33
d. Génome viral.....	33
e. Protéines virales	34
f. Cycle viral	37
E) Prévenir les maladies émergentes et négligées par la vaccination.....	39
II- Les traitements antiviraux	41
A) Modulation du cycle viral.....	42
a. Entrée virale	43
1. Les anticorps monoclonaux.....	43
2. Les peptides.....	44
3. Les petites molécules	45
b. Réplication virale	46
1. Inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase.....	46
2. Inhibiteurs nucléosidiques du VHB et du VIH.....	47
3. Inhibiteurs nucléosidiques de l'ARN polymérase	48
4. Inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase	48
c. Assemblage et sortie	49
B) Modulation de la réponse de l'hôte	50
a. Réponse immunitaire antivirale : inflammation et immunité innée.....	51
b. Récepteurs cellulaires.....	53
1. Récepteurs nicotiniques	54
i. Structure et classification.....	54
ii. Fonction	55
iii. Rôle dans l'inflammation.....	58
iv. Implications dans les infections virales.....	60
2. Récepteurs purinergiques	61
i. Structure et classification.....	61
ii. Fonction	63
iii. Rôle dans l'inflammation.....	64
iv. Implications dans les maladies virales.....	66

3.	Collaboration des récepteurs nAChR et P2X	67
III-	Les traitements contre la COVID-19 et la rage	68
A)	La COVID-19	68
a.	Modulation du cycle viral.....	69
1.	Entrée virale	69
2.	Réplication virale	70
i.	Analogues nucléosidiques	71
ii.	Inhibiteurs de protéase.....	72
iii.	Oligonucléotides antisens	72
b.	Modulation de la réponse de l'hôte	73
1.	Réponse inflammatoire.....	73
2.	Récepteurs cellulaires	74
3.	Ivermectine et SARS-CoV-2.....	75
B)	La rage.....	76
a.	Modulation du cycle viral.....	77
1.	Entrée virale	77
2.	Réplication	79
b.	Modulation de la réponse de l'hôte	80
1.	Prophylaxie post-exposition	80
2.	La réponse inflammatoire.....	81
3.	Les récepteurs cellulaires.....	82
	Objectifs.....	84
	Résultats.....	86
	Partie 1	88
	Partie 2	150
	Partie 3	185
	Discussion et perspectives	201
	1. Développement d'une approche thérapeutique ciblant la réplication du RABV	201
	2. Moduler la réponse inflammatoire de l'hôte pour réduire les signes cliniques de la COVID-19.....	204
	Références bibliographiques.....	212

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie des épidémies virales les plus meurtrières et les plus récentes à travers le monde.	18
Figure 2 : Émergences ou réémergences récentes d'épidémies virales de 1981 à 2020.....	19
Figure 3 : Nombre total de cas de SARS-CoV-2 pour 100 000 habitants à travers le monde en septembre 2023.	21
Figure 4 : Émergence des variants préoccupants (VoCs) du SARS-CoV-2 au cours de la pandémie.....	22
Figure 5 : Signes cliniques courants ou sévères observés chez les patients atteints de la COVID-19.....	23
Figure 6 : Taxonomie des Coronaviridae.....	24
Figure 7 : Particule virale du SARS-CoV-2.....	25
Figure 8 : Génome du SARS-CoV-2.	26
Figure 9 : Cycle de réplication viral du SARS-CoV-2.	27
Figure 10 : Mécanisme d'entrée virale du SARS-CoV-2.....	28
Figure 11 : Prévalence de la rage transmise par les chiens dans le monde en 2021.	29
Figure 12 : Transmission du virus de la rage par le chien chez l'homme et sa propagation dans le corps humain.	30
Figure 13 : Tableau clinique de la rage.....	31
Figure 14 : Taxonomie des Lyssavirus.....	32
Figure 15 : Particule virale du virus de la rage.	33
Figure 16 : Génome du virus de la rage.....	34
Figure 17 : Domaines et structure de la protéine L.	35
Figure 18 : Domaines de la phosphoprotéine et structure du complexe de la protéine L et de la phosphoprotéine.....	36
Figure 19 : Structure du complexe ARN-Nucléoprotéine.....	37
Figure 20 : Cycle de réplication du virus de la rage.....	38
Figure 21 : Les différents types de vaccins.	40
Figure 22 : Activation de la réponse interféron déclenchée par la détection de PAMPs viraux.	52
Figure 23 : Structure et domaines des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine.	55
Figure 24 : Schéma et structure du récepteur nAChR- α 7 dans différents états de conformation.	56

Figure 25 : Les voies de signalisation intracellulaire du récepteur nAChR- α 7 dans la réponse anti-inflammatoire.	59
Figure 26 : Schéma de la structure des récepteurs purinergiques.	62
Figure 27 : : Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs P2X4 et P2X7 impliquées dans la réponse inflammatoire.	65
Figure 28 : Dialogue modulant la réponse inflammatoire entre les cellules A549-ACE2-TMPRSS2 et les cellules THP-1 dans un modèle de co-culture.	209

Liste des abréviations

ACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ACh	Acétylcholine
Acm	Anticorps monoclonaux
Ago-PAM	PAM agoniste
Ajd	Aujourd'hui
ARNi	ARN interférent
ARNsg	ARN subgénomique
Ca²⁺	Calcium
CAP	Domaine de coiffe des ARNm viraux
CAP	Voie cholinergique anti-inflammatoire (<i>Cholinergic anti-inflammatory pathway</i>)
CD	Domaine connecteur
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019 (<i>Coronavirus Disease 2019</i>)
CTD	Domaine C-terminal
C-ter	C-terminal
db	Double-brin
dNTP	Désoxynucléoside triphosphate
E	Protéine d'enveloppe (SARS-CoV-2)
EC	Domaine extracellulaire
ERGIC	Compartiment intermédiaire du Golgi-réticulum endoplasmique
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FDA	Food and Drug Administration
G	Glycoprotéine (RABV)
GABA	Récepteur GABA fixant l'acide γ -aminobutyrique
HAND	Troubles neuro-cognitifs associés au VIH (<i>HIV-associated neurocognitive disorders</i>)
HCMV	Cytomégalovirus
HTNV	Virus de Hantaan
IC	Domaine intracellulaire
IFN	Interféron

IFNAR	Récepteur de l'interféron α/β (<i>Interferon-alpha/beta receptor</i>)
IGR	Immunoglobuline antirabique
IL	Interleukine
ISG	Gènes stimulés par l'interféron (<i>Interferon-stimulated genes</i>)
ISRE	Élément de réponse stimulée par l'interféron (<i>Interferon-stimulated response element</i>)
K⁺	Potassium
KO	Knock-out
L	Polymérase (RABV)
L	Séquence leader (SARS-CoV-2)
M	Protéine de la membrane (SARS-CoV-2)
M	Protéine de Matrice (RABV)
MERS	Syndrome respiratoire du Moyen-Orient (<i>Middle east respiratory syndrome</i>)
MERS-CoV	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
mGluR2	Récepteur du sous-type 2 métabotrope du glutamate
MT	Domaine de méthyltransférase
N	Nucléoprotéine (SARS-CoV-2)
N	Nucléoprotéine (RABV)
N⁰	Nucléoprotéine soluble
Na⁺	Sodium
nAChR	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NAM	Modulateurs allostérique négatif (<i>Negative allosteric modulator</i>)
NCAM	Molécule d'adhésion aux neurones cellulaires
NF-κB	Facteur nucléaire- κ B
NLR	Récepteur de type NOD (<i>NOD-like receptor</i>)
Nsp	Protéine non structurale
NTD	Domaine N-terminal
N-ter	N-terminal
NTP	Ribonucléoside triphosphate
OD	Domaine central
OMS	Organisation mondiale de la santé
OMSA	Organisation Mondiale de la Santé Animale

ORF	Cadre de lecture ouvert (<i>Open reading frame</i>)
P	Phosphoprotéine (RABV)
p75NTR	Récepteur de la neurotrophine p75
PAM	Modulateurs allostérique positif (<i>Positive allosteric modulator</i>)
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogène (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PANXI	Pannexine-I
PPE	Prophylaxie post-exposition
PrEP	Prophylaxie pré-exposition
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaire (<i>Pattern recognition receptor</i>)
RABV	Virus de la rage
RdRP	ARN polymérase ARN dépendant
RE	Réticulum endoplasmique
RLR	Récepteur de type RIG-I (<i>RIG-I-like receptor</i>)
S	Glycoprotéine spike (SARS-CoV-2)
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
sb	Simple-brin
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SfS	Sous-unité de surface
SFTSV	Virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie (<i>Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus</i>)
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA	Petit ARN interférent (<i>Small interfering RNA</i>)
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOCS3	Suppresseur de la signalisation des cytokines 3
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
TI	Transcriptase inverse
TLR	Récepteur de type Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TM	Domaine transmembranaire
TMEV	Virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler

TMPRSS2	Protéase transmembranaire à sérine 2
TmS	Sous-unité transmembranaire
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRS	Transcription and regulatory sequence
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHS	Virus herpes simplex
VIA	Virus de l'influenza A
VIB	Virus de l'influenza B
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIRIP	Peptide inhibiteur de virus (<i>Virus inhibitory peptide</i>)
VLM	Virus de la leucémie murine
VNC	Virus de la maladie de Newcastle
VOC	Variants préoccupants (<i>Variants of Concern</i>)
VPH	Papillomavirus
VRS	Virus respiratoire syncytial
VSN	Virus Sin Nombre
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse
VV	Poxvirus variola
VZV	Virus varicelle-zona

Introduction

Introduction

I- Les virus (ré)-émergents et/ou négligés

A) Origine et apparition des épidémies

De nombreuses épidémies de virus (ré)émergents et/ou négligés ont impacté les civilisations à travers le monde, laissant des marques remontant jusqu'à l'Antiquité. C'est le cas de la variole, aujourd'hui éradiquée, dont des descriptions furent retrouvées dans des écrits médicaux en Inde (1500 av. J.-C.) (Shchelkunov, 2011) et en Chine (1122 av. J.-C.) (Hopkins, 2003). Et également celui de la rage, dont la première trace remonte à 2000 ans av. J.-C. dans les lois d'Eshnunna de Mésopotamie (Adamson, 1977) et qui fut également décrite par Aristote dans *l'Histoire des animaux* datant de -343 av. J.-C. (Bertier, 1995).

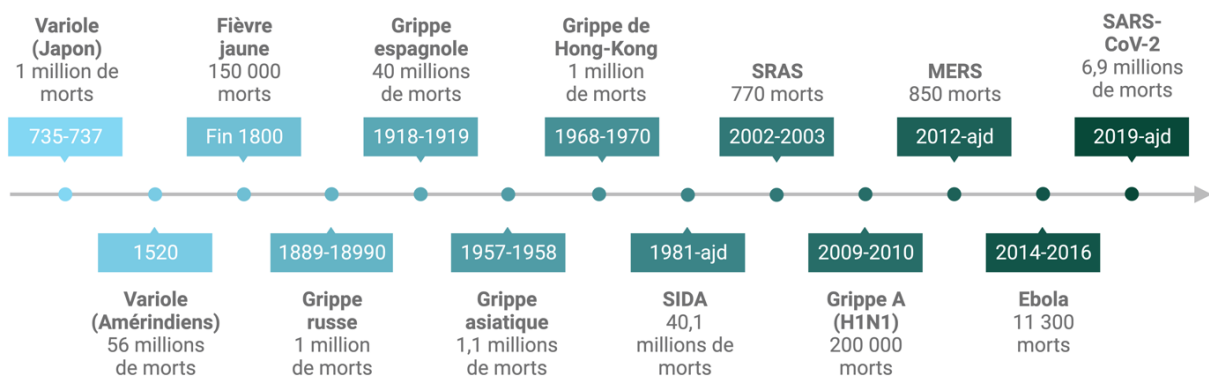


Figure 1 : Chronologie des épidémies virales les plus meurtrières et les plus récentes à travers le monde.

(ajd : aujourd'hui, le 10 juin 2023), d'après (Patterson and Pyle, 1991; Patterson, 1992; Kohn, 2007; CDC, 2017, 2019a, 2019b, 2019c; Koch et al., 2019; Barbiero, 2020; UNAIDS, 2021; Berche, 2022; OMS, 2023c, 2023a).

Plus récemment, de nombreuses épidémies se sont succédé (Figure 1) : la grippe espagnole de 1918-1920, causée par le virus H1N1 et faisant près de 40 millions de morts à travers le monde (Berche, 2022) ; le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ayant débuté en 1981 et toujours présente aujourd'hui, provoquée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), avec près de 40 millions de morts (UNAIDS, 2021) ; le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) apparu en Chine en 2002 (CDC, 2017) ; la grippe H1N1 de 2009 (CDC, 2019c) ; le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) apparu en Arabie Saoudite en 2012 (OMS, 2023c) ; la fièvre hémorragique Ebola en Afrique de l'ouest

fin 2013 (Barbiero, 2020) ; l'infection au virus Zika au Brésil en 2015 ; et plus récemment, la COVID-19 (Maladie à coronavirus 2019), apparue en décembre 2019, causée par le SARS-CoV-2 (Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère), et toujours présente aujourd'hui, avec près de 770 millions de cas, dont 7 millions de décès (OMS, 2023a). Toutes ces épidémies ont été provoquées par des virus (ré)émergents et/ou négligés (Figure 2).

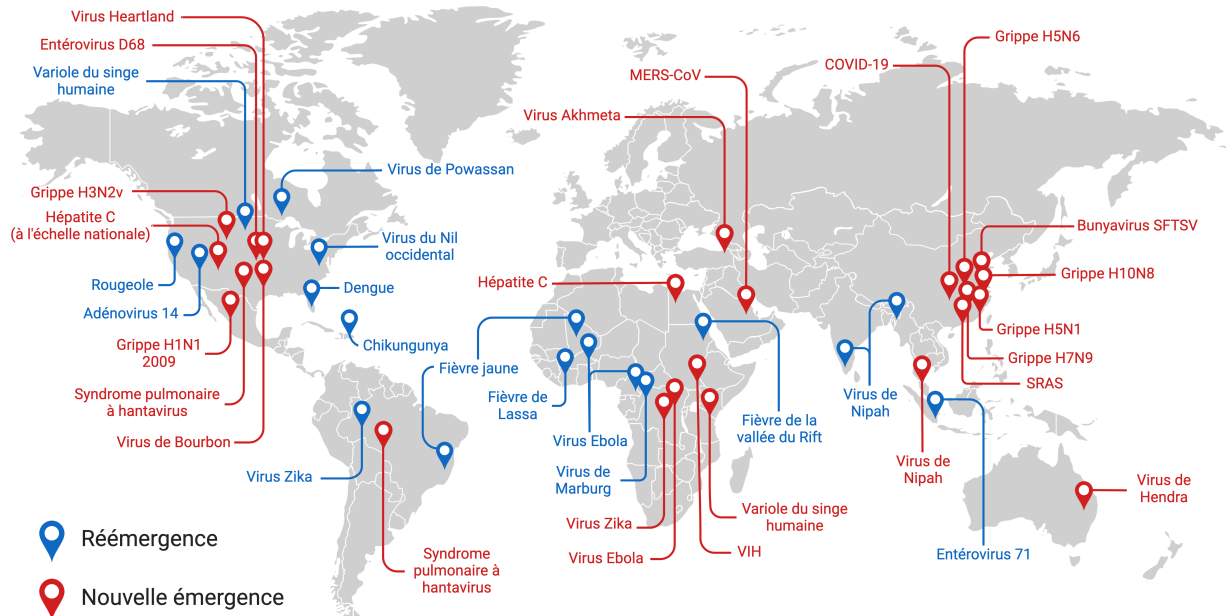


Figure 2 : Émergences ou réémergences récentes d'épidémies virales de 1981 à 2020. (MERS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère ; SFTSV : virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopenie), d'après (Morens and Fauci, 2020).

B) Causes et conséquences

Un virus (ré)émergent est responsable de maladies dites émergentes qui apparaissent dans une population pour la première fois, ou bien qui existaient auparavant et connaissent une augmentation soudaine en termes d'incidence ou de distribution géographique (OMS, 2004). Un virus négligé, responsable de maladie tropicale négligée, est principalement présent dans les zones tropicales et touche les communautés les plus pauvres. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), seuls les virus de la rage, de la dengue et du chikungunya font partie de la classification des virus négligés (OMS, 2023d).

Ces virus sont pour la plupart zoonotiques ou à transmission vectorielle (Jones *et al.*, 2008). Un virus zoonotique est transmis à l'homme par des animaux vertébrés, tandis qu'un virus à transmission vectorielle sera transmis à l'homme par l'intermédiaire d'un arthropode, le plus souvent hématophage (moustiques, tiques, phlébotomes) (OMS, 2020).

Divers facteurs vont permettre à ces virus d'émerger de réservoirs de la faune sauvage et d'infecter l'être humain. Ces facteurs faciliteront également la propagation et la transmission de ces virus (Church, 2004). Il peut s'agir par exemple d'une augmentation de l'urbanisation, de la mondialisation, de l'augmentation de la densité des populations, de la pauvreté, des troubles sociaux, des voyages, du commerce à l'international, du vieillissement de la population, du défrichage, de la déforestation, du changement climatique, de l'agriculture et de la chasse, de l'élevage d'animaux domestiques et de toute autres activités humaines détruisant l'habitat de la faune sauvage ou augmentant les contacts avec les réservoirs zoonotiques (Heffernan, 2018; Tazerji *et al.*, 2022).

Les maladies (ré)émergentes et/ou négligées engendrées par ces virus ont de lourdes conséquences sur le système de santé publique, mais également de graves impacts sur le progrès social, politique et économique (Mackey and Liang, 2012).

Les initiatives d'« Une Seule Santé » et de Santé Globale encouragent la coopération et la planification stratégique entre des professionnels de la santé publique, animale, humaine, végétale et environnementale (OMS, 2017; OMSA, 2022). Ces coopérations ont pour but d'améliorer la santé humaine et animale et également de lutter contre la propagation des maladies par les zoonoses et les facteurs environnementaux. Ces initiatives peuvent servir de modèle potentiel pour des interventions efficaces contre ces maladies. (Pappaioanou and Spencer, 2008; Mwacalimba and Green, 2015; Pungartnik *et al.*, 2023).

La nature du défi posé par ces maladies exige une surveillance constante et une intervention rapide. Il est impératif de développer et de déployer efficacement des vaccins et des thérapies antivirales là où ils sont nécessaires. Il faut également disposer des infrastructures nécessaires et du personnel qualifié pour permettre un diagnostic rapide, ainsi que d'une recherche permanente pour aider au développement de contre-mesures efficaces (Nii-Trebi, 2017).

De plus, du fait de la pression de sélection et de la pression évolutive, certains virus présentent une forte variation génétique se manifestant par des taux de mutations élevés, de la recombinaison génétique ou bien un réassortiment. La recombinaison consiste en l'échange d'une partie du génome entre deux virus semblables (Arenas *et al.*, 2018). Un réassortiment se produit lorsque deux virus segmentés similaires échangent une partie de leur génome au cours d'une co-infection cellulaire (McDonald *et al.*, 2016). Ces phénomènes peuvent être à l'origine du franchissement de la barrière d'espèce et participer à l'émergence de nouvelles épidémies (Olival *et al.*, 2017; Choudhury *et al.*, 2022).

En outre, cette forte variation génétique présentée par certains virus nécessite une surveillance constante des pandémies éventuelles sous la forme d'une mise à jour des vaccins disponibles qui sont devenus obsolètes en raison de l'émergence de nouvelles souches virales (Gonçalves *et al.*, 2021). C'est le cas du virus de la COVID-19, le SARS-CoV-2, qui sera abordé par la suite comme un exemple pour illustrer les virus émergents. Le virus de la rage sera, quant à lui, présenté pour illustrer les virus négligés.

C) Le SARS-CoV-2, un exemple de virus émergent

a. Épidémiologie et physiopathologie

La COVID-19, dont les premiers cas ont été recensés à Wuhan dans la province d'Hubei en Chine en novembre 2019, a entraîné une pandémie, déclarée en mars 2020 par l'OMS et qui se poursuit toujours en automne 2023 (OMS, Sharma *et al.*, 2021). Cette maladie a provoqué en septembre 2023 près de 770 millions de cas à travers le monde avec près 7 millions de décès recensés depuis le début de la pandémie (OMS, 2023a) (Figure 3).

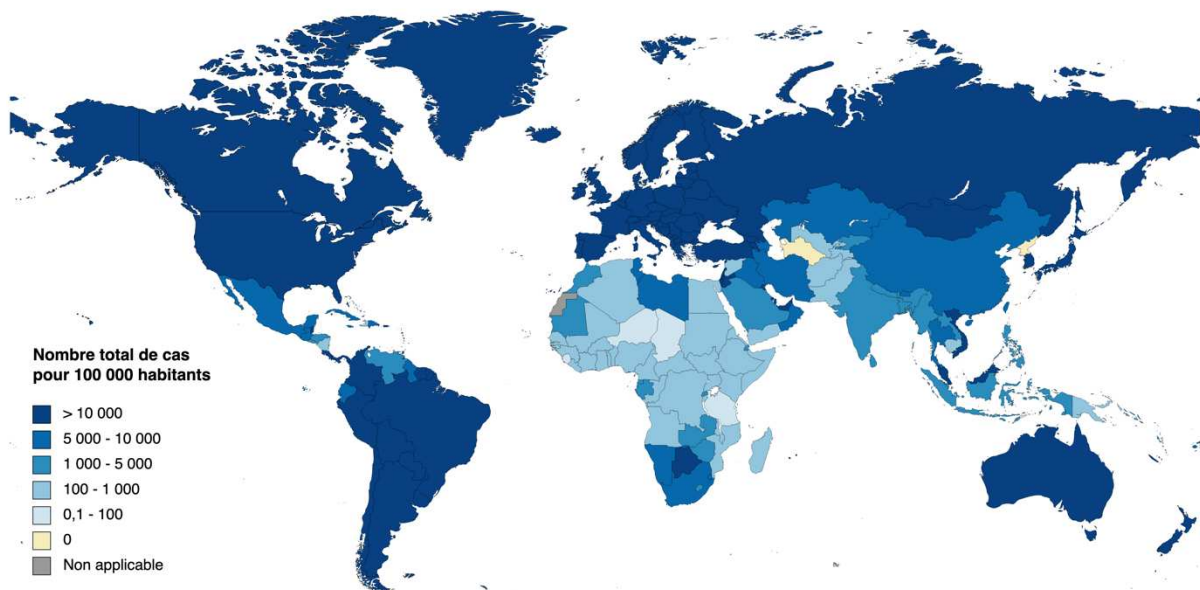


Figure 3 : Nombre total de cas de SARS-CoV-2 pour 100 000 habitants à travers le monde en septembre 2023.

Il s'agit du nombre de cas déclarés par les différents pays ou territoires (d'après (OMS, 2023a)).

Depuis le début de la pandémie de nombreux variants du SARS-CoV-2, l'agent étiologique de la COVID-19, sont apparus et certains furent classés comme variants préoccupants (ou VOC, « variants of concern »). Ces variants ont un impact démontré sur la santé publique avec une augmentation de la transmissibilité, de la gravité de l'infection ou une

capacité d'échappement immunitaire (Santé Publique France, 2023). Ils nécessitent une surveillance constante en réalisant un séquençage du génome viral sur les prélèvements nasopharyngés de patients atteints. Les premiers VOC sont apparus fin 2020, avec le variant Alpha (B.1.1.7), devenu majoritaire en mars 2021. Les variants Beta (B.1.351) et Gamma (P.1) ont ensuite circulé pendant le 1^{er} semestre 2021. Le variant Delta (B1.617.2), apparu en mai 2021, a rapidement supplanté les précédents variants, pour représenter 99 % des variants circulants au mois d'août 2021. Enfin, le variant Omicron, le dernier variant à être apparu fin novembre 2021 est actuellement en circulation avec ses différentes sous-lignées (B.1.1.529, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, BA.2.86) et plus récemment, l'apparition de différents recombinants (XBB. 1.16, XBB.1.5) (Figure 4) (ECDC, 2023c).

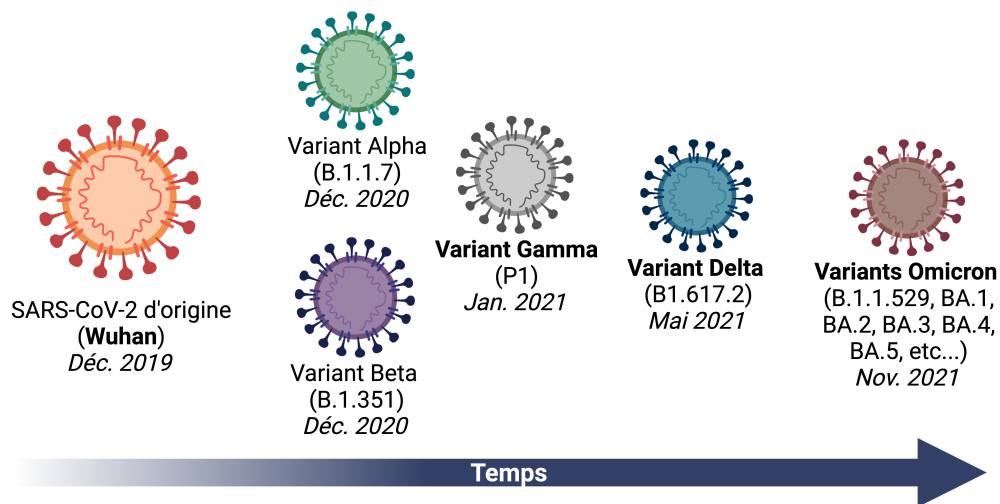


Figure 4 : Émergence des variants préoccupants (VoCs) du SARS-CoV-2 au cours de la pandémie.

D'après (ECDC, 2023c).

Le SARS-CoV-2 est un virus qui se transmet par gouttelettes de Flüge ou par aérosols d'une personne à l'autre lors d'un contact étroit de moins d'un mètre ou dans des espaces mal ventilés et/ou bondés (OMS, 2021c). Il peut également se transmettre de façon indirecte, par contact avec une surface infectée et une entrée par les muqueuses nasales, buccales ou conjonctivales (Bonny *et al.*, 2020).

Une fois infectée, les symptômes vont apparaître chez une personne en moyenne 5 à 6 jours après l'exposition (Kumar *et al.*, 2021). Les patients peuvent présenter un tableau clinique très varié (Figure 5), allant de formes asymptomatiques aux formes graves voire mortelles. Les symptômes les plus courants ne sont pas spécifiques de la maladie et

appartiennent à ceux du syndrome pseudo-grippal (fièvre, mal de gorge, toux, céphalées, myalgies et asthénies) (OMS, 2023b). Certains patients aux symptômes légers peuvent également présenter de l'agueusie et de l'anosmie, respectivement une perte de goût et une perte d'odorat (de Melo, Lazarini, Levallois, *et al.*, 2021). Chez des personnes présentant des facteurs de risque tels que l'obésité, l'âge avancé, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, ou les maladies pulmonaires chroniques, le risque de développement de formes sévères peut être aggravé. Cela se manifeste par une insuffisance respiratoire sévère, nécessitant une hospitalisation d'urgence (OMS, 2023b). Afin de prévenir ces formes graves et de diminuer la transmission, plusieurs vaccins ont été développés et commercialisés, dont les vaccins Pfizer/BioNTech et Moderna (Feraoun *et al.*, 2021).

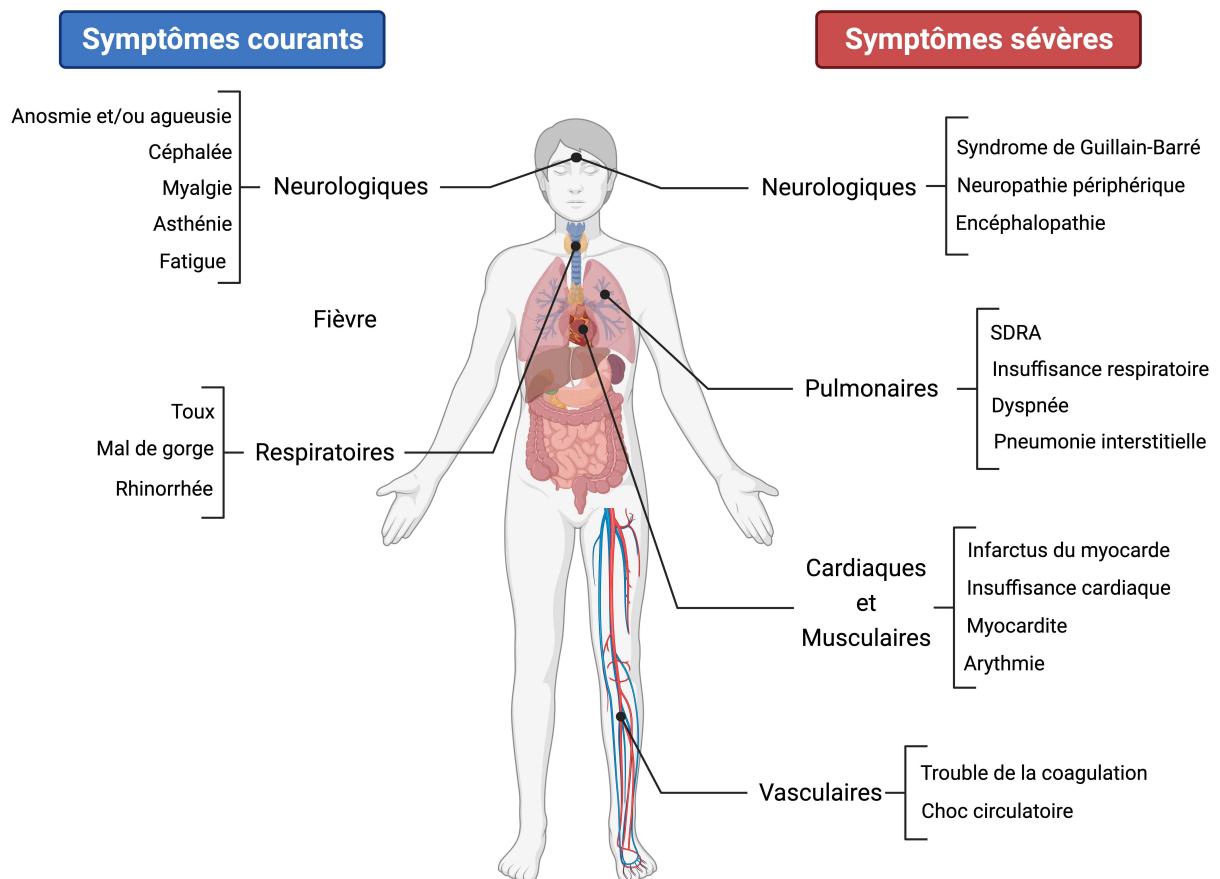


Figure 5 : Signes cliniques courants ou sévères observés chez les patients atteints de la COVID-19.

(SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë), d'après (Alturki *et al.*, 2020; Falzone *et al.*, 2021; ECDC, 2023a).

Chez certains patients, les symptômes respiratoires ou extra-respiratoires peuvent persister ou se développer 3 mois après l'épisode aigu de l'infection. Leur présence durant au moins deux mois, sans aucune autre explication, est un état défini par l'OMS comme COVID-

long ou syndrome post-COVID-19 (HAS, 2021). Ces symptômes, variés, sont principalement : la fatigue, la dépression, l'anxiété, les troubles cognitifs et du sommeil, l'agueusie, l'anosmie et la dyspnée, mais également une altération de l'attention, de la concentration et de la mémoire. (Sudre *et al.*, 2021). Les mécanismes précis menant à cet état de COVID-long restent encore à être élucidés.

b. Taxonomie

Le SARS-CoV-2 appartient à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous-famille des *Coronavirinae*. Cette dernière est sous-divisée en 4 genres : *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, et *Delta-coronavirus* (Figure 6) (de Groot *et al.*, 2009). Le SARS-CoV-2 appartient au genre des *Beta-coronavirus*, tout comme le SARS-CoV et le MERS-CoV, qui causent des infections pulmonaires chez les mammifères et dont les hôtes les plus récurrents sont les chauves-souris, les chameaux, la civette et l'homme (de Wit *et al.*, 2016; Gong and Bao, 2018).

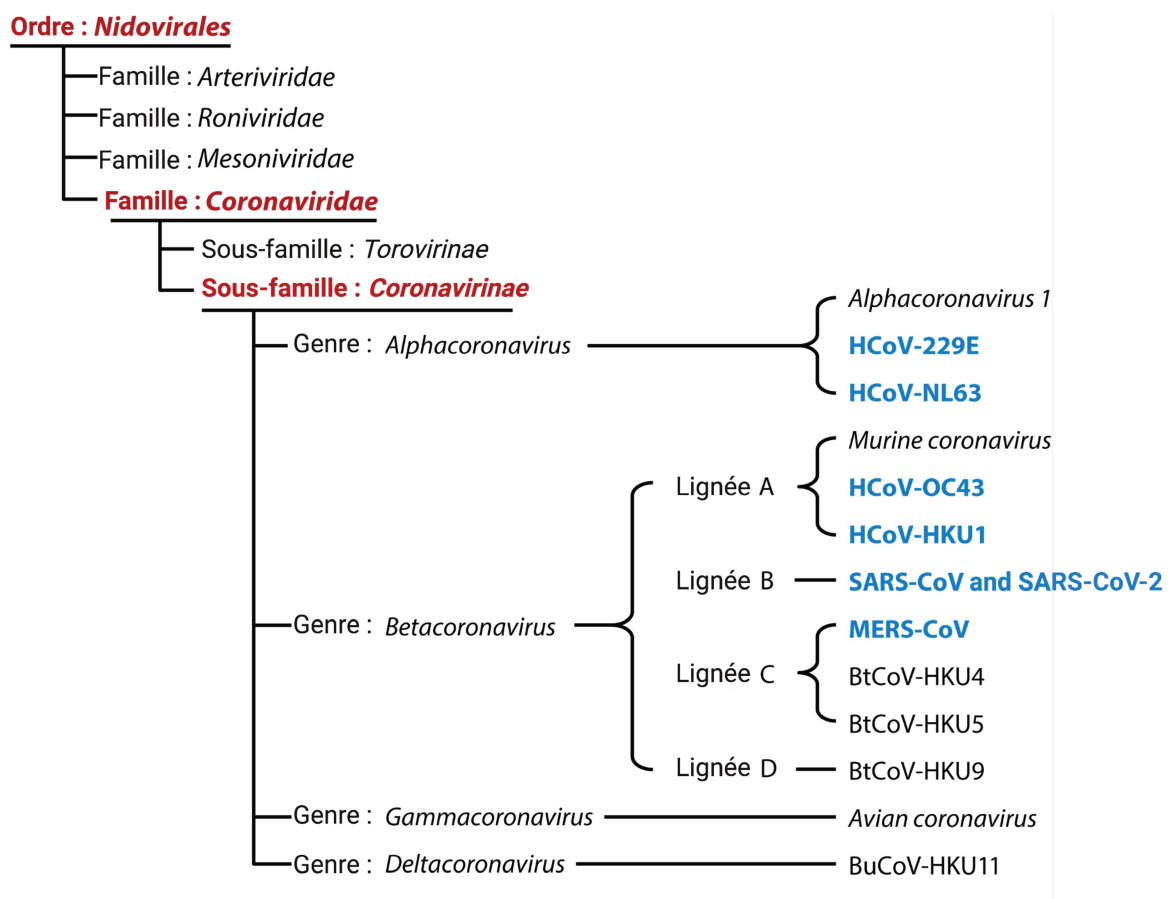


Figure 6 : Taxonomie des Coronaviridae.

(En bleu, les coronavirus dont des cas humains ont été rapportés) (Fung and Liu, 2019).

L'origine du SARS-CoV-2 reste encore un sujet débattu. Après une enquête dépêchée par l'OMS à Wuhan aucune conclusion définitive n'a pu être établie (OMS, 2022).

c. Morphologie

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé sphérique d'environ 120 nm de diamètre, présentant à sa surface des trimères de glycoprotéine « Spike » (S) (Bar-On *et al.*, 2020) (Figure 7). Cette protéine va permettre à la particule virale de se fixer aux récepteurs de la cellule hôte et d'y entrer. Ancrée dans l'enveloppe, se trouvent la protéine de la membrane (M) impliquée dans l'assemblage du virus et le bourgeonnement des virions et la protéine d'enveloppe (E) qui joue un rôle dans l'assemblage du virus et également dans la stabilité de la particule virale et sa pathogénie (Ruch and Machamer, 2012; Schoeman and Fielding, 2019). Enfin, à l'intérieur de la particule virale, la nucléoprotéine (N), associée au génome viral, forme la nucléocapside pour protéger ce dernier (Figure 7) (Krupovic and Koonin, 2017).

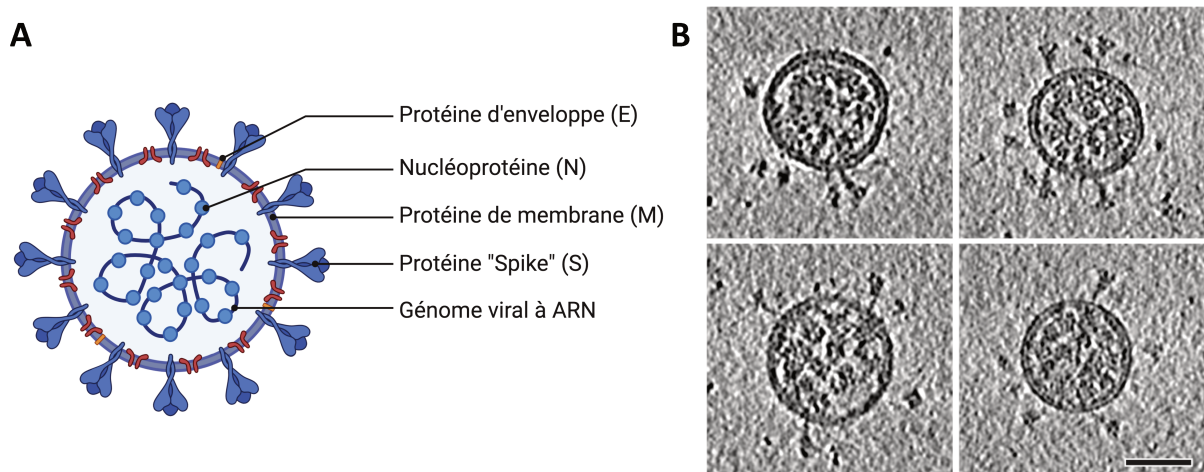


Figure 7 : Particule virale du SARS-CoV-2.

A. Représentation schématique de la morphologie du SARS-CoV-2. **B.** Quatre coupes tomographiques représentatives de virions SARS-CoV-2 provenant du surnageant de cellules infectées et obtenues par microscopie électronique (Barre d'échelle : 50 nm) (Ke *et al.*, 2020).

d. Génome viral

Le génome du SARS-CoV-2 est composé d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 30 kb. C'est un génome viral dit infectieux, c'est-à-dire qu'il va être directement pris en charge par la polymérase cellulaire en tant qu'ARNm viral (V'kovski *et al.*, 2021). Le génome possède en 5' une coiffe, suivie d'une séquence TRS (Transcription and regulatory sequence) ou *leader*. En 3', le génome présente une queue poly-adenylée, lui assurant une plus grande stabilité et lui permettant également d'échapper aux exonucléases de la cellule hôte (Brant *et al.*, 2021). Le génome est divisé en 14 ORF (« Open reading frame » ou cadre de lecture ouvert) de tailles variées et qui présentent un décalage du cadre ribosomal permettant l'expression de gènes codant de nombreuses protéines non-structurales. Approximativement

deux tiers de l'extrémité 5' du génome contiennent les ORF 1a et 1b qui codent principalement des protéines impliquées dans la réplication (la protéase « papain-like », la protéase 3CL, le RdRp, l'hélicase et l'endoribonucléase). Le dernier tiers de la partie 3' du génome code pour les protéines structurales (les protéines S, E, M et N) et huit protéines accessoires (Figure 8) (Wu *et al.*, 2020).

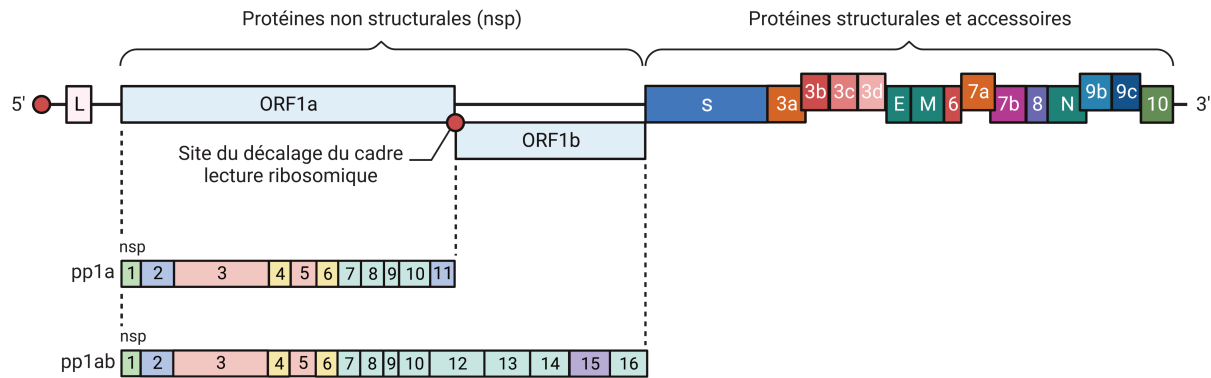


Figure 8 : Génome du SARS-CoV-2.

(ORF : Cadre de lecture ; L : séquence leader ; S : protéine « Spike » ; E : protéine d'enveloppe ; M : protéine de membrane ; N : protéine de nucléocapside), adapté de (Hartenian *et al.*, 2020).

e. Protéines virales

Le génome viral code 16 protéines non-structurales, impliquées dans la réplication du génome et la régulation précoce de la transcription (Yoshimoto, 2020) : 11 protéines accessoires, impliquées dans la pathogénèse et ayant un rôle important dans les interactions virus-hôte (Rohaim *et al.*, 2021) et 4 protéines structurales, dont les rôles ont été décrits précédemment. Seule la glycoprotéine S sera abordée plus en détail.

La glycoprotéine « spike » S, de classe I, est présente à la surface de l'enveloppe virale sous forme de trimère. Cette protéine joue un rôle important dans l'infectivité, la diversité d'hôtes et la pathogénèse (Li, 2016). Elle est divisée en deux sous-unités distinctes : S1 et S2 (V'kovski *et al.*, 2021). La sous-unité S1 contient le domaine de liaison au récepteur cellulaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) et la sous-unité S2 possède le peptide de fusion, assurant la fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire et ainsi l'entrée de la particule virale (V'kovski *et al.*, 2021). Deux sites de clivages, séquentiellement clivés par des protéases cellulaires vont permettre d'une part de faciliter la liaison entre le récepteur cellulaire et S1 et d'autre part la libération du peptide de fusion (de Haan and Rottier, 2005; Heald-Sargent and Gallagher, 2012).

f. Cycle viral

Le SARS-CoV-2 possède un cycle viral cytoplasmique, qui peut se décomposer en six étapes : l'entrée dans la cellule, la traduction de la polyprotéine, la réplication, la transcription des ARN viraux, l'assemblage et la sortie (Figure 9).

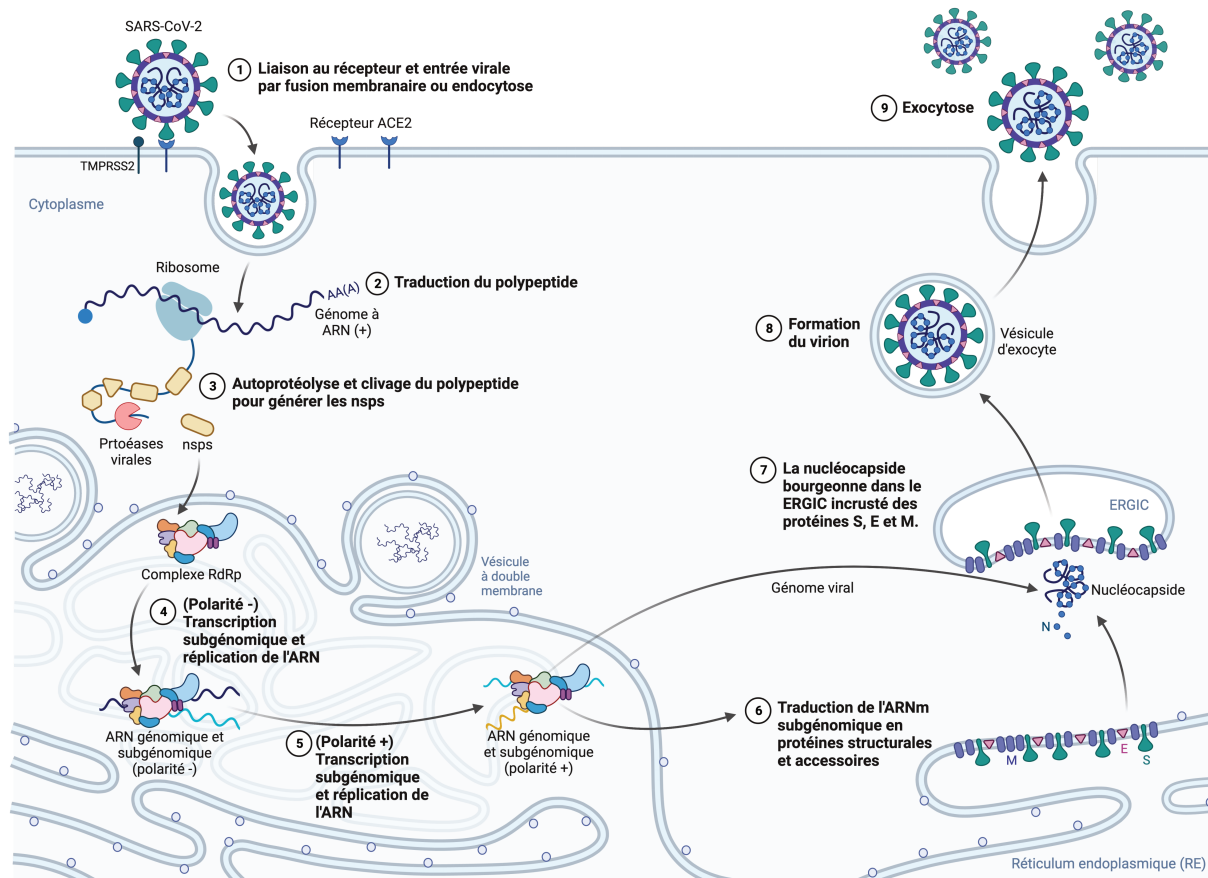


Figure 9 : Cycle de réplication viral du SARS-CoV-2.

(nsp : protéine non structurale ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante ; ERGIC : compartiment intermédiaire Golgi-réticulum endoplasmique ; S : protéine « Spike » ; E : protéine d'enveloppe ; M : protéine de membrane), adapté de (Hartenian *et al.*, 2020).

- Adsorption et entrée dans la cellule hôte :

L'entrée du virus dans la cellule se fait par soit par endocytose, soit par l'interaction entre la protéine S et son récepteur cellulaire ACE2. Ce récepteur est présent sur la membrane de nombreux types cellulaires tels que les cellules alvéolaires (poumon), les entérocytes (intestin grêle), les cellules endothéliales (artères, veines), ou les cellules de muscles lisses (Sallard *et al.*, 2020).

La fusion des membranes du virus et de la cellule hôte se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, les deux sous-unités S1 et S2 sont clivés par une furine. La sous-unité S1 présentant un peptide signal va permettre de guider la particule vers la membrane cible (Xia, 2021). Ensuite, la sous-unité S2 est clivée par la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2), permettant ainsi

l'activation du domaine S2 et la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte (Figure 10) (Lan *et al.*, 2020).

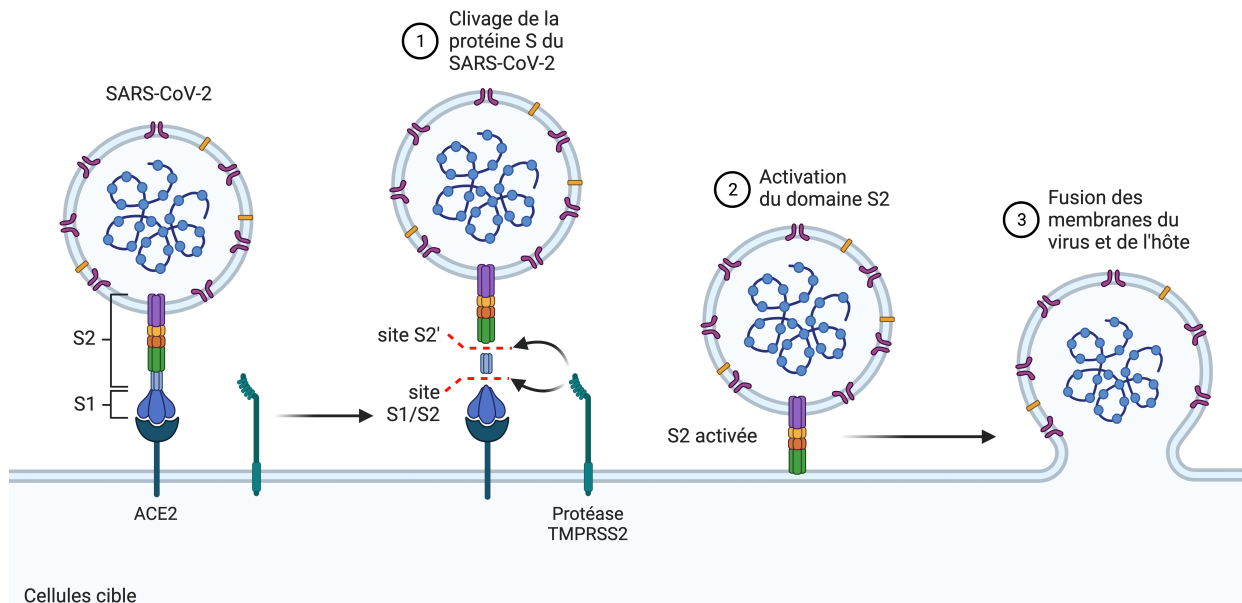


Figure 10 : Mécanisme d'entrée virale du SARS-CoV-2.

Adapté de (Hartenian *et al.*, 2020).

- Traduction de la polyprotéine :

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, la décapsidation de l'ARN viral s'accomplit et les ORF1a et ORF1b sont traduites à l'aide des ribosomes cellulaires (V'kovski *et al.*, 2021; Eriani and Martin, 2022). Les polyprotéines produites, respectivement pp1a et pp1b sont clivées par les deux protéases « papain-like » virales, PLPro (Nsp3) et 3CLPro (Nsp5) en 16 protéines non-structurales qui s'assemblent ensuite pour former le complexe viral de transcription et de réplication contenant notamment l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Lan *et al.*, 2020).

- La réplication :

L'ARN viral de polarité positive va servir de matrice pour générer un antigénome (de polarité négative), qui servira à son tour de matrice pour la réplication du génome viral. Cette réplication se déroule au sein de vésicules à double membrane qui permettent la séparation physique de ces ARN des senseurs immunitaires présents dans le cytoplasme, et cela afin d'échapper à l'immunité innée de l'hôte (Brant *et al.*, 2021). Cependant, la présence de séquence TRS va parfois induire une interruption de la transcription et la production d'ARN subgénomiques (ARNsg) de polarité négative qui servent alors de matrice pour la transcription d'ARNsg de polarité positive (Brant *et al.*, 2021; V'kovski *et al.*, 2021).

- Transcription et traduction des ARN viraux :

Ces ARNs de polarité positive sont ensuite traduits pour permettre la synthèse des protéines structurales (S, M, E et N) et des protéines accessoires (Lan et al., 2020). Ces étapes se déroulent dans des vésicules périnucléaires à double membrane, toutes dérivées du réticulum endoplasmique (RE), qui vont permettre de protéger les ARN viraux (V'kovski et al., 2021).

- L'assemblage et la sortie :

La protéine N s'attache ensuite aux brins d'ARN de polarité positive pour former le complexe nucléoprotéique. Les protéines structurales ainsi que le complexe nucléoprotéique s'assemblent dans le compartiment intermédiaire Golgi-réticulum endoplasmique (ERGIC) (Arya et al., 2021). Les virions se forment ensuite par bourgeonnement de l'appareil de Golgi et sont libérés hors de la cellule par exocytose (V'kovski et al., 2021).

D) La rage, un exemple de virus négligé

a. Épidémiologie et physiopathologie

La rage est une zoonose responsable selon des estimations d'environ 59 000 décès par an (Hampson et al., 2015) et touchant particulièrement les populations pauvres vivant en milieu rural et âgées de moins de 15 ans (OMS, 2023e). 95 % des cas de rage surviennent en Afrique et en Asie (Figure 11) (OMS, 2023e).

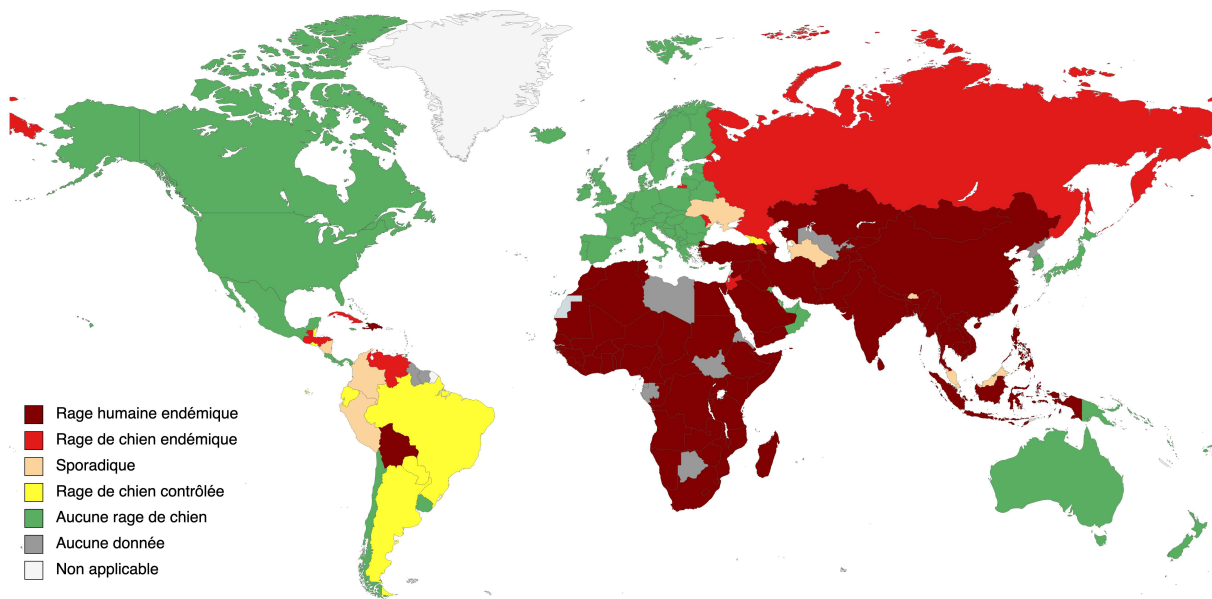


Figure 11 : Prévalence de la rage transmise par les chiens dans le monde en 2021.
D'après (OMS, 2021d).

Les mammifères et particulièrement les chauves-souris constituent les hôtes primaires des *Lyssavirus*, genre regroupant plusieurs espèces virales, dont le virus de la rage est le chef de file (Banyard *et al.*, 2020). En ce qui concerne ce dernier, les carnivores terrestres comme le chien, le renard, le raton-laveur, la mouffette, la mangouste et les chauves-souris constituent les hôtes primaires principaux (OMS, 2023e).

La transmission de l'animal à l'Homme se fait principalement par morsure, par griffure ou léchage sur peau lésée, ou bien par projection sur les muqueuses (oculaire ou buccale) (OMS, 2023e). Des cas de transmission interhumaines ont également été rapportés, lors de greffes d'organes ou de tissus provenant de donneurs infectés (Hellenbrand *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2018). Le chien est responsable de 95 % à 99 % de la transmission de la rage chez l'Homme (OMS, 2023e).

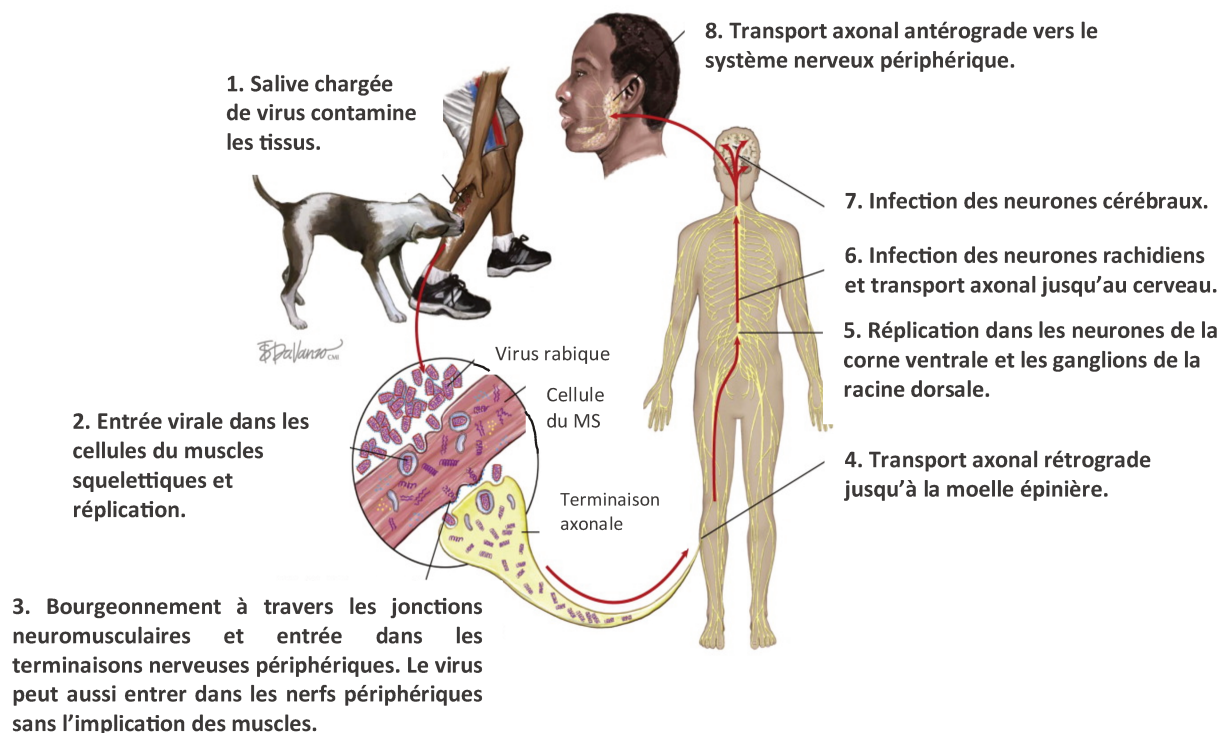


Figure 12 : Transmission du virus de la rage par le chien chez l'homme et sa propagation dans le corps humain.

(MS : Muscle squelettique), (Jong and Stevens, 2012).

Après l'entrée du virus dans l'organisme, la période d'incubation débute, pouvant aller de quelques semaines à plusieurs années, mais d'une durée moyenne de 2 à 3 mois (OMS, 2023e). Cette variabilité est fonction de la localisation du site et de la sévérité de la morsure, de la quantité de virus introduit, et du statut immunitaire de la personne mordue (OMS, 2023e). Durant cette période d'incubation, le virus se réplique dans le muscle au niveau du

site de morsure, puis rejoint le système nerveux périphérique (SNP) via la jonction neuromusculaire, afin d'atteindre le système nerveux central (SNC) par transport rétrograde (Fooks and Jackson, 2020) (Figure 12). Ce transport est caractérisé par la période prodromique, d'une durée de 2 à 10 jours, se manifestant par des symptômes non-spécifiques et de faible intensité, tels que de la fièvre, des céphalées, ainsi qu'une sensation anormale autour du site de morsure (démangeaison, brûlure, engourdissement) (OMS, 2023e). Une fois le virus dans le SNC, la période neurologique aiguë débute, caractérisée par une rage furieuse ou une rage paralytique. La rage furieuse, développée dans 80 % des cas, se caractérise par des troubles du comportement, une hyperactivité, une hydrophobie et aérophobie, des spasmes respiratoires et des dysfonctionnements du système nerveux autonome. La rage paralytique se caractérise par une paralysie flasque. Enfin, cette période est suivie d'un coma, étape finale de la maladie, qui aboutit à la mort du patient au bout de 2 à 7 jours (Figure 13) (OMS, 2023e).

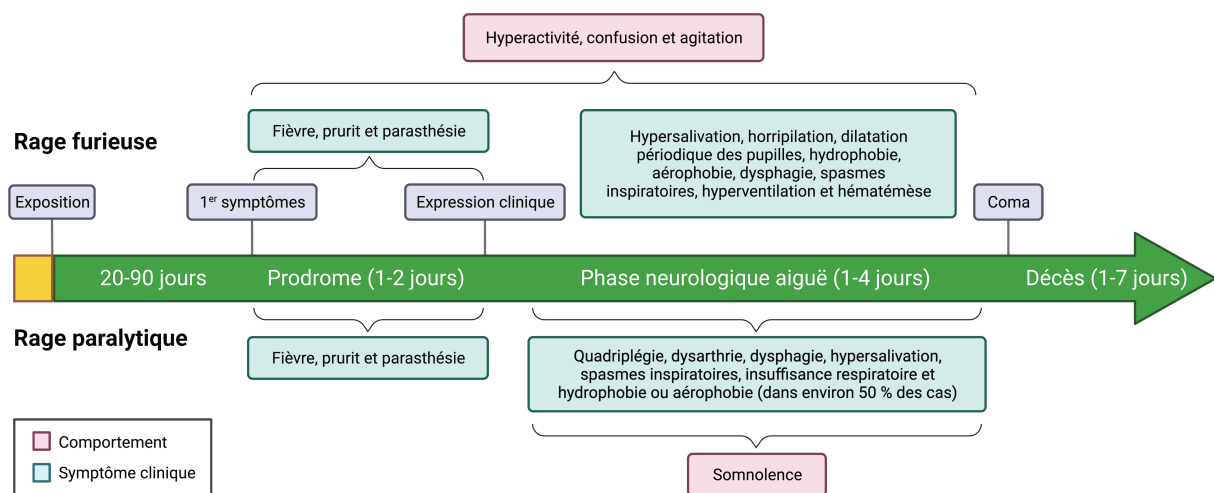


Figure 13 : Tableau clinique de la rage.

Comportements et symptômes cliniques observés au cours du temps chez les patients atteints de rage furieuse ou de rage paralytique (Fooks et al., 2017).

Il n'existe actuellement aucun traitement contre la rage dès l'apparition des symptômes et l'issue de la maladie est inévitablement fatale. C'est pourquoi de nombreuses mesures de prévention chez l'animal et chez l'Homme sont mises en œuvre dans le but de diminuer le nombre de cas de rage humaine, avec notamment le plan stratégique mondial mis en place par l'OMS, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, « Food and Agriculture Organization ») pour éliminer la rage humaine d'origine canine d'ici 2030 (OMS, 2018a). Les mesures prises chez l'animal sont : le contrôle aux frontières des animaux importés et la vaccination des animaux

domestiques et en particulier des chiens ainsi que de la faune sauvage dans les régions concernées (par exemple, le renard en Europe) (OMS, 2023e). Chez l'Homme, il existe deux circonstances d'administration du vaccin antirabique : la vaccination préventive pour personne à risque ou vivant en zone endémique, aussi appelée prophylaxie pré-exposition (PrEP) et la prophylaxie post-exposition (PPE) en cas d'exposition récente, complétée par l'injection d'immunoglobuline antirabique selon la gravité de la morsure (Xu et al., 2021).

b. Taxonomie

Le virus de la rage appartient à l'ordre des Mononegavirales qui comprend 11 familles, dont les Filoviridae, les Paramyxoviridae et les Bornaviridae (ICTV, 2022). Au sein de cet ordre, il appartient à l'une des familles les plus importantes, les Rhabdoviridae. Cette dernière est composée de 20 genres dont les plus importants sont les *Cytorhabdovirus*, les *Nucleorhabdovirus*, les *Novirhabdovirus*, les *Ephemerovirus*, les *Vesiculovirus* et les *Lyssavirus*. Le genre des *Lyssavirus* est formé de 16 espèces (Figure 14) (ICTV, 2022).

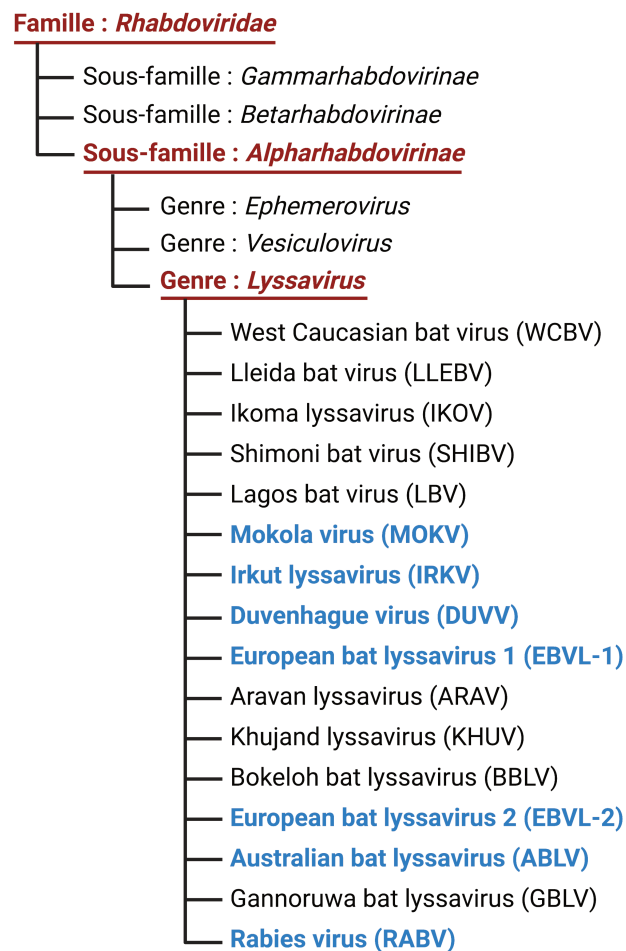


Figure 14 : Taxonomie des *Lyssavirus*.

(En bleu, les *Lyssavirus* responsables de décès chez l'homme), d'après (Echevarría et al., 2019; ICTV, 2022).

c. Morphologie

Le virus de la rage est un virus enveloppé, d'environ 180 nm de long et 75 nm de diamètre, qui possède une morphologie en « balle de fusil » (Howley and Knipe, 2022). L'enveloppe est formée d'une bicouche phospholipidique avec, fichée à sa surface, des glycoprotéines virales (G) transmembranaires. Ces protéines permettent l'entrée du virus dans la cellule cible. Sur la face interne de l'enveloppe et associées à cette dernière, se trouvent des protéines de matrice (M), qui permettent une association de la bicouche lipidique à la nucléocapside (Lenard and Vanderoef, 1990; Dancho *et al.*, 2009), formée de la nucléoprotéine (N), qui encapside le génome viral pour former une structure de symétrie hélicoïdale (Howley and Knipe, 2022).

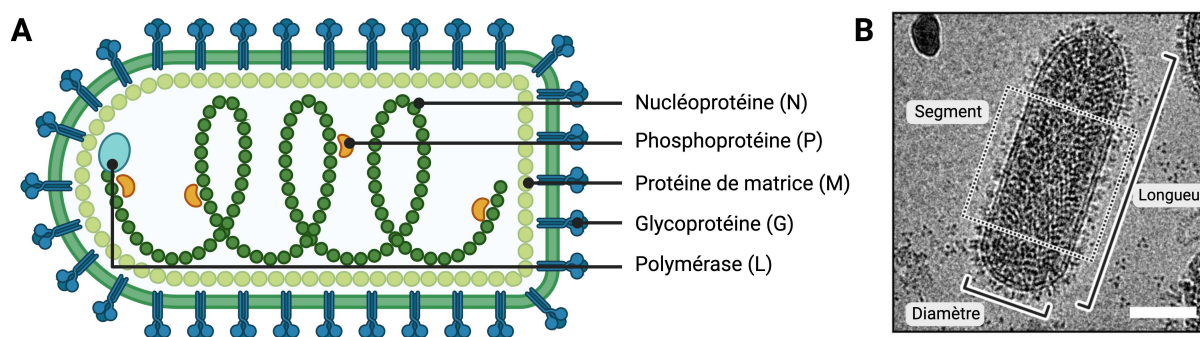


Figure 15 : Particule virale du virus de la rage.

A. Représentation schématique de la morphologie du virus de la rage. **B.** Particule virale du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), proche du virus de la rage, en forme de balle de fusil, obtenue par cryo-microscopie électronique. L'image a été filtrée en mode passe-bas et le contraste a été renforcé (Barre d'échelle : 50 nm), (Jenni *et al.*, 2022).

d. Génome viral

Le génome du virus de la rage est formé d'un ARN simple-brin de polarité négative et non segmenté d'environ 12 kb (Fooks *et al.*, 2017). Non-infectieux, il n'est ni cappé, ni polyadénylé (Albertini, Ruigrok and Blondel, 2011). Il possède des séquences *Leader* et *Trailer* respectivement aux extrémités 3' et 5', de 58 et 70 nucléotides, qui sont partiellement complémentaires (Ogino and Green, 2019). Elles servent de promoteurs lors de la transcription et la réplication et permettent l'encapsulation de génomes et d'antigénomes lors de la réplication. Les séquences *Leader* peuvent également être transcrites en petits ARN non coiffés et non polyadénylés, qui ne seront pas traduits en protéines, et dont les fonctions sont encore ignorées (Conzelmann and Schnell, 1994; Schnell, Mebatsion and Conzelmann, 1994; Finke and Conzelmann, 1997; Ogino and Green, 2019; Ogino *et al.*, 2019) (Figure 16).

Les gènes N, P, M, G et L, présents dans cet ordre dans le génome viral, sont séparés par des séquences non-codantes intergéniques qui contrôlent l'activité de la polymérase virale (Figure 16). Ces séquences permettent de signaler à la polymérase la fin du gène en amont et le commencement du gène en aval du génome. En outre, ces séquences induisent le détachement de la polymérase du génome ainsi qu'une diminution progressive de l'efficacité de la transcription (Barr *et al.*, 2008; Albertini, Ruigrok and Blondel, 2011). Cela expliquerait le mécanisme d'initiation et d'arrêt de la transcription (« start and stop ») proposé pour la polymérase virale lors de la transcription (Albertini, Ruigrok and Blondel, 2011).

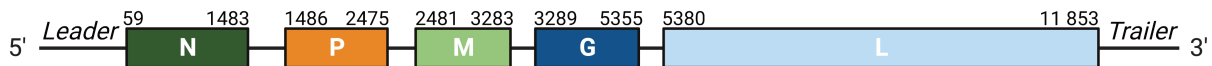


Figure 16 : Génome du virus de la rage.

(N : Nucléoprotéine ; P : Phosphoprotéine ; M : Protéine de matrice ; G : Glycoprotéine ; L : Protéine L), adapté de (Howley and Knipe, 2022).

e. Protéines virales

Les protéines L, P et N forment le complexe de réplication viral. Ce complexe est formé de deux structures principales : L-P et L-P-N.

La protéine L (255 kDa) possède la capacité de transcrire l'ARN génomique en 5 ARN messagers coiffés et méthylés, et polyadénylés (Li, Fontaine-Rodriguez and Whelan, 2005; Ogino *et al.*, 2005, 2019; Ogino and Banerjee, 2007; Rahmeh *et al.*, 2009; Morin, Rahmeh and Whelan, 2012). Sa structure n'a été résolue que récemment, en 2020, par cryo-microscopie électronique à une résolution de 3,3 Å (Horwitz *et al.*, 2020) en s'aidant de la structure de la protéine L du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) disponible depuis plusieurs années pour affiner la résolution. Cette protéine comprend 5 domaines : un domaine RdRp ; un domaine comprenant une activité enzymatique synthétisant la coiffe des ARNm viraux en 5' et une activité de polyribonucleotidyltransférase (CAP) ; un domaine connecteur (CD) ; un domaine de méthyltransférase (MT) permettant la méthylation de la coiffe des ARNm viraux ; et un domaine C-terminal (CTD) (Horwitz *et al.*, 2020). Plusieurs motifs, conservés au sein des *Rhabdovirus*, caractérisent les sites actifs des différents domaines : le motif GDN étant le site catalytique du domaine polymérase (RdRp) ; les motifs GxxT et HR responsables de l'activité de polyribonucleotidyltransférase et impliqués dans l'ajout de coiffe ; et les motifs GxGxG et K-D-K-E impliqués dans la méthylation de la coiffe (Figure 17) (Horwitz *et al.*, 2020).

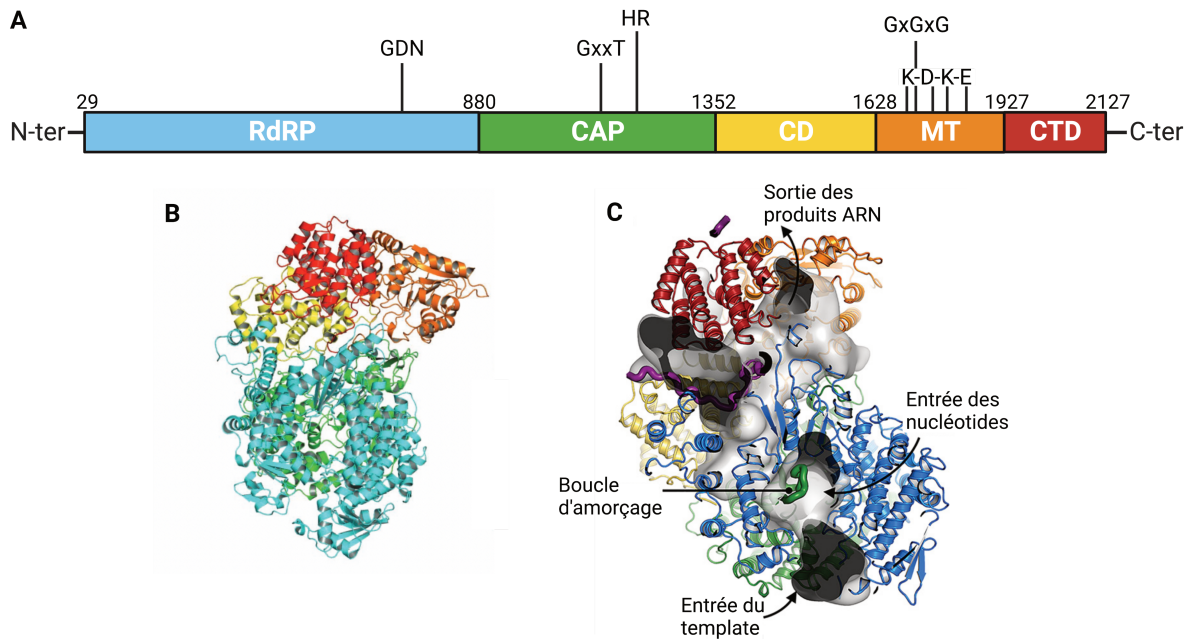


Figure 17 : Domaines et structure de la protéine L.

A. Domaines et motifs de la protéine L du virus de la rage. **B.** Structure de la protéine L du VSV, résolue par cryomicroscopie électronique. Le code couleur correspond au domaine de la figure A. **C.** Trajet de l'ARN proposé à travers la protéine L. Coupe montrant les cavités internes continues (grises, surface translucide) à travers la protéine L. Les flèches noires indiquent les voies d'entrée des nucléotides et de la matrice ARN et la voie de sortie présumée du produit ARN néosynthétisé. (RdRP : Domaine ARN polymérase ARN dépendant ; CAP : Domaine de coiffe ; CD : Domaine connecteur ; MT : Domaine de méthyltransférase ; CTD : Domaine C-terminal ; N-ter : N-terminal ; C-ter : C-terminal ; GDN, GxxT, HR, GxGxG, et K-D-K-E : motifs caractérisant les sites actifs des différents domaines ; template : matrice d'ARN), d'après (Horwitz *et al.*, 2020; Ouizougou-Oubari and Fearn, 2023).

La phosphoprotéine (P) (35 kDa) est un cofacteur indispensable de la protéine L (Ogino and Green, 2019). Elle s'y associe par son domaine C-terminal, à l'aide de deux régions composées des résidus 1 à 19 et des résidus 40 à 100 (Chenik *et al.*, 1998). La structure de ce complexe a été partiellement résolue par cryo-microscopie électronique d'une résolution de 3,3 Å, où la protéine L interagit avec les résidus 1 à 91 de la phosphoprotéine (Horwitz *et al.*, 2020). Cette interaction induit la conformation de la RdRp, et permet son positionnement et son maintien sur la matrice d'ARN-N, aussi appelé ribonucléoprotéine (Ogino and Green, 2019) (Figure 18). La phosphoprotéine possède la capacité d'interagir avec la nucléoprotéine liée à l'ARN par les résidus 186 à 296 en position carboxy-terminale (domaine C-terminal ou CTD), mais également avec la nucléoprotéine présente sous forme soluble à l'aide des résidus 4 à 40 en position amino-terminale (domaine N-terminal ou NTD) pour former le complexe

N-P, permettant l'encapsidation du génome en cours de réplication, dont la structure a été résolue (Mavrakis *et al.*, 2003, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009; Ogino and Green, 2019).

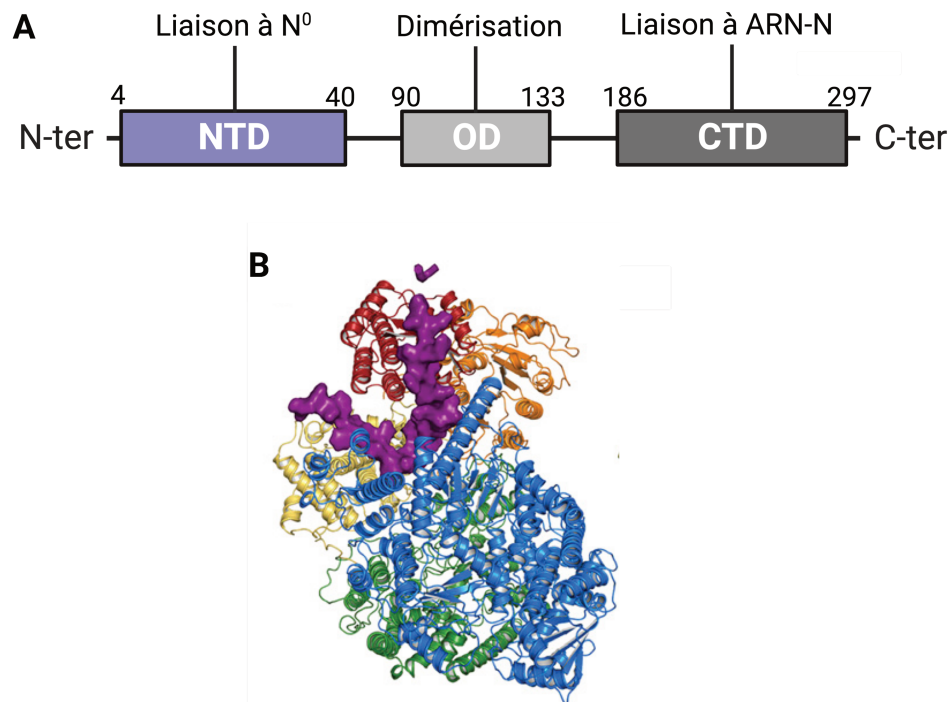


Figure 18 : Domaines de la phosphoprotéine et structure du complexe de la protéine L et de la phosphoprotéine.

A. Domaine de la phosphoprotéine du virus de la rage. **B.** Structure du complexe L-P du virus de la rage, avec les résidus 1 à 91 de la P représentés en violet. (NTD : Domaine N-terminal ; OD : Domaine central ; CTD : Domaine C-terminal ; N-ter : N-terminal ; C-ter : C-terminal ; N : Nucléoprotéine ; N° : Nucléoprotéine soluble), d'après (Horwitz *et al.*, 2020).

La nucléoprotéine (N) (54 kDa) possède aussi deux domaines distincts en position N et C-terminale : NTD (résidus 32 à 233) et CTD (résidus 236 à 366). Ces domaines s'orientent de façon à former un sillon capable d'interagir avec l'ARN viral, dont la structure a été résolue en 2006 (Figure 19) (Albertini *et al.*, 2006). Mais la nucléoprotéine interagit aussi avec la phosphoprotéine par une boucle dans sa région C-terminale (Green and Luo, 2009). En se fixant aux ARN viraux, cette protéine les protège de la dégradation par les RNases, et prévient également la formation de structures secondaires sur ces ARN viraux (Ogino and Green, 2019).

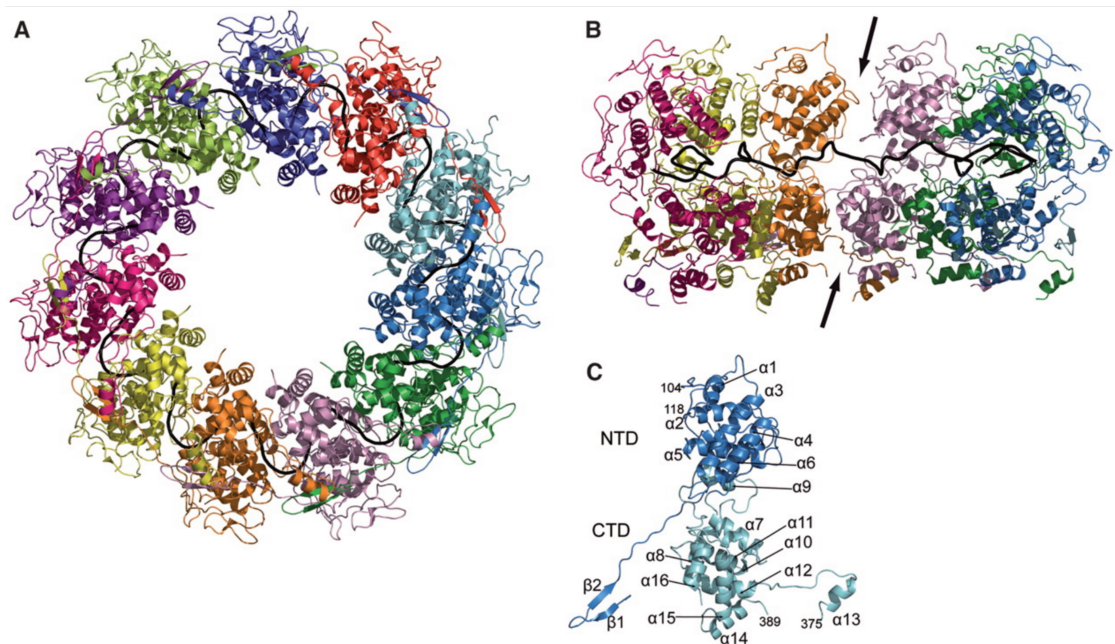


Figure 19 : Structure du complexe ARN-Nucléoprotéine.

A. Structure en anneau de l'oligomère N-ARN vue du bas. Chaque protomère N est coloré différemment. L'ARN est représenté en noir. **B.** Vue de l'intérieur de la structure en anneau ; le domaine NTD est en haut et le domaine CTD, en bas. L'ARN est représenté en noir. La flèche du haut indique que les NTD n'interagissent pas entre eux ; la flèche du bas pointe vers l'interface entre les CTD. **C.** Structure du protomère N ; le NTD est représenté en bleu foncé et le CTD en bleu clair. Les éléments de la structure secondaire hélicoïdale sont numérotés consécutivement. (Albertini et al., 2006).

La glycoprotéine (G) (65 à 80 kDa) et la protéine de matrice (M) (22 à 25 kDa) sont deux protéines structurales, respectivement impliquées dans la fixation du virus à divers récepteurs cellulaires (Belot, Albertini and Gaudin, 2019) et dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales (Graham et al., 2008; Ge et al., 2010).

f. Cycle viral

Le virus de la rage possède un cycle viral cytoplasmique, qui peut se décomposer en quatre étapes : l'entrée dans la cellule, la transcription et traduction, la réplication, l'assemblage et la sortie (Figure 20) (Albertini, Ruigrok and Blondel, 2011).

- Fixation et entrée dans la cellule cible :

La fixation du virus aux cellules cibles se fait par l'intermédiaire des glycoprotéines présentes à la surface de ce dernier. Cette protéine va se lier à divers récepteurs, tels que le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) (Gastka, Horvath and Lentz, 1996), la molécule d'adhésion aux neurones cellulaires (NCAM) (Belot, Albertini and Gaudin, 2019), le

récepteur de la neurotrophine p75 (p75NTR) (Tuffreau *et al.*, 1998), et le récepteur du sous-type 2 métabotropes du glutamate (mGluR2) (Wang *et al.*, 2018).

Après la fixation du virus à un récepteur cellulaire, ce dernier pénètre dans la cellule par endocytose (Piccinotti, Kirchhausen and Whelan, 2013). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale après l'acidification endosomale permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire (Belot, Albertini and Gaudin, 2019).

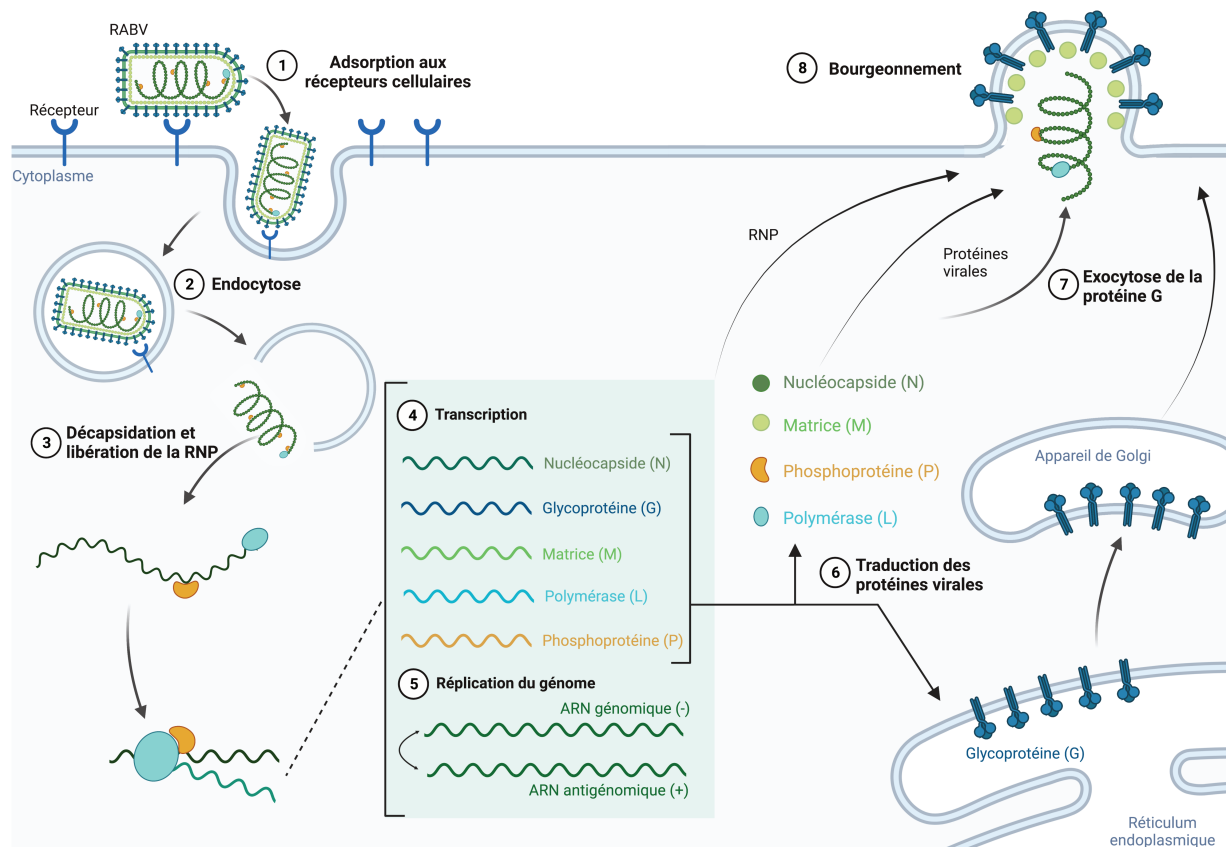


Figure 20 : Cycle de réplication du virus de la rage.
D'après Juliette Perrot (2021), adapté de (Fooks *et al.*, 2017).

- Transcription et traduction :

Une fois la ribonucléocapside libérée dans le cytoplasme, la protéine M, ayant la capacité d'inhiber la transcription, se détache (Clinton *et al.*, 1978). La transcription, médiée par la RdRp virale, débute alors dans les corps de Negri, ou usine virale, pour synthétiser des ARN messagers codant pour les différentes protéines virales (Kristensson *et al.*, 1996; Lahaye *et al.*, 2009; Nikolic *et al.*, 2017; Ogino and Green, 2019). Les ARNm transcrits et polyadénylés sont ensuite pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire pour les traduire en protéines virales.

- Réplication virale :

La réplication virale débute une fois que suffisamment de nucléoprotéines et de phosphoprotéines ont été synthétisées. Ceci permet au génome viral répliqué d'être rapidement encapsidé par la nucléoprotéine limitant la détection des ARN viraux par les senseurs du système immunitaire cellulaire (Ogino and Green, 2019).

De plus, l'encapsidation de l'ARN en cours de la transcription semblerait être un signal permettant à la polymérase virale de ne pas détecter les séquences intergéniques, d'éviter le détachement du complexe de réplication et ainsi de synthétiser un ARN complet de polarité positive, aussi appelé antigénome (Blumberg, Leppert and Kolakofsky, 1981). Ce dernier va alors servir de matrice pour la transcription des ARN génomiques viraux de polarité négative (Albertini, Ruigrok and Blondel, 2011).

- Assemblage et bourgeonnement des particules virales :

Après la synthèse des protéines virales, celles-ci vont soit s'associer aux ARN génomiques et antigénomiques viraux nouvellement synthétisés, soit emprunter la voie de sécrétion (Knipe, Baltimore and Lodish, 1977). En effet, la nucléoprotéine, une fois traduite, va s'associer à l'ARN viral, tandis que la protéine de matrice, synthétisée sous forme de protéine soluble, va s'associer à la membrane cellulaire du côté cytoplasmique (McCreeedy, McKinnon and Lyles, 1990). La glycoprotéine néosynthétisée emprunte alors la voie de sécrétion. Pour cela, elle est transportée dans le réticulum endoplasmique, puis dans l'appareil de Golgi où elle va être l'objet de modifications post-traductionnelles. Finalement, les glycoprotéines sont transportées jusqu'à la membrane plasmique où elles s'organisent en microdomaines trimérique (Brown and Lyles, 2003; Callaway *et al.*, 2022). La sortie des particules virales se fait par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique.

Ces maladies (ré)émergentes et/ou négligées sont responsables de nombreux décès dans le monde lors d'épisodes épidémiques ou par manque de moyens disponibles pour lutter contre ces infections. Néanmoins, pour prévenir certaines de ces maladies, la vaccination reste un outil indispensable.

E) Prévenir les maladies émergentes et négligées par la vaccination

Le vaccin est un produit biologique qui va induire une réponse immunitaire pour produire des anticorps et garder en mémoire ce premier contact, afin de protéger l'organisme

contre d'éventuelles nouvelles infections grâce à une réponse immunitaire plus efficace (OMS, *Vaccins et vaccination*, 2022). Plusieurs catégories de vaccins sont disponibles sur le marché : vaccins vivants atténués, inactivés, à vecteur viral non répliquatif, à acides nucléiques (ADN ou ARN), sous-unitaires (Figure 19) (Pollard and Bijker, 2021).

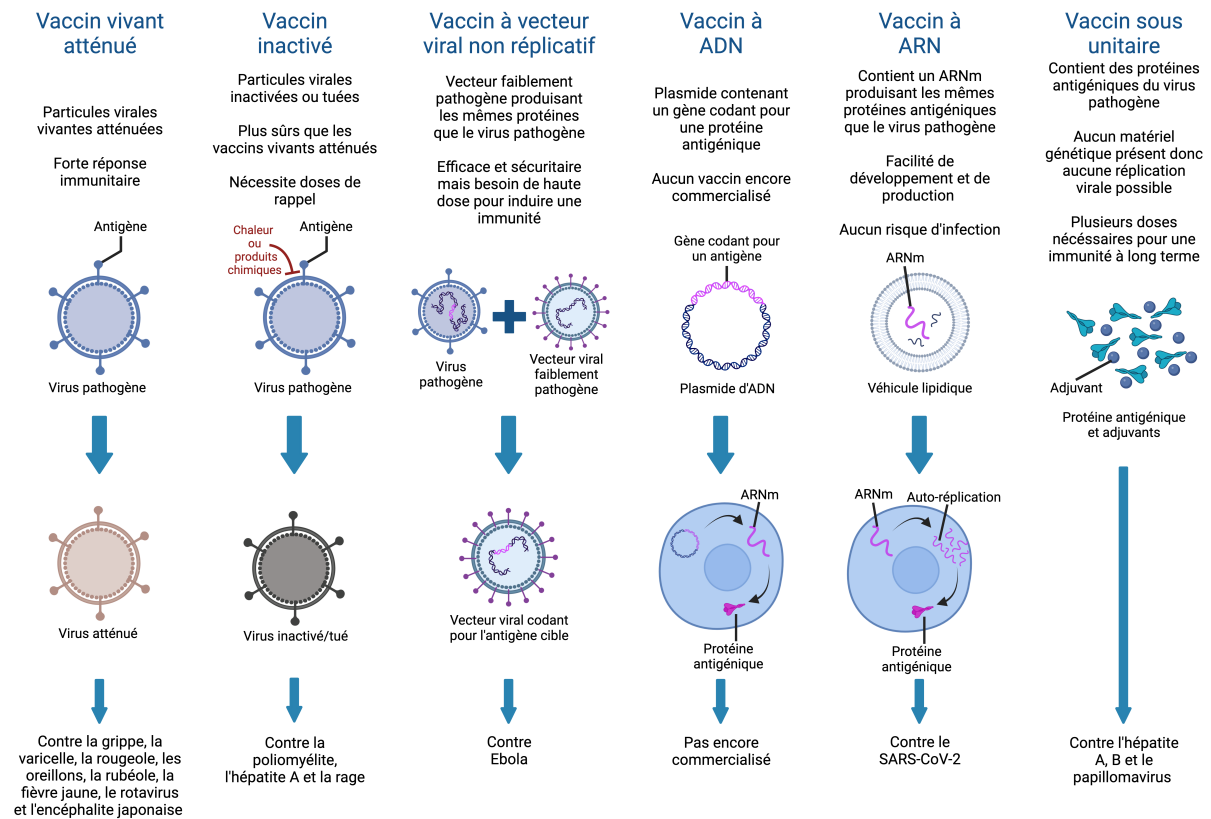


Figure 21 : Les différents types de vaccins.

Description des vaccins actuellement utilisés en médecine humaine, leurs avantages, leurs modes de fonctionnement, et contre quelles maladies ils sont utilisés. D'après (Pollard and Bijker, 2021; Ramesh, 2021).

La vaccination est l'un des moyens les plus efficaces pour prévenir et contrôler les maladies infectieuses (Andre *et al.*, 2008; Rémy, Zöllner and Heckmann, 2015). Cela a particulièrement été le cas pour la variole, la première et seule maladie humaine éradiquée, grâce à la vaccination (Henderson, 2011). Outre la variole, d'autres maladies telles que la rage, la poliomyélite, la rubéole, la rougeole, mais aussi la COVID-19 ont pu être contrôlées par la vaccination (Greenwood, 2014). Et bien que de nombreuses technologies aient été développées au cours des dernières décennies, la mise au point d'un vaccin induisant une réponse immunitaire sûre et protectrice est souvent une tâche très difficile en particulier pour les maladies négligées et émergentes (Brisse *et al.*, 2020). De plus, il est impératif de rendre la vaccination accessible au plus grand nombre de pays possible. Cet objectif ne peut être atteint que si les chercheurs disposent de ressources suffisantes pour comprendre chaque cible et la

réponse immunitaire sous-jacente à l'infection naturelle, ce qui est rare pour les maladies négligées. L'absence de vaccins contre certaines maladies négligées et émergentes n'est pas surprenante. Le développement de nouveaux vaccins se heurte à plusieurs difficultés, notamment la faiblesse des investissements dans la recherche, le manque d'intérêt de l'industrie due à la taille réduite du marché et de la complexité du cycle de vie de certains agents pathogènes, mais aussi de la difficulté d'identifier des mécanismes de protection. Un autre problème est la montée récente du mouvement anti-vaccination, qui a un impact non seulement sur la santé publique et les progrès en matière de vaccination, mais aussi sur la stabilité sociale et politique (OMS, 2021b). Cette insuffisance de la vaccination contre certaines maladies nécessite donc un travail portant sur l'amélioration de l'acceptation sociétale et également un investissement dans la recherche et le développement de nouveaux médicaments antiviraux (Gonçalves *et al.*, 2021).

II- Les traitements antiviraux

Les thérapies antivirales développées pour traiter les infections virales, sont basées sur l'utilisation de différents composés qui inhibent la formation de nouvelles particules en ciblant différentes étapes du cycle viral. Le développement de médicaments antiviraux est un processus complexe qui comprend de nombreuses étapes telles que le criblage et l'identification de molécules actives, leurs optimisations, les différentes études cliniques, l'enregistrement des médicaments et leur autorisation de mise sur le marché (Saxena *et al.*, 2010). La plupart des antiviraux mis au point sont spécifiques à une famille de virus. C'est un processus privilégié par rapport à la conception plus complexe d'antiviraux à large spectre, nécessitant de cibler des protéines critiques appartenant à plusieurs virus ou de cibler des processus cellulaires essentiels utilisés par différents virus (Geraghty, Aliota and Bonnac, 2021). Une autre stratégie est celle de la réutilisation de médicaments déjà approuvés et connus pour avoir des effets antiviraux contre d'autres virus ou non. Cette stratégie est avantageuse en termes de réduction des coûts et de gain de temps, et constitue donc un élément essentiel des réponses d'urgence mises en place lors des crises de santé publique, telles que les dernières épidémies d'Ebola, de Zika, de la Dengue et du SARS-CoV-2 (Mercorelli, Palù and Loregian, 2018). Les virus étant des pathogènes intracellulaires obligatoires, ils utilisent la machinerie de la cellule hôte pour se répliquer, cela rend donc difficile la conception d'un médicament antiviral sûr et efficace, qui interférerait avec le virus

sans endommager les cellules de l'hôte (Romanowski, 2013). En outre, les principales complications dans le développement de médicaments antiviraux sont dues à la variabilité et la vitesse d'évolution génétique des virus. Ainsi, certains virus nécessitent parfois l'utilisation de plusieurs molécules, constituant alors une polythérapie antivirale ou une thérapie combinée, utilisée par exemple dans le cas du VIH, afin d'augmenter l'efficacité du traitement (Dewdney *et al.*, 2013).

Ces thérapies antivirales, palliant l'inexistence ou l'insuffisance de la vaccination présente pour certains virus, ont émergé après le développement du premier traitement antiviral chez l'homme en 1963 : l'iododeoxyuridine, un analogue de nucléoside, actif contre le virus herpes simplex (VHS) (Prusoff, 1963). Puis dans les années 1970, le développement de l'aciclovir, également contre le VHS, a représenté une avancée majeure dans le développement de traitements contre les infections virales (Schaeffer *et al.*, 1978). En effet, cette molécule a ouvert la voie au développement de prodrogues, comme le valaciclovir, qui sont métabolisées et activées par l'organisme, permettant d'augmenter significativement leur biodisponibilité (De Clercq and Field, 2006). Depuis ces années, plus d'une centaine de thérapies antivirales ont été développées pour traiter des milliers de patients à travers le monde. Néanmoins, ces thérapies ne ciblent qu'une dizaine de virus : le VIH, les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC), le virus de la grippe, le VHS, le papillomavirus (VPH), le virus respiratoire syncytial (VRS), le cytomégalovirus (HCMV) et le virus varicelle-zona (VZV). Cela souligne un besoin croissant pour de nouvelles stratégies afin de développer des antiviraux contre d'autres virus tout autant pathogènes (Zika, Ebola, SARS-CoV-2, etc...) (Tompa *et al.*, 2021). Les antiviraux présents actuellement sur le marché vont soit interférer directement avec la particule virale et son cycle, soit moduler la réponse de l'hôte.

A) Modulation du cycle viral

En principe, toutes les étapes du cycle de vie du virus, de l'entrée à la libération, peuvent être explorées en tant que cibles moléculaires pour la recherche d'une thérapie antivirale (Richman and Nathanson, 2016). Néanmoins, certains antiviraux ciblant le cycle de réplication du virus et nécessitant la machinerie cellulaire, peuvent également affecter des fonctions essentielles de la cellule hôte, entraînant un risque élevé de toxicité. Par conséquent, la préoccupation majeure dans le développement de médicaments antiviraux est l'identification de cibles spécifiques avec une sélectivité accrue et des effets secondaires réduits (Bule, Khan and Niaz, 2019).

a. Entrée virale

L'entrée du virus dans la cellule cible hôte est la première étape du cycle de réplication viral. Elle est initiée par l'attachement de la particule virale à la cellule cible grâce à une interaction spécifique entre la ou les protéines de surface du virus et le ou les récepteurs de la cellule hôte. Cette interaction déclenche des changements de conformation de la (des) protéine(s) virale(s) de surface, ce qui entraîne l'entrée, par fusion membranaire ou endocytose, du matériel génétique viral dans la cellule hôte en vue de sa réplication. Les inhibiteurs de l'entrée du virus sont des agents antiviraux qui bloquent l'entrée du virus dans la cellule hôte, y compris ceux qui lient les protéines de surface virales, interfèrent avec l'interaction entre les protéines virales et les protéines de l'hôte, inhibent la fusion de la membrane plasmique ou endosomale médiée par les protéines virales, ou inactivent les virions acellulaires (Jiang and Lu, 2022). L'entrée virale peut-être ciblée par plusieurs types de molécules : les anticorps monoclonaux, les peptides ou les petites molécules.

1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Acm) peuvent protéger contre les infections virales en empêchant les glycoprotéines virales des virus enveloppés ou l'enveloppe protéique des virus non enveloppés de se lier aux cellules hôtes cibles (Kabanova *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2019; Pantaleo *et al.*, 2022). Il existe de nombreux Acm ciblant différents types de virus en cours d'évaluation, dont les Acm contre Ebola, le VRS et le virus de l'influenza, qui seront abordés par la suite.

Contre Ebola, une maladie grave et trop souvent mortelle causée par le virus Ebola, l'OMS a fortement recommandé deux traitements à base d'anticorps monoclonaux : le mAb I 14 (Ansuvimab ; Ebanga) et le REGN-EB3 (Inmazeb). Ces deux anticorps ont la capacité de se lier à la protéine de surface du virus et d'empêcher sa liaison avec le récepteur cellulaire (Kabanova *et al.*, 2014; Markham, 2021).

Le VRS provoque des infections fréquentes et peu graves chez les adultes mais peut causer une hospitalisation chez les personnes âgées ou les nourrissons (Pantaleo *et al.*, 2022). Le premier Acm à avoir été approuvé, en 1998, est le palivizumab, utilisé pour traiter les infections sévères de VRS chez les enfants à haut risque (The IMpact-RSV Study Group, 1998; Pantaleo *et al.*, 2022). Cet anticorps se lie à la glycoprotéine du virus et bloque ainsi l'entrée du virus et la fusion membranaire en empêchant le changement de conformation post-fusion

de la glycoprotéine (Huang *et al.*, 2010). De nouveaux Acm sont en cours d'évaluation clinique, tels que le nirsevimab (MEDI8897) et le suptavumab (REGN2222), qui ciblent des sites antigéniques présents sur la glycoprotéine en conformation de pré-fusion (Pantaleo *et al.*, 2022).

Le virus de l'influenza peut être responsable d'infections sévères chez l'homme, notamment les virus influenza A et B (VIA et VIB) (Pantaleo *et al.*, 2022). Plusieurs Acm sont en cours de développement, notamment MEDI8852 (MedImmune) et VIR-2482 (Vir Biotechnology) (Kallewaard *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2018). Ces deux anticorps ciblent le VIA. Le VIR-2482 se lie à la région conservée de la glycoprotéine HA et neutralise toutes les principales souches depuis la grippe espagnole de 1918 (H1N1) (Kallewaard *et al.*, 2016). Il est donc tentant de penser que ce type d'anticorps puisse être utilisé comme agent prophylactique universel, surmontant les limites des vaccins antigrippaux actuels, pour lesquels la réponse de type anticorps dépend des antigènes saisonniers individuels. En outre, comme la demi-vie sérique du VIR-2482 a été augmentée par la modification du domaine Fc, une seule dose pourrait protéger durant toute la saison grippale, soit environ 5 à 6 mois (Pantaleo *et al.*, 2022).

2. Les peptides

Le premier peptide inhibiteur de l'entrée virale approuvé a été le T20, aujourd'hui appelé enfuvirtide. Il s'agit d'un oligopeptide synthétique, analogue de la région HR2 de la protéine d'enveloppe gp41 du VIH, au niveau de la sous-unité transmembranaire (TmS). Il s'est avéré actif chez les patients infectés par le VIH-1 chez lesquels les autres traitements anti-VIH s'étaient révélées inefficace. (Lazzarin *et al.*, 2003). Des peptides dérivés de la région HR2 présente chez les protéines de fusion de classe I, ont également montré une activité antivirale similaire. Par exemple, peu après l'identification du SARS-CoV, du MERS-CoV et du SARS-CoV-2, respectivement en 2003, 2012 et 2019, le groupe de Jiang a immédiatement identifié la région HR2 de ces trois coronavirus et a constaté que les peptides dérivés de cette région du SARS-CoV, du MERS-CoV ou du SARS-CoV-2 avaient une activité antivirale contre ces virus (Liu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2020). Un peptide dérivé de la région HR2 du VRS a également montré une capacité d'inhibition de l'entrée et de l'infection chez des souris BALB/c (Gaillard *et al.*, 2017).

D'autres région de la sous-unité TmS peuvent également servir de cible antivirale. Par exemple, le peptide de fusion du VIH peut être ciblé par un segment naturel de l' α 1-antitrypsine, aussi appelé peptide inhibiteur de virus (VIRIP, « Virus-inhibitory peptide »)

(Münch *et al.*, 2007). La monothérapie d'une variante du VIRIP, le VIR-576, chez des personnes infectées par le VIH-I et naïves de tout traitement a réduit la charge virale plasmatique sans provoquer d'effets indésirables graves lors d'un essai clinique (Forssmann *et al.*, 2010). Un peptide virucide naturel, l'urumin, peut détruire physiquement les virions grippaux en ciblant spécifiquement la région conservée du TmS du VIA (Holthausen *et al.*, 2017).

D'autres régions de la protéine de fusion peuvent également être ciblées pour bloquer l'entrée virale, telle que la sous-unité de surface (SfS) (Jiang and Lu, 2022). De nombreux peptides imitant la conformation du récepteur/co-récepteur viral peuvent ainsi se lier au SfS viral et bloquer l'entrée virale. Par exemple, la construction de résidus de CD4, le récepteur du VIH, permet de cibler la poche de liaison conservée de CD4 du SfS du VIH-I et ainsi inhiber l'infection par le VIH-I (Van Herrewege *et al.*, 2008).

Certains peptides peuvent également cibler directement des protéines ou des voies de signalisation de la cellule hôte. Ces antiviraux sont généralement à spectre plus large car plusieurs virus peuvent cibler les mêmes protéines de l'hôte. Mais ils nécessitent une appréciation plus approfondie car ils interfèrent directement avec les fonctions physiologiques de la cellule hôte. Par exemple, des peptides dérivés de la β -défensine-4 de souris, P9, et P9R ont présenté des effets antiviraux à large spectre contre de nombreux virus respiratoires *in vitro* et *in vivo*, y compris le SARS-CoV, MERS-CoV, ainsi que les VIA H1N1, H3N2, H5N1, H7N7 et H7N9 (Zhao *et al.*, 2020). D'autres types de peptides prometteurs ont également été étudiés *in vitro* : les peptides cycliques (Charrel *et al.*, 2011). Ces derniers ont bloqué l'infection de cellules Vero E6 par le virus Sin Nombre (VSN) et le virus de Hantaan (HTNV) ((Larson *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2007). Des peptides cycliques multivalents contenus dans des nanoparticules ont empêchés spécifiquement l'infection par le VSN *in vitro* (Hall *et al.*, 2008).

3. Les petites molécules

La sous-unité de surface virale est largement utilisée pour cribler les antiviraux à base de petites molécules. En mesurant l'inhibition compétitive contre l'attachement d'anticorps spécifiques de la SfS du VIH-I, le groupe de Jiang a découvert que les dérivés de porphyrine pouvaient bloquer l'entrée du VIH-I (Neurath *et al.*, 1992). Depuis, d'autres petites molécules ont été découvertes. Le fostemsavir (Rukobia, BMS-663068) a réduit la charge virale chez les patients atteints d'une infection à VIH-I multirésistante dans un essai clinique (Kozal *et al.*, 2020). En 2020, il est donc devenu le premier médicament ciblant les SfS pour le VIH-I approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) américaine. Outre le VIH, l'infection

par le VIA et le virus Ebola peuvent également être inhibés par des composés à petites molécules ciblant les SfS (Yu *et al.*, 2014; Anantpadma *et al.*, 2016).

Le TmS est également une cible populaire pour la conception d'inhibiteurs d'entrée à base de petites molécules. Plusieurs composés ont été identifiés ayant la capacité de cibler le VIH-1 et d'autres virus, tels que le virus Ebola et le VIA (Jiang *et al.*, 2011; Si *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2018). Un médicament approuvé contre la grippe, l'Umifenovir (arbidol), a été signalé comme se liant à une poche hydrophobe spécifique dans la région supérieure du TmS du VIA pour bloquer l'entrée virale (Kadam and Wilson, 2017). Le peptide de fusion du TmS peut également être ciblée par des inhibiteurs d'entrée à base de petites molécules contre le VIH-1 (Murray *et al.*, 2010) et le virus Ebola (Zhao *et al.*, 2016). Un autre exemple, le maraviroc (Selzentry, UK 427857), un dérivé d'un ligand du CCR5, est le premier antiviral ciblant les corécepteurs approuvé par la FDA pour le traitement de l'infection par le VIH (Jiang and Lu, 2022).

D'autres petites molécules prometteuses ont également été identifiées comme jouant un rôle antiviral *in vitro*. C'est le cas de LHF-535, un analogue optimisé du dérivé benzimidazole ST-193, qui inhibe l'entrée virale en ciblant la glycoprotéine d'enveloppe des arénavirus. Il possède une activité antivirale contre les virus Guanarito, Junin, Machupo et a montré une efficacité *in vivo* contre le virus de Lassa (Madu *et al.*, 2018).

b. Réplication virale

La plus grande classe de médicaments antiviraux comprend ceux qui inhibent la réplication du génome viral, le plus souvent en inhibant une polymérase virale. Les virus dont la réplication du génome a été ciblée avec succès pour produire des médicaments approuvés ou autorisés par la FDA comprennent les herpesvirus VHS, HCMV et le VZV, le poxvirus variola virus (VV), le lentivirus VIH, l'hepadnavirus VHB, l'hépacivirus VHC et le coronavirus SARS-CoV-2. La plupart de ces médicaments sont des analogues nucléosidiques qui inhibent les polymérases virales qui seront présentés par la suite (Howley and Knipe, 2022).

1. Inhibiteurs nucléosidiques de l'ADN polymérase

Les analogues nucléosidiques qui ciblent notamment les polymérases virales sont approuvés ou autorisés pour le traitement de certains herpesvirus, du VV, du VHB, du VIH, du VHC et du SARS-CoV-2. Ces médicaments doivent être activés par phosphorylation pour imiter les nucléosides triphosphates et exercer leur effet. Les enzymes de l'hôte sont

généralement responsables de la phosphorylation des analogues nucléosidiques, à l'exception de la plupart des analogues nucléosidiques actifs contre les herpesvirus, pour lesquels une kinase virale est responsable de la première phosphorylation. La sélectivité des analogues nucléosidiques est largement dictée par l'efficacité relative avec laquelle l'analogue nucléosidique triphosphate peut inhiber la réplication virale par rapport aux fonctions cellulaires.

Les analogues nucléosidiques phosphorylés peuvent agir sur les polymérases virales de plusieurs manières. Tous entrent en compétition avec la liaison du substrat naturel (désoxynucléoside triphosphate (dNTP) pour l'ADN polymérase, ribonucléoside triphosphate (NTP) pour l'ARN polymérase) de la polymérase, et tous sont également incorporés dans la chaîne d'acide nucléique en croissance. L'une ou l'autre de ces caractéristiques - l'inhibition et l'incorporation - peut être importante pour l'activité antivirale. L'incorporation de l'analogue peut aboutir à trois résultats : (1) une terminaison obligatoire de la chaîne car l'analogue ne peut pas être étendu par la polymérase parce qu'il n'a pas de groupe hydroxyle (OH) 3' ; (2) une terminaison non obligatoire de la chaîne où l'analogue conserve un groupe hydroxyle 3' mais où la synthèse de l'ADN est terminée, parfois après l'incorporation d'un ou de plusieurs nucléotides supplémentaires (terminaison retardée) ; et (3) une élongation relative sans entrave (Howley *et al.*, 2023).

Les principaux analogues de nucléosides autorisés sur le marché sont : l'acyclovir et le valacyclovir, actifs contre le VHS et le VZV (Wutzler, 2008) ; le ganciclovir, actif contre le HCMV (Grossi and Baldanti, 1997); le penciclovir et famciclovir, actifs contre le VHS (Sacks and Wilson, 1999) ; et le cidofovir et brincidofovir, actifs contre la rétinite à HCMV (MacDougall, 1997). Des analogues flexibles ou « fleximère » de l'acyclovir ont également été développés et présentent une activité contre divers virus à ARN, démontrant ainsi leur potentiel à large spectre. Les études visant à élucider leur mécanisme d'action suggèrent que les triphosphates des analogues flexibles, en particulier le I-TP, inhibent les méthyltransférases du virus de la dengue et du virus Zika (Thames *et al.*, 2020).

2. Inhibiteurs nucléosidiques du VHB et du VIH

Le VHB ou les lentivirus, comme le VIH, répliquent leur génome par des intermédiaires sous forme d'ADN et d'ARN. La transcriptase inverse (TI) du VIH et l'ADN polymérase du VHB sont donc essentielles à la réplication virale et diffèrent considérablement des

polymérase cellulaires, ce qui en fait d'excellentes cibles pour les antiviraux. Le succès des analogues nucléosidiques contre les herpesvirus a justifié le développement d'analogues nucléosidiques actifs contre le VIH et, par la suite, contre le VHB. De nombreux analogues nucléosidiques ont été approuvés pour traiter le VIH, et tous sont des terminateurs de chaîne obligatoires. Ainsi, bon nombre des principes qui régissent leurs mécanismes d'action et de résistance sont similaires à ceux de l'acyclovir, bien qu'il existe des différences importantes (Howley *et al.*, 2023).

Le premier analogue ayant une activité démontrée contre le VIH a été la zidovudine ou AZT en 1985 (Mitsuya *et al.*, 1985). Bien que rarement utilisés de nos jours, l'AZT est toujours présente sur la liste de médicaments essentiels de l'OMS (Howley *et al.*, 2023). Cependant, l'efficacité clinique limitée de l'AZT et les problèmes de toxicité et de résistance ont conduit à l'utilisation de thérapies combinées et au développement d'autres médicaments anti-VIH (Howley *et al.*, 2023), tels que le lamivudine ou l'emtricitabine ou encore l'abacavir ou le tenofovir (Tan *et al.*, 2011). Le lamivudine, le tenofovir mais aussi le telbivudine, l'adefovir et l'entecavir sont des traitements approuvés contre le VHB.

Il existe actuellement six inhibiteurs non nucléosidiques de la TI approuvés par la FDA, à savoir l'éfavirenz, la névirapine, l'étravirine, la rilpivirine, le dasabuvir et la doravirine, qui sont utilisés pour le traitement des infections par le VIH (Howley *et al.*, 2023).

3. Inhibiteurs nucléosidiques de l'ARN polymérase

Avec tous les médicaments à base d'analogues nucléosidiques contre les virus à ADN et les rétrovirus, il peut sembler surprenant qu'il y ait si peu d'analogues nucléosidiques contre les virus à ARN. Cette situation peut s'expliquer par les concentrations plus élevées de ribonucléotides concurrents dans les cellules par rapport aux désoxyribonucléotides (Howley *et al.*, 2023). Néanmoins, il existe un analogue nucléosidique de longue date, la ribavirine, dont l'utilisation a été approuvée contre certains virus à ARN, dont le RSV (Turner *et al.*, 2014) et le VHC (Abonyi and Lakatos, 2005), le virus de Lassa (McCormick *et al.*, 1986; Charrel *et al.*, 2011), ainsi que le sofosbuvir, un médicament utilisé contre le VHC (Bourlière *et al.*, 2015).

4. Inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase

Les polymérase virales sont d'excellentes cibles pour les médicaments antiviraux, et les analogues nucléosidiques, malgré tous leurs succès, peuvent inhiber des enzymes cellulaires aussi bien que virales, et les virus peuvent muter pour résister à ces médicaments. Par

conséquent, des efforts ont été faits pour découvrir des composés qui inhibent les polymérase virales par d'autres mécanismes (Howley *et al.*, 2023).

Le premier de ces inhibiteurs de la polymérase à avoir été approuvé pour un usage clinique a été le foscarnet, actif contre le VHS, le VZV et le HCMV, lors d'infections résistantes aux médicaments de première intention (Howley *et al.*, 2023). Le foscarnet est un analogue du pyrophosphate, qui est un produit de la polymérisation des acides nucléiques. Contrairement aux analogues nucléosidiques décrits ci-dessus, il ne nécessite pas d'activation par des enzymes cellulaires ou virales, mais inhibe directement et sélectivement les ADN polymérase des herpesvirus. L'inhibition n'est pas compétitive avec les désoxynucléosides triphosphates. Il semble plutôt que le foscarnet agisse comme un analogue du produit, empêchant la libération normale du pyrophosphate de sorte que la polymérase ne puisse pas achever le cycle catalytique (Ostrander and Cheng, 1980; Eriksson, Oberg and Wahren, 1982).

D'autres molécules prometteuses ont également été identifiés comme jouant un rôle antiviral *in vitro*. C'est le cas de la fluoxétine et de ces analogues, identifiés dans des cribles de repositionnement de médicaments, qui sont de puissant inhibiteur de la réplication de l'entérovirus B et D (Manganaro *et al.*, 2020). Des inhibiteurs de l'activité méthyltransférase et de l'ajout de coiffe des flavivirus, ciblant notamment le virus de la Dengue, ont également pu être identifié par la méthode de criblage de fragments ou « Fragment-Based Drug Discovery » ouvrant la voie au développement d'une nouvelle classe d'inhibiteurs (Benmansour *et al.*, 2017; Abdelnabi *et al.*, 2020).

c. Assemblage et sortie

Les processus par lesquels les virus assemblent les virions infectieux et sortent des cellules sont étroitement liés et constituent des cibles intéressantes pour la découverte de médicaments, car ils sont propres à la biologie des virus. De plus, certaines étapes de l'assemblage sont cruciales pour la sortie et réciproquement (Howley *et al.*, 2023). Les médicaments approuvés par la FDA qui ciblent différentes étapes de cette phase sont : le letermovir, qui cible l'emballage de l'ADN dans les capsides du HCMV (Lischka *et al.*, 2010) ; le maribavir, qui cible la sortie nucléaire du HCMV avant l'achèvement de l'assemblage du virion (Krosky, Baek and Coen, 2003) ; le tecovirimat, qui cible l'assemblage d'une glycoprotéine du poxvirus, cruciale pour la sortie (Yang *et al.*, 2005; Duraffour *et al.*, 2015) ; divers inhibiteurs de la protéase du VIH ciblant l'étape finale de l'assemblage - la maturation

en virions infectieux - qui peut se produire après la sortie ; et divers inhibiteurs de la neuraminidase de la grippe inhibant la libération des particules virales de la surface extracellulaire des cellules (Howley *et al.*, 2023).

Pour de nombreux virus, dont le VIH, le simple assemblage des protéines et de l'acide nucléique en particules ne suffit pas à produire un virion infectieux. Pour ces virus, une étape supplémentaire, la maturation, est nécessaire. Dans la plupart des cas, ces virus codent pour des protéases qui sont essentielles à la maturation. Il existe une longue liste de médicaments antiviraux approuvés qui ciblent la protéase du VIH, responsable de la maturation de ce virus, et qui sont toujours commercialisés : le saquinavir, le ritonavir, le lopinavir, le fosamprenavir, l'indinavir, le nelfinavir, l'atazanavir, le darunavir et le tipranavir (Howley *et al.*, 2023).

Les inhibiteurs des neuraminidases du virus de la grippe bloquent la libération virale des VIA et VIB. En effet, la grippe s'attache aux cellules par le biais d'interactions entre l'hémagglutinine du virus et l'acide sialique, présent sur de nombreuses glycoprotéines de la membrane cellulaire. Toutefois, lorsque le virus de la grippe sort des cellules à la fin d'un cycle de réplication, l'hémagglutinine des virions se lie à nouveau à l'acide sialique et retient les virions, empêchant leur libération et l'initiation de nouveaux cycles d'infection. Pour surmonter ce problème, le virus de la grippe code pour une neuraminidase virale qui clive l'acide sialique des glycoprotéines membranaires (Howley *et al.*, 2023). Plusieurs inhibiteurs de la neuraminidase sont disponibles : l'oseltamivir (Kim *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998), le peramivir (Bantia *et al.*, 2001; Barrett *et al.*, 2011), et le baloxavir, une molécule en développement qui est active contre les mutants résistants aux inhibiteurs classiques de la neuraminidase (Howley *et al.*, 2023).

B) Modulation de la réponse de l'hôte

Les traitements antiviraux ciblant la réponse de l'hôte vont permettre de contrôler l'infection virale en modulant cette dernière par un renforcement de la réponse immunitaire via la sécrétion d'anticorps, d'interférons ou bien en intensifiant l'immunité à médiation cellulaire (Saxena *et al.*, 2010). Cette modulation peut s'effectuer par des anticorps monoclonaux, ou bien via les récepteurs cellulaires tels que les récepteurs nicotiniques ou les récepteurs purinergiques.

a. Réponse immunitaire antivirale : inflammation et immunité innée

Presque toutes les infections virales provoquent le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires, en particulier les macrophages et, dans certaines infections, les neutrophiles. Ces cellules vont à leur tour libérer une série de molécules induisant des lésions ou des dysfonctionnements tissulaires, les cytokines pro-inflammatoires : TNF- α (« Tumor necrosis factor »), et les interleukines comme, l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1, l'IL-12, ou l'IL-18 (Rouse and Sehrawat, 2010). Cette réponse constitue la première ligne de défense contre une infection virale que l'on nomme immunité innée. Elle va permettre d'éliminer, d'inhiber ou de ralentir les infections de manière rapide mais avec peu de spécificité et sans adaptation ni, à ce stade, de génération d'une mémoire protectrice durable, appelée immunité adaptative, qui interviendra plus tard (Weber, 2021).

Cette réponse immunitaire innée débute par la détection de motifs moléculaires associés aux pathogène (PAMP, « Pathogen-associated molecular pattern »), tels que des composants viraux spécifiques comme de l'ARN ou de l'ADN, ou d'autres produits viraux, par exemple les protéines virales. Les PAMPs sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, « Pattern Recognition Receptor ») présents sur les cellules de l'immunité innée. Il existe plusieurs classes de PRRs, dont notamment les récepteurs de types Toll (TLR, « Toll-like receptor »), les récepteurs de type RIG-I (RLR, « RIG-I-like receptor ») et les récepteurs de type NOD (NLR, « NOD-like receptor ») (Koyama *et al.*, 2008).

Les infections virales activent généralement les TLR endosomaux (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) qui reconnaissent les ARN simples et doubles brins ainsi que les ADN doubles brins viraux non méthylés (Pichlmair and Reis e Sousa, 2007). Les protéines virales peuvent être reconnues par les TLR extracellulaires (TLR1-2 et TLR4) (Bowie and Unterholzner, 2008). Les récepteurs cytoplasmiques de type RIG-I reconnaissent les ARN doubles brins (Yoneyama *et al.*, 2004), tandis que les NLR reconnaissent les ARN viraux (Kim, Shin and Nahm, 2016).

Cette reconnaissance va permettre aux cellules infectées et aux cellules immunitaires de produire de l'interférons de type I (IFN) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Koyama *et al.*, 2008), par l'intermédiaire de plusieurs protéines de signalisation (Seth, Sun and Chen, 2006). Ces dernières vont conduire à l'activation de facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et IRF7 qui migrent alors, par un mécanisme dénommé translocation, du cytoplasme vers le noyau

où ils activent l'expression du gène de l'IFN- β (Weber, 2021). Cet interféron, une fois excrété, se lie au récepteur de l'interféron α/β (IFNAR, « Interferon-alpha/beta receptor ») afin d'initier une boucle de rétrocontrôle positive entraînant la production supplémentaire d'IFN de type I. Celle-ci se fait par l'activation des kinases JAK1 et Tyk-2 qui à leur tour vont phosphoryler et activer les protéines STAT1 et STAT2. Ces dernières vont former un complexe avec IRF9 et se transloquer dans le noyau afin de se fixer sur la séquence nommée ISRE (« Interferon-stimulated response element ») pour induire l'expression des ISGs (« Interferon-stimulated genes »), dont il existerait plus de 300 types (Honda *et al.*, 2005; Schoggins, 2019) (Figure 22).

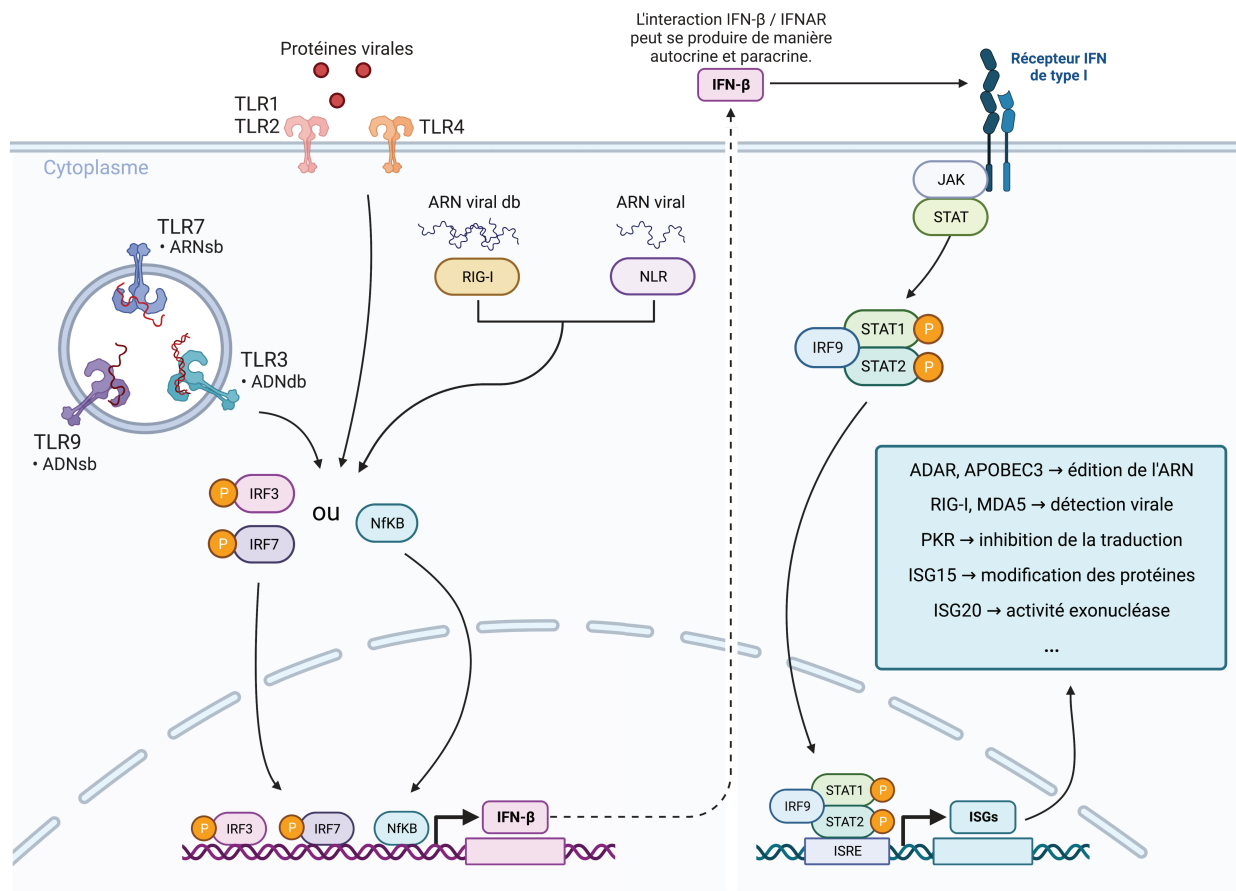


Figure 22 : Activation de la réponse interféron déclenchée par la détection de PAMPs viraux.

(sb : simple-brin ; db : double-brin ; TLR : récepteur de type Toll ; NLR : récepteur de type NOD ; RIG-I : récepteur de type RIG ; ISG : gènes stimulés par l'interféron), d'après (Bowie and Unterholzner, 2008; Schoggins and Rice, 2011; Hartenian *et al.*, 2020).

Ces molécules permettent non seulement d'endiguer rapidement l'infection virale en inhibant la réplication et l'assemblage du virus, mais jouent également un rôle crucial dans

l'activation du système immunitaire adaptatif afin d'éradiquer le virus, avec par exemple la production d'anticorps (Sun, Liu and Chen, 2010).

Deux types de médicaments approuvés pour le traitement des infections virales - l'imiquimod et les interférons renforcent les réponses immunitaires innées de l'hôte à l'infection virale (Howley and Knipe, 2023). L'imiquimod, qui est autorisé pour le traitement de certaines maladies causées par les papillomavirus humains, interagit avec les récepteurs TLR7 et TLR8 pour stimuler l'immunité innée, y compris la sécrétion d'interférons (Gibson *et al.*, 2002; Jurk *et al.*, 2002; Heming, Conway and Homa, 2017). L'IFN- α est autorisé pour le traitement du VHC, du VHB, et du condylome acuminé causé par certains papillomavirus humains, et le sarcome de Kaposi, causé par l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (herpesvirus humain 8) (Howley and Knipe, 2023).

b. Récepteurs cellulaires

Les cibles cellulaires ne faisaient pas l'objet d'une attention particulière pour le développement de thérapies antivirales dans le passé, mais présentent aujourd'hui un intérêt croissant (Richman and Nathanson, 2016). Le développement de telles thérapies nécessite une attention particulière, car il ne faut pas interférer avec les fonctions vitales de la cellule hôte. Cela pourrait constituer un problème pour les traitements à long terme, mais ne pas en être un pour les traitements courts.

Des cibles cellulaires comme les récepteurs, ont un avantage théorique sur les cibles virales car elles ne subissent pas de mutations d'échappement. Le récepteur de chimiokine CCR5, un co-récepteur du VIH, présente chez certaines personnes la mutation homozygote $\Delta 32$, empêchant l'expression du gène de CCR5. Cette mutation ne génère aucun effet néfaste chez ces personnes et leur confère même une forte résistance à l'infection par le VIH. C'est sur la base de cette observation qu'a été développé le maraviroc, dont l'efficacité dans le traitement du VIH a été démontrée (Fätkenheuer *et al.*, 2005). En bloquant, le récepteur CCR5, il permet de traiter l'infection par le VIH sans interférer avec les fonctions cellulaires essentielles. Un autre exemple de molécules ciblant les récepteurs cellulaires est la découverte d'agonistes des TLR qui peuvent être utilisés pour lutter contre les infections virales, en réduisant la charge virale et donc la maladie associée (Shah *et al.*, 2016; Hennessy and McKernan, 2021). Ces agonistes, toujours en cours de développement, sont étudiés contre plusieurs virus : le VHB, le VIH, le VPH mais également le VHS (Hennessy and McKernan,

2021). Contre le VPH, l'utilisation de l'imiquimod, un agoniste du TLR7, a montré dans un essai clinique randomisé en double aveugle, une disparition de VPH6 et une baisse significative de la charge virale de VPH11 (Kumar *et al.*, 2014). D'autres types de récepteurs peuvent également être ciblés mais par la suite seulement les récepteurs ionotropes seront abordés, dont notamment les récepteurs cholinergiques de types nicotiques et les récepteurs purinergiques.

I. Récepteurs nicotiques

Il y a 52 ans, le premier récepteur de neurotransmetteur était identifié à partir de l'organe électrique de poisson : le nAChR (Changeux, Kasai and Lee, 1970; Miledi, Molinoff and Potter, 1971). Ce récepteur cationique est par la suite devenu le chef de file de la superfamille des récepteurs pentamérique à laquelle appartiennent également les récepteurs GABA fixant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et les récepteurs Glycine (Cecchini and Changeux, 2015). Ces nAChR sont présents au niveau des muscles squelettiques où ils assurent la communication entre les nerfs et les muscles et également dans le SNC et SNP où ils assurent la transmission synaptique (Changeux, 2020).

i. Structure et classification

Les nAChR sont des protéines membranaires d'une masse moléculaire d'environ 290 kDa. Elles comprennent cinq sous-unités identiques ou homologues disposées symétriquement autour d'un canal ionique central (Figure 23) (Wang, Kuryatov and Lindstrom, 2015; Zoli, Pistillo and Gotti, 2015).

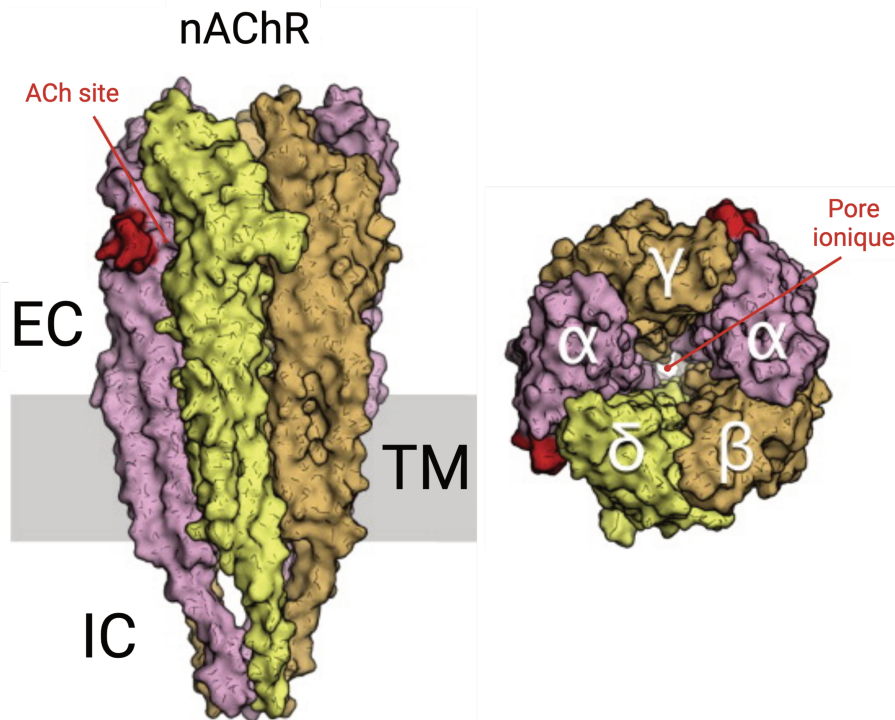


Figure 23 : Structure et domaines des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine. (EC : domaine extracellulaire ; TM : domaine transmembranaire ; IC : domaine intracellulaire), (Cecchini and Changeux, 2015).

Chez les mammifères, il existe plusieurs types d'oligomères de nAChR, qui diffèrent par la composition de leurs sous-unités à travers l'organisme (Zoli, Pistillo and Gotti, 2015). Dix-sept sous-unités nAChR différentes ont été identifiées à ce jour, dont dix sous-unités α ($\alpha 1-10$), quatre β ($\beta 1-4$), une sous-unité γ , une sous-unité δ et une sous-unité ϵ . Les nAChRs sont assemblés soit en homo-pentamères de $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$, soit en hétéro-pentamères de $\alpha 2-6$ en combinaison avec des sous-unités $\beta 2-4$ ou $\alpha 9$ avec des sous-unités $\alpha 10$ (Ho, Abraham and Lewis, 2020). La structure primaire de chaque sous-unité consiste en un grand domaine hydrophile extracellulaire en position amino-terminale (EC), un domaine transmembranaire (TM) comprenant quatre segments hydrophobes (M1-M4) et un domaine cytoplasmique ou intracellulaire (IC) hydrophile variable (Figure 23) (Cecchini and Changeux, 2015). Il existe 2 à 5 sites de liaison à l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur, dans le domaine EC, qui sont distants (environ 60 Å) mais fonctionnellement liés à un canal ionique cationique unique, situé sur l'axe de symétrie du domaine TM (Taly *et al.*, 2009, 2014).

ii. Fonction

Les nAChR convertissent un signal chimique, typiquement l'augmentation locale de la concentration extracellulaire du neurotransmetteur ACh, en un courant ionique à travers une

membrane post-synaptique (Cecchini and Changeux, 2015). Au repos, le canal ionique est fermé. La fixation du neurotransmetteur, tels que l'acétylcholine, entraîne une isomérisation rapide vers l'état actif, appelé « gating », qui ouvre un pore transmembranaire permettant la diffusion d'ions (Na^+ , K^+ , et parfois Ca^{2+}) à des taux approchant les dizaines de millions d'ions par seconde. L'exposition prolongée à des niveaux élevés d'agonistes, comme la nicotine, entraîne à terme une diminution du courant en fonction du temps, appelée désensibilisation, qui implique la transition vers une forme de canal fermé dont il est pensé que la structure est différente de celle de l'état de repos (Figure 24) (Cecchini and Changeux, 2022).

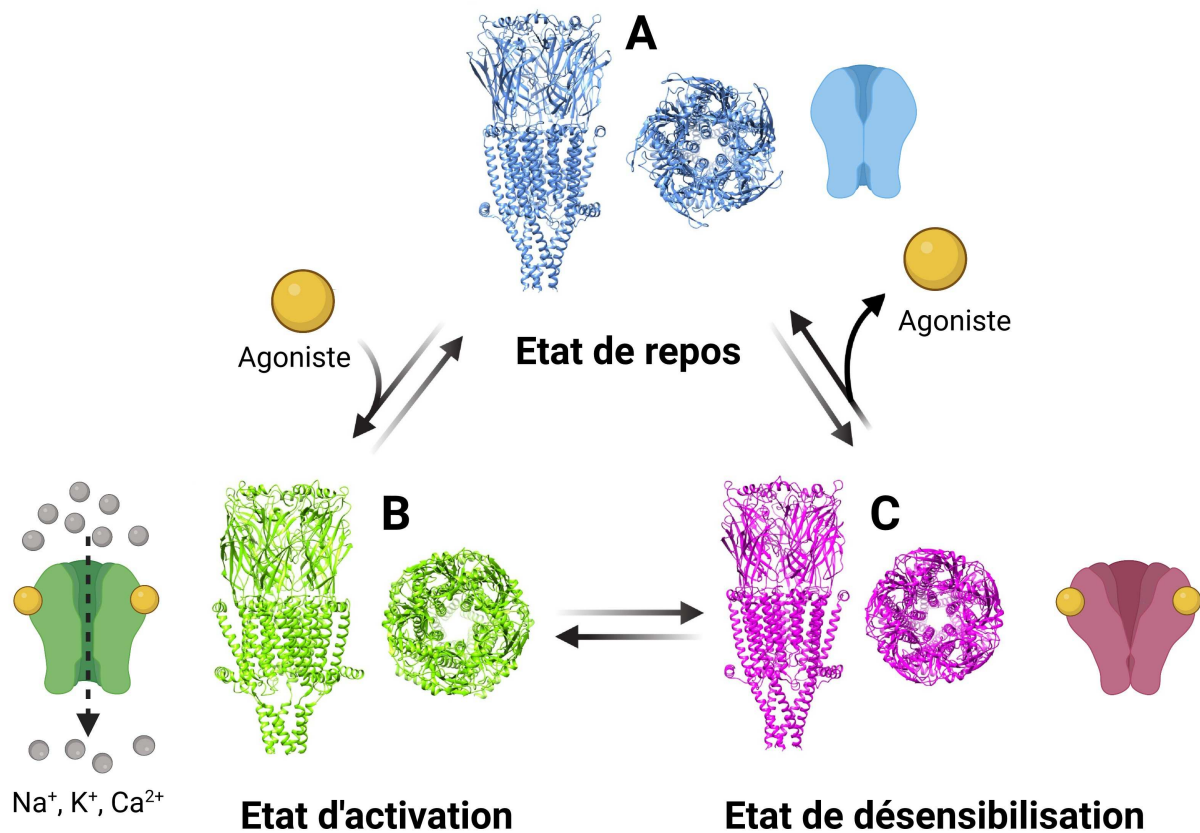


Figure 24 : Schéma et structure du récepteur nAChR- α 7 dans différents états de conformation.

Les images structurales sont basées sur des données provenant d'études de microscopie électronique fonctionnelle et visualisées via le logiciel Chimera. **A.** Récepteurs nAChR- α 7 à l'état de repos. **B.** La fixation d'un agoniste (en jaune) permet l'activation du nAChR- α 7, entraînant l'ouverture du pore central et la traversée de cations (en gris) à travers le récepteur pour entrer dans la cellule. **C.** Une exposition prolongée à l'agoniste entraîne la désensibilisation du récepteur (après activation) et la fermeture du pore. (Na^+ : sodium ; K^+ : potassium ; Ca^{2+} : calcium), d'après (Corradi and Bouzat, 2016; Letsinger, Gu and Yakel, 2022).

Des études fonctionnelles par électrophysiologie ont permis de mettre en évidence le couplage entre la liaison du neurotransmetteur ou de l'agoniste et le passage des ions dans les nAChRs (Cecchini and Changeux, 2022). À l'inverse, un antagoniste va entraîner une réponse du récepteur inférieure à la réponse basale, c'est-à-dire en l'absence de ligands, ou bien va favoriser l'inhibition du récepteur en s'y fixant. Certains agonistes, appelés agonistes complets, sont capables de provoquer la réponse maximale du récepteur. D'autres ne peuvent susciter qu'une fraction de cette réponse et sont appelés agonistes partiels (Cecchini and Changeux, 2022). Afin de distinguer les agonistes complets des agonistes partiels, une classification basée sur l'efficacité de l'agoniste a été utilisée. Celle-ci correspond à la probabilité d'ouverture maximale mesurée dans les expériences monocanales ou au courant de « gating » maximal enregistré dans les expériences réalisées sur cellules entières (Sakmann and Neher, 1995). Des composés qui potentialisent ou réduisent la réponse du récepteur lorsqu'ils sont appliqués en même temps que des agonistes (mais qui sont parfois capables de provoquer des courants de « gating » seuls) ont également été décrits (Arias, Bhumireddy and Bouzat, 2006; Bertrand and Gopalakrishnan, 2007; Changeux and Christopoulos, 2016). Ils sont appelés modulateurs allostériques positifs ou négatifs (c'est-à-dire PAM et NAM). Le terme "allostérique" fait référence à l'emplacement topographique de leur site de liaison sur le récepteur, qui est distinct du site de liaison du neurotransmetteur ou site orthostérique. D'un point de vue pharmacologique, ces composés sont particulièrement intéressants parce qu'ils agissent comme des ligands non compétitifs et peuvent être utilisés en co-application pour le développement de stratégies pharmacologiques, ouvrant éventuellement la voie à la médecine personnalisée (Changeux and Christopoulos, 2016). Il a été démontré que la liaison des PAM aux nAChRs augmentait les pics de courant avec ou sans effet significatif sur le taux de diminution du courant, ce qui est associé à la désensibilisation des récepteurs (Cecchini and Changeux, 2022). La suite de ce travail se focalisera essentiellement sur les travaux réalisés sur le nAChR homo-pentamérique $\alpha 7$. Le 5-hydroxyindole (5HI) est la première molécule qui s'est avérée être un PAM pour le nAChR $\alpha 7$. Sa potentialisation relativement modeste, nécessitait de fortes doses de médicament et laissait les diminutions de courant essentiellement inchangées. Ce composé est devenu le prototype d'une classe de PAM appelée type I (Zwart *et al.*, 2002). Il existe d'autres molécule classée comme PAM-I dont le composé NS-1738, mais aussi l'ivermectine (Krause *et al.*, 1998; Sattelle *et al.*, 2009), dont les particularités seront décrites plus loin.

Une autre classe de PAM, plus efficace, qui augmente les pics de courants mais ralentit fortement le taux de diminution du courant, est désignée sous le nom de PAM de type II (Grønlien *et al.*, 2007). Des composés comme le PNU-120596 (Hurst *et al.*, 2005) ou le TQS (Gill *et al.*, 2012) sont de puissants PAM de type II ciblant le nAChR $\alpha 7$. Il est à noter que les PAM de type II peuvent réactiver des récepteurs préalablement désensibilisés (Papke *et al.*, 2009; Cecchini and Changeux, 2022). Enfin, les ago-PAM (PAM agoniste), sont une classe de PAM qui présentent une double activité : ce sont des modulateurs allostériques et également des agonistes allostériques. C'est le cas de la molécule GAT-107 (Schwartz and Holst, 2006; Bagdas *et al.*, 2016; Cong *et al.*, 2021).

Les nAChRs peuvent jouer un rôle de médiateur dans les processus physiopathologiques (Matta *et al.*, 2021). Leur large distribution leur confère des rôles physiologiques dans les tissus neuronaux, sensoriels, métaboliques mais aussi immunitaires.

iii. Rôle dans l'inflammation

Le récepteur nAChR- $\alpha 7$ a été identifié comme étant bénéfique pour le devenir de maladies graves, tels que les septicémies ou encore les lésions pulmonaires aiguës dû à des infections sévères, montré par l'atténuation de l'inflammation excessive et l'amélioration des taux de survie dans des modèles animaux (Ren *et al.*, 2017). En outre, de nombreuses études ont montré que le récepteur nAChR- $\alpha 7$ était largement distribué dans des cellules non neuronales, tels que les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules dendritiques et les kératinocytes (Albuquerque *et al.*, 2009; Bencherif *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). L'activation rapide du nAChR- $\alpha 7$ peut entraîner des réactions anti-inflammatoires importantes, notamment une diminution des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, une diminution de l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion, ainsi qu'une modification de la différenciation et de l'activation des cellules immunitaires (Ren *et al.*, 2017).

Par exemple, la voie cholinergique anti-inflammatoire (CAP, « Cholinergic anti-inflammatory pathway »), composée du nerf vague efférent et du nAChR- $\alpha 7$, peut atténuer l'inflammation excessive dans les états graves (Pavlov and Tracey, 2006; Su *et al.*, 2007; Reys *et al.*, 2013). Activés par des stimuli périphériques ou centraux, les neurones cholinergiques du cerveau transmettent l'information aux nerfs vagues efférents qui innervent les organes périphériques. Ces derniers libèrent de l'acétylcholine qui peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires en interagissant avec le nAChR- $\alpha 7$ des cellules inflammatoires

(Borovikova *et al.*, 2000; Tracey, 2007; Rosas-Ballina and Tracey, 2009). En effet, de multiples voies de signalisation sont responsables des mécanismes anti-inflammatoires engendrés par le nAChR- $\alpha 7$. Celles-ci sont représentées par l'axe JAK2-STAT3-NF- κ B qui interagit avec d'autres voies pour renforcer ses effets protecteurs de manière synergique (Ren *et al.*, 2017). L'activation du récepteur nAChR- $\alpha 7$ est étroitement liée avec l'inhibition de l'activation de NF- κ B (Figure 26) (Jiang *et al.*, 2015; Corsi-Zuelli *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). Les inhibiteurs de NF- κ B (I κ B) sont normalement présents dans le cytoplasme. Et une stimulation vagale peut augmenter l'expression de nAChR- $\alpha 7$ dans la microglie hippocampique et ainsi exercer des effets anti-inflammatoires en inhibant la phosphorylation de p65 et la translocation nucléaire de NF- κ B (Figure 25) (H. Liu *et al.*, 2023).

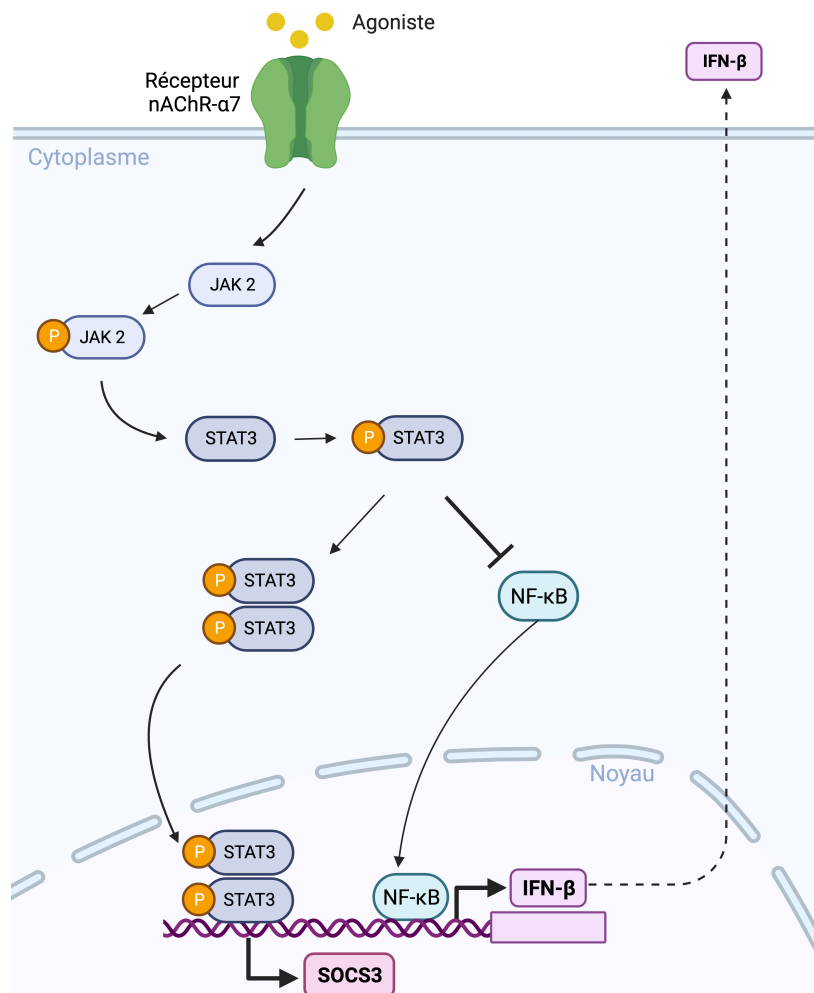


Figure 25 : Les voies de signalisation intracellulaire du récepteur nAChR- $\alpha 7$ dans la réponse anti-inflammatoire.

Le récepteur nAChR- $\alpha 7$ activé inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires principalement en bloquant l'activité du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B). La voie JAK2-STAT3 représente une cascade

anti-inflammatoire typique pour le récepteur nAChR- $\alpha 7$. STAT3 phosphorylé supprime la dissociation entre I κ B et NF- κ B, puis inhibe l'activation de NF- κ B. STAT3 activé augmente également l'expression du suppresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3). D'après (Ren *et al.*, 2017; Piovesana *et al.*, 2021).

Ainsi, les récepteurs nAChR- $\alpha 7$ pourraient être une cible thérapeutique efficace pour inhiber l'inflammation excessive et moduler l'homéostasie immunitaire (Ren *et al.*, 2017).

iv. Implications dans les infections virales

Le nAChR- $\alpha 7$ est impliqué dans plusieurs maladies virales. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des canaux ioniques dans l'infection par le VIH (Holden *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2011; Tewari *et al.*, 2015), suggérant qu'ils pourraient être utilisés comme cibles pharmacologiques potentielles (Capó-Vélez, Delgado-Vélez, *et al.*, 2018). Parmi ces canaux ioniques, les nAChR joueraient un rôle important (Bracci *et al.*, 1992; Ballester *et al.*, 2012; Gundavarapu *et al.*, 2013; Báez-Pagán, Delgado-Vélez and Lasalde-Dominicci, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Capó-Vélez, Morales-Vargas, *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2021). En particulier, le nAChR- $\alpha 7$ apparaît comme un acteur important dans le domaine de la physiopathologie du VIH, car il est exprimé non seulement dans le cerveau, mais aussi dans une grande variété de cellules immunitaires ciblées lors de l'infection par le VIH, telles que les macrophages, les monocytes, les lymphocytes B et les lymphocytes T (CD4+) (Wang *et al.*, 2003; van der Zanden *et al.*, 2012; Kawashima *et al.*, 2015). Ceci en fait une cible appropriée pour la mise au point d'un traitement (Capó-Vélez, Morales-Vargas, *et al.*, 2018). Les études réalisées par Bracci *et al.* ont mis en évidence une homologie significative entre une séquence spécifique de la gp120, la protéine d'enveloppe du VIH, et les sites actifs putatifs des neurotoxines mimétiques du curare de serpent, qui ont la capacité de se lier de manière irréversible aux nAChR. En outre, les auteurs ont démontré que la gp120 recombinante inhibe la liaison de l'antagoniste des nAChR, l' α -bungarotoxine, suggérant que d'autres types de récepteurs (tels que les nAChR) peuvent fonctionner comme récepteurs du VIH. Cela soutient l'idée que les canaux ioniques peuvent jouer un rôle au cours de l'infection par le VIH (Capó-Vélez, Morales-Vargas, *et al.*, 2018). Plus récemment Zhao *et al.* ont étudié le rôle des nAChR- $\alpha 7$ dans les troubles neurocognitifs associés au VIH (HAND, « HIV-associated neurocognitive disorders »). Ils ont montrés qu'un traitement avec le PAM-II, PNU-120596, a entraîné une protection significative contre les troubles locomoteurs, de l'apprentissage et de la mémoire induits par la protéine neurotoxique Tat du VIH. Ce traitement a aussi induit une protection contre l'activation des astrocytes/microglies et des lésions neuronales. Ces résultats démontrent pour la première

fois que le nAChR- $\alpha 7$ et son PAM sont très prometteurs pour le développement de traitements de la maladie de HAND (Zhao *et al.*, 2021). Les nAChR- $\alpha 7$ sont également impliqués dans les infections par le virus de la rage et le SARS-CoV-2, mais cela sera abordé ultérieurement.

2. Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques, qui furent conceptualisés par Geoffrey Burnstock dans les années 70, sont des protéines membranaires présentes dans presque tous les tissus de mammifères et capables de détecter les nucléotides ou l'ATP (Burnstock, 2014; Ralevic, 2021). Ces récepteurs sont impliqués dans des processus physiologiques fondamentaux (tels que la coagulation sanguine (Hechler and Gachet, 2015) et la neurotransmission (Khakh and North, 2012)). Une dérégulation du système purinergique contribue à la physiopathologie de nombreuses maladies, notamment le diabète, les maladies neurologiques, l'ostéoporose et le cancer (Huang *et al.*, 2021). La signalisation purinergique est également impliquée au cours de l'infection par de nombreux virus, tels que les virus du VIH (Chen *et al.*, 2016), de la grippe (Leyva-Grado *et al.*, 2017), de la Dengue (Corrêa *et al.*, 2016), du VHC (Ashraf *et al.*, 2013), ainsi que les adenovirus (Lee *et al.*, 2012), et le VSV (Li *et al.*, 2014). En outre, la stimulation des récepteurs purinergiques dans les cellules infectées induit également des réponses inflammatoires et antivirales, contribuant ainsi à la défense antivirale de l'hôte (Ferrari *et al.*, 2018).

i. Structure et classification

Les récepteurs purinergiques sont divisés en deux groupes : ceux qui sont activés par l'adénosine, les récepteurs P1, et ceux qui sont activés par l'ATP (P2). Il existe 4 types différents de récepteurs P1 : P1A₁, P1A_{2A}, P1A_{2B}, P1A₃ (Fredholm *et al.*, 2001). Les récepteurs P2 sont eux-mêmes subdivisés en 2 sous-groupes : les récepteurs ionotrope P2X (1-7) et les récepteurs métabotropes P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) sur la base de leur séquence, de la topologie de leur membrane et de la sélectivité de l'agoniste (Figure 26) (Burnstock and Knight, 2004; Surprenant and North, 2009).

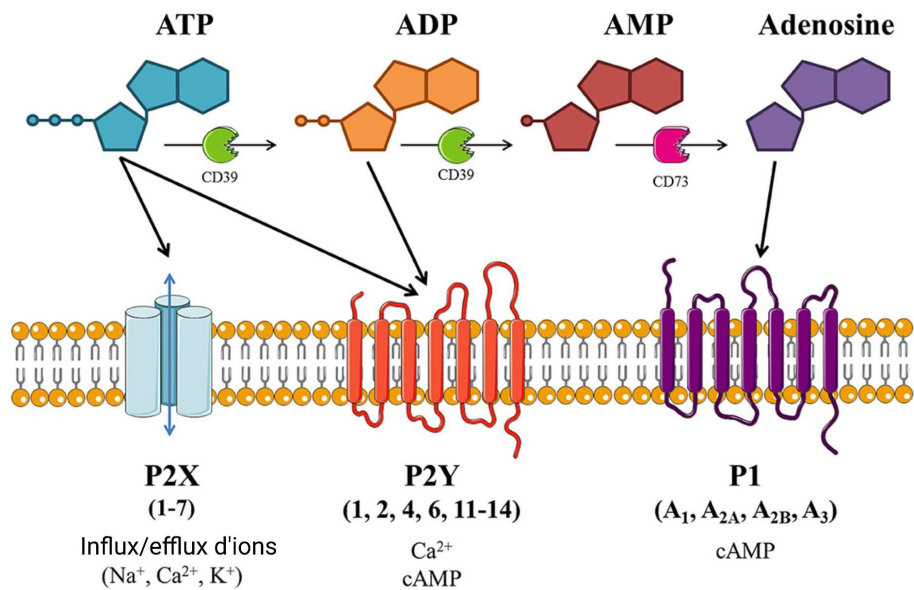


Figure 26 : Schéma de la structure des récepteurs purinergiques.

L'ATP extracellulaire active les récepteurs P2X et/ou P2Y, modifiant ainsi les concentrations intracellulaires d'ions et/ou d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'ATP peut être hydrolysé par des ectonucléotidases (dont CD39 et CD73), produisant de l'adénosine diphosphate (ADP), de l'adénosine monophosphate (AMP) et de l'adénosine. L'ADP est également capable d'activer les récepteurs P2Y, tandis que l'adénosine active les récepteurs P1 qui modulent l'activité de l'adénylate cyclase (AC) pour modifier les niveaux intracellulaires d'AMPc. (Thompson *et al.*, 2021).

Les récepteurs P2X sont activés par l'ATP extracellulaire (Surprenant and North, 2009). Ce sont des canaux ioniques trimériques dépendants de l'ATP et perméables aux espèces cationiques (Khakh, 2001; Habermacher *et al.*, 2016). Les extrémités N-ter et C-ter des récepteurs P2X1-7 sont intracellulaires et présentent des motifs de liaison consensuels pour les protéines kinases. Ces récepteurs présentent également deux régions transmembranaires (TM1 et TM2) (Habermacher *et al.*, 2016). La TM1 est impliquée dans le « gating » du canal et la TM2 tapisse le pore ionique. Il y a également une grande boucle extracellulaire composée de 10 résidus de cystéine conservés (Khakh, 2001; Jiang, Taly and Grutter, 2013; Rokic and Stojilkovic, 2013; Alves *et al.*, 2014). Les sous-types P2Y, quant à eux, appartiennent à la classe A des récepteurs couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires, activés par les nucléotides ATP, ADP, UTP et UDP (Figure 26) (Ferrari *et al.*, 2018).

Les sous-unités P2X4 et P2X7 sont largement coexprimées, en particulier dans les cellules épithéliales sécrétrices et les cellules immunitaires et inflammatoires, et régulent l'inflammation et la nociception (Schneider *et al.*, 2017). Bien que l'hétéromérisation

fonctionnelle ait été établie pour les sous-unités P2X2 et P2X3 exprimées dans les neurones sensoriels (Lewis *et al.*, 1995), il existe des rapports contradictoires concernant une interaction fonctionnelle entre les sous-unités P2X4 et P2X7 (Torres, Egan and Voigt, 1999; Guo *et al.*, 2007). Néanmoins, il a également été montré que les sous-unités P2X4 et P2X7 peuvent former des récepteurs P2X4/P2X7 hétérotrimériques (Schneider *et al.*, 2017). À l'heure actuelle, malgré les efforts déployés pour déterminer si P2X4 et P2X7 interagissent en tant qu'hétérotrimères ou homotrimères, il n'existe aucune preuve définitive en faveur de l'un ou l'autre modèle (Kanellopoulos *et al.*, 2021). Cependant, plusieurs publications montrent que des interactions fonctionnelles entre P2X4 et P2X7 se produisent (Kawano *et al.*, 2012; Sakaki *et al.*, 2013; Zech *et al.*, 2016).

ii. Fonction

Les récepteurs P1, de type A₁, A_{2A} et A₃ ont une forte affinité pour l'adénosine et sont donc activés par un niveau physiologique d'adénosine extracellulaire. Au contraire, le récepteur de type A_{2B} nécessite une concentration d'adénosine beaucoup plus élevée et serait associé à des conditions pathologiques telles que l'hypoxie (Fredholm *et al.*, 2001; Cieślak, Komoszyński and Wojtczak, 2008). Les récepteurs A1 sont principalement localisés dans le système nerveux, tandis que les trois autres sous-types sont exprimés de manière diffuse dans un large éventail de tissus, notamment le système nerveux, la rate, le côlon, les testicules, etc (Poulsen and Quinn, 1998; Huang *et al.*, 2021). Les récepteurs P1 sont impliqués dans un grand nombre de réponses physiologiques, telles que la modulation du rythme cardiaque (Mustafa *et al.*, 2009).

Les récepteurs P2 détectant l'ATP et autres nucléotides, sont sensibles à la concentration extracellulaire de l'ATP. En effet, celle-ci est élevée dans le cytoplasme et faible dans le compartiment extracellulaire (1-10 mM contre 10-100 nM, respectivement) (Ainscow *et al.*, 2002; Rathmacher *et al.*, 2012). La concentration extracellulaire d'ATP est maintenue à un niveau bas par l'activité des enzymes hydrolysant les nucléotides exprimés sur la membrane cellulaire, tel que CD39 ou CD73 (Yegutkin, 2008; Zimmermann, Zebisch and Sträter, 2012). Mais de nombreux facteurs de stress biologique ont la capacité d'induire la libération d'ATP par la cellule eucaryote (Ferrari *et al.*, 2018). Cet ATP ou d'autres nucléotides peuvent donc être détectés par les récepteurs purinergiques de type P2. Ces récepteurs peuvent être impliqués dans divers processus physiologiques, notamment la neurotransmission, l'apoptose, la sécrétion de cytokines, la chimiotaxie, la douleur inflammatoire et l'activation des cellules

immunitaires (Burnstock and Boeynaems, 2014; Cekic and Linden, 2016). Les récepteurs P2Y2 peuvent induire également l'activation et le chimiotactisme de cellules inflammatoires, en particulier les cellules dendritiques et les neutrophiles (Eltzschig, Sitkovsky and Robson, 2012; Müller and Idzko, 2012; Hechler and Gachet, 2015) et favoriser un phénotype pro-fibrotique dans les fibroblastes pulmonaires (Müller *et al.*, 2017). Les récepteurs P2X peuvent subir une désensibilisation vis-à-vis de l'ATP. P2X1 et P2X3, qui sont les plus sensibles à l'ATP se désensibilisent rapidement. P2X2 et P2X5, moins sensibles à l'ATP, ont une désensibilisation plus lente. P2X4 possède une sensibilité similaire à l'ATP, mais une désensibilisation prolongée par rapport à P2X2 et P2X5. Enfin, P2X7 présente la plus faible sensibilité à l'ATP et une désensibilisation pratiquement nulle (North, 2002; Habermacher *et al.*, 2016; Schmid and Evans, 2019). Quant à P2X6, il n'est pas classé dans ces groupes car il ne dispose pas de la capacité à s'associer de manière homotrimérique (Barrera *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2021).

iii. Rôle dans l'inflammation

L'ATP ainsi que d'autres médiateurs émis par les cellules blessées ou mourantes, lors de lyse cellulaire induite par une infection virale par exemple, peuvent venir consolider le signal de la réponse inflammatoire déclenchée par la reconnaissance initiale de l'agent pathogène. En effet, l'ATP se comporte comme un médiateur de l'inflammation et de l'immunité (Virgilio *et al.*, 2003; Di Virgilio, Boeynaems and Robson, 2009). Les récepteurs purinergique et en particulier les récepteurs P2X sont largement exprimés sur les cellules immunitaires des mammifères (Sun *et al.*, 2023), et vont détecter ce « signal de danger » que représente l'ATP. Ainsi, les récepteurs P2X2 et P2X4 sont impliqués dans la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des cellules T et la différenciation des cellules T CD4⁺ (Vitiello *et al.*, 2012; Sakaki *et al.*, 2013; Kanellopoulos *et al.*, 2021; Alberto *et al.*, 2022). L'activation de P2X2/3 ou P2X3 est associée à l'hyperalgésie inflammatoire (Oliveira *et al.*, 2009), et P2X5 est nécessaire à l'activation de l'inflammasome induite par *Listeria monocytogenes* et à la production d'IL-1 β (Jeong *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2023). Néanmoins, le récepteur P2X7 reste le plus étudié, c'est pourquoi, par la suite, seulement ce récepteur sera abordé.

Le récepteur P2X7 joue un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire (Di Virgilio *et al.*, 2017). En effet, ce récepteur, présent dans presque tous les organes et tissus, tels que le foie, les reins, les poumons, la prostate et l'utérus, mais surtout concentré dans le système nerveux et principalement dans la microglie, est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation pro-inflammatoire (Collo *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2022).

P2X7 est impliqué dans l'activation et l'expression de certains facteurs de transcription *in vivo*, et joue un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire au niveau de la transcription de gènes, tels que ceux des familles NF- κ B, Egr (gène répondant à la croissance précoce) et AP-1 (Gao *et al.*, 2017; Taefehshokr *et al.*, 2017; Gazon *et al.*, 2018).

Le récepteur P2X7 est connu comme un puissant activateur de la voie de l'inflammasome du récepteur NOD-like (NLRP3) (Schroder and Tschopp, 2010; Gombault, Baron and Couillin, 2013). À cet égard, la reconnaissance des produits microbiens agit comme un signal d'amorçage pour les cellules inflammatoires, induisant la transcription des formes biologiquement inactives des cytokines IL-1 β et de l'IL-18, et l'expression de NLRP3. La stimulation du récepteur P2X7 agit comme le signal final pour l'activation de NLRP3, qui permet à son tour d'activer la caspase-1, induisant alors la maturation protéolytique de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Figure 27) (Perregaux and Gabel, 1994; Schroder and Tschopp, 2010; Burnstock, 2016). Le récepteur P2X7 activé peut former de larges pores au niveau de la membrane, ce qui permet à l'IL-1 β mature d'être libérée à l'extérieur de la cellule pour jouer son rôle pro-inflammatoire (Ryoden *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2022).

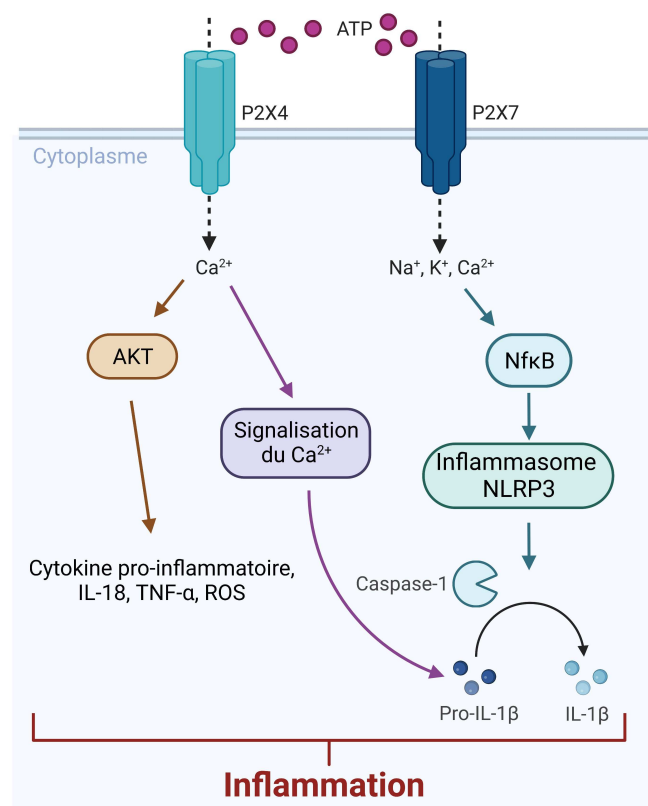


Figure 27 : Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs P2X4 et P2X7 impliquées dans la réponse inflammatoire.

L'ATP agit sur les récepteurs P2X4 et P2X7, entraînant l'ouverture des canaux ioniques. L'activation de P2X7 entraîne l'activation de la signalisation NF- κ B intracellulaire, l'induction de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération des précurseurs de l'IL-1 β . Sous l'action de la caspase-1, le précurseur IL-1 β est clivé en IL-1 β mature et active, ce qui entraîne une réponse inflammatoire. L'activation de P2X4 induit la libération de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la production d'IL-1 β en induisant un flux d'ions calcium. (Na⁺ : sodium ; K⁺ : potassium ; Ca²⁺ : calcium ; ROS : dérivés réactifs de l'oxygène). D'après (J. Liu *et al.*, 2023).

Il existe déjà plusieurs agonistes et antagonistes des récepteurs P2 qui ont été développés pour le traitement de maladies humaines. Puisque l'ATP agit généralement comme un signal pro-inflammatoire, les antagonistes, tels que BX-430 ou A-438079 (Illes *et al.*, 2021), ciblant respectivement les récepteurs P2X4 et P2X7, peuvent contribuer à freiner l'inflammation (Huang *et al.*, 2021). En plus de l'ATP, l'ivermectine agit également comme un PAM des P2X4 en facilitant l'ouverture et en retardant sa fermeture (Khakh *et al.*, 1999; Priel and Silberberg, 2004), mais aussi des P2X7 chez l'humain et la souris (Nörenberg *et al.*, 2012; Illes *et al.*, 2021).

iv. Implications dans les maladies virales

Le lien entre les nucléotides/nucléosides extracellulaires et les virus a été négligé pendant des années malgré les premières observations identifiant une activité extracellulaire de type ATPase dans les cellules HeLa infectées par le VHS et à la surface de deux types de myxovirus (Epstein and Holt, 1963; Dawson, Epstein and Hummeler, 1965; Ferrari *et al.*, 2018). En 1968, il a été démontré que la présence d'adénosine dans le liquide extracellulaire affectait la biologie virale. Il a ensuite été démontré que l'adénosine réduisait la production de virus de la vaccine en activant les récepteurs A₂ et la protéine kinase A (Mécs, 1968; Leão-Ferreira *et al.*, 2002). En outre, une augmentation de l'expression de CD39 a été constatée sur la membrane plasmique des lymphocytes de patients séropositifs pour le VIH-1 (Nikolova *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2018). La signalisation purinergique participe de diverses manières à la modulation de la réponse inflammatoire déclenchée par l'infection virale. Par exemple, les récepteurs A_{2A} contribuent partiellement à la protection contre les lésions neurologiques à médiation immunitaire dans un modèle de sclérose en plaques due au virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV). Cela suggère que les inhibiteurs des récepteurs P1 pourraient être une option pour le traitement de la composante inflammatoire des lésions neurologiques induites par ce virus (Mecha *et al.*, 2013; Ferrari *et al.*, 2018). Certains récepteurs P2X sont cruciaux pour l'entrée virale du VHB et du VHC dans les hépatocytes (Taylor and Han, 2010). De plus, il a été démontré que l'activation de P2X7 par l'ATP et des

récepteurs P2Y6 par l'UDP limitait la réplication du VSV à la fois *in vitro* et *in vivo* (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). En outre, il a également été démontré que l'ajout pharmacologique d'ATP, avant l'infection virale, diminue la réplication du VSV, du virus de la maladie de Newcastle (VNC), du virus de la leucémie murine (VLM) et du VHS d'une manière dépendante de P2X7 (Ferrari *et al.*, 2018). Des travaux ont également montré que l'inhibition du récepteur P2X7 inhibait de manière significative la réponse IFN- γ au virus de la Dengue (Tsai *et al.*, 2015). Les récepteurs P2 seraient aussi impliqués lors de l'infection par le VIH (Séror *et al.*, 2011; Hazleton, Berman and Eugenin, 2012; Pacheco *et al.*, 2014). Jusqu'à présent, les récepteurs P2X1, P2X7, P2Y1 et P2Y2 ont été impliqués dans les premières étapes de l'infection et de la réplication du VIH-1 (Pacheco *et al.*, 2018). Il a également été démontré que l'ATP était libérée par la pannexine-1 (PANX1) de cellules humaines lors de l'infection et que l'inhibition pharmacologique des récepteurs purinergiques empêchait la réplication du VIH-1 *in vitro* (Orellana *et al.*, 2011; Hazleton, Berman and Eugenin, 2012; Pacheco *et al.*, 2018).

L'administration pharmacologique d'ATP avant l'infection provoque un stress membranaire élevé et/ou la mort cellulaire, prévient une augmentation de la charge virale et stimule le chimiotactisme des macrophages, des neutrophiles et de cellules microgliales, activant ainsi le système immunitaire cellulaire et renforçant la production de cytokines antivirales (Corrêa *et al.*, 2016; Manzoor *et al.*, 2016). Par conséquent, le message clair qui ressort de ce domaine est que le réseau purinergique de la cellule eucaryote représente une nouvelle cible pharmacologique potentielle pour lutter contre les infections virales (Ferrari *et al.*, 2018).

3. Collaboration des récepteurs nAChR et P2X

Une collaboration fonctionnelle entre les récepteurs P2X et nAChR a été observée dans les neurones sympathiques de rat (Nakazawa, 1994) provenant très probablement d'une interaction directe entre ces molécules (Lalo *et al.*, 2012). En effet, le récepteur nAChR s'associe avec divers hétérodimères de récepteurs couplés à la protéine G, y compris les récepteurs P2X (Bono *et al.*, 2023). À cet égard, un complexe de récepteurs formé par les $\alpha 4\beta 2$ nAChRs et le P2X2 a été identifié en utilisant la microscopie FRET à la fois dans les cellules Hek293 et dans les membranes des neurones de l'hippocampe transfectés par ces récepteurs (Khakh *et al.*, 2005). De plus, en utilisant la co-immunoprécipitation, une interaction entre les nAChRs $\alpha 3\beta 2$ et les récepteurs P2X1-3 a été rapportée et est liée fonctionnellement au contrôle de la libération de norépinéphrine provoquée dans l'hippocampe de rat (Rodrigues

et al., 2016; Bono et al., 2023). D'autres interactions ont été observées, notamment par l'utilisation du transfert d'énergie par résonance de Förster qui a démontré des interactions physiques entre les récepteurs P2X2 ou P2X3 et les récepteurs $\alpha 6\beta 4$ dans les cellules Neuro2a et les neurones corticaux cultivés de souris (Limapichat, Dougherty and Lester, 2014). Deux types d'interaction distincts ont été rapportés. L'une est inhibitrice et ne se produit que pendant la co-activation du récepteur par l'ACh. L'autre type d'interaction est préorganisé et constitutif, dans lequel une propriété biophysique d'un canal est modulée par l'autre (Limapichat, Dougherty and Lester, 2014). En outre, il a été observé une interaction inhibitrice croisée rapide entre les récepteurs nAChR et P2X dans les neurones cœliaques. Les propriétés décrites pour ces interactions soutiennent l'hypothèse que ces récepteurs sont situés suffisamment près les uns des autres dans la membrane neuronale pour former des unités fonctionnelles constituées d'au moins un canal de chaque type (Ochoa-Cortés et al., 2010). Une étude a montré, chez le rat, que les récepteurs P2X7 et les nAChRs- $\alpha 7$ semblaient coexister et interagir sur les terminaux glutamatergiques du néocortex. En particulier, les récepteurs P2X7 exerceraient un rôle permissif sur l'activation des nAChR- $\alpha 7$ (Patti et al., 2006). Enfin, il a été montré un couplage fonctionnel entre les nAChRs $\alpha 7$, les canaux Panx1 et les récepteurs P2X7 qui aurait une importance physiologique dans la neurosécrétion (Maldifassi et al., 2021).

III- Les traitements contre la COVID-19 et la rage

La COVID-19 et la rage, causées respectivement par le SARS-CoV-2 et le virus de la rage, seront les exemples utilisés dans la suite de ce travail pour illustrer les maladies émergentes et négligées. Bien que de nombreux moyens ont été déployés contre le SARS-CoV-2, peu de traitement efficace sont à ce jour disponibles. Contre la rage, une maladie connue depuis des millénaires, il n'existe toujours pas de traitement disponible. Les pistes de thérapies possibles et les traitements disponibles seront donc évoqués dans cette partie.

A) La COVID-19

La COVID-19 est une maladie virale aiguë très contagieuse et pouvant provoquer des formes graves chez certains patients. Contre cette maladie apparue il y a 4 ans, deux principaux vaccins à ARNm ont rapidement été développés : Comirnaty® de Pfizer/BioNTech et Spikevax® de Moderna, ainsi que deux vaccins à vecteur viral non répliquatif : Jcovden de

Janssen (Johnson & Johnson) et Vaxzevira d'Oxford/AstraZaneca. Néanmoins, ces vaccins ne protègent pas complètement contre l'infection mais préviennent surtout le développement de formes graves. C'est pourquoi le développement de thérapies antivirales reste un enjeu important contre la COVID-19.

a. Modulation du cycle viral

La modulation du cycle viral au niveau de l'entrée ou de la réplication virale est une piste thérapeutique présente dans la lutte contre le SARS-CoV-2.

1. Entrée virale

Plus de 20 Acm ciblant la glycoprotéine S, provenant soit de cellules B de patients convalescents atteints de la COVID-19, soit de l'immunisation de souris humanisées, ont été testés dans le cadre d'essais cliniques, et certains ont reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA pour le traitement de patients atteints de COVID-19 légère à modérée. Il s'agit notamment du sotrovimab (FDA, 2021), de l'association du casirivimab et de l'imdevimab (Baum *et al.*, 2020), du bamlanivimab (Jones *et al.*, 2021) (utilisé en monothérapie ou en association avec l'etesevimab), de l'association du cilgavimab et du tixagevimab, du regdanvimab et du bebtelovimab (Pantaleo *et al.*, 2022). Cependant, l'une des principales limites de la plupart des Acm évalués jusqu'à présent contre la COVID-19 a été l'apparition rapide des VOCs qui peuvent échapper à la fois aux Acm seuls et aux cocktails de Acm (Hoffmann *et al.*, 2022). Les VOCs tels que Alpha, Beta, Gamma et Delta présentent 9 à 12 mutations dans des régions de la glycoprotéine S, qui n'ont généralement qu'un impact partiel sur l'efficacité des Acm. Cependant, les variants d'Omicron ont accumulé plus de 35 mutations dans la glycoprotéine S, dont 15 dans le RBD, qui n'est pas seulement le site qui se lie au récepteur hôte ACE2, mais aussi la cible clé des Acm, ainsi que des anticorps neutralisants produits par la réponse immunitaire naturelle ou induite par un vaccin. L'émergence des VOCs Omicron (BA.4, BA.5 et XBB) a rendu partiellement ou presque inefficaces de nombreux Acm présents sur le marché ou en phase avancée de développement clinique. Il s'agit par exemple de l'association du casirivimab et de l'imdevimab, de l'association du bamlanivimab et de l'etesevimab (Pantaleo *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2022). C'est pourquoi il est important de trouver des anticorps neutralisants à plus large spectre ou bien de développer davantage de cocktails d'anticorps pour surmonter la résistance des variants (Jiang and Lu, 2022; Pantaleo *et al.*, 2022).

L'utilisation de molécule antivirale bloquant l'entrée du virus est une piste thérapeutique également envisagée. C'est le cas de l'amantadine, qui grâce à ses propriétés physicochimiques lipophiles et alcalines, peut traverser la membrane du lysosome et empêcher la libération de l'ARN viral dans les cellules (Smieszek, Przychodzen and Polymeropoulos, 2020). Une autre étude a montré que l'adamantane pouvait avoir des effets protecteurs contre la COVID-19. Néanmoins, cette étude présente des limites, comme un échantillon de petite taille, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour la confirmer (Rejdak and Grieb, 2020). L'enfuvirtide, un peptide inhibiteur de la fusion du VIH, pourrait être utilisé comme un puissant inhibiteur de la fusion SARS-CoV-2. Des essais cliniques doivent être réalisés pour confirmer l'effet de l'enfuvirtide contre le COVID-19 (Ahmadi *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2023). Enfin, l'arbidol est un agent antiviral non nucléosidique qui inhibe la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire de l'hôte, empêchant ainsi l'entrée du virus dans les cellules de l'hôte. En outre, l'arbidol peut renforcer le système immunitaire de l'hôte en induisant la production d'IFN et en activant les macrophages. Cette molécule a un effet antiviral sur de nombreux virus, comme le VRS, le VHB et le VHC, le virus de la grippe et l'adénovirus (Boriskin, Pécheur and Polyak, 2006). Récemment, une étude *in vitro* a montré que l'arbidol avait la capacité d'inhiber l'infection du SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2020), mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

2. Réplication virale

Dans le cas de la COVID-19, différents types de molécules ciblant la réplication virale peuvent être utilisés. C'était le cas de l'IFN, qui a été utilisé pour traiter des patients atteints par la COVID-19, puisque des expériences *in vitro* ont montré que les IFN de type I et de type III inhibaient la réplication du SARS-CoV-2 (Vanderheiden *et al.*, 2020) et des observations cliniques l'ont confirmé (Lopez *et al.*, 2020; Bastard *et al.*, 2021). Mais malgré les avantages potentiels des IFN en tant qu'agents antiviraux, une surexposition prolongée à ces derniers augmente l'inflammation pulmonaire, entraînant des lésions tissulaires, rendant ainsi le patient plus susceptible aux infections bactériennes (Major *et al.*, 2020). Actuellement, les lignes directrices de l'OMS ne recommandent donc pas l'utilisation d'interférons pour le traitement du COVID-19 (Chalmers *et al.*, 2021; OMS, 2023f). D'autres molécules tels que des analogues nucléosidiques, ou des petites molécules comme les inhibiteurs de protéase ou les oligonucléotides antisens sont aujourd'hui utilisées contre la COVID-19

i. Analogues nucléosidiques

Les inhibiteurs nucléosidiques testés contre le SARS-CoV-2 sont aux nombres de 3 : le favipiravir, le remdesivir et le molnupiravir, provenant d'un repositionnement de médicament.

Le favipiravir, un analogue modifié de la pyrazine, a été initialement approuvé pour un usage contre la grippe et la fièvre hémorragique Ebola (Sweiti *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2022). Ce médicament inhibe la RdRp (Furuta, Komeno and Nakamura, 2017). Avec la propagation du SARS-CoV-2, le favipiravir a été l'un des premiers médicaments étudiés pour le traitement de la COVID-19, et plus d'une trentaine d'essais cliniques ont été réalisés. Cette approche a toutefois ses limites, car l'ARN polymérase du virus possède une activité exonucléasique qui lui permet de corriger les mutations. Le favipiravir n'est actuellement pas inclus dans les dernières directives thérapeutiques internationales contre la COVID-19 (Gudima *et al.*, 2023; OMS, 2023f).

Le remdesivir, un analogue de l'adénosine, est initialement utilisé pour traiter les infections causées par les virus Ebola et Marburg. Il a été ultérieurement approuvé par la FDA contre le SARS-CoV-2 et il est recommandé de l'administrer dans la semaine qui suit l'apparition des symptômes, et à la condition que les patients soient atteints de forme sévère de COVID-19 (OMS, 2023f). Cependant, l'effet antiviral clinique du remdesivir contre le SARS-CoV-2 reste controversé. Des essais cliniques à grande échelle ont révélé une amélioration de l'état clinique chez 68 % des patients traités par le remdesivir (Grein *et al.*, 2020). Il a également été démontré que l'initiation même tardive d'une thérapie antivirale à base de remdesivir est efficace dans le traitement des patients atteints de COVID-19 sévère (Hillaker *et al.*, 2020). Cependant, une étude menée dans dix cliniques en Chine, n'a pas montré de bénéfices statistiquement significatifs du remdesivir chez des patients adultes (Grein *et al.*, 2020). L'étude du médicament se poursuit, avec plus de 100 essais cliniques en cours (Gudima *et al.*, 2023).

Le molnupiravir, un agent antiviral à large spectre, est un analogue nucléosidique de la β -D-N4-hydroxycytidine (NHC) initialement utilisé contre la grippe, l'hépatite C, la fièvre hémorragique Ebola, l'encéphalite équine vénézuélienne et le MERS-CoV (Tian *et al.*, 2022) . Son efficacité contre le SARS-CoV-2 était de 90 % dans les essais cliniques (Merck Sharp & Dohme LLC, 2022). Ce médicament est approuvé par la FDA depuis fin décembre 2021. Le

traitement par molnupiravir est recommandé dès que possible après le diagnostic de la COVID-19 et dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes. L'utilisation du molnupiravir est actuellement recommandée pour les patients atteints de forme non sévère de COVID-19 mais présentant un risque élevé d'hospitalisation (OMS, 2023f).

ii. Inhibiteurs de protéase

La principale protéase du SARS-CoV-2, M-pro (également appelée protéase 3CL), catalyse le clivage des polyprotéines virales en protéines non structurales, et joue donc un rôle crucial dans la réplication virale (Gudima *et al.*, 2023).

Le lopinavir est un inhibiteur de protéase initialement développé contre le VIH et approuvé pour le traitement du SIDA en association avec le ritonavir (Huang *et al.*, 2018). Cette molécule inhibe spécifiquement la M-pro du SARS-CoV-2. Au début de la pandémie, l'association lopinavir/ritonavir a été utilisée pour le traitement du COVID-19 et a donné des résultats prometteurs (Z. Zhang *et al.*, 2020). Cependant, d'autres études ont démontré l'absence de bénéfice clinique (Cao *et al.*, 2020; RECOVERY Collaborative Group, 2020). L'OMS ne recommande donc pas l'utilisation du lopinavir/ritonavir pour le traitement des patients atteints de la COVID-19 (OMS, 2023f).

Le Paxlovid ou nirmatrelvir est un inhibiteur spécifique de la M-pro du SARS-CoV-2, développé au cours de la pandémie. Le nirmatrelvir a été approuvé pour une utilisation clinique en association avec son booster pharmacocinétique, le ritonavir (Owen *et al.*, 2021). Le nirmatrelvir/ritonavir conçu contre le SARS-CoV-2 réduit le taux de mortalité ou d'hospitalisation des patients atteints de COVID-19, mais d'autres études sont nécessaires pour une analyse complète de leur efficacité. Actuellement, les lignes directrices de l'OMS recommandent le nirmatrelvir/ritonavir pour traiter le COVID-19 (OMS, 2023f).

iii. Oligonucléotides antisens

L'utilisation d'oligonucléotides synthétiques antisens ciblant spécifiquement le génome viral est une approche prometteuse pour la thérapie spécifique contre les maladies virales (Gudima *et al.*, 2023). Il s'agit d'un nouvel antiviral qui cible la région du génome du SARS-CoV-2 codant pour la RdRp par le mécanisme d'interférence par ARN.

L'interférence par ARN est un phénomène de régulation négative de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel par de petits ARN interférents (siRNA). La molécule

MIR 19[®] (siR-7-EM/KK-46), ciblant une séquence conservée dans les variants connus du SARS-CoV-2, réduit significativement le délai d'amélioration clinique chez les patients hospitalisés pour COVID-19 modéré par rapport au traitement standard basé sur la limitation de la réaction inflammatoire (Khaitov *et al.*, 2023). Néanmoins, d'autres essais cliniques devront être réalisés afin de s'assurer de l'effet bénéfique sur les patients hospitalisés.

b. Modulation de la réponse de l'hôte

En complément de la modulation du cycle viral, moduler la réponse de l'hôte est également une piste thérapeutique utilisée contre la COVID-19, soit par la modulation de la réponse inflammatoire des patients ou en ciblant des récepteurs cellulaires.

1. Réponse inflammatoire

Au cours de l'infection par le SARS-CoV-2, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires CXCL10, IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL2 et CXCL5 a été observée (Khalil, Elemam and Maghazachi, 2021). Cette dernière est responsable du recrutement de polynucléaires neutrophiles et il a été observé dans des souris KO (« Knock-out ») pour CXCL5 une diminution de l'inflammation pulmonaire sans diminuer la clairance virale. Cela suggère une cible potentielle pour le contrôle de la pneumonie due à la COVID-19 (Liang *et al.*, 2020).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre les principaux médiateurs inflammatoires, tels que l'interféron- γ , les interleukines IL-1 et IL-6 ainsi que le facteur du complément C5a, sont conçus pour supprimer la réponse inflammatoire après une infection par le SARS-CoV-2 afin de prévenir des dommages aux organes (Gudima *et al.*, 2023). Les inhibiteurs de l'IL-6, le tocilizumab et le sarilumab, ont été les plus étudiés et plus d'une douzaine d'essais cliniques randomisés ont été menés (Alzghari and Acuña, 2020; Sanders *et al.*, 2020; Scavone *et al.*, 2020). Ces essais ont montrés une diminution de la mortalité et de la nécessité d'une ventilation mécaniques chez les personnes atteintes de forme sévères de COVID-19 (OMS, 2021a).

Une autre façon de réduire la réponse inflammatoire est l'utilisation d'inhibiteur de la voie de transduction JAK/STAT, qui régule un certain nombre de cytokines inflammatoires en transférant les signaux des récepteurs de la membrane cellulaire vers le noyau. Plusieurs inhibiteurs de JAK, tels que le Baricitinib, le Ruxolitinib, le Tofacitinib et le Nerizutinib, ont eu

un impact clinique significatif sur l'amélioration des résultats cliniques des patients hospitalisés atteints de COVID-19. Ces inhibiteurs de kinases sont utilisés pour traiter la COVID-19 car ils inhibent l'activation immunitaire induite par le virus et la signalisation de l'inflammation (W. Zhang *et al.*, 2020).

2. Récepteurs cellulaires

Les récepteurs cellulaires pourraient également jouer un rôle lors de l'infection virale par le SARS-CoV-2. L'hypothèse du rôle des nAChR dans l'interaction entre ACE2 et le SARS-CoV-2 a été mise en évidence avec l'impact du tabagisme sur le COVID-19 (Leung and Sin, 2020; Rossato *et al.*, 2020). Deux mécanismes antinomiques ont été discutés. La modulation des nAChRs dans le poumon pourrait augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires, un processus pouvant conduire à la "tempête cytokinique" pendant l'infection (Borovikova *et al.*, 2000; Pavlov and Tracey, 2017). À l'inverse, le nAChR- $\alpha 7$ a été impliqué dans le contrôle de l'inflammation associée à l'infection par le virus de la grippe (Gao *et al.*, 2021), et ce récepteur pourrait également contrôler la physiopathologie de la COVID-19 en modulant le système rénine-angiotensine (Alifano *et al.*, 2020).

Enfin, les récepteurs purinergiques pourraient aussi être impliqués dans l'infection par le SARS-CoV-2. En effet, la signalisation purinergique est impliquée dans la physiopathologie de plusieurs infections virales, ce qui fait du système purinergique une cible potentielle dans la recherche contre le SARS-CoV-2 (Franciosi *et al.*, 2021). De plus en plus de données suggèrent qu'une cascade de libération d'ATP par le canal PANXI et l'activation des récepteurs purinergiques jouent un double rôle, aboutissant à l'infection et la réplication virale ainsi qu'à l'induction de réponses inflammatoires et antivirales (Nadeali *et al.*, 2022). Parmi ces récepteurs purinergiques, P2X7 pourrait être responsable de la « tempête cytokinique » en libérant des cytokines inflammatoires et des chimiokines, tels que IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IL-1 β et IL-1 α (Burnstock, 2016). Cela suggère que les bloqueurs de P2X7 pourraient être bénéfiques pour les patients COVID-19 présentant des réponses immunitaires exacerbées telles que des myocardite, une coagulation anormale, une arythmie, un syndrome coronarien aigu ou un infarctus du myocarde (Bansal, 2020; dos Anjos *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020). En outre, comme l'ont souligné Di Virgilio *et al.* (Di Virgilio *et al.*, 2020), de nombreux processus associés à l'insuffisance pulmonaire, tels que ceux observés chez les patients atteints de COVID-19, sont médiés par les récepteurs P2X7 (Di Virgilio *et al.*, 2017). La libération massive d'ATP après l'invasion des phagocytes mononucléaires pulmonaires par le SARS-CoV-2 peut

activer les récepteurs P2X7 des cellules présentatrices d'antigènes et des macrophages, augmentant ainsi la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'ATP (Di Virgilio *et al.*, 2017). De plus, des souris knock-out pour le récepteur P2X7 soumises à un modèle de fibrose pulmonaire ont montré une réduction de l'infiltration interstitielles par des cellules inflammatoires, de la libération de cytokines, de l'apoptose et de la fibrose, tandis que les agonistes du récepteur P2X7 augmentaient ces processus délétères (Monção-Ribeiro *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2021).

Il est donc essentiel de comprendre comment le système purinergique affecte le système immunitaire et les processus inflammatoires dans le tissu pulmonaire au cours de l'évolution du COVID-19 (Leão Batista Simões *et al.*, 2021). De plus, le système purinergique pourrait représenter un domaine d'étude important pour le développement de produits qui bloquent les récepteurs nucléotidiques et nucléosidiques. Ces produits réduiraient la cascade de signalisation purinergique et, par conséquent, les effets pro-inflammatoires de la cascade de cytokines associée aux lésions des poumons et d'autres organes causés par le virus.

3. Ivermectine et SARS-CoV-2

L'ivermectine, un médicament anthelminthique découvert dans les années 1970 (Campbell, 2012), est utilisé en médecine vétérinaire et aussi contre les parasitoses telle que la gale. Mais ce médicament possède également des propriétés antivirales et immunomodulatrices de l'hôte (Patil, Verma and Masand, 2022). Plusieurs hypothèses ont donc été évoquées concernant son mode d'action possible contre le SARS-CoV-2. Une étude a observé que l'ivermectine s'arrimait dans la région de la leucine 91 de la glycoprotéine S du SARS-CoV-2 et de l'histidine 378 du récepteur ACE-2 de la cellule hôte, bloquant ainsi son entrée dans la cellule hôte (Lehrer and Rheinstein, 2020). L'ivermectine est également capable, lors d'une infection virale, de cibler le facteur IMP α de l'hétérodimère IMP α/β I et de se lier à lui, empêchant l'interaction avec IMP β I, et bloquant ainsi le transport nucléaire des protéines virales. Ceci permettrait à la cellule de monter une réponse antivirale normale (Yang *et al.*, 2020). Or, pour échapper à la réponse immunitaire, le SARS-CoV-2 lorsqu'il pénètre dans la cellule hôte, tend à "charger" ses protéines sur l'hétérodimère IMP α/β I de la protéine hôte (IMP) pour pénétrer dans le noyau par le complexe du pore nucléaire. Une fois à l'intérieur, la molécule IMP se détache tandis que les protéines virales du virus SARS-CoV-2 détourne la machinerie de la cellule hôte et inhibe la réponse antivirale de la cellule en bloquant la libération d'IFN (Zaidi and Dehgani-Mobaraki, 2022). Zhang *et al.* ont également suggéré que

l'ivermectine inhiberait la production de cytokines inflammatoires induite par le lipopolysaccharide (LPS) en bloquant la voie NF- κ B et en améliorant la survie induite par le LPS chez les souris (Zhang *et al.*, 2008). Une autre hypothèse proposée est que l'ivermectine inhiberait la signalisation JAK/STAT3 en favorisant la dégradation de PAK1, l'activité STAT3 est compromise et la production d'IL-6 est réduite (Matsuyama *et al.*, 2020). Cette molécule possède également une haute affinité de liaison avec la Nsp12-RdRp du SARS-CoV-2, ce qui pourrait interférer avec la réplication virale (Sen Gupta *et al.*, 2020). L'ivermectine jouerait également un rôle immunomodulateur, comme il a été observé dans un modèle de hamster, où le rapport IL-6/IL-10 a été considérablement réduit dans les tissus pulmonaires, expliquant probablement la présentation clinique plus favorable des animaux traités (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021). Plus récemment, un traitement prophylactique par l'ivermectine dans un modèle hamster a permis d'obtenir une diminution des signes cliniques et de l'inflammation (Uematsu *et al.*, 2023). Enfin, comme vu précédemment, l'ivermectine est un modulateur allostérique positif des récepteurs nAChR, P2X4 et P2X7 et pourrait également jouer un rôle sur ces récepteurs lors de l'infection par le SARS-CoV-2.

Ainsi, bien que les essais cliniques entrepris chez l'homme n'aient pas encore montré d'avantages significatifs d'un traitement ivermectine, les effets chez le hamster pourraient être facilement explorés afin de comprendre le mécanisme d'action de l'ivermectine. Les récepteurs nAChR, P2X4 ou P2X7 pourrait être impliqués, ouvrant la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

B) La rage

La rage est une maladie évitable grâce à la vaccination ou à une prise en charge suffisamment précoce après l'infection. La majorité des décès causés par la rage, peuvent être attribués aux obstacles socio-économique, aux pénuries de réactifs et à la difficulté de maintenir une chaîne du froid ininterrompue pour le transport des produits biologiques destinés à la PPE (DuPont, Plemper and Schnell, 2019). À ce jour, les différents essais cliniques mises en place n'ont pas été concluant, c'est la cas, par exemple, du protocole de Milwaukee ayant permis la guérison d'une patiente en 2004 mais qui n'a jamais pu être reproduit (Zeiler and Jackson, 2016). Ainsi, la découverte de nouveaux composés antiviraux pourrait pallier ces obstacles et s'ajouter à la PPE (Bourhy *et al.*, 2010).

a. Modulation du cycle viral

La modulation du cycle viral va permettre d'empêcher l'accomplissement du cycle viral à plusieurs étapes, que ce soit au niveau de l'entrée virale, de la réplication ou bien de l'assemblage.

1. Entrée virale

L'entrée du virus de la rage peut être notamment ciblé par des molécules ou par des Acm. Cette entrée est assurée par une endocytose médiée par la clathrine qui dépend de la réorganisation du cytosquelette d'actine pour l'internalisation (Weir *et al.*, 2014). La dynamine est un composant essentiel de plusieurs voies d'endocytose et joue un rôle dans le réassemblage et l'organisation de l'actine (Weir *et al.*, 2014). Il a été démontré que le Dynasore, un inhibiteur de l'activité GTPase de la dynamine, inhibe le processus d'entrée de plusieurs virus, dont le virus de la rage et le VSV (Weir *et al.*, 2014; Mues *et al.*, 2015). La stratégie de repositionnement des médicaments a également permis d'identifier la Clofazimine, un médicament contre la lèpre ciblant la fusion des membranes virales. Cette molécule possède un indice de sélectivité supérieur à 967 contre le virus de la rage. Il s'agit donc d'un médicament prometteur contre l'infection par le virus de la rage (Wu *et al.*, 2021). Néanmoins, toutes ces molécules n'ont pas été testées *in vivo* et ne sont donc que des pistes potentielles pour le futur, contrairement aux Acm actuellement utilisées dans la PPE.

Les anticorps monoclonaux, utilisés parfois comme alternatives aux immunoglobulines antirabiques (IGR), ont prouvé leur efficacité antivirale (Vincent, Bussereau and Sureau, 1988; Thongcharoen *et al.*, 1990). Ces Acm ont plusieurs avantages par rapport aux IGR : une dose plus faible, une meilleure sécurité, une durée de conservation plus longue, une facilité d'administration, un coût de production plus faible, une capacité de production à grande échelle et une constance du produit (de Melo *et al.*, 2022). En outre, les Acm neutralisant le virus de la rage peuvent être obtenus par : humanisation de Acm de souris précédemment identifiés ; ou développés en tant que Acm humains dérivés de personnes vaccinées ; ou produits en tant que Acm humains dans des souris transgéniques exprimant des séquences de gènes d'anticorps humains (Lonberg, 2005). Cependant, chaque Acm présente une monospécificité et il est donc recommandé d'utiliser des cocktails contenant au moins deux Acm se liant à des épitopes qui ne se chevauchent pas, afin de limiter le risque d'échec dû à une couverture insuffisante des souches de virus de la rage en circulation ou à l'émergence d'échappement viral (Dietzschold, 1994; Ilina *et al.*, 2018; OMS, 2018b). Actuellement,

seulement deux Acm sont autorisés sur le marché, le Rabishield et le Twinrab, et d'autres sont en cours de développement. Rabishield, dont l'utilisation chez l'homme a été approuvée en 2016, ne contient qu'un seul Acm humain recombinant (IgG1) contre un épitope conformationnel de la protéine G du virus de la rage (Gogtay *et al.*, 2018; de Melo *et al.*, 2022). Le Rabishield a été décrit comme présentant un large spectre de neutralisation sur les isolats de virus de la rage importants pour la santé publique et provenant d'Amérique, d'Europe, d'Afrique et d'Asie (Sloan *et al.*, 2007). Cependant, en raison de sa mono-spécificité, l'une des principales préoccupations liées à ce produit est l'absence potentielle de neutralisation des variants émergents de la rage, ainsi que le risque de sélection de mutants d'échappement viraux (Sparrow *et al.*, 2019). En effet, le Rabishield neutralise mal les virus de la rage porteurs de la mutation N336D de la protéine G, qui est détectée dans environ 60 % des isolats africains et qui est de plus en plus souvent détectée en Amérique du Nord (Wang *et al.*, 2011, 2019; De Benedictis *et al.*, 2016). Twinrab, autorisé en 2019, contient deux Acm recombinants de souris : M777-16-3 ou Miromavimab, une IgG1 qui se lie au site antigénique II de la protéine G du virus de la rage, et 62-71-3 ou Docaravimab, une IgG2b qui se lie au site antigénique III de la glycoprotéine du virus de la rage (Müller *et al.*, 2009). Ces anticorps monoclonaux présentent le risque de réactions d'hypersensibilité à la suite de leur injection. Les deux produits, Rabishield et Twinrabs, ont donné des résultats comparables à ceux des IGR lorsqu'ils sont utilisés dans la PPE (de Melo *et al.*, 2022).

Actuellement, d'autres cocktails de Acm sont en cours de développement, avec des résultats prometteurs dans des modèles précliniques ou déjà testés dans des essais cliniques chez l'homme. Ces Acm sont dirigés contre différents sites antigéniques de la glycoprotéine de la rage (de Melo *et al.*, 2022). L'un de ces produits est le SYN023, actuellement en phase III de l'étude clinique, est composé de deux Acm humanisés, CTB011 et CTB012 (IgG1), qui reconnaissent des épitopes qui ne se chevauchent pas sur la protéine G du virus de la rage (Chao *et al.*, 2017). De même, les Acm humains I1B6 et NP-19-9 (IgG1) ont été récemment décrits comme neutralisant puissamment un large éventail de types de Lyssavirus et comme protégeant les souris d'une exposition létale à des isolats indiens du RABV (SV1-SV6) (Kim *et al.*, 2021). Les anticorps RVC20 et RVC58 sont deux autres Acm humains (IgG1) en cours de développement (De Benedictis *et al.*, 2016), et également étudiés comme potentiel traitement après l'apparition de symptômes. Ils se lient respectivement aux sites antigéniques I et III de la protéine G du virus de la rage. Ensemble, ces anticorps ont été capables de neutraliser plusieurs lignées de RABV et d'autres Lyssavirus, et aussi de protéger des hamsters syriens

contre une infection mortelle par le virus de la rage (De Benedictis *et al.*, 2016). Ces deux anticorps sont les seuls à avoir été testé comme thérapie pour traiter la rage clinique. En effet, il a récemment été montré que ce cocktail de Acm a pu guérir efficacement des souris enrégées symptomatiques. Pour cela, ces anticorps ont été administrés de façon concomitantes sur le site de l'infection en intra-musculaire et directement dans le SNC, permettant ainsi de bloquer la propagation du virus et de rendre possible l'élimination de ce dernier du SNC, tout en modulant l'inflammation cérébrale (de Melo *et al.*, 2020). Ces résultats prouvent que ce cocktail représente une opportunité de développer un traitement efficace de l'infection du SNC par le virus de la rage, en particulier s'il est associé à un diagnostic de l'infection plus précis et plus précoce (de Melo *et al.*, 2020).

2. Réplication

De nombreuses molécules ont été identifiées comme des inhibiteurs potentiels de la réplication du virus de la rage, mais avec des résultats *in vivo* peu prometteurs. C'est le cas de la Ribavirine, un analogue nucléosidique, qui peut efficacement inhiber la réplication du RABV *in vitro*, mais qui n'a pas d'efficacité clinique (Anindita *et al.*, 2018). Le favipiravir, un dérivé de la pyrazine, communément appelé T-705, est un inhibiteur de l'ARN polymérase à large spectre qui a un effet antiviral contre le RABV *in vitro*. Néanmoins, des expériences *in vivo* ont montré que dans des conditions de traitement précoce, il améliore les signes cliniques et le taux de survie des souris infectées par voie intramusculaire. Mais si le début du traitement au favipiravir est retardé de 1 ou 2 jours, aucun effet protecteur significatif ne peut être observé. Cela indique que le favipiravir pourrait être inefficace contre les virus situés dans le SNC et qu'il pourrait n'être efficace qu'avant la neuroinvasion (Virojanapirom *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2016; Jochmans and Neyts, 2019). L'amantadine et la katamine, des antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), avaient également un effet anti-RABV *in vitro*, mais se sont avérés inefficaces lors d'essais cliniques (Appolinario and Jackson, 2015). Une autre molécule, la pyriméthamine a montré sa capacité d'inhiber l'infection du RABV *in vitro* grâce à l'inhibition de la synthèse de l'adénosine. En outre, ce composé présente une interaction synergique avec la ribavirine. Malheureusement, chez les souris infectées par la rage, la pyriméthamine n'a montré aucune efficacité. Une explication possible est que l'effet antiviral est annulé par l'interférence observée de la pyriméthamine avec la réponse immunitaire innée (Rogée *et al.*, 2019).

Outre les approches médicamenteuses, les mécanismes d'interférence ARN (ARNi) ont également été évalués. Les mécanismes d'ARNi inhibent la réplication du virus par la liaison de siARN complémentaires à l'ARN viral, ce qui les inactive. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées sur divers siRNA, généralement dirigés contre les ARN N, G ou L, et administrés à l'aide de liposomes ou d'un vecteur adénovirus (Brandão *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2019). Malheureusement, malgré leur succès dans la suppression de la réplication virale *in vitro*, ces approches n'ont pas été aussi efficaces que la PPE traditionnelle *in vivo* (Sonwane *et al.*, 2012; Ono *et al.*, 2013).

La problématique majeure de ces thérapies est d'augmenter la capacité de ces molécules effectrices à traverser la barrière hémato-encéphalique, afin de rendre ces molécules plus efficaces une fois que le virus pénètre dans le cerveau (Smith *et al.*, 2019). Cela ouvre la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques.

b. Modulation de la réponse de l'hôte

La modulation de la réponse de l'hôte peut être une cible intéressante pour contrer l'infection par le virus de la rage, qu'ils s'agissent de la PPE, de l'utilisation de cytokines induisant une réponse immunitaire ou bien de cibler des récepteurs cellulaires.

1. Prophylaxie post-exposition

La période d'incubation relativement longue du virus rabique permet la mise en place d'une PPE. Celle-ci est basée sur les recommandations de l'OMS et s'applique en fonction du type d'exposition. Il existe trois catégories d'exposition à des animaux suspectés d'être enrégés. L'exposition de catégorie I consiste uniquement à toucher ou à nourrir des animaux qui lèchent une peau intacte. L'exposition de catégorie II est définie comme le mordillage de la peau nue, des égratignures ou griffures superficielles sans saignement. L'exposition de catégorie III implique des morsures ou des griffures uniques ou multiples ayant traversées le derme, la contamination des muqueuses ou des lésions cutanées par la salive des animaux, et l'exposition due à un contact direct avec des chauves-souris (OMS, 2023e). Dans le cas d'une absence préalable d'immunisation, les personnes ayant subi une exposition de catégorie II ou III doivent recevoir une dose de vaccin antirabique dès que possible (OMS, 2023e).

Pour les plaies classées dans la catégorie III ainsi que pour celles de catégories II liées à un contact avec une chauve-souris, l'administration d'IGR est indiquée dans le traitement.

L'IGR doit être administrée autour de la plaie et également injectée dans un site intramusculaire éloigné de celui de l'inoculation du vaccin. Il faut un certain temps pour que les vaccins déclenchent une immunité active ; par conséquent, l'immunisation passive avec des IGR peut neutraliser le virus de la rage, pendant que la réponse immunitaire se développe (Both *et al.*, 2012; Kessels *et al.*, 2019). Récemment, en cas de pénurie d'IGR, ces derniers peuvent être remplacés par les AcM, qui seront abordés ultérieurement.

2. La réponse inflammatoire

Les réponses immunitaires de l'hôte sont dirigées contre le virus de la rage et le matériel cellulaire dégénéré. Ces processus inflammatoires peuvent être bénéfiques au début de l'infection grâce à l'élimination du virus, mais dommageables aux stades ultérieurs s'ils sont largement activés dans le SNC (Hooper, 2005). Des études expérimentales chez la souris confirment l'intérêt thérapeutique des immunomodulateurs dans le cas d'infection par le virus de la rage. Un traitement par corticoïdes chez la souris initié tardivement (72-96h après l'infection) a permis d'obtenir un taux de mortalité inférieur de 14% dans les groupes traités par rapport aux groupes témoins, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative, peut-être en raison de la petite taille de l'échantillon (Enright *et al.*, 1970). Plus récemment, des inhibiteurs de processus pro-inflammatoires ont été administrés chez la souris 5 jours après son infection par le virus de la rage (Smreczak *et al.*, 2019). L'apparition des signes cliniques et la mort ont été retardés chez les souris traitées par l'infliximab, un inhibiteur de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α , ou par le tosylate de sorafenib, un inhibiteur multi-kinase. Le traitement par tocilizumab, un inhibiteur du récepteur de l'IL-6, a également retardé le décès, mais ce résultat n'était pas statistiquement significatif (Smreczak *et al.*, 2019; Knobel *et al.*, 2022). En revanche, une autre équipe a montré que le traitement avec un dérivé de la tétracycline aux propriétés anti-inflammatoires, la minocycline, n'était pas du tout bénéfique pour les souris adultes infectées (Jackson *et al.*, 2007). De plus, une étude récente a démontré que la réponse inflammatoire dans le cerveau de la souris après une infection par le virus de la rage différait considérablement de celle du cerveau humain, avec une réponse inflammatoire plus prononcée chez la souris (Feige *et al.*, 2021), ce qui suggère que l'effet de la thérapie immunomodulatrice chez la souris peut ne pas être transposable à l'homme (Knobel *et al.*, 2022).

3. Les récepteurs cellulaires

Comme vu précédemment, les récepteurs cellulaires peuvent jouer un rôle lors de l'infection virale. Pour le virus de la rage, le premier récepteur identifié comme cible de sa glycoprotéine a été le sous-type musculaire des nAChRs présents sur les sites post-synaptiques de la jonction neuromusculaire (Lentz *et al.*, 1983). En plus de fournir une explication mécanistique possible des changements comportementaux associés à la rage, l'interaction fonctionnelle du virus de la rage avec le nAChR est utilisée pour le développement d'approches thérapeutiques pour traiter le cancer et la rage (Lian, Hueffer and Weltzin, 2022). Afin de développer de meilleures stratégies thérapeutiques, il est essentiel de comprendre le processus par lequel le virus de la rage est capable d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et d'accéder au SNC. Une glycoprotéine du virus de la rage trimérique recombinante est capable de se lier aux nAChR- $\alpha 7$ exprimés sur les macrophages dérivés de monocytes (Embregts *et al.*, 2021). Cette interaction induit l'activation de la voie anti-inflammatoire cholinergique, y compris la suppression de la fonction des macrophages en tant qu'activateurs des lymphocytes T, et peut affecter la polarisation des macrophages. Ces résultats suggèrent que le virus de la rage pourrait échapper au système immunitaire en induisant un état anti-inflammatoire dans les macrophages humains par le biais d'interactions avec le nAChR- $\alpha 7$ (Embregts *et al.*, 2021; Lian, Hueffer and Weltzin, 2022). Enfin, les interactions entre les peptides dérivés du nAChR- $\alpha 1$ et la glycoprotéine du virus de la rage ont été étudiées dans le but de concevoir des agents antirabiques potentiels. Des séquences de peptides nAChR- $\alpha 1$ provenant de différentes espèces hôtes (bovin, humain, poisson électrique/torpille) ont été testées, et les peptides bovins et de la torpille se sont liés à la glycoprotéine et l'ont inhibé (Sajjanar *et al.*, 2017). Il est encourageant de constater que les peptides nAChR- $\alpha 1$ et leurs analogues peuvent servir de pistes potentielles pour le développement d'agents antiviraux contre l'infection par le virus de la rage (Lian, Hueffer and Weltzin, 2022).

Objectifs

Objectifs

Les pistes thérapeutiques étudiées au cours de ma thèse ont porté soit sur (i) l'utilisation de modulateurs des récepteurs cellulaires, tels que les nAChR- $\alpha 7$ et les récepteurs purinergiques de type P2X, dans le cas du SARS-CoV-2, un virus émergent ; soit sur (ii) l'utilisation de petits composés chimiques de la famille des Phthalazinone qui inhibent la réplication du RABV, un virus négligé.

L'étude de la modulation du cycle viral par de petites molécules chimiques ciblant le complexe de réplication du RABV a constitué la première partie de mon travail de thèse. Afin de décrire les interactions impliquées entre les protéines du RABV et ces composés, et à terme, d'optimiser les conditions de délivrance de ces derniers, **le premier objectif de ma thèse a été d'identifier (1) les protéines virales et leur(s) domaine(s) ciblé(s) par les composés et (2) les résidus chimiques et les résidus protéiques clefs impliqués dans les interactions.** La production de mutants viraux échappant à l'action des molécules *in vitro*, a permis d'identifier différentes mutations dans le gène de la protéine L et de la protéine P. Le rôle biologique de ces résidus a été validé à l'aide de virus recombinants obtenus par génétique inverse, mutés sur chacune de ces positions. L'identification des domaines et des résidus du composé impliqués dans les interactions avec les protéines virales a été réalisée par RMN en condition *ex vivo*. Les données atomiques ainsi obtenues, combinées à des approches *in silico* de modélisation par homologie et de « machine-learning », nous ont permis d'obtenir des modèles structuraux d'interaction.

Un travail réalisé précédemment au laboratoire (De Melo et al., 2021) a décrit l'IVM comme une molécule permettant de diminuer la gravité des signes cliniques, de réduire la perte d'odorat et de limiter l'inflammation des voies respiratoires supérieures et inférieures chez des hamsters infectés par le SARS-CoV-2. L'IVM étant un modulateur allostérique positif connu des récepteurs cholinergiques, $\alpha 7$ nAChR, et purinergiques, P2X4 et P2X7, **le second objectif de mon travail de thèse vise à déterminer quelle est l'implication de chacun de ces récepteurs dans la modulation de la réponse de l'hôte observée lors du traitement par l'IVM.** Cette analyse a été réalisée au travers d'expérimentations *in vivo* sur un modèle de hamster infectés par le SARS-CoV-2 en présence de différents modulateurs orthostériques et/ou allostériques des nAChR- $\alpha 7$ (agonistes et/ou antagonistes). Divers modèles *in vitro* impliquant d'une part des cellules Vero-E6, et d'autre part un modèle plus

physiologique de co-cultures de cellules épithéliales humaines (A549-ACE2-TMPRSS2) et de macrophages (THP-1 différenciées) ont également été utilisés. Des analyses de microscopie confocale à haut débit et des analyses de transcriptomique, nous ont permis d'évaluer l'implication de chacun de ces récepteurs dans la modulation de la réponse de l'hôte par l'IVM au cours de l'infection par le SARS-CoV-2.

Les résultats issus de ces deux axes majeurs de mon travail de thèse sont présentés sous la forme d'un article soumis intitulé « *Mechanism of action of phthalazinone derivatives against rabies virus* » et d'un projet d'article : « *Host response against SARS-COV-2 infection is impacted by allosteric modulator of cholinergic and purinergic receptors* ».

En plus de ces deux objectifs principaux, j'ai contribué à un article du laboratoire intitulé « *Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants* », qui sera présenté dans la partie résultat. Dans cet article, j'ai participé à l'étude du profil clinique et transcriptomique de hamsters infectés par trois variants préoccupants : Gamma, Delta et Omicron/BA.1, et un virus recombinant délété de l'ORF7.

Résultats

Partie I

Partie I

Identification de composés chimiques capables d'inhiber la réplication du virus de la rage

La rage est une zoonose qui cause, malgré la présence d'une prophylaxie post-exposition efficace, plus de 59 000 décès chaque année (Hampson *et al.*, 2015), en effet, aucun traitement n'est disponible après l'apparition des premiers symptômes. La difficulté majeure pour ces thérapies est le passage de la barrière hémato-encéphalique, afin de les rendre efficaces une fois que le virus pénètre dans le cerveau (Smith *et al.*, 2019).

Ainsi, la première partie de mon travail de thèse concerne le développement d'une piste thérapeutique utilisant de petits composés chimiques ayant la capacité de moduler le cycle viral du RABV.

Ce travail, commencé avant mon arrivée au laboratoire, a débuté par un criblage de 30000 composés de la Chembridge Diverset Library qui a permis d'identifier une famille de dérivés de la phtalazinone comme de puissants inhibiteurs de l'infection par le RABV et plus largement des infections à *Lyssavirus* ou *Mononegavirales*. Ils franchissent la barrière hémato-encéphalique mais il a été nécessaire d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques avant d'envisager de pouvoir les utiliser dans des modèles animaux et d'obtenir une preuve de concept plus établie. Plus de 276 analogues de la molécule princeps ont ainsi été synthétisés et testés pour leur capacité à inhiber la croissance virale et deux composés dérivés du même hit (CIMI 14116 et CIMI 14669) ont été identifiés comme étant les antiviraux les plus efficaces et ayant la plus faible cytotoxicité.

En combinant des expériences *in vitro* et des études de modélisation, nous avons démontré pour la première fois que des dérivés de phtalazinone induisent une forte inhibition de l'infection par les *lyssavirus* en agissant directement sur le complexe de réplication du virus. Leur utilisation dans le cadre d'expérimentations *in vivo* est très prometteuse car ils retardent l'apparition des signes cliniques.

Pour ma part, j'ai participé à l'identification des protéines virales ciblées par ces composés. La production de mutants échappant à ces molécules a permis d'identifier le complexe de réplication virale comme cible de ces dérivés, et plus précisément les protéines L et P du complexe. Le rôle biologique de ces résidus a été validé à l'aide de virus recombinants obtenus par génétique inverse, mutés sur chacune des positions identifiées. Les régions ciblées

par ces composés se trouvant proches de motifs catalytiques conservés au sein des *Lyssavirus*, cela pourrait expliquer leur large spectre d'inhibition parmi ce genre. Les résidus chimiques et protéiques clefs impliqués dans ces interactions ont été étudiés par des techniques de RMN en condition *ex vivo* et des approches *in silico* de modélisations menées en collaboration avec des équipes de l'Institut Pasteur.

Cette étude a permis la soumission de l'article « *Mechanism of action of phthalazinone derivatives against rabies virus* » dont le contenu est présenté ci-après.

1 **Mechanism of action of phthalazinone derivatives against rabies virus**

2 Victoire Perraud¹, Bart Vanderhoydonck², Guillaume Bouvier³, Guilherme Dias de Melo¹,
3 Amuri Kilonda², Mohamed Koukni², Dirk Jochmans⁴, Sophie Rogée¹, Youcef Ben Khalifa¹,
4 Lauriane Kergoat¹, Julien Lannoy¹, Tina Van Buyten⁴, Nadia Izadi-Pruneyre⁵, Arnaud
5 Marchand², Patrick Chaltin², Johan Neyts⁴, Florence Larrous^{1*} and Hervé Bourhy^{1**}.

6 ¹ *Institut Pasteur, Université Paris Cité, Unité Lyssavirus, Epidémiologie et Neuropathologie,*
7 *WHO Collaborating centre for Reference and Research on Rabies, F-75015 Paris, France*

8 ² *Center for Innovation and Stimulation of Drug Discovery (Cistim) Leuven, Belgium*

9 ³ *Institut Pasteur, Université Paris Cité, Structural Bioinformatics Unit, F-75015 Paris, France*

10 ⁴ *Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium*

11 ⁵ *Institut Pasteur, Université Paris Cité, Bacterial transmembrane systems Unit, F-75015 Paris,*
12 *France*

13

14

15

16 * : corresponding author.

17 ** : corresponding author.

18

19 *E-mail addresses: florence.larrous@pasteur.fr (F. Larrous) ; herve.bourhy@pasteur.fr (H. Bourhy)*

20

21 **Abstract**

22
23 Rabies, a viral zoonosis, is responsible for almost 59,000 deaths each year, despite the
24 existence of an effective post-exposure prophylaxis. Indeed, rabies causes acute
25 encephalomyelitis, with a case-fatality rate of 100 % after the onset of neurological clinical
26 signs. Therefore, the development of therapies to inhibit the rabies virus (RABV) is crucial.
27 Here, we identified, from a 30,000 compound library screening, phthalazinone derivative
28 compounds as potent inhibitors of RABV infection and more broadly of *Lyssavirus* and even
29 *Mononegavirales* infections. Combining *in vitro* experiments, structural modelling, *in silico*
30 docking and *in vivo* assays, we demonstrated for the first time that phthalazinone derivatives
31 display a strong inhibition of lyssaviruses infection by acting directly on the replication
32 complex of the virus, and with noticeable effects in delaying the onset of the clinical signs in
33 our mouse model.

34
35 **Keywords**

36
37 Antiviral therapy – Rabies – Replication complex – Phthalazinone – *In silico* drug-target
38 modelling

39
40
41 **Highlights**

- 42
- A library of 30,000 compounds from the Chembridge Diverset Library was screened to
43 inhibit rabies infection.
 - Phthalazinone derivatives strongly inhibit *Lyssavirus* infection by targeting the viral
44 polymerase L and phosphoprotein P.
 - By using *in silico* modelling and docking, three putative compounds binding sites were
45 identified.
 - The compounds delayed the onset of clinical symptoms in infected mice.
- 46
47
48
49

50 1. Introduction

51

52 Rabies is a viral zoonosis, transmitted mainly by the saliva of infected dogs, that causes
53 acute encephalomyelitis, with a case-fatality rate of almost 100% after the onset of
54 neurological symptoms. Rabies can be effectively prevented by post-exposure prophylaxis
55 (PEP), consisting of vaccines and rabies immune globulin (RIG), but once the first clinical signs
56 appear, there is no effective treatment (Roy, Phares et al. 2007, Castillo-Neyra, Bottenheim et
57 al. 2020, Deborah Nadal 2023). Due to the limited access to PEP of some target populations,
58 mostly in Asia and in Africa, and due to economical and national health organizational
59 problems, the burden of rabies is estimated to still be higher than 59,000 deaths per year
60 (Hampson, Coudeville et al. 2015). Further, there is presently no effective treatment that can
61 be administered to patients after the onset of symptoms (Warrell, Warrell et al. 2017).
62 Therefore, potent inhibitors of rabies virus replication are needed to late PEP and could help
63 to save the life of infected patients.

64 Over the last few decades, several trials have been carried out to identify new
65 therapies. Only a few of them have demonstrated an improvement in clinical signs in animals.
66 We have previously shown that a combination of monoclonal antibodies (RVC20 and RVC58)
67 effectively cured already symptomatic (late infection) mice when administered concomitantly
68 both directly into the central nervous system, by intracerebroventricular injection, and
69 peripherally, at the site of the infection (de Melo, Sonthonnax et al. 2020). In humans, no trials
70 have shown significant efficacy, although in 2004, the successful treatment of the girl Jeanna
71 Giese using the Milwaukee protocol (Willoughby and Hammarin 2005, Willoughby, Fukami
72 et al. 2007) has generated considerable optimism. As a result, efforts have been made in
73 several countries to treat rabies patients. However, these efforts were generally unsuccessful,
74 and this protocol subsequently became highly controversial (Hemachudha,
75 Sunsaneewitayakul et al. 2006, Aramburo, Willoughby et al. 2011, Jackson 2013).

76 Despite numerous studies evaluating the antiviral activities against rabies virus (RABV)
77 infection of a large range of molecules (Dacheux, Delmas et al. 2011, Jochmans and Neyts
78 2019), no drug has been shown to be effective *in vivo*, particularly when clinical signs are
79 already present.

80 The main target of the different compounds used to inhibit RABV replication is the viral
81 replication complex. The replication complex of RABV, and more broadly that of viruses of the

82 *Mononegavirales* order which includes RABV, consists of two protein complexes ensuring the
83 transcription activity with the viral polymerase (L) and the phosphoprotein (P), and the
84 replication activities, composed of the L, P, and nucleoprotein (N). The L protein (255 kDa) is
85 able to transcribe RNA into a capped and methylated messenger, and to polyadenylate it
86 (Ogino and Green 2019). The structure of RABV L-P complex has been resolved very recently
87 (Horwitz, Jenni et al. 2020), so all reported L-structures were calculated based on the structure
88 of the L protein of the Vesiculovirus newjersey (former known as VSV), belonging to the same
89 family as RABV and available for several years. This protein comprises five domains: an RdRp
90 domain; with an enzymatic activity synthesizing the cap of viral mRNAs in 5' and a
91 polyribonucleotidyltransferase (CAP) activity; a connector domain (CD); a methyltransferase
92 domain (MT); and a C-terminal domain (CTD). Several motifs are also present within these
93 domains, such as the GDN motif comprising the catalytic site of the polymerase domain
94 (RdRp); the GxxT and HR motifs present in the CAP domain and involved in cap addition; and
95 the GxGxG and K-D-K-E motifs involved in cap methylation (Horwitz, Jenni et al. 2020).

96 In this study, the screening of 30,000 compounds from the Chembridge Diverset
97 Library allowed us to identify a family of compounds derived from phthalazinone as potent
98 inhibitors of RABV infection and more broadly of *Lyssavirus* and even *Mononegavirales*
99 infections. Combining *in vitro* experiments and *in silico* docking, we demonstrated for the first
100 time that phthalazinone derivatives display a strong inhibition of lyssaviruses infection by
101 acting directly on the replication complex of the virus. Their use in the context of *in vivo*
102 experiment is very promising as they delayed the onset of the clinical signs despite their short
103 half-life in the brain. These results could pave the way for new therapeutic approaches against
104 rabies.

105

106 **2. Material and method**

107 *2. 1. Cells and viruses:*

108 The BSR T7/5 cells (Buchholz, Finke et al. 1999) and the BHK-T7 cells were grown in Glasgow
109 medium supplemented with 10 % calf serum, tryptose phosphate and non-essential amino
110 acids and antibiotic. These cells were used for infection experiments and minireplicon assays
111 respectively.

112 Cells were maintained in a humidified incubator with 5 % CO₂. All cell lines were passed twice
113 a week.

114 The screening was performed on a rabies field dog isolate from Thailand 8743THA (EVAg
115 collection, Ref-SKU: **014V-02106**), further named as Tha virus, and confirmed on another
116 RABV strain, 9001FRA, a *Lyssavirus Hamburg* (EBLV-1), 8918FRA and a Lagos bat virus (LBV)
117 8619NGA.

118 A recombinant virus of Measle, rMV2/Luc, derived from MV vaccine (Schwarz strain)
119 (expressing a luciferase reporter gene), kindly provided by Pr. F. Tangy (Institut Pasteur, Paris)
120 was also used.

121

122 Tha-GFP recombinant virus and the mutated viruses Tha-eGFP in which the residue in position
123 222 of the P protein was mutated from I to M (P_{I222M}), Tha-eGFP-Lp_{1485T}, Tha-eGFP-LE_{1893D},
124 Tha-eGFP-Lv_{1897F}, Tha-eGFP-P_{I222M}-Lp_{1485T}, Tha-eGFP-P_{I222M}-LE_{1893D} and Tha-eGFP-
125 P_{I222M}-Lv_{1897F} were produced by reverse genetic as already described (Ben Khalifa, Luco et
126 al. 2016). Lv_{1897F}, P_{I222M}-Lp_{1485T}, P_{I222M}-LE_{1893D} and P_{I222M}-Lv_{1897F} were introduced into
127 the P and the L sequence on the plasmid encoding the complete genome of the Tha-eGFP
128 using the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific) according to the
129 manufacturer's instructions. All mutagenesis primers are listed in Supplementary Table 1.

130

131 2. 2. Screening of chemical compounds library on RABV

132 A library of 30,000 compounds was purchased from Chembridge Diverset Library. The
133 screening was performed as previously described (Rogee, Larrous et al. 2019). Briefly, 100 µL
134 of compounds diluted in DMSO (200 µg/mL to 1,5625 µg/mL) were added to each well of 96-
135 well plates.

136 Then, 50 µL/well of BSR cells at 1.10^6 cells/mL and 50 µL of Tha virus (200 fluorescent forming
137 units, FFU; MOI: 0.0002) were added. As a solvent control, a subset of wells was given 0.5 %
138 DMSO instead of compound dilution. Untreated cells infected by Tha virus were used as a
139 positive infection control. At day two post-infection (dpi), cells were fixed and the amount of
140 viral nucleoprotein (a major component of viral nucleocapsid present in the cytoplasm) in
141 treated wells relative to wells with only DMSO was measured by ELISA, using a mix of two
142 monoclonal antibodies targeting the rabies virus nucleoprotein and conjugated to HRP. The
143 absorbance was measured at 450 nm and 600 nm. For each compound, the amount of

144 nucleoprotein was calculated as the ratio of absorbance value (OD 600 nm – OD 450 nm) to
145 the mean of absorbance values obtained from untreated-infected-wells (relative infection
146 100 %). The concentration giving 50 % of viral growth inhibition (IC₅₀) was calculated by
147 nonlinear regression analysis (GraphPad Prism).

148

149 *2.3 Inhibition assay of Measle infection*

150 Some of the compounds were tested on Measle. Fifty microliters per well of HEK293T cells at
151 $5 \cdot 10^5$ cells/mL and 50 μ L/well of rMV2/Luc virus (MOI of 0.1) were added in the plate and
152 incubated for 48 hours. Cells were lysed with Passive Lysis Buffer (Cat.# E1941, Promega) and
153 the luciferase activity was controlled with the “Luciferase assay reagent” (Cat.# E1483;
154 Promega) according to manufacturer’s instruction on undiluted lysate.

155

156 *2. 4. Cytotoxicity analysis.*

157 The cytotoxicity was determined using ATPlite assay (Perkin Elmer) as described previously
158 (Rogee, Larrous et al. 2019). Briefly, $5 \cdot 10^4$ BSR cells were incubated with different
159 concentration of drug in 200 μ L of medium for 48 h then washed and lysed with the lysis
160 buffer.

161 The concentration giving the 50 % cytotoxic concentration (CC50) was calculated by nonlinear
162 regression analysis (GraphPad Prism).

163

164 *2. 5. RNA isolation, reverse transcription and quantitative real- time PCR*

165 RNA was isolated using Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel). Reverse transcription was
166 performed on 4 μ g of RNA using Superscript II (Invitrogen) with 2 pmol of oligo(dT) primers
167 (Fermentas) in a final volume of 30 μ L. Transcription analysis was performed on 100 ng of total
168 RNA using Taqman Power SYBR Green (Applied Biosystems) on a 7500 Fast Real-Time PCR
169 System (Applied Biosystems) and specific primers (Table S1), following manufacturer
170 instruction. Relative quantification was performed using GAPDH gene as endogenous control.
171 Results were analysed using 7500 SDS software version 2 (Applied Biosystems).

172

173

174

175 *2. 6. Plasmids and site-directed mutagenesis*

176 Mutations P_{I222M}, L_{F177L} L_{P1485T}, L_{E1893D} and L_{V1897F} were introduced into the P and the L
177 sequence on the plasmid encoding the complete genome of the Tha-GFP (Ghanem, Kern et al.
178 2012, Ben Khalifa, Luco et al. 2016), using the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo
179 Scientific) according to the manufacturer's instructions.

180 Mutations were also introduced in P-pTIT and L-pTIT vectors using the same technology.

181 All mutagenesis primers are listed in Supplementary Table S1.

182

183 *2. 7. Tha minireplicon assay*

184 Minireplicon assay was carried out as already described in (Rogee, Larrous et al. 2019). Briefly,
185 BHK-T7 cells were transfected in 6-well plates with either 1 µg of pSDI-THA-CAT (-), 10 ng
186 pCMV-RL 1 µg of N-pTIT, 0.5 µg of P-pTIT and 0.5 µg of L-pTIT using 6 µL of lipofectamine 2000
187 (Invitrogen). In the negative control, one of the pTIT vector was omitted. Forty-eight hours
188 post-transfection cells were harvested in passive lysis buffer (Roche) and lysates were
189 subjected to reporter CAT assays using the kit « Elisa CAT assay » (Roche) according to
190 manufacturer's instruction. Each lysate was tested undiluted and on three serial one to ten
191 dilutions. The renilla activity was controlled with the kit « Renilla-Glo » (Promega) according
192 to manufacturer's instruction on undiluted lysate.

193 To investigate the inhibitor potency of the different compounds, cells were treated with 50
194 µg/mL or 10 µM of each at 24 h post-transfection. The CAT expression was quantified by ELISA
195 CAT assay 48 h post-transfection as described before.

196

197 *2. 8. Measle minireplicon assay*

198 Measle minireplicon system (Shu, Habchi et al. 2012) was kindly provided by Pr. Denis Gerlier
199 (Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Team Immunobiology of Viral
200 infections, Univ Lyon, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, Université Claude Bernard Lyon 1).
201 Minireplicon activity was measured by luminescence activity expressed from the
202 nanoluciferase reporter gene.

203

204

205

206 *2. 9. Escape mutants*

207 BSR cells were incubated in DMEM medium at a concentration of 1.5×10^6 cells/mL for 24
208 hours at 37 °C with 5 % CO₂. The following day, they were pre-treated with compounds
209 7671954 (33 μM, 3.5 x IC₅₀), CIM114116 or CIM114669 compounds at different concentrations
210 (from 1.2 to 3.9 μM (3 and 5 x IC₅₀) for CIM114116 and from 0.21 to 0.7 μM for CIM114669
211 (3, 5, 7 and 10 x IC₅₀) for 2 h at 37 °C with 5 % CO₂. They were then infected at an MOI of 0.1
212 with Tha-eGFP virus for 1h. Next, the supernatants were removed from the flasks and medium
213 containing the inhibitor molecules at the respective concentrations was added. The cells were
214 then incubated for 72 h at 37 °C with 5 % CO₂. Finally, the supernatant was collected, aliquoted
215 and titrated. Successive passages were then performed by infecting the BSR cells at a MOI of
216 0.1 with the viruses harvested during the previous passages, always in the presence of
217 compounds 7671954, CIM114116 or CIM114669.

218

219 *2. 10. High-throughput sequencing of escape mutants*

220 Total RNA from cells infected with virus selected during five passages using chemical
221 compounds were extracted using Trizol (Ambion) according to the manufacturer's
222 instructions. 5 μl of RNA were then reverse transcribed using Superscript III reverse
223 transcriptase with random hexamers (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.
224 The complete viral genome (excluding the 3' and 5' extremities, corresponding to the leader
225 and the trailer regions, respectively) was amplified with 6 overlapping PCR fragments (Delmas,
226 Holmes et al. 2008) by using the Phusion polymerase (ThermoFisher) as described previously
227 (Troupin, Dacheux et al. 2016)]. Each PCR fragment was independently purified using the
228 NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) and quantified using Picogreen dsDNA
229 quantification kit (Invitrogen). For each sample, all six PCR fragments were pooled with
230 equimolar proportions to obtain 500 ng of dsDNA. For the preparation of libraries and next-
231 generation sequencing, dsDNA was fragmented by ultrasound with Bioruptor (Diagenode),
232 libraries were prepared using NEXTflex PCR-Free DNA-Seq kit (Bioo Scientific), and then
233 sequenced using a 2 x 300 nucleotides paired-end strategy on the Illumina MiSeq platform.
234 All genome sequence analysis was performed using the Galaxy platform (*Galaxy 2022*) as
235 already described (Bonnaud, Troupin et al. 2019), using as reference sequence the 8743THA
236 one (GenBank: **EU293111**).

237 *2. 11. Viral growth kinetics*

238 2×10^6 BSR cells were infected at a MOI of 0.1 under agitation at 37 °C with 5 % CO₂. After 1h
239 incubation, the cells were centrifuged at 800 g for 5 min and the pellet resuspended in
240 complete medium that contained either the molecules 2 μM of CIM114116 or 0.35 μM of
241 CIM114669. The cells were then seeded in a T25 flask and incubated at 37 °C with 5 % CO₂.
242 After 24, 48 and 72 hours of incubation, 0.5 mL of supernatant was aliquoted for titration and
243 0.5 mL of fresh medium, containing or not the compounds, was added to each flask.

244

245 *2. 12. Determination of IC₅₀ using Opera Phenix High-Content Screening System*

246 100 μL of complete DMEM medium was added to the wells of a 96-well plate. The compounds
247 CIM114116 or CIM114669 were diluted 1:2 and 1×10^4 BSR was added to each well. Finally,
248 50 μL of Tha-eGFP virus, derived from escape mutants or recombinant virus, was added at a
249 MOI of 0.1, and the plates were incubated at 37 °C and 5 % CO₂. After 48 h incubation, the
250 plates were fixed with 4 % PFA for 30 min at room temperature, then washed with PBS. Cell
251 nuclei were then labelled with Hoeschst 33342 (1/1000, Thermo Scientific) for 15 min. Data
252 acquisition using the Opera Phenix High-Content Screening System involved counting cells
253 using Hoeschst 33342-labelled nuclei and infected cells using eGFP expression.

254

255 *2. 13. NMR sample preparation*

256 BHKT7 cell extracts overexpressing NPL complex (Nucleoprotein, Phosphoprotein and
257 Polymerase) of rabies virus were prepared as follow: Cells were transfected as described in
258 “Minireplicon assay” and 48 hours post-transfection cells were harvested in PBS and washed
259 twice by centrifugation at 1500 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 50 μL of
260 deuterated phosphate-buffer saline (PBD) just before use. The cell extracts were then diluted
261 four times (50 μL of cell extract in 150 μL of PBD buffer). In the experiments with the drug, 5
262 μL of deuterated DMSO (DMSO-d₆, 99.96% 2H atoms, Euriso-top, France) was added for the
263 solubility.

264 A stock solution of the compound CIM114116 at concentration of 10 mM was prepared by
265 dissolving it in deuterated DMSO. The final concentration of the drug in the NMR samples was

266 at 40 μ M and the amount of DMSO-d₆ at 2.5 % (v/v). At this concentration and in this buffer
267 the compound was completely soluble.

268

269 *2. 14. NMR spectroscopy*

270 All NMR experiments were performed using 3 mm NMR tubes at 25°C, and on a NMR
271 spectrometers operating at a proton frequency of either 600 MHz or 800 MHz (Bruker Biospin)
272 equipped both with a cryogenically cooled triple resonance ¹H[¹³C /¹⁵N] probe. The
273 compound resonances were assigned from spectra recorded on a 600 MHz spectrometer
274 using standard 1D ¹H, and 2D ¹³C-¹H HSQC, ¹³C-¹H HMBC,¹³C-¹H H₂BC, ¹H-¹H TOCSY
275 (mixing time of 60 ms) and ¹H-¹H NOESY (mixing time of 600 ms) experiments. Saturation
276 transfer difference (STD) spectra were acquired at an 800 MHz spectrometer by using the
277 standard pulse sequences with on- and off-resonance frequencies at respectively -2 and -40
278 ppm and with 1760 scans. The off-resonance spectrum was used as reference spectrum. The
279 ¹H chemical shifts were referenced to external DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate).
280 The STD experiments were repeated with at least two independent cell preparations.

281

282 *2. 15. Modelling the LP complex*

283 The L subunit in interaction with P was built using MODELLER 10.4 (Webb and Sali 2016).
284 Multiple structural templates were used to model the complex. The L subunit was mainly built
285 using the structure of rabies SAD-B19 L-P complex from cryo-EM (Horwitz, Jenni et al. 2020)
286 (PDB code 6UEB chain A) sharing 95 % sequence identity with the targeted sequence of P. The
287 chain B from 6UEB was used to place the disordered region of P interacting with L.

288 The structure of the Human Metapneumovirus Polymerase bound to the phosphoprotein
289 tetramer (PDB code 6U5O) (Pan, Qian et al. 2020) was used as a template to define the relative
290 placement of P with respect to L. Due to the low sequence identity with P (22 %), two other
291 experimental structures were used: the structure of the dimerisation domain of the rabies
292 virus (strain China/MRV) phosphoprotein (PDB code 3L32) (Ivanov, Crepin et al. 2010) and the
293 structure of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus (strain CVS-11)
294 (PDB code 1VYI) (Mavrikakis, McCarthy et al. 2004) sharing high sequence identity with the
295 targeted sequence of L (respectively 95 % and 94 % of sequence identity).

296 *2. 16. Molecular docking of potential inhibitors*

297 83 from the 296 phtalazinone derivatives tested were docked on the whole surface of the
298 modelled LP complex using DiffDock (Corso et al., 2022). Those derivatives are representative
299 of inactive, moderate and highly active compounds. DiffDock was used for two reasons: (i) it
300 allows to dock small molecules on the whole protein surface using a state of the art generative
301 deep-learning model (ii) it outperforms other methods, particularly on computationally folded
302 structures. DiffDock makes use of ESM (Lin, Akin et al. 2023) embedding of sequences.
303 However, the official DiffDock package truncates internally (in file 'utils//inference_utils.py')
304 sequences larger than 1022 for ESM embedding. To accommodate the 2377 sequence length
305 of the LP complex, we increased the truncation length accordingly in the source code of
306 DiffDock.

307 Ten poses per compounds were generated by DiffDock. To analyze the binding pockets
308 explored by the 83 compounds, we computed the atomic density of all the poses of the 83
309 compounds, leading to 830 individual poses. The density was saved as an MRC format
310 (Crowther, Henderson et al. 1996) and visualized using PyMOL Molecular Graphics System,
311 Version 2.6, Schrodinger, LLC (Corso G.).

312

313 *2. 17. In vivo experiment*

314 All animal experiments were performed according to the French legislation and in compliance
315 with the European Communities Council Directives (2010/63/UE, French Law 2013–118,
316 February 6, 2013) and according to the regulations of Pasteur Institute Animal Care
317 Committees. The Animal Experimentation Ethics Committee (CETEA 89) of the Institut Pasteur
318 approved this study (160111; APAFIS#I5773-2018062910157376 v5). All animals were
319 handled in strict accordance with good animal practice.

320 Four-week-old BalBc mice were infected by intra-muscular injection (i.m) with 1000 PFF of Tha
321 in 200 μ L of DMEN (2 x 50 μ L /leg). To investigate the potential protective role of CIM114116
322 or CIM114669, mice were separated in two groups of five or six respectively. One group was
323 treated with 100 mg/kg of compound by intraperitoneal injection (i.p) four time per day with
324 CIM114116 and three time per day with CIM114669. The other group was treated with vehicle
325 (0.5 % CMC + 0.1 % of tween 80). The treatment began four days post-inoculation for

326 CIM114116 and 48 hours post-inoculation for CIM114669. Mice were euthanized at day eight
327 after challenge.

328

329 2. 18. Statistics

330 Statistical tests were carried out using Prism software (GraphPad Prism, version 10, San Diego,
331 USA), with $p < 0.05$ considered significant. Non-linear regression analysis, Mann-Whitney tests
332 and unpaired t test with Welch's correction were performed.

333

334 3. Results

335 3. 1. Phtalazinone derivatives are active against rabies infection

336 To identify antiviral compounds against RABV, a high-throughput cell-based screen was
337 developed using a field dog isolate of RABV from Thailand (Tha) (Figure 1A). A primary screen
338 of 30,000 chemical compounds from Chembridge Corporation (Chembridge Diverset Library)
339 identified 86 compounds at a cutoff of 50 % inhibition. The validity of this assay for small-
340 molecule screening was confirmed using the means and standard deviations of positive and
341 negative values. This yielded a Z factor value of 0.51 and demonstrated that the assay was
342 robust and suitable for large scale compound screening (Figure 1B). These 86 compounds
343 were further evaluated in a secondary assay to calculate the half maximum inhibitory
344 concentration (IC_{50}) and toxicity. Six compounds were identified with IC_{50} 's less than 30 μ M
345 and with a low cytotoxicity (Table 1). The six compounds belonged to five distinct chemical
346 classes. The spectrum activity of these compounds was tested using three field isolates
347 belonging to two different species of lyssavirus, *Lyssavirus rabies* with Tha and RABV-1
348 (9001FRA) and *Lyssavirus Hamburg* (EBLV-1: 8918FRA). The different compounds were able
349 to inhibit the replication of the two species of lyssavirus with a variable efficacy. The
350 compound 7671954, a derivative of phtalazinone, was identified as the most effective antiviral
351 agent with IC_{50} 's of 9.46 μ M, 5.71 μ M and 10.31 μ M for Tha, RABV1 and EBLV-1 respectively
352 (Table 1).

353 To investigate the action of these compounds on the replication complex, minireplicon assays
354 were performed in presence of 50 μ g/mL of the six compounds using minigenomes of Tha and
355 Measle virus, a more distantly related virus, belonging also to the *Mononegavirales* order but
356 to the *Morbillivirus* genus within the *Paramyxoviridae* family). All the six selected compounds

357 were found to inhibit the replication complex of Tha (less than 10 % of the control activity)
358 and measles viruses (less than 50 % of the control activity) and at least in a more efficient or
359 similar manner than Ribavirin (Anindita, Sasaki et al. 2018) used as a positive control of the
360 inhibition of replication (Figures 1C).

361

362 *3. 2. L and P proteins are targeted by the Phthalazinone derivatives*

363 As compound 7671954 was identified as the most potent and selective antiviral agent we
364 focused the rest of our work on this molecule. To identify the viral protein and domains
365 targeted by the confirmed compounds, selection of drug-resistant variants was performed in
366 cell culture using 33 μ M (3.5 fold the IC₅₀) of compound 7671954 which was shown to be the
367 most effective in the context of RABV infection (Table 1). In these conditions, the titer
368 significantly increased after five passage (P5) *in vitro* (Figure 1D) in favor of the development
369 of escape(s) mutant(s). To confirm and characterize potential mutations generated during the
370 selection, viral supernatants collected at P5 and grown or not in the presence of compound
371 7671954, were submitted to high throughput sequencing (Table S2). Sixteen variable positions
372 were observed in terms of mutations present in subpopulations of the genome of escape
373 mutants. Mutations occurring in the genome at equivalent and low frequencies in the treated
374 and non-treated conditions were considered as non-specific of the treatment (Table S2).
375 Further, we did not consider mutations in proteins, such as the glycoprotein, not involved in
376 the viral replication complex. Finally, we focused our attention on one mutation in the
377 phosphoprotein (P) gene: residue in position 222 was mutated from I to M, noted P_{I222M}, and
378 10 mutations in the polymerase (L) gene exhibiting a large increase of their percentage
379 between non-treated and treated conditions (Table S2). To determine if some of these
380 mutations are present on the same RNA strand and to quantify the proportion of mutant
381 clones, the L gene of the viruses collected at P5 was cloned and 83 clones were sequenced by
382 Sanger technic. Only 13.2 % of clones presented no mutation and the two main mutations
383 found in the L gene were V1897F (~24 %) and P1485T (~11 %) (Table S3). These frequencies
384 were in concordance with the one obtained in NGS analysis. The mutation E1893D (2.4 %) was
385 in most of the case combined with other mutations in the L (1.2 % with P1485T, 2.4 % with
386 V1897F and 13.3 % with F177L) and was found alone only in 2.4 % of the clones. The frequency
387 of the mutation F177L alone was of 7.2 %. Interestingly, when we aligned the amino acid

388 sequence of the L protein of the different species of Lyssavirus, the amino acid at position 177
389 can be F or L (Figure S1). Combinations of multiple mutations were also observed in 10,8 % of
390 the clones (Q717R, F1037L and E1251D, Table S3).

391 The effect of the mutations P1485T, V1897F, E1893D and F177L-E1893D was then investigated
392 alone or in combination with the mutation in the P, P1222M on a minireplicon assay in presence
393 or not of the compound 7671954. The replication complex activity observed for the different
394 mutations tested in the absence of compounds was significantly increased, except for the
395 combination of the mutation P1222M with the mutation P1485T and F177L-E1893D (Figure
396 1E). In the presence of compound 7671954, mutations P1485T, V1897F or F177L-E1893D
397 induced a significant increase of CAT activity compared to the control with wild type proteins
398 (WT, Figure 1F). Finally, the mutation observed in the P protein was tested in combination
399 with the native or mutated L protein. None of the combinations did show any significant
400 changes of minireplicon activity in comparison with each mutation taken alone (Figure 1E).
401 However, each tested mutation maintained the replication complex activity in the presence
402 of compound 7671954 (Figure 1F). Therefore, L and P proteins seem to be the target of
403 Phtalazinone drugs.

404

405 *3. 3. Hit-to-lead optimization*

406 To characterize a potential early structure-activity relationship (SAR) of phtalazinone against
407 RABV and to be able to find more active compounds, a pharmacophoric core was defined
408 according to the results obtained with the previously tested compounds. Then based on this
409 core, a hit explosion consisting in the acquisition of commercial compounds, and in some
410 chemical modifications, when possible, was performed. Finally, the series entered hit-to-lead
411 optimization to reach more than 293 analogues tested on Tha as for the initial screening. Two
412 of these molecules, derived from the same hit (CIM114116 and CIM114669) (Figure 2A) which
413 were identified as the most effective antiviral agents against rabies virus ($IC_{50}=0.39 \mu M$ and
414 $0.07 \mu M$ for CIM114116 and CIM114669 respectively, which correspond to a decrease of the
415 IC_{50} of 24 and 135 fold, respectively when compared to the initial hit 7671954) (Table 2). The
416 toxicity of the compounds was evaluated, and the selectivity calculated (Table 2). As we
417 determined that the compound 7671954 was also active against Measles virus replication
418 complex, we tested some of these other analogues on Measles virus infection. Compounds

419 CIM114116 and CIM114669 were also identified as the most effective antiviral agents against
420 Measles virus with IC_{50} of 0.43 μ M and 0.06 μ M for CIM114116 and CIM114669 respectively
421 (Table 2).

422 To understand the mode of action of these compounds, we then investigated if these
423 molecules were active on the viral replication complex of RABV and Measles virus using native
424 and mutated viral proteins in minireplicon assays (Figure 2B). As expected, CIM114116
425 inhibited around 75 % of RABV and Measles virus replication activity, and CIM114669 showed
426 90% of inhibition of the same minireplicons (Figure 2B). RABV replication activity was then
427 measured in context of the mutations described previously in the P and L proteins of RABV
428 escape mutants. The mutation V1897F in the L protein is the only one which nearly fully
429 restore the replication complex activity in presence of CIM114116 and CIM114669 (Figure 2C
430 et 2D). More interestingly, the mutation I222M in the P protein, expressed together with any
431 of other mutations located in the L protein provides an additional effect and nearly fully
432 compensates the effect of CIM114116 and CIM114669 (Figure 2C et 2D). The other mutations
433 P1485T and E1893D alone or in combination with F177L restored the activity of the replication
434 complex although in a slightly lower extent than V1897F. The mutation F177L in combination
435 with E1893D had no effect in the presence of CIM114669.

436

437 *3. 4. Biological role of the mutations in the context of viral infection*

438 In order to understand the role of the mutations identified using the minireplicon assay in the
439 more physiological context of viral infection, we produced Tha-eGFP recombinant virus
440 (Besson, Sonthonnax et al. 2017) harboring single mutation in the L protein (LP1485T, LE1893D
441 or LV1897F) or in the P protein (PI222M mutant and double mutants: PI222M_LP1485T,
442 PI222M_LE1893D and PI222M_LV1897). These mutations explored all the positions already
443 obtained in minireplicon activity except LF177L, Indeed, this mutation exists among the
444 lyssaviruses and did not bring any positive advantage in combination with PI222M_LE1893D.
445 The viral growth of those recombinant mutated viruses was performed with or without hit
446 compounds, CIM114116 and CIM114669, at the concentration of 2 and 0.35 μ M ($5 \times IC_{50}$),
447 respectively (Figure S3). Recombinant viruses with single mutation in the L or the P protein
448 have the same growth than Tha-eGFP. Conversely, viruses mutated either on PI222M and

449 LP1485T or on P1222M and LE1893D exhibited a more limited growth than Tha-eGFP at 24 and
450 48 h post infection (pi) but not at 72 hpi. We then tested Tha-eGFP and the related mutated
451 viruses in the presence of CIM114116 and CIM114669. The mutation LP1485T did not provide
452 any rescue of the growth alone nor in combination with P1222M. However, viral growth of the
453 viruses mutated on LV1897F and P1222M_LV1897F was higher than that of Tha-eGFP, in
454 particular at 48 hpi with the two compounds (p-value = 0.057), suggesting a gain of function
455 provided by the LV1897F mutation alone (Figure S3).

456 Finally, we determined the IC₅₀ of the compounds CIM114116 and CIM114669 at 48 hpi for
457 each mutated recombinant virus using the Opera Phenix High-Content Screening System. We
458 confirmed on Tha-eGFP the IC₅₀ previously obtained in the screening, respectively, 0.39 and
459 0.07 μM. The mutation on the P protein (P1222M) had no effect on the IC₅₀ of both compounds.
460 Conversely, a slight increase of IC₅₀ was observed between the recombinant viruses mutated
461 in the L compared to the control Tha-eGFP, the higher IC₅₀ being obtained with the mutation
462 LE1893D whatever the compound considered (Table S4, Figure S4).

463
464 In an attempt to confirm residues and further delineate regions on the viral proteins involved
465 in interactions with this phtalazinone family of compounds, a new viral escape assay was
466 undertaken by exposing Tha-eGFP virus to the two main active compounds identified
467 CIM114669 and CIM114116. CIM114669 was used at different concentrations: 3 x IC₅₀, 5 x IC₅₀,
468 7 x IC₅₀ and 10 x IC₅₀. The 7 x IC₅₀ and 10 x IC₅₀ concentrations could not be used for
469 CIM114116, due to a strong viral growth inhibition. The escape was less clear than with those
470 obtained previously with 7671954, (Figure S5) : for CIM114116 and CIM114669, at passage
471 four, the viral titers of treated cells reached the level of the non-treated but the increase at
472 P5 is smaller than what was observed in figure 1D. IC₅₀ values were compared by high-
473 throughput confocal microscopy on suspensions of viruses collected on the third (P3) and
474 seventh (P7) passages. When exposed to CIM114116, the IC₅₀ value of viruses collected at P7,
475 does not significantly increase (0.5 μM at P3 vs 0.6 μM at P7). However, this difference was
476 greater in the presence of CIM114669 with an IC₅₀ of 2.4 compared to 0.07 μM (Figure 2E).
477 These data show that the viruses collected from P7 have acquired mutations providing a

478 phenotype more prone to escape the action of the compounds. This was further explored
479 using NGS (Table S5). Mutations occurring in the presence of CIM114116 and CIM114669 were
480 located on positions of the L protein that are different from those observed with 7671954 and
481 at lower frequencies (between 2 and 15 %). However, some of these mutations (K542R,
482 N1915K, F1923L, or G1961E) were common between the escape virus populations obtained
483 with the two different compounds CIM114116 and CIM114669. The analysis of mutations
484 suggest that the replication complex of Tha virus is the main target of the compounds.

485

486 *3. 5. Target engagement of the drug candidates*

487 To validate the target engagement of the drug candidates, we used Nuclear Magnetic
488 Resonance (NMR) and Saturation transfer difference (STD) experiment, widely used in the
489 drug-target interaction studies (Mayer and Meyer 1999). Among the compounds
490 characterized previously, we selected CIM114116 due to its highest solubility (50 μ M
491 compared to 5.56 μ M for CIM114669) making it a promising candidate for further
492 investigation.

493 The NPL complex, identified as potential target of this set of compounds, cannot be easily
494 purified and stabilized. Therefore, we adopted a new approach that we and other groups
495 developed for performing STD experiments in whole cells (Bouvier, Simenel et al. 2019,
496 Theillet 2022). Since the ability of compounds to penetrate cells was not known, we employed
497 an alternative method involving a cell extract (see Material & Methods). The STD spectra are
498 shown in Figure S2A. In the presence of the NPL complex, we observed STD signal
499 corresponding to proton signal of CIM114116 (Figure S2A), indicating that the drug candidate
500 interacts with one of the cellular proteins, potentially the viral replication complex. In the
501 absence of the P protein with the cells overexpressing only NL- the STD signals are very weak
502 or almost undetected (Figure S2A and S2B). The signal of the interaction of the drug with the
503 cellular proteins is enhanced when the P protein is overexpressed. This suggests that the
504 compound interacts with the whole NPL complex, and that the P protein is required for this
505 interaction.

506

507

508

509 3. 6. *Blind docking*

510 To investigate the putative localization of CIM114116 and CIM114669 in the structure of the
511 viral replication complex and its mode of action, we performed *in silico* docking and explored
512 the capacity of the compounds to interact with several parts of the 3D-structure of the LP
513 complex. The model obtained for the LP complex has an RMSD of 0.5 Å compared to the
514 electron microscopy structure of the Rabies virus SAD-B19 L-P complex (pdb code: 6UEB)
515 (Horwitz, Jenni et al. 2020). The docking of the identified active compounds on the whole
516 surface of the LP complex model (blind docking) leads to the identification of three main
517 potential binding sites (depicted A, B and C on Figure 3). Interestingly, the site C is the catalytic
518 site of the polymerase and in that case, the CIM114669 compound is interacting with the
519 Asn731 of the GDN motif (Figure 3).

520 In an attempt to discriminate between the three putative binding sites, the 83 compounds
521 were then docked by confidence score as given by DiffDock. Interestingly, the first ranked
522 compound with the highest confidence is the compound CIM114669 (Figure S7). The
523 corresponding pose is close to the Asn731 of the catalytic site GDN of the L protein (13 Å
524 distance between the pose and the Asn731). The compound CIM114116 has a score close to
525 the average score of all the other compounds.

526 However, none of the mutations characterized in the escape mutants of the L protein (P1485T,
527 E1893D and V1897F in the case of CIM7671954 and K542R, N1915K, F1923L and G1961
528 obtained with CIM114116 and CIM114669) maps with the three putative binding sites (Figure
529 3A and 3B). Indeed, the escape mutations are all localized at the surface of the L protein. This
530 may suggest that these mutations trigger a long-distance effect through an epistatic
531 mechanism.

532

533 3. 7. *In vivo* experimentation

534 Given the efficacy of CIM114116 and CIM114669 to inhibit *Tha* infection *in vitro*, we tested
535 these compounds *in vivo* to investigate their capacity to limit virus infection in the animal
536 model when administered after infection. Following an intramuscular challenge using a high
537 inoculum of rabies virus (1000 Unit Forming Focus), five or six mice per group were treated
538 four times per day or three times per day with 100 mg/kg of CIM114116 (start of treatment
539 at D2 pi) or CIM114669 (start of treatment at D4 pi) respectively, or with vehicle, by
540 intraperitoneal injection until the euthanasia of the mice (Figure 4A). In respect of the

541 humane endpoint, all the surviving mice were euthanized at D8 pi as the treated mice were
542 suffering from the multiple IP injection. At this post-infection time, the majority of mice (60
543 to 68 %) receiving either CIM114116 or CIM114669 did not show any clinical symptom of
544 rabies, and this in stark contrast to the placebo group (0 to 20 %) (Figure 4B). Viral RNA was
545 quantified in the brain of treated and non-treated mice was performed (Figure 4C). The mean
546 level of viral RNA present in the brain of CIM114116 or CIM114669-treated mice was slightly
547 reduced (2.8 and 2-fold respectively) in comparison with the mice receiving the placebo
548 (Figure 4C). In the treated mice analyzed, there is strong link between the lower number of
549 viral RNA and the mild symptoms observed (two in the CIM114116-treated mice and three
550 in the CIM114669-treated mice). Considering the short half-life of CIM114116 and
551 CIM114669 in the brain (respectively 12 min and 2 h 20 min) and the relative low brain
552 permeability of CIM114669, these results are very promising (Table S6).

553

554 **4. Discussion**

555

556 Rabies still causes over 59,000 deaths annually worldwide despite an effective PEP, and there
557 is currently no treatment available to cure it after the onset of clinical signs. Several
558 compounds have been identified as potential inhibitors of RABV replication, but with
559 unpromising *in vivo* results (Dacheux, Delmas et al. 2011, Jochmans and Neyts 2019). The
560 challenge is to obtain active and stable compounds in the peripheral infected tissues, and able
561 to cross the blood brain barrier to block the replication of the virus in the brain, the virus being
562 highly neurotropic. These challenges have so far never been met except in the case of
563 antirabies monoclonal antibodies (de Melo, Hellert et al. 2022).

564 In our study, a primary screen of 30,000 chemical compounds from Chembridge Corporation
565 (Chembridge Diverset Library) identified 86 hits at a cutoff of 50 % inhibition. Six compounds
566 were characterized by IC₅₀s below 30 µM, low cytotoxicity and broad-spectrum activity. This
567 was demonstrated against two members of the *Lyssavirus rabies* species, one circulating in
568 dog in Asia (8743THA) and the other one in hematophagous bats in the Amazonian region
569 (9001FRA), representing a large diversity within this species (Troupin, Dacheux et al. 2016),
570 but also against *Lyssavirus hamburg*, a bat lyssavirus species circulating in Europe (8918FRA,
571 EBLV-1) and even more widely on Measles virus (*Morbillivirus hominis*), a more distant virus
572 belonging to the *Mononegavirales* order (*Morbillivirus* genus, *Paramyxoviridae* family).

573 Further, those six compounds were shown to act both on the replication complex of RABV and
574 Measle virus, which share many structural and functional features among their polymerase
575 (Liang 2020, Pyle, Whelan et al. 2021) and similar interactions between the proteins that
576 compose this complex (Mavrakis, McCarthy et al. 2004, Ivanov, Crepin et al. 2010, Horwitz,
577 Jenni et al. 2020).

578 Several compounds were previously shown to act on the replication of RABV. This is the case
579 for Ribavirin, a nucleoside analogue (Anindita, Sasaki et al. 2018) or Favipiravir, a pyrazine
580 derivative commonly known as T-705, a broad-spectrum RNA polymerase inhibitor (Yamada,
581 Noguchi et al. 2019). Amantadine and ketamine, non-competitive NMDA (N-methyl-D-
582 aspartate) receptor antagonists, also had an anti-RABV effect *in vitro*, but proved ineffective
583 in clinical trials (Appolinario and Jackson 2015). Another molecule, pyrimethamine, has been
584 shown to inhibit RABV infection *in vitro* by inhibiting adenosine synthesis, but unfortunately,
585 pyrimethamine showed no efficacy in rabies-infected mice (Rogee, Larrous et al. 2019).

586 Here, we focused on one family derived from the phthalazinone derivative 7671954.
587 Phthalazinones are already used in various cancer therapies for their antiproliferative efficacy
588 against different cancer cell lines (Salado, Singh et al. 2020, Abdelgawad, Bukhari et al. 2023)
589 but also as inhibitor of a variety of neglected parasitic diseases (Salado, Singh et al. 2020) or
590 viral infection (Lu, Liu et al. 2018, Zang, Liu et al. 2022). In the case of Dengue, a phthalazinone
591 derivative was identified as a potent inhibitor against DENV-2 RNA replication *in vitro* (Lu, Liu
592 et al. 2018), whereas in the case of HBV the phthalazinone derivative target the core protein
593 of the virus (Zang, Liu et al. 2022).

594 In order to improve the potency of 7671954 and better characterize this new phthalazinone
595 series, some early hit to lead optimization has been performed. This led to the discovery of
596 two compounds (CIM114116 and CIM114669) which were identified as being the most
597 effective rabies virus antivirals ($IC_{50} = 0.39 \mu M$ and $0.07 \mu M$ for CIM114116 and
598 CIM114669 respectively) together with a low cytotoxicity. Both compounds
599 demonstrated some mouse brain exposure ($C_{max} = 2335 \text{ ng/ml}$ and 220 ng for
600 CIM114116 and CIM114669 respectively) with a half-life ranging from 12 min to 2 h 20
601 for CIM114116 and CIM114669 respectively (Table S2).

602
603 In an attempt to identify the molecular target of those compounds different approaches
604 were carried out in parallel. The selection of drug-resistant variants revealed that the

605 polymerase (L) and phosphoprotein (P) were the targets of the compounds. All the
606 mutations (V1897F, E1893D or N1915K, F1923L and G1961E) occurred in the
607 methyltransferase domain of the L protein (Paesen, Collet et al. 2015). This further correlate
608 with minireplicon system data showing that the compounds were active on the replication
609 complex of rabies virus (Figure 1 and 2). NMR and STD experiment (Figure S2) confirmed that
610 the compound interacts with the whole NPL complex. Further, using DiffDock, three putative
611 binding pockets were highlighted in the L protein (Figure 3) including two located in the
612 polymerase domain of the L and one in the CD domain. These interaction modes are
613 compatible with the NMR data where interactions were observed with almost all sides of
614 CIM114116 : E, D and A (Figure S2B). The mutations characterized in the escape mutants could
615 modify the structure of the L protein and may have an impact on the viral replication complex
616 properties. This long-distance effect may be explained through an epistatic mechanism.
617 Indeed, epistatic interactions in the form of compensatory mutations are a known
618 phenomenon that accompanies antiviral therapy (Delaney, Yang et al. 2003, Maisnier-Patin
619 and Andersson 2004, Knops, Sierra et al. 2018). Epistatic interactions were described for
620 multiple RNA virus, such as HIV (Nijhuis, Schuurman et al. 1999), HCV (McCloskey, Liang et al.
621 2015, Dultz, Srikakulam et al. 2021) or IAV (Lyons and Lauring 2018, Lee, Raghunathan et al.
622 2023).

623 Most of the residues in contact with CIM114116 or CIM114669 compounds are highly
624 conserved among the Lyssaviruses (Figure S8) reinforcing the idea that these compounds
625 target one or several structural and conserved region(s) of viral polymerase.

626 Based on docking results, the catalytic domain GDN of the L protein interacts with the
627 compound CIM114669, explaining why the growth of viruses were slowed in its presence.
628 Interestingly, none of the mutations observed in the drug-resistant variants are present in
629 the three pockets. As part of the minireplicon experiments, we observed that the mutations
630 induced an increase in the activity of the replication complex (two to four times more active
631 than the wild-type complex). We can hypothesize that these escape mutations compensated
632 the polymerase function for the inhibitory effect of the compounds, due to their binding in
633 the immediate vicinity of the polymerization domain. This compensation could occur either
634 by modifying the structure of the catalytic domain or by enhancing the replication capacity of
635 the polymerase.

636

637 Despite the promising *in vivo* results regarding the delay onset of clinical signs, the compounds
638 still need optimization to enhance their overall profile and more specifically, their aqueous
639 solubility, brain exposure and half-life life to get to better *in vivo* efficacy. Our modelling and
640 docking results combined with the work of (Kiriwan and Choowongkomon 2021) could
641 facilitate a large-scale virtual screening of new phthalazinone derivatives or other compounds
642 libraries. This approach avoid the need to synthesize all chemical compounds, allowing the
643 testing of only a selection of few *in vitro* and *in vivo*.

644 Taken together, our results show that phtalazinone derivatives are promising drug candidates,
645 although they need further bioavailability optimisation. Their mode of action suggests that
646 they could be administrated in cooperation with promising cocktail of monoclonal antibodies
647 treatment already tested *in vivo* in mice (de Melo, Sonthonnax et al. 2020).

648

649 **Declaration of competing interest**

650 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
651 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

652

653 **Data availability**

654 Data will be made available on request.

655

656 **Acknowledgements**

657 This project was supported by the European Union's Seventh Framework Program under grant
658 agreement no. 260644-SILVER, by the INFECT-ERA 2016 Project ANR 16-IFEC-0006-01
659 ToRRENT and by Program "Maturation for therapeutic application 2020" from Direction des
660 applications de la recherche et des relations industrielles (DARRI), Institut Pasteur Paris.

661 V.P. is recipient of a fellowship from the European Union's Horizon 2020 Framework Program
662 for Research and Innovation under Specific Grant Agreement No. 945539 (Human Brain
663 Project SGA3) and acknowledges the funding by the the Fondation pour la Recherche
664 Médicale (grant ANRS MIE202112015304). We wish to thank Margot Dropy and Baptiste
665 Faussurier for their help on this study. The 800-MHz NMR spectrometer of the Institut Pasteur
666 was partially funded by the Région Ile de France (SESAME 2014 NMRCHR grant no 4014526).
667 We thank NMR platform of C2RT at the Institut Pasteur, Muriel Delepierre and Catherine
668 Simenel for NMR resonance assignments.

669 **References**

- 670 - Abdelgawad, M. A., S. N. A. Bukhari, A. Musa, M. Elmowafy, A. A. Nayl, A. H. El-Ghorab,
671 M. Sadek Abdel-Bakky, H. A. Omar, N. Hadal Alotaibi, H. M. Hassan, M. M. Ghoneim and R. B.
672 Bakr (2023). "Phthalazone tethered 1,2,3-triazole conjugates: In silico molecular docking
673 studies, synthesis, in vitro antiproliferative, and kinase inhibitory activities." Bioorg Chem **133**:
674 106404.
- 675 - Anindita, P. D., M. Sasaki, K. Okada, N. Ito, M. Sugiyama, N. Saito-Tarashima, N.
676 Minakawa, S. Shuto, S. Otsuguro, S. Ichikawa, A. Matsuda, K. Maenaka, Y. Orba and H. Sawa
677 (2018). "Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward rabies virus."
678 Antiviral Res **154**: 1-9.
- 679 - Appolinario, C. M. and A. C. Jackson (2015). "Antiviral therapy for human rabies."
680 Antivir Ther **20**(1): 1-10.
- 681 - Aramburo, A., R. E. Willoughby, A. W. Bollen, C. A. Glaser, C. J. Hsieh, S. L. Davis, K. W.
682 Martin and A. Roy-Burman (2011). "Failure of the Milwaukee protocol in a child with rabies."
683 Clin Infect Dis **53**(6): 572-574.
- 684 - Ben Khalifa, Y., S. Luco, B. Besson, F. Sonthonnax, M. Archambaud, J. M. Grimes, F.
685 Larrous and H. Bourhy (2016). "The matrix protein of rabies virus binds to RelAp43 to
686 modulate NF-kappaB-dependent gene expression related to innate immunity." Sci Rep **6**:
687 39420.
- 688 - Besson, B., F. Sonthonnax, M. Duchateau, Y. Ben Khalifa, F. Larrous, H. Eun, V. Hourdel,
689 M. Matondo, J. Chamot-Rooke, R. Grailhe and H. Bourhy (2017). "Regulation of NF-kappaB by
690 the p105-ABIN2-TPL2 complex and RelAp43 during rabies virus infection." PLoS Pathog **13**(10):
691 e1006697.
- 692 - Bonnaud, E. M., C. Troupin, L. Dacheux, E. C. Holmes, E. Monchatre-Leroy, M. Tanguy,
693 C. Bouchier, F. Cliquet, J. Barrat and H. Bourhy (2019). "Comparison of intra- and inter-host
694 genetic diversity in rabies virus during experimental cross-species transmission." PLoS Pathog
695 **15**(6): e1007799.
- 696 - Bouvier, G., C. Simenel, J. Jang, N. P. Kalia, I. Choi, M. Nilges, K. Pethe and N. Izadi-
697 Pruneyre (2019). "Target Engagement and Binding Mode of an Antituberculosis Drug to Its
698 Bacterial Target Deciphered in Whole Living Cells by NMR." Biochemistry **58**(6): 526-533.
- 699 - Buchholz, U. J., S. Finke and K. K. Conzelmann (1999). "Generation of bovine respiratory
700 syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue
701 culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter." J Virol
702 **73**(1): 251-259.
- 703 - Castillo-Neyra, R., A. M. Buttenheim, J. Brown, J. F. Ferrara, C. Arevalo-Nieto, K. Borrini-
704 Mayori, M. Z. Levy, V. Becerra and V. A. Paz-Soldan (2020). "Behavioral and structural barriers
705 to accessing human post-exposure prophylaxis and other preventive practices in Arequipa,
706 Peru, during a canine rabies epidemic." PLoS Negl Trop Dis **14**(7): e0008478.
- 707 - Corso G., S. r. H., Jing B., Barzilay R. & Jaakkola T. "DiffDock Diffusion Steps, Twists,
708 and Turns for Molecular docking."
- 709 - Crowther, R. A., R. Henderson and J. M. Smith (1996). "MRC image processing
710 programs." J Struct Biol **116**(1): 9-16.
- 711 - Dacheux, L., O. Delmas and H. Bourhy (2011). "Human rabies encephalitis prevention
712 and treatment: progress since Pasteur's discovery." Infect Disord Drug Targets **11**(3): 251-299.
- 713 - de Melo, G. D., J. Hellert, R. Gupta, D. Corti and H. Bourhy (2022). "Monoclonal
714 antibodies against rabies: current uses in prophylaxis and in therapy." Curr Opin Virol **53**:
715 101204.

716 - de Melo, G. D., F. Sonthonnax, G. Lepousez, G. Jouvion, A. Minola, F. Zatta, F. Larrous,
717 L. Kergoat, C. Mazo, C. Moigneu, R. Aiello, A. Salomoni, E. Brisebard, P. De Benedictis, D. Corti
718 and H. Bourhy (2020). "A combination of two human monoclonal antibodies cures
719 symptomatic rabies." EMBO Mol Med **12**(11): e12628.

720 - Deborah Nadal, K. B., Ramesh Masthi, Ashwath Narayana, Yasmeeen Ross, Ryan
721 Wallace, Bernadette Abela, (2023). "Rabies Post-Exposure Prophylaxis Delivery to Ensure
722 Treatment Efficacy and Increase Compliance." IJID One Health, **2023**, **100006**.

723 - Delaney, W. E. t., H. Yang, C. E. Westland, K. Das, E. Arnold, C. S. Gibbs, M. D. Miller
724 and S. Xiong (2003). "The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during
725 lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro." J Virol **77**(21): 11833-11841.

726 - Delmas, O., E. C. Holmes, C. Talbi, F. Larrous, L. Dacheux, C. Bouchier and H. Bourhy
727 (2008). "Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses." PLoS One **3**(4): e2057.

728 - Dultz, G., S. K. Srikakulam, M. Konetschnik, T. Shimakami, N. T. Doncheva, J. Dietz, C.
729 Sarrazin, R. M. Biondi, S. Zeuzem, R. Tampe, O. V. Kalinina and C. Welsch (2021). "Epistatic
730 interactions promote persistence of NS3-Q80K in HCV infection by compensating for protein
731 folding instability." J Biol Chem **297**(3): 101031.

732 - Galaxy, C. (2022). "The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative
733 biomedical analyses: 2022 update." Nucleic Acids Res **50**(W1): W345-W351.

734 - Ghanem, A., A. Kern and K. K. Conzelmann (2012). "Significantly improved rescue of
735 rabies virus from cDNA plasmids." Eur J Cell Biol **91**(1): 10-16.

736 - Hampson, K., L. Coudeville, T. Lembo, M. Sambo, A. Kieffer, M. Attlan, J. Barrat, J. D.
737 Blanton, D. J. Briggs, S. Cleaveland, P. Costa, C. M. Freuling, E. Hiby, L. Knopf, F. Leanes, F. X.
738 Meslin, A. Metlin, M. E. Miranda, T. Muller, L. H. Nel, S. Recuenco, C. E. Rupprecht, C.
739 Schumacher, L. Taylor, M. A. Vigilato, J. Zinsstag, J. Dushoff and P. Global Alliance for Rabies
740 Control Partners for Rabies (2015). "Estimating the global burden of endemic canine rabies."
741 PLoS Negl Trop Dis **9**(4): e0003709.

742 - Hemachudha, T., B. Sunsaneewitayakul, T. Desudchit, C. Suankratay, C. Sittipunt, S.
743 Wacharapluesadee, P. Khawplod, H. Wilde and A. C. Jackson (2006). "Failure of therapeutic
744 coma and ketamine for therapy of human rabies." J Neurovirol **12**(5): 407-409.

745 - Horwitz, J. A., S. Jenni, S. C. Harrison and S. P. J. Whelan (2020). "Structure of a rabies
746 virus polymerase complex from electron cryo-microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **117**(4):
747 2099-2107.

748 - Ivanov, I., T. Crepin, M. Jamin and R. W. Ruigrok (2010). "Structure of the dimerization
749 domain of the rabies virus phosphoprotein." J Virol **84**(7): 3707-3710.

750 - Jackson, A. C. (2013). "Current and future approaches to the therapy of human rabies."
751 Antiviral Res **99**(1): 61-67.

752 - Jochmans, D. and J. Neyts (2019). "The path towards effective antivirals against rabies."
753 Vaccine **37**(33): 4660-4662.

754 - Kiriwan, D. and K. Choowongkamon (2021). "In silico structural elucidation of the
755 rabies RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) toward the identification of potential rabies
756 virus inhibitors." J Mol Model **27**(6): 183.

757 - Knops, E., S. Sierra, P. Kalaghatgi, E. Heger, R. Kaiser and O. V. Kalinina (2018). "Epistatic
758 Interactions in NS5A of Hepatitis C Virus Suggest Drug Resistance Mechanisms." Genes (Basel)
759 **9**(7).

760 - Lee, C. Y., V. Raghunathan, C. J. Caceres, G. Geiger, B. Seibert, F. Cargnin Faccin, L. C.
761 Gay, L. M. Ferreri, D. Kaul, J. Wrammert, G. S. Tan, D. R. Perez and A. C. Lowen (2023).

762 "Epistasis reduces fitness costs of influenza A virus escape from stem-binding antibodies."
763 Proc Natl Acad Sci U S A **120**(17): e2208718120.

764 - Liang, B. (2020). "Structures of the Mononegavirales Polymerases." J Virol **94**(22).
765 - Lin, Z., H. Akin, R. Rao, B. Hie, Z. Zhu, W. Lu, N. Smetanin, R. Verkuil, O. Kabeli, Y.
766 Shmueli, A. Dos Santos Costa, M. Fazel-Zarandi, T. Sercu, S. Candido and A. Rives (2023).
767 "Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model."
768 Science **379**(6637): 1123-1130.

769 - Lu, D., J. Liu, Y. Zhang, F. Liu, L. Zeng, R. Peng, L. Yang, H. Ying, W. Tang, W. Chen, J. Zuo,
770 X. Tong, T. Liu and Y. Hu (2018). "Discovery and optimization of phthalazinone derivatives as
771 a new class of potent dengue virus inhibitors." Eur J Med Chem **145**: 328-337.

772 - Lyons, D. M. and A. S. Lauring (2018). "Mutation and Epistasis in Influenza Virus
773 Evolution." Viruses **10**(8).

774 - Maisnier-Patin, S. and D. I. Andersson (2004). "Adaptation to the deleterious effects of
775 antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution." Res Microbiol **155**(5):
776 360-369.

777 - Mavrakis, M., A. A. McCarthy, S. Roche, D. Blondel and R. W. Ruigrok (2004). "Structure
778 and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus." J Mol Biol
779 **343**(4): 819-831.

780 - Mayer, M. and B. Meyer (1999). "Characterization of Ligand Binding by Saturation
781 Transfer Difference NMR Spectroscopy." Angew Chem Int Ed Engl **38**(12): 1784-1788.

782 - McCloskey, R. M., R. H. Liang, J. B. Joy, M. Krajden, J. S. Montaner, P. R. Harrigan and
783 A. F. Poon (2015). "Global origin and transmission of hepatitis C virus nonstructural protein 3
784 Q80K polymorphism." J Infect Dis **211**(8): 1288-1295.

785 - Nijhuis, M., R. Schuurman, D. de Jong, J. Erickson, E. Gustchina, J. Albert, P. Schipper,
786 S. Gulnik and C. A. Boucher (1999). "Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a
787 result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy." AIDS **13**(17):
788 2349-2359.

789 - Ogino, T. and T. J. Green (2019). "Transcriptional Control and mRNA Capping by the
790 GDP Polyribonucleotidyltransferase Domain of the Rabies Virus Large Protein." Viruses **11**(6).

791 - Paesen, G. C., A. Collet, C. Sallamand, F. Debart, J. J. Vasseur, B. Canard, E. Decroly and
792 J. M. Grimes (2015). "X-ray structure and activities of an essential Mononegavirales L-protein
793 domain." Nat Commun **6**: 8749.

794 - Pan, J., X. Qian, S. Lattmann, A. El Sahili, T. H. Yeo, H. Jia, T. Cressey, B. Ludeke, S. Noton,
795 M. Kalocsay, R. Fearn and J. Lescar (2020). "Structure of the human metapneumovirus
796 polymerase phosphoprotein complex." Nature **577**(7789): 275-279.

797 - Pyle, J. D., S. P. J. Whelan and L. M. Bloyet (2021). "Structure and function of negative-
798 strand RNA virus polymerase complexes." Enzymes **50**: 21-78.

799 - Rogee, S., F. Larrous, D. Jochmans, Y. Ben-Khalifa, J. Neyts and H. Bourhy (2019).
800 "Pyrimethamine inhibits rabies virus replication in vitro." Antiviral Res **161**: 1-9.

801 - Roy, A., T. W. Phares, H. Koprowski and D. C. Hooper (2007). "Failure to open the blood-
802 brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the
803 lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection." J Virol **81**(3): 1110-1118.

804 - Salado, I. G., A. K. Singh, C. Moreno-Cinos, G. Sakaine, M. Siderius, P. Van der Veken,
805 A. Matheeussen, T. van der Meer, P. Sadek, S. Gul, L. Maes, G. J. Sterk, R. Leurs, D. Brown and
806 K. Augustyns (2020). "Lead Optimization of Phthalazinone Phosphodiesterase Inhibitors as
807 Novel Antitrypanosomal Compounds." J Med Chem **63**(7): 3485-3507.

808 - Shu, Y., J. Habchi, S. Costanzo, A. Padilla, J. Brunel, D. Gerlier, M. Oglesbee and S. Longhi
809 (2012). "Plasticity in structural and functional interactions between the phosphoprotein and
810 nucleoprotein of measles virus." J Biol Chem **287**(15): 11951-11967.

811 - Theillet, F. X. (2022). "In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic
812 Scale." Chem Rev **122**(10): 9497-9570.

813 - Troupin, C., L. Dacheux, M. Tanguy, C. Sabeta, H. Blanc, C. Bouchier, M. Vignuzzi, S.
814 Duchene, E. C. Holmes and H. Bourhy (2016). "Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the
815 Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts." PLoS Pathog
816 **12**(12): e1006041.

817 - Warrell, M., D. A. Warrell and A. Tarantola (2017). "The Imperative of Palliation in the
818 Management of Rabies Encephalomyelitis." Trop Med Infect Dis **2**(4).

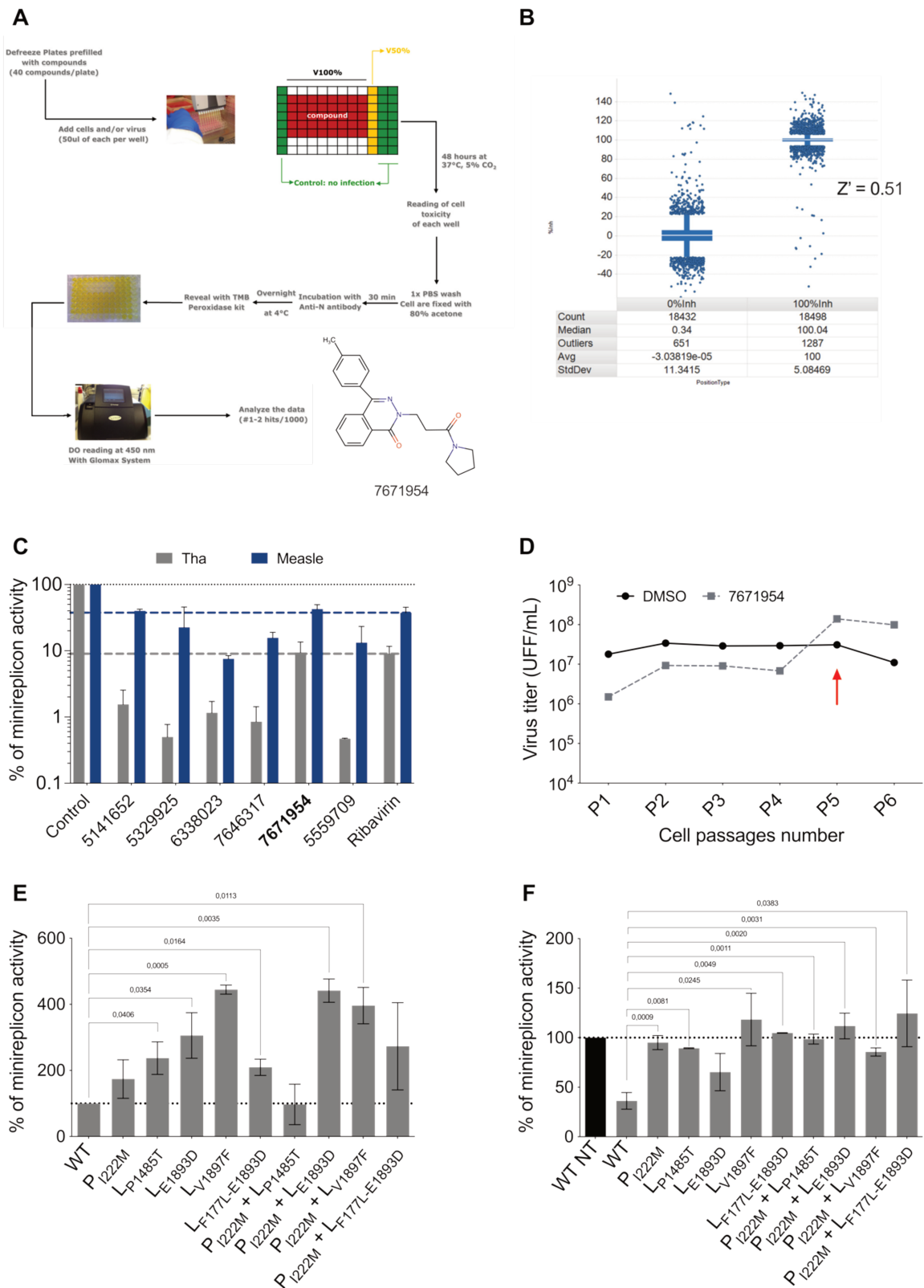
819 - Webb, B. and A. Sali (2016). "Comparative Protein Structure Modeling Using
820 MODELLER." Curr Protoc Bioinformatics **54**: 5 6 1-5 6 37.

821 - Willoughby, L. M., S. Fukami, S. Bunnapradist, J. A. Gavard, K. L. Lentine, K. L. Hardinger,
822 T. E. Burroughs, S. K. Takemoto and M. A. Schnitzler (2007). "Health insurance considerations
823 for adolescent transplant recipients as they transition to adulthood." Pediatr Transplant **11**(2):
824 127-131.

825 - Willoughby, R. E., Jr. and A. L. Hammarin (2005). "Prophylaxis against rabies in children
826 exposed to bats." Pediatr Infect Dis J **24**(12): 1109-1110.

827 - Yamada, K., K. Noguchi, K. Kimitsuki, R. Kaimori, N. Saito, T. Komeno, N. Nakajima, Y.
828 Furuta and A. Nishizono (2019). "Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus
829 using in vivo imaging analysis." Antiviral Res **172**: 104641.

830 - Zang, J., M. Liu, H. Liu and L. Ding (2022). "A molecular simulation study of hepatitis B
831 virus core protein and the nuclear protein allosteric modulators of phthalazinone derivatives."
832 Phys Chem Chem Phys **24**(38): 23209-23225.
833
834



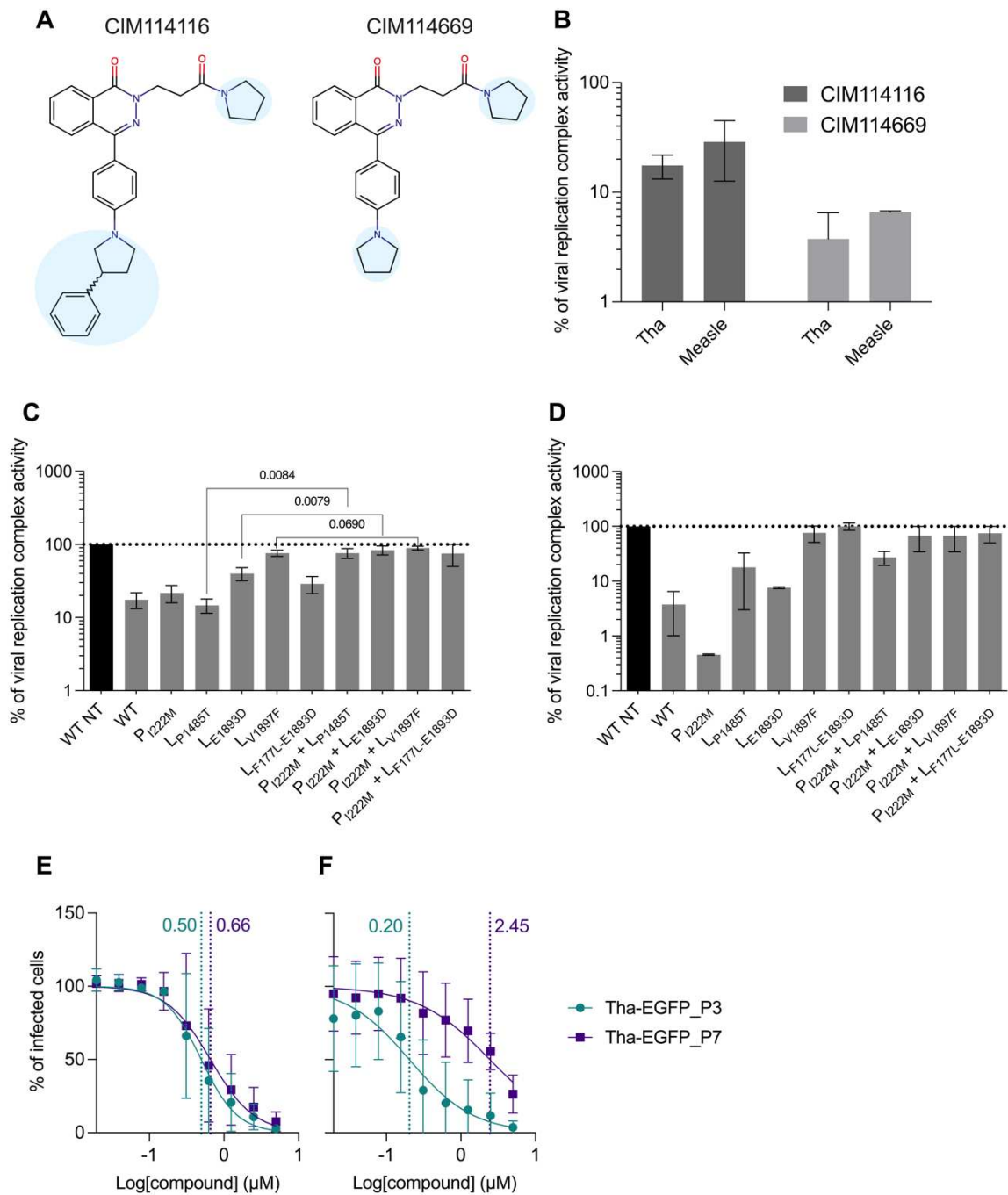
836

837 **Figure 1: Phtalazinone derivatives target L and P proteins during rabies infection. (A)** High-

838 throughput cell-based screening. Development of a 96-well based antiviral assay for Lyssavirus

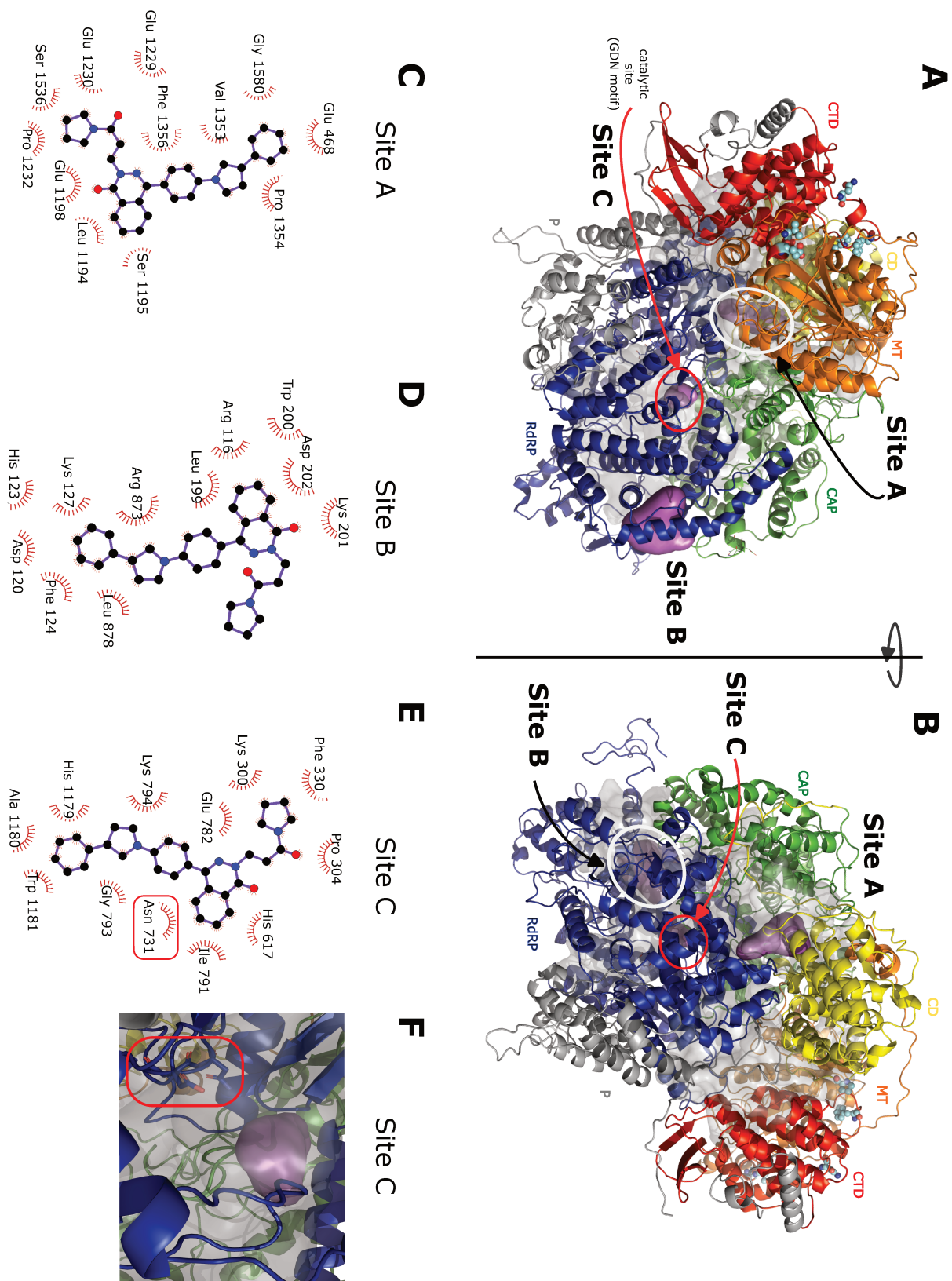
839 screening of a chemical compound library. A field dog isolate of rabies virus from Thailand were used

840 for this assay. 7671954 structure is indicated. **(B)** Screening Z-Factor to measure the statistical effect
841 size. **(C)** Minireplicon CAT assay evaluating the inhibition of Tha (in grey) and Measle (in blue)
842 replication complex. The black dotted line indicates the 100 % activity of the control. The blue and grey
843 dotted line indicate the percentage of activity in the presence of Ribavirin of Measle and Tha
844 minireplicon, respectively. **(D)** Growth kinetics of untreated Tha-eGFP viruses (DMSO) and Tha-eGFP
845 viruses treated with the compound 7671954. The escape occurs at the 5th passage, as indicated by the
846 red arrow **(E, F)** Minireplicon CAT assay of Tha to identify mutations restoring the replication complex
847 activity **(E)** without any treatment or in the presence of compound **(F)** 7671954. All the values are
848 represented as mean, error bars indicate \pm SD. Three independent experiment were performed.
849 Unpaired t test with Welch's correction were performed.



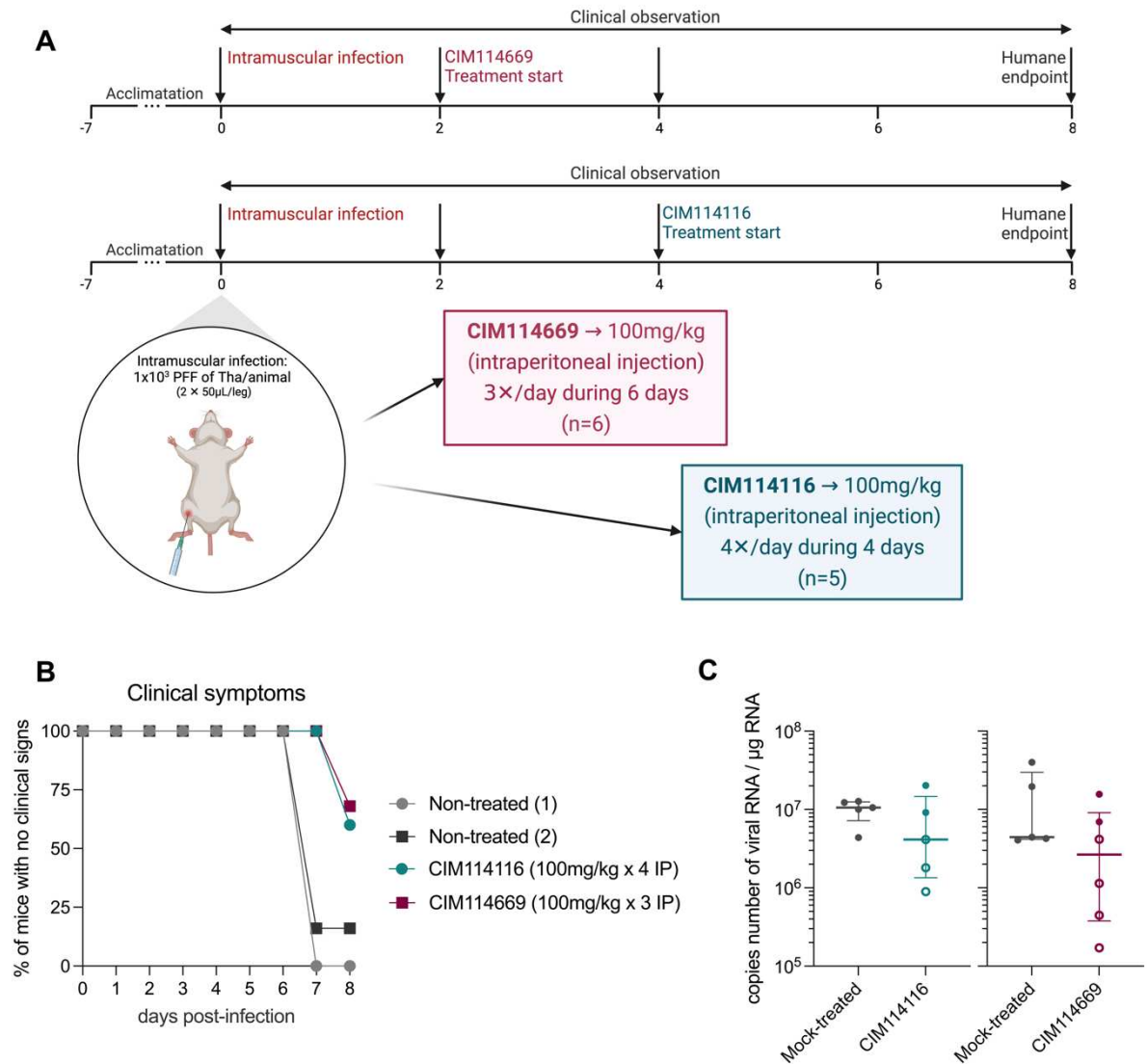
850
851
852
853
854
855
856
857
858

Figure 2: Compounds optimization and identification of CIM114116 and CIM114669. (A) Structure of CIM114116 and CIM114669. In blue, residues characterizing the molecules (B) Minireplicon CAT assay evaluating the inhibition of Tha and Measle replication complex. (C, D) Minireplicon CAT of Tha assay to identify mutations restoring the replication complex activity in the presence of compounds (C) CIM114116 and (D) CIM114669. (E, F) New IC_{50} values for Tha-eGFP viruses from passages 3 and 7, exposed to $5 \times IC_{50}$ of (E) CIM114116 or (F) CIM114669. All the values are represented as mean, error bars indicate \pm SD. Three independent experiment were performed. Unpaired t test with Welch's correction were performed.



859
 860 **Figure 3: Blind-docking of the identified active compounds in the LP complex model.** (A-B) Model of the
 861 structure of the RABV L-P complex, with domains highlighted by colors, represented on both sides
 862 (with a 180° pivot). The surfaces in magenta depict binding pockets identified by DiffDock. The 3 main
 863 potential binding pockets are labeled Site A, Site B and Site C (GDN catalytic site). The cyan coloured
 864 spheres represent the positions of the mutations found in mutants escaping 7671954, CIM114116 and

865 CIM114669. An arbitrary cutoff of mutation frequency of 10 % was used, only the positions of P1485T,
866 E1893D, V1897F, N1915K and F1923L mutations are represented, mainly present in the
867 methyltransferase domain **(C-E)** Ligplots of CIM114669 interacting with residues in **(C)** site A, **(D)** site
868 B, and **(E)** site C. In the site C, is indicated in framed red the Asn 731 of the GDN motif, interacting with
869 the CIM114669 compound, **(F)** also represented on a close-up of the site C in the LP complex model.
870 (RdRp: RNA dependant RNA polymerase domain; CAP: Capping domain; CD: Connector domain; MT:
871 Methyltransferase domain; CTD: C-terminal domain).



872
 873 **Figure 4: CIM114116 and CIM114669 delayed clinical symptoms and lowered viral RNA in the brain. (A)**
 874 Experimental procedure: mice were infected intramuscularly and treated with CIM114116 and
 875 CIM114669 intraperitoneally until mice euthanasia at D8. The clinical observation was performed during this
 876 time (created with BioRender.com). **(B)** Percentage with no clinical symptoms treated or not with
 877 CIM114116 and CIM114669 during the experimental period. **(C)** Copies number of viral RNA in the brain of
 878 non-treated or CIM114116 or CIM114669 treated mice. Empty circles represent animals with no clinical
 879 symptoms. The values are represented as median, error bars indicate \pm interquartile range.

880 **Tables**

881

882 **Table 1 – IC₅₀ values of Tha, 9001FRA and 8918FRA viruses exposed to various compounds.**

Hit ID	IC ₅₀ (μM)		
	Tha	9001FRA	8918FRA
5141652	13.77	12.15	12.27
5329925	23.97	10.8	7.88
6338023	14.95	5.05	6.64
7646317	24.75	11.97	28
7671954	9.46	5.71	10.31
5559709	15.2	8.42	10.6

883 IC₅₀: half maximal inhibitory concentration; Highlighted in grey: the compound of interest

884

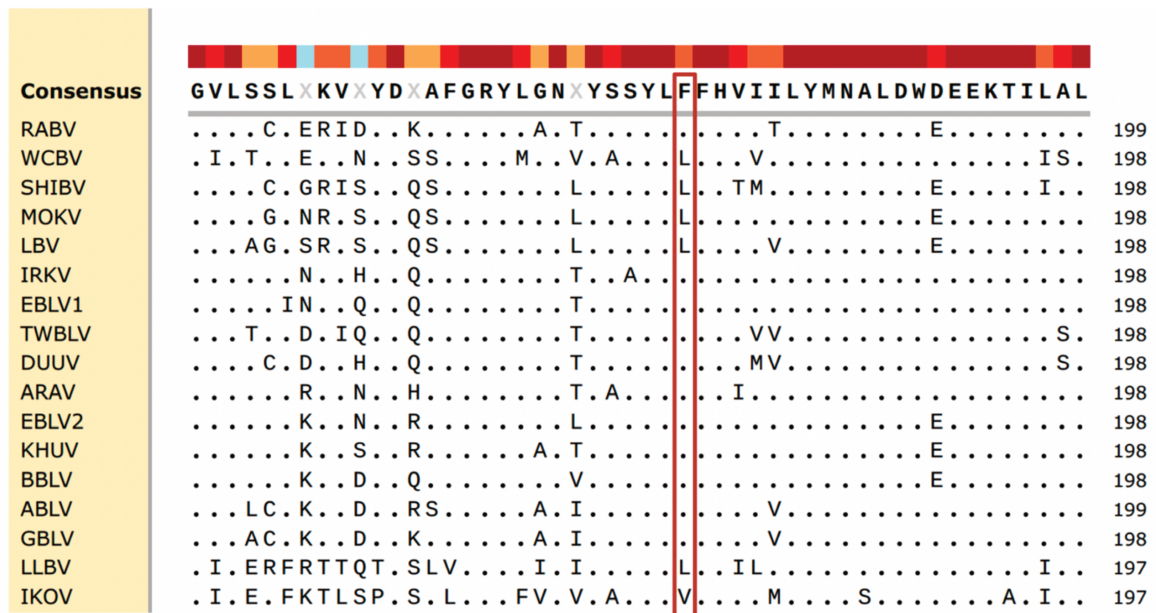
885 **Table 2 – IC₅₀ values and selectivity index of RABV (Tha) and Measle exposed to phthalazinone**
886 **derivatives.**

Compound	RABV		
	IC ₅₀ (μM)		Selectivity index (SI)
	Mean	SD	Mean
CIM114116	0.39	0.16	>10.60
CIM114669	0.07	0.02	>74.65

Compound	MEASLE		
	IC ₅₀ (μM)		Selectivity index (SI)
	Mean	SD	Mean
CIM114116	0.43	0.13	>11.68
CIM114669	0.06	0.02	>86.20

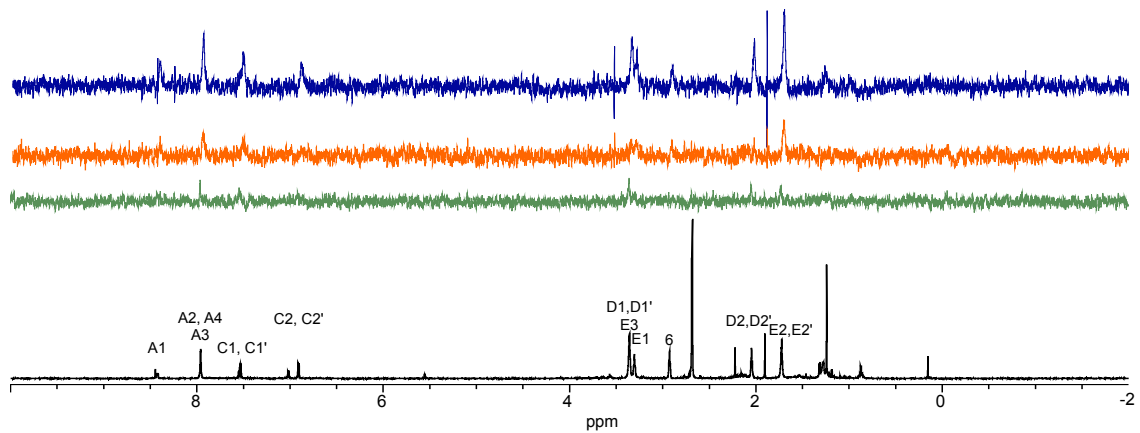
887 SD: Standard Deviation; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration

888 **Supplementary Figures**

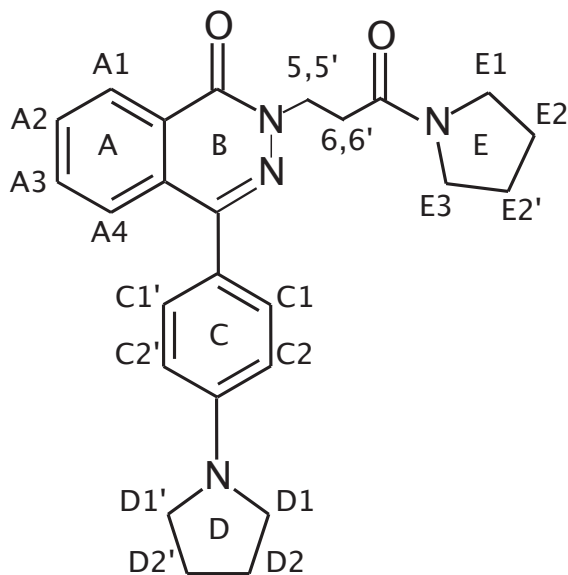


889
 890 **Supplementary Figure 1: Alignment of amino acids in the L protein of different *Lyssavirus* species.** The red
 891 rectangle shows position 177, with amino acid F or L. Strain THA (RABV) is the reference sequence for this
 892 alignment, performed with Clustal Omega. Amino acids identical to the reference sequence are indicated
 893 by a dot.
 894 RABV: Rabies Virus 8743THA (GenBank: **EU293111**); WCBV: West Caucasian bat lyssavirus (GenBank:
 895 **MZ501949.1**); SHIBV: Shimoni Bat Virus (GenBank: **GU170201.1**); MOKV: Mokola Virus (GenBank:
 896 **KF155005.1**); LBV: Lagos Bat Virus (GenBank: **LC717429.1**); IRKV: Irkut Virus (GenBank: **NC_020809.1**);
 897 EBLV1: European Bat Lyssavirus 1 (GenBank: **MT374180.1**); TWBLV: Taiwan Bat Lyssavirus (GenBank:
 898 **ON437591.1**); DUUV: Duvenhage virus (GenBank: **OU524420.1**); ARAV: Aravan Virus (GenBank:
 899 **MZ501949.1**); EBLV2: European Bat Lyssavirus (GenBank: **MG760849.1**); KHUV: Khujand Virus (GenBank:
 900 **EF614261.1**); BBLV: Bokeloh Bat Lyssavirus (GenBank: **OU524416.1**); ABLV: Australian Bat Lyssavirus
 901 (GenBank: **KJ685548.1**); GBLV: Gannoruwa Bat Lyssavirus (GenBank: **KU244269.2**); LLBV: Lleida Bat
 902 Lyssavirus (GenBank: **MG983927.1**); IKOV: Ikoma Lyssavirus (GenBank: **JX193798.1**).

903 **A**



904
905 **B**
906

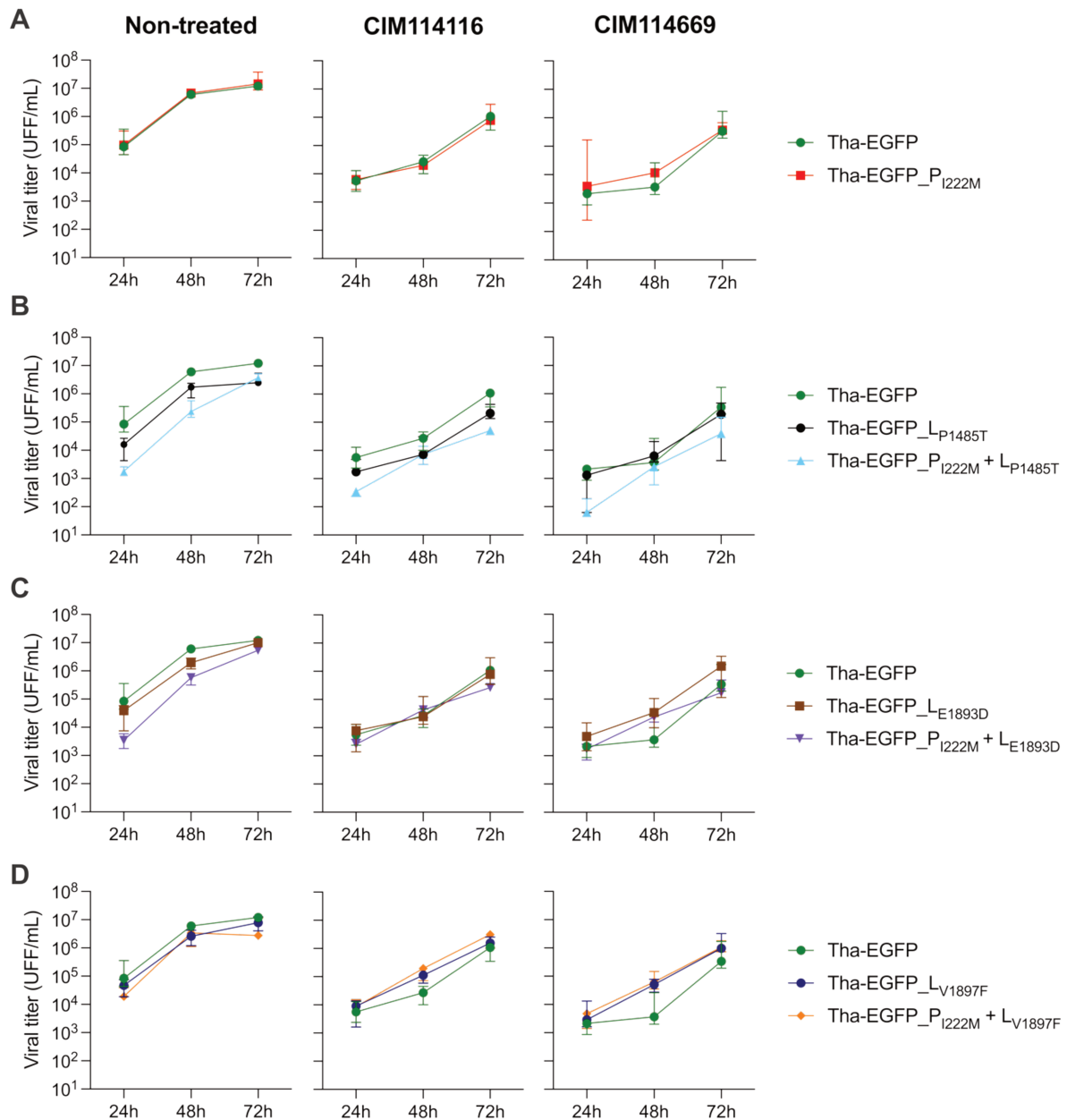


Proton	Chemical shift
A1	8.423
A2	7.96
A3	7.91
A4	7.96
C1,C1'	7.536
C2,C2'	6.90
D1,D1'	3.357
D2,D2'	2.051
E1	3.306
E2,E2'	1.724
E3	3.362
5	4.598
6	2.929

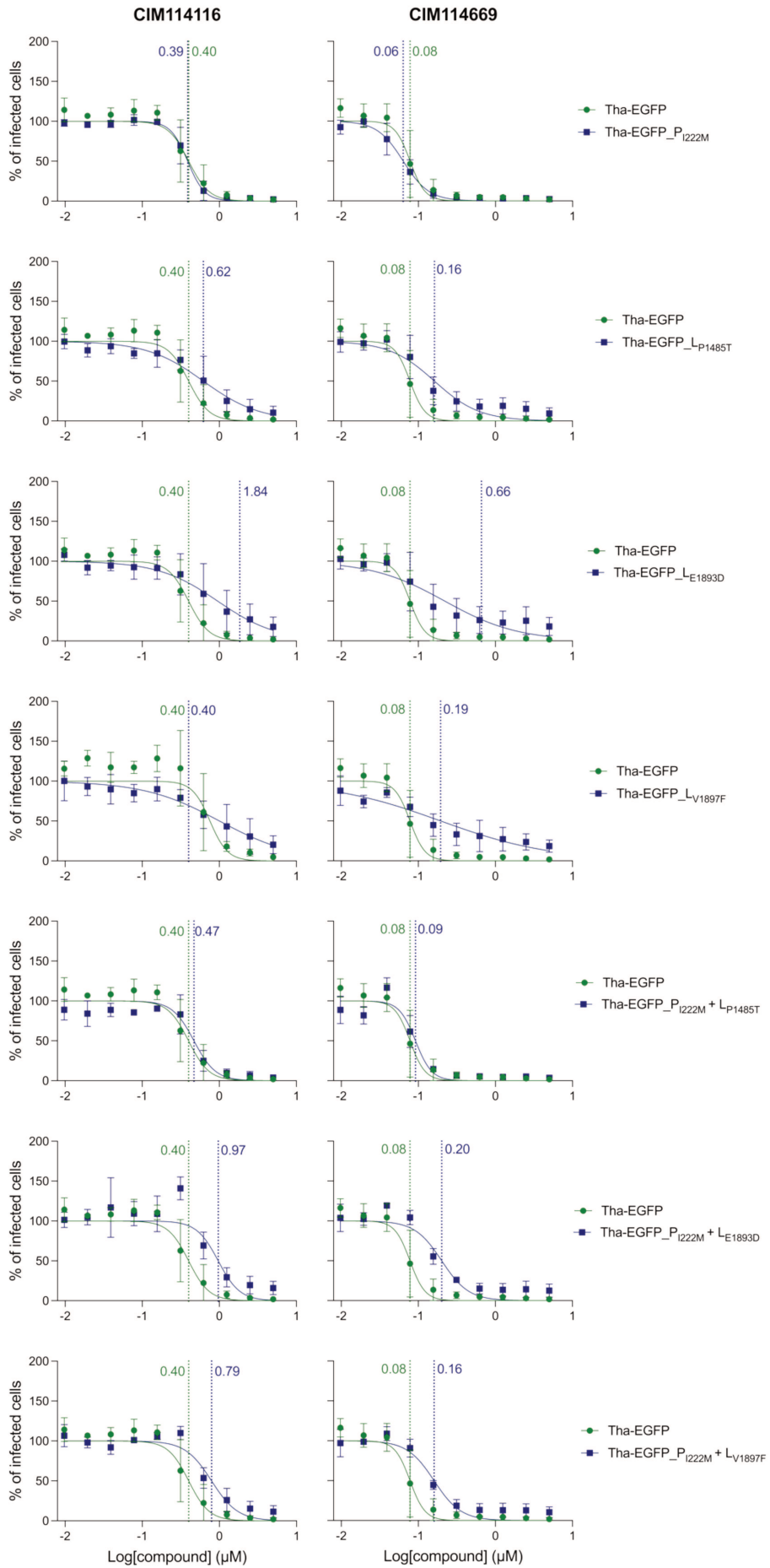
907

908

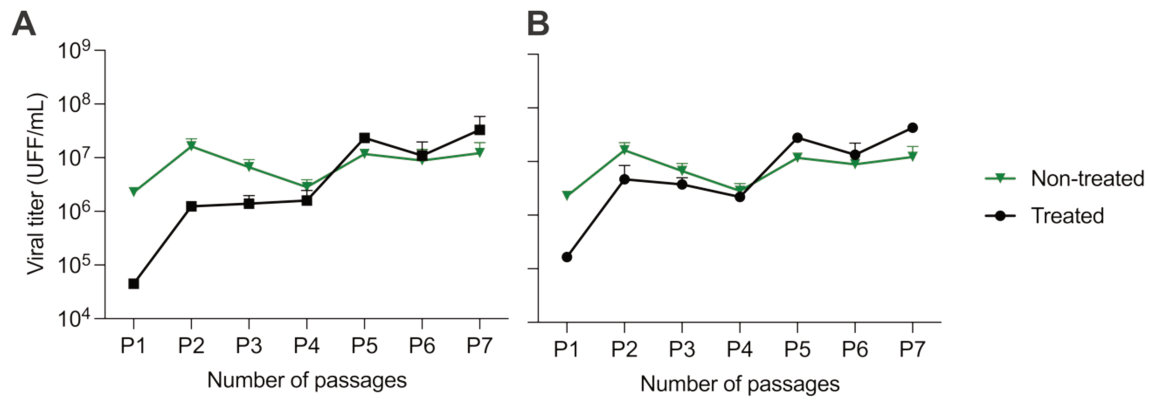
909 **Supplementary Figure 2: NMR analysis of various samples of CIM114116 and cells. (A)** ^1H NMR
910 spectrum of CIM114116 alone in black, and saturation transfer difference spectra of CIM114116 alone
911 (green) or in the presence of cells overexpressing the NL (orange) or NPL (dark blue) complexes. The
912 proton labelling corresponds to those indicated in (B). **(B)** CIM114116 chemical structure with arbitrary
913 proton numbering. On the right table are the assigned chemical shifts in ppm.



914
 915 **Supplementary Figure 3: Biological role of the mutations found with CIM114116 and CIM114669 in the**
 916 **context of a viral infection.** Kinetic growth was performed at 24 h, 48 h and 72 h post-infection with
 917 recombinant viruses in the presence of 2 μ M and 0.35 μ M of CIM114116 and CIM114669 respectively. Viral
 918 kinetic growth of the recombinant viruses : **(A)** Tha-eGFP_P-I222M, **(B)** Tha-eGFP_L-P1485T and Tha-
 919 eGFP_L-P1485T_P-I222M, **(C)** Tha-eGFP_L-E1893D and Tha-eGFP_L-E1893D_P-I222M, **(D)** Tha-eGFP_L-
 920 V1897F and Tha-eGFP_L-V1897F_P-I222M, compared to the Tha-eGFP virus, either non-treated or treated
 921 with CIM114116 or CIM114669. The kinetic growth was performed on BSR cells, infected at an MOI of 0.1.
 922 The non-treated cells were exposed to DMSO, the diluant of the small compounds, at the same
 923 concentration. Three occurred experiment were performed and the titration was carried out in duplicates.
 924 All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range.

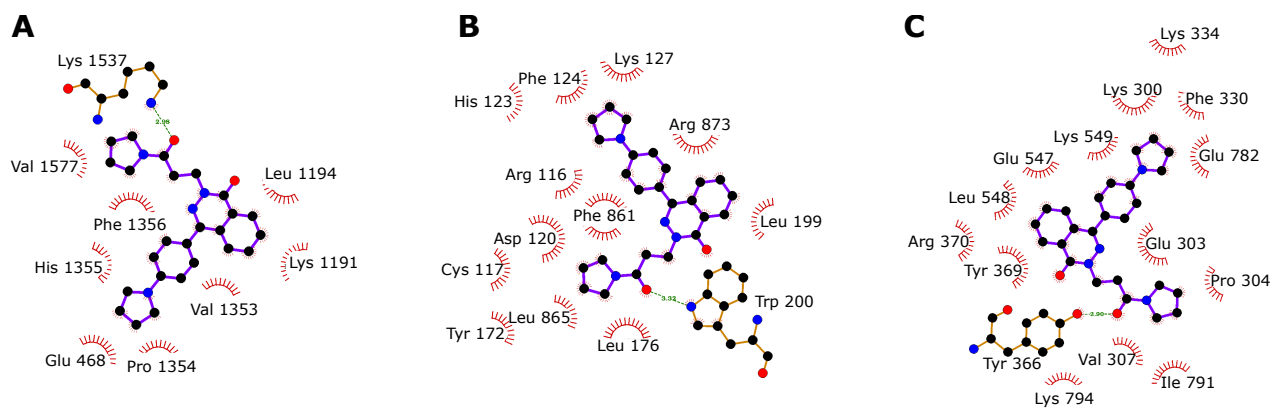


926 **Supplementary Figure 4 : Dose-response curve and half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of**
927 **Tha-eGFP and recombinant viruses exposed to small compounds CIM114116 and CIM114669.** Dose-
928 response curve of : Tha-eGFP, Tha-eGFP_L-P1485T, Tha-eGFP_L-E1893D, Tha-eGFP_L-V1897F, Tha-eGFP_P-
929 I222M, Tha-eGFP_P-I222M_L-P1485T, Tha-eGFP_P-I222M_L-E1893D, Tha-eGFP_P-I222M_L-V1897F
930 viruses. BSR cells were infected with at an MOI of 0.1. At 48 hpi, the percentage of infected cells was
931 measured using the « Opera Phenix High-Content Screening System ». The IC₅₀ values are indicated near
932 the colored dotted line. All the values are expressed as means, error bars indicate ± SD. Two independent
933 experiments in duplicates were performed (except for Tha-eGFP_P-I222M_L-V1897F where three
934 independant experiment were carried out).



935

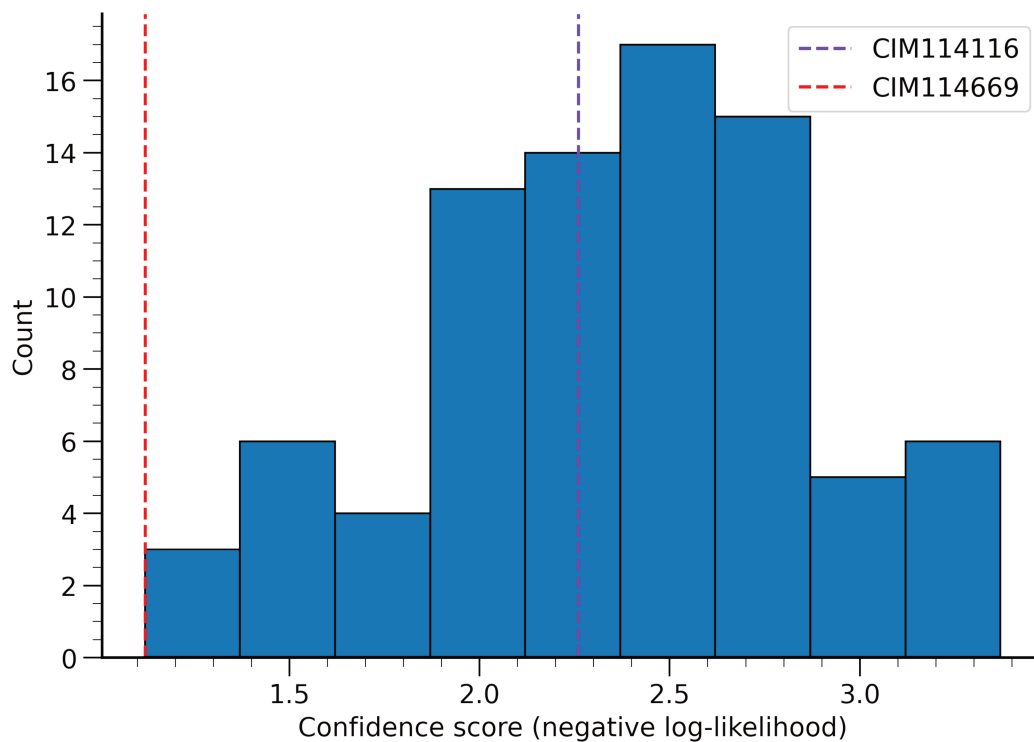
936 **Supplementary Figure 5: No escape occurred when Tha-eGFP was exposed to CIM114116 or**
 937 **CIM114669.** Growth kinetics of untreated Tha-eGFP viruses and Tha-eGFP viruses treated with
 938 compounds **(A)** CIM114116 or **(B)** CIM114669. The titration was performed in duplicates. All the values
 939 are represented as mean, error bars indicate ± SD.



940

941 **Supplementary Figure 6: Ligplots of CIM114116 interacting with residues.** Residues are present in **(A)**

942 site A, **(B)** site B, and **(C)** site C.



943

944 **Supplementary Figure 7: DiffDock score distribution of the docked 83 potential inhibitors.** Score
 945 values for CIM114669 (in red) and CIM114116 (in blue) are depicted by vertical lines.

946

947

948

949

Consensus	XXLWLHGHSESTRSRKCLXDLXFYQKSSPIEKLLNYTLENRGLXXPX
RABV	IS...Y.A...N...R.IA...AH...S...C.G...RI.P.
WCBV	MA..CNK..L...R..NN..Q..N...AI.K.S..I...QN.RD
SHIBV	MNT.VLC..A..S...T...I...R.I...SI...S...QT.K.
MOKV	MG..VL...S...A...A...RTL...SI..H..M...QT.R.
LBV	MG..VL...A..S...S...A...R.L...SI...L...QT.K.
IRKV	TT...A...S...Q..K...I...QT.A.
EBLV1	IT...TE..Q..K...KT.T.
TWBLV	IN..I...TE..Q..K...NT.S.
DUUV	VT...AE..Q..K...A...T...C...RT.P.
ARAV	IS..I...N...T...N...KI.R.
EBLV2	MS...A...S...AL..R.A...AI.TD
KHUV	TS...A...S...AQ...QV.P.
BBLV	MS...A...S...TH...RA...QT.P.
ABLV	TS...E...N...S...TQ...G...RI.P.
GBLV	IS...A...N...MS..AQ..H...T...G...RI.S.
LLBV	FKK.VTN.YV...N..MFA..QE...VE...AITSKF..K...KY.AK
IKOV	FKR.VTHNYV...N..MFM..RE...LE...TIT.RF..R...QC.SL

950

Consensus	GVLSSLXKVXYDXAFGRYLGNYSSYLFFHVIIILYMNALDWDEEKTILAL
RABV	...C.ERID..K...A.T...T...E...
WCBV	.I.T..E..N..SS...M..V.A...L..V...IS.
SHIBV	...C.GRIS..QS...L...L..TM...E...I..
MOKV	...G.NR.S..QS...L...L...E...
LBV	...AG.SR.S..QS...L...L..V...E...
IRKV	...N..H..Q...T..A...
EBLV1	...IN..Q..Q...T...
TWBLV	...T..D.IQ..Q...T...VV...S.
DUUV	...C.D..H..Q...T...MV...S.
ARAV	...R..N..H...T.A...I...
EBLV2	...K..N..R...L...E...
KHUV	...K..S..R...A.T...E...
BBLV	...K..D..Q...V...E...
ABLV	...LC.K..D..RS...A.I...V...
GBLV	...AC.K..D..K...A.I...V...
LLBV	.I.ERFRTTQT.SLV...I.I...L..IL...I.
IKOV	.I.E.FKTLSP.S.L...FV.V.A...V...M...S...A.I..

Consensus	WKDXXSXDXKDXVKFRDQIWGSLXVTKDFVYSQSXNCLFDRNYTLMLKD
RABV	...LT.V.IGK.L...K...V.I...SS...
WCBV	.R.IIHYET.E.RLTIK...L...E...S.TSA...K..V...
SHIBV	..EIT.I.V.N.K.T...PL..KFL...E...YTNCS...
MOKV	.R.IT.I.I.N.R.Y.K.PL..K.L...AHNS...K...
LBV	..IAVI.V.S.K.S.K.PL..KFL...E...H.S.S...
IRKV	..IA.I.V.N.L...V...A...
EBLV1	..EIA.I.V.S.L...VI...A...
TWBLV	.R.IA.I.TRV.L...VV...S...
DUUV	.R.IS.I.I.N.L...K...T.V...I...A...
ARAV	..ELN.V.VGK.Q...V...A.S...
EBLV2	..LN.V.I.K.Q...L...A...
KHUV	..LN.V.I.K.Q...V...A...
BBLV	..LS.V.I.K.Q...V...I...A...
ABLV	.R.LN.V.I.K.Q...S...I...E...NS...
GBLV	.RELN.I.T.K.Q...I...S.S...
LLBV	.RSLLDYN.S.T.S.SVK.I.L..QMI...YLFIIDV.S...FV...
IKOV	.RSFLDYN.SRTNS.SVK.LL..RMV...EY.LMLDIS...FM...

951

952

Consensus	LFLSRFNLLILLSPPEPRYSDDLXSXLCQLYIAGDXVLSXCGNSGYDVI	
RABVM.....I.Q.....Q...M.....E..	299
WCBVM..I....SK...T.IET..S..V...Q.VAQ.....	298
SHIBVI.....I.N.....KS..K.I.E.....	298
MOKVV...DS.....AAN..R...S..RL..S...A.....	298
LBVI.....VAN..R...T..R...T.....I..	298
IRKVF.....V.T.....K..AS.....	298
EBLV1I...S.....V.N.....K..A.....	298
TWBLVF.....SK...V.S.....K..AS.....	298
DUUVF.....A.....V.N.....S..R...V.....F..	298
ARAVV.Q.....NI..I.....	298
EBLV2E..I.Q.....N..T.....	298
KHUVI.Q.....N..M.....	298
BBLVI.Q.....H..AM.....	298
ABLVI.L.....H..M.....	299
GBLVV.QM.....N..M.....E..	298
LLBV	T.....M.....DTL..S.FPENI.S..M...S..AD...A.....	297
IKOV	T.....S.....DSL..A.FSES..D..NV..NIIAE...A...I..	297

Consensus	KMLEPYVVNXLVQRAEXFRPLIHSLGDFPXFIKDKTXQLEGTFGPSAXXF	
RABV	..I.....S.....K.....V.....VS.....KR..	349
WCBV	..C..HE..E..KY...T.....E..RE.KA..I.I...P.SR..	348
SHIBV	..I.....H...K..T.....A.....T..R...C.SQ..	348
MOKV	..C..DL...T.....E..A.....T..I...C.SQ..	348
LBV	..DL..R..T.....E..M..R...N..I...C.AQ..	348
IRKV	..I..K...S.....Q..R...T...I...R.RE..	348
EBLV1	..L..I..K..K..R.....Q..R...N.....RE..	348
TWBLV	..L.....R.....E.....Q..R...H.....KE..	348
DUUV	..L..I..K...K.....Q.....T.....KE..	348
ARAV	..S...K..E.....I.....VG.....RK..	348
EBLV2	..S.....G..M.....T.....VS.....RN..	348
KHUV	..S.....G.....L.....VT.....RN..	348
BBLV	..S.....G.....L.....VT...I...RN..	348
ABLV	..I..S.....S.....L..RE.VG.....RR..	349
GBLV	..S.....G.....V.....VG.....RK..	348
LLBV	..FI..K..E..NY...PK.....E.....R..V...V.DS..	347
IKOV	..F..K..KS..E...M.PK.....E.....Q..I...V.NF..	347

953

Consensus	FXXLDQLDNIHDLVFVYGCYRHWGHPYIDYRKGLSKLYDQVHXKXIDXX	
RABV	..RV...F.....I..V..KS	399
WCBV	..SVI.R.....M..F..EG	398
SHIBV	..SA...F.....T..F...M..T..KH	398
MOKV	..SM.Q.F.....I.....F...M..T..QQ	398
LBV	..SM.N.FE.....I.....T..F...M..T..KK	398
IRKV	..QTM.L.....T.....V..V..QH	398
EBLV1	..QTM.L.....V..I..RN	398
TWBLV	..QS..L.....V..V..QS	398
DUUV	..QTM.S...V.....R.....L..T..KS	398
ARAV	..RV.....V..V..GD	398
EBLV2	..FV.....V..V..GN	398
KHUV	..RI.....E.....V..V..GD	398
BBLV	..HI.....L..V..KD	398
ABLV	..QV...V.....L.....V..M..GA	399
GBLV	..QV...F.....I..V..GT	398
LLBV	..SQ..RFN.....H.....M..S..TS	397
IKOV	..SK.E.YN.....H.....M..S..SR	397

Consensus

YQECCLASDLAKRILRWGFDKYSKWYLDXXLLXXDHPLXPYIKTQTWPPKH

RABVR.....I.SRF.PR.....T.....	449
WCBV	..KS.....P.ARMRR.....RQ.VS.....	448
SHIBVK.....R....TS..PKN...I..T.....R.	448
MOKV	..R.....RK.....E.....TGVIPK...A..A.....	448
LBVK.....TR..PR...A..A.....	448
IRKVR.....QE..PK...T..V.....	448
EBLV1R.....SN..PG...S..V.....	448
TWBLVV.....R....TH..QN...T..V.....R.	448
DUUVR..V.PN..QN...V..VR.....	448
ARAVAK..TK...T.....	448
EBLV2PK..EK...I..Q.....	448
KHUVSK..APN...T.....	448
BBLVSK..AH...T..V.....	448
ABLVPK..AP...A.....	449
GBLVSK..SK...A.....	448
LLBV	..S.....R.V.....R..V.SRG.PSH..K..S.....	447
IKOV	..S.....K.....V.VKKVPLH..RS..L.....	447

Consensus

IVDXVGDTHWXLPTITQIFELIPESMDPSEILDDKSHSFTRTKLASWLSNR

RABV	..L.....K.....R.....	499
WCBV	..L.....E.....L.S..G..A..	498
SHIBV	V..LL..S..S..M.....R.....	498
MOKV	V..LL..S..T..M.....V.....S..S..H.	498
LBV	..LL..S..L..M.....MY.....K	498
IRKV	V..LI..S..N.....L.....	498
EBLV1	V..M.....S.....R.....	498
TWBLV	V..V..N..N.....R.....	498
DUUV	V..V.....N.....H.	498
ARAV	V..I..N..K.....	498
EBLV2	..I..N..K.....DH.	498
KHUV	..M..N..K.....D.	498
BBLV	..I..N..R.....D.	498
ABLV	..L..N..K.....A.....	499
GBLV	V..L..N..K.....L..V.....	498
LLBV	..MM.....E.....L.....L..NR..I.....GK	497
IKOV	..A..MI..N..E.....L..D.....S..IA.....G.	497

954

Consensus

GGPVPSEKVIITALSRPPVNPREFLKSIDXGGLPDDDLIIGLKPKERELK

RABVK.....L.....E.....	549
WCBVKS.....R.V.AH..DEE.....	548
SHIBVKA.....AV.LN..AE.....	548
MOKVD.....Q.....	548
LBVK.....QD..K.....	548
IRKVR.....V.....	548
EBLV1R.....V.....	548
TWBLVRA..I.....	548
DUUVR.....VS.....	548
ARAVR.....I.....	548
EBLV2L.....	548
KHUVI.....	548
BBLVL.....	548
ABLVK.....L.....	549
GBLV	..I.....L.....	548
LLBVQN..I.....R..DH..DQ.....	547
IKOVQN.....R..DH..DP.....	547

955

956

Consensus	IEGRFFALMSWNLRLYFVITEKLLANYILPLFDALMTDNLNKVFKKLID	
RABV	599
WCBVH.....	598
SHIBVH.....	598
MOKV	.D.....H.I.....	598
LBVH.....	598
IRKV	V.....T.....	598
EBLV1T.....	598
TWBLVT.....	598
DUUVT.....S.....	598
ARAV	598
EBLV2	598
KHUV	598
BBLV	598
ABLV	599
GBLV	598
LLBVSH.I.....S.....	597
IKOVH.I.....S.....	597

Consensus	RVTGQGLXDYSRVTYAFHLDYEKWNHQRLESTKDVFSVLDKVFGLKKVF	
RABVL.....E.....Q.....R..	649
WCBVM.....M.....ER..	648
SHIBVC.....A..SR..	648
MOKVK.....RA..M...	648
LBVR.....A..MSR..	648
IRKVL.....A.....R..	648
EBLV1L.....	648
TWBLVL.....	648
DUUVL.....I.....	648
ARAVL.....Y.....R..	648
EBLV2Q.....Y.....	648
KHUVQ.....Y.....	648
BBLVQ.....H.....R..	648
ABLVQ.....Q.....	649
GBLVL.....QA.....	648
LLBVS.....M..RN..E.....	647
IKOVT.....M..EH..Q.....	647

957

Consensus	SRTHEFFQKSWIYYSDRSDLIGLWXDQIYCLDMSNGPTCWNGQDGGLEGL	
RABVE.....	699
WCBVE.....IAGGN.....TG.....	698
SHIBVV.....I.N.....AD.....	698
MOKVI.K.....TE.....	698
LBVI.K.....A.....	698
IRKVM.K.....	698
EBLV1V.....R.....T.....	698
TWBLVK.....GD.....	698
DUUVR.....	698
ARAVV.....E.....T.....	698
EBLV2V.....E.....D.....	698
KHUVV.....E.....	698
BBLVV.....EG.....	698
ABLVE.....D.....	699
GBLVE.....	698
LLBVE.....V.G.K.C.....E.....D.....	697
IKOVE.....I.GNK.C.....E.....D.....	697

Consensus	RQKGWSLVSLLMIDRESQTRNTRTKILAQQDNQVLCPTYMLSSGLXXEGL	
RABVP..SR...	749
WCBVMI.....I.....V...SQD...	748
SHIBVNN...	748
MOKVE..K.....NN...	748
LBVE.....NN...	748
IRKVTK...	748
EBLV1NK...	748
TWBLVNN...	748
DUUVP..NK...	748
ARAVTQ...	748
EBLV2TQ...	748
KHUVTQ...	748
BBLVTE...	748
ABLVSH...	749
GBLVSH...	748
LLBVI..K.....VV..P..NED...	747
IKOVI.....VV..Q..NED...	747

Consensus	LYELESISRNAXSIYRAIEDGASKLGLIIKKEETMCSYDFLIYGKTLFR	
RABVL.....E.....	799
WCBV	K...N..K..M.....E..GR.....	798
SHIBV	M.....K..M.....E.....	798
MOKV	R...N..K..M.....F.....	798
LBV	M.....K..M.....E.....F.....	798
IRKV	...D.....I.....	798
EBLV1	...D.....I.....	798
TWBLV	...D...K..I.....	798
DUUV	...D.....I.....A.....	798
ARAV	...D.....L.....	798
EBLV2	I...D.....L.....E.....	798
KHUV	...D.....L.....	798
BBLV	...D.....L.....	798
ABLV	...D.....L.....	799
GBLV	...D.....L.....	798
LLBV	R...N...I.....E..G.....F.....	797
IKOV	K...N...L.....E..R.....Y.....	797

Consensus	GNILVPESKRWARVSCISNDQIVNLANIMSTVSTNALTVAQHSQSLIKPM	
RABV	849
WCBV	848
SHIBV	848
MOKVV...	848
LBV	848
IRKVV...	848
EBLV1	848
TWBLV	848
DUUV	848
ARAV	848
EBLV2	848
KHUV	848
BBLV	848
ABLV	849
GBLV	848
LLBVIS.....V..I	847
IKOVIS.....V..I	847

958

959

960

Consensus	RDFLLMSVQAVFHYLLFSPILKDRVYKILXAXGD ⁺ XFLAMSRIIYLDPSL	
RABVG.....S.E..N.....	899
WCBVIY.....N.Q.ED..MS.A.....	898
SHIBVIY.....V.NSK..D..T.....	898
MOKVIY.....I.....V.NSKD.D.....	898
LBVIY.....V.NSK..E.....	898
IRKVV.D.NE.....V.....	898
EBLV1V.D.TE.....	898
TWBLVA.E.TE.....	898
DUUVN.....V.D.TE.....	898
ARAVS.D.E.....	898
EBLV2A.....S.E..N.....	898
KHUVS.D..D.....VF.....	898
BBLVS.G..D.....V.....	898
ABLVA.....G.....S.E..D.....V.....	899
GBLVG.....S.E..D.....	898
LLBVIY.....S.HG.SLS.ERL...A.....	897
IKOVM.....Y.F.....S.HC.NLSHERL...F.....	897

Consensus	GGVSGMSLGRFHIRQFSDPVSEGLSFWKEIW ⁺ XSSE ⁺ XWIHSLCQEAGNPD	
RABVR...L.H.S...A.....	949
WCBVT.....EV..G.....	948
SHIBVT.....L...S..H.....	948
MOKVP.....T.....L...T..H.....	948
LBVT.....L...T..Y.....	948
IRKVA..R...L..N.P.....	948
EBLV1L...S...A.....	948
TWBLVL..N.P.....	948
DUUVR...S...T.....	948
ARAVS...P..Q.....	948
EBLV2A...S...S.....	948
KHUVS...S.....	948
BBLVA...S...A.....	948
ABLVT...S.....	949
GBLVA...S...A.....	948
LLBV	..I.....T.....E...N..LA.....	947
IKOVT.....E.C...E..L.....	947

Consensus	LGDRSLESFTRLLEDPTTLNIRGGASPTILLKEAIRKALYDEVKVNSE	
RABV	..E.T.....K.....D.....	999
WCBVI.....R.....	998
SHIBVR.....	998
MOKVR.....	998
LBVE.....	998
IRKVE.....	998
EBLV1E.....	998
TWBLV	..T.....	998
DUUV	..E.....	998
ARAVE.....	998
EBLV2E.....	998
KHUVE.....	998
BBLVD.....	998
ABLVD.....	999
GBLV	..E.....K.....D.....	998
LLBV	I.E.T.....Q.....S.....	997
IKOV	I.E.T.....Q.....S.....	997

961

Consensus	FREAILLSKTHRDNFILFLKSIEPLFPRFLSELFSSSFLGIPESIIGLIQ	
RABVV.....	1049
WCBV	1048
SHIBVI.....	1048
MOKVI.....	1048
LBVI.....	1048
IRKVV.....	1048
EBLV1R.V.....	1048
TWBLVV.....	1048
DUUVR.V.....	1048
ARAVV.....	1048
EBLV2	1048
KHUVR.....	1048
BBLVR.V.....	1048
ABLV	1049
GBLV	1048
LLBVI.....R.....	1047
IKOVI.....V.Y.R.....	1047

Consensus	NSRTIRRQFRRLSRTLEESFFNSEIHGI X RMTQVPQRIGRVW X CSAERA	
RABVY.....N.....T...V....P..S...	1099
WCBVQS.....K..L..LT.L.....V....R.....	1098
SHIBV	...V...K...A...H...S...S...L...S.....	1098
MOKV	...V...K...K...L...N.V..T...L...T.....	1098
LBV	...V...H...S...T...L...P...K.....	1098
IRKVA.....VN.....A.....	1098
EBLV1S.....S.....S.....	1098
TWBLVA.....S.....K...N.....	1098
DUUVK.....S...Q..S.V...A.K...R.....	1098
ARAVV...N...I...D.....	1098
EBLV2N...V...N.....	1098
KHUVK.....V..N.....P.....	1098
BBLVV..N.....K..A.....	1098
ABLVS...Y...S.....S..S...	1099
GBLVY...N.....S..S...	1098
LLBVK.....YR..LN.LE...TG..V...D..SDK.	1097
IKOVK.....K..YK..LS.LEK.A.MG..V.T..K.....	1097

962

Consensus	DQLREISWGRKVVGTTVPHPSEML X LXPKSSISC X CG X XG X XXNPRISVSV	
RABV	.L.....G.L.R.....T..TT.GE...V....	1149
WCBVK.....N.V...V..N..RINPES.....	1148
SHIBVM.V...V..G.SIRELY.....	1148
MOKVN...T.V...VA.G.YTREVG.....	1148
LBVA..V.I...VA.G.NIREAY.....I	1148
IRKVIA.I.....T.SQS.EA.....	1148
EBLV1A.I.....T..QS.DDS.....	1148
TWBLVVMV.....N..QS.ED.....	1148
DUUVSMI.....T..QLEDD.....	1148
ARAVA..A.L.....T..QT.ENS.....	1148
EBLV2	.L.....G..V.L...V..V.KQT.EDS.....	1148
KHUV	.L.....A.L.....V..QT.EDS.....	1148
BBLV	.L.....A..V.V.R...V.TQT.EDS.....	1148
ABLV	.L.....A.L.....P..LT.SE...V....	1149
GBLV	.L.....SML.....T..SS.GE...V....	1148
LLBV	.R.....S.T...V..G.KISDIK..V....	1147
IKOV	.R.....L.S.T.R...G.RIQDVQK..V....	1147

963

964

Consensus	LPSFDQSF SR GPLKGYLGSSTSMSTQLFHAW E KVTNVHVV K RALS S LKES	
RABV	1199
WCBVN..L.....VT.....I..R.....	1198
SHIBVN.....S.R.....V.....	1198
MOKVP..L.....S.....	1198
LBVH.....V.....	1198
IRKVY.....	1198
EBLV1L.....	1198
TWBLVH..L.....	1198
DUUVT.....	1198
ARAV	1198
EBLV2	1198
KHUV	1198
BBLVR.....	1198
ABLV	1199
GBLVT.....	1198
LLBVCR.D.....V.....R.....	1197
IKOVNR.V.....V.....R.....	1197

Consensus	INWFI X RDSNLAQTLIRNI X SLTGP X FPLEEAPVFKRTGSALHRFKSARY	
RABVT.N.....M.....D.....	1249
WCBVD.....K.I.....L.....D.VI..T.L.....	1248
SHIBVS.....L.....E.I.....	1248
MOKVVS.E...K..G..L...S..I.....	1248
LBVVS.....K..L...T..I.....	1248
IRKVT.....K..V...T.....	1248
EBLV1T.....V...L.....	1248
TWBLVI.....K..M...A..I.....	1248
DUUVS.....H...V...S.....	1248
ARAVV.....K..I...S.....T.....	1248
EBLV2A.....K..T...Q...T.....	1248
KHUVV.....V..K..I...L...T.....	1248
BBLVD.K.....K..I...L...T.....	1248
ABLVS.N.....I...Q.....	1249
GBLVV.....M...D.....	1248
LLBVN.....K...K...E.EI..I.....	1247
IKOVE.....K.I...K...E.EID..I..L.....S..	1247

Consensus	SEGGYSSICPNLLSHISVSTDTMSDLTQDG X NFDFMFQPLMLYAQTWTSE	
RABVV.....K.Y.....	1299
WCBVV.....S.....S.....	1298
SHIBVAV.....T.....	1298
MOKVAV.....T.....	1298
LBVV.....T.....	1298
IRKVT.....	1298
EBLV1E.....T.....	1298
TWBLVM.....T.....	1298
DUUVT.....	1298
ARAVT.....	1298
EBLV2K.....	1298
KHUVE.....K.....	1298
BBLVR.....	1298
ABLVH..R.....	1299
GBLVV.....R.....	1298
LLBVV.....E..HG.L.....S...A..	1297
IKOVV.....E..H..R.....S...A..	1297

965
966

Consensus

LVQKDLRLX DSTFHWHLRCX KCIRPIDDITLEAPQVF X FPDVSKRISRMV

RABV	... R.T..K.....NR.V.....I..TS.I.E.....	1349
WCBV	I..R....R.T.Y.....QR.....E....DS.CC.V...I.N.....	1348
SHIBVR.....Q.....EEVS.....S.A..I.T.....	1348
MOKVF.A.....Q.....EEV..D...L.D..I.S.....	1348
LBVG.K.....K.....EEVS.....S.T..I.T.....	1348
IRKVK.....L.....VI..T...V.....	1348
EBLV1R.....L.....KI.S.....	1348
TWBLVK.....LR.V...VV...N..S.....	1348
DUUVK.....VR.V.....N..S.....R.....	1348
ARAVD.K.....P.....N.....M.....	1348
EBLV2I.R.....L.....D...M.....	1348
KHUVK.....P.....M.....	1348
BBLVI.R.....L.....E.....T.....	1348
ABLVI.K.....P...S..VI.DT...D.....	1349
GBLVT.R.....H.V.....T...A.....	1348
LLBV	I..R..K.R...Y.....HN..I..V..C...D..I.T.....	1347
IKOV	...RN.K.R...Y.....KD.V...VV..C.KI.E..I.T.....	1347

Consensus

SGAVPQF X KLPEIX LKPGX FXXL X GKX KSRHIGTAQGLLYSILVAX HDSG

RABV	...H.Q...D.R...D.ES.S.RE...S.....I...	1399
WCBV	...EVR...VA..A.D.STISPRER.Y.....I..P.	1398
SHIBV	...R...T.E..A.DLSS.TNNER.Y.V.....I..P.	1398
MOKV	...R...VG..A.DLTA.SSSER.Y.....V..P.	1398
LBV	...R...D.E..V.DLMI.SNGER.Y.....I..P.	1398
IRKV	...R...D.T...K.DA.K..E..Q.....T...	1398
EBLV1	...R...G...K.DS.KE.D.....T...	1398
TWBLV	...R...E...K.DT.S..D.....T...	1398
DUUV	...H.Q...S...K.ET.S..DQ.K.....I...	1398
ARAV	...H.Q...N...K.EL.S..D.....V..T...	1398
EBLV2	...Q...N...K.EA.NS.D.....I...	1398
KHUV	...QR...S...K.ES.N..D.....T...	1398
BBLV	...QR...VV...K.ES.N..E.....T..A.	1398
ABLV	...Q...VN...H.ES.C..D.....S.....T..P.	1399
GBLV	...Q...H.RA.H.ES.G..E.....S.....T...	1398
LLBV	...E.K...H.Q..DLNTMTD.S..F.....I..P.	1397
IKOV	...E.K...VS..Q.NLSMMSNED..F.....I..P.	1397

Consensus

YNDGTIFPVNIYGKVS PRDYLRGLARGVLI GSSICFLTRMTNININRPLE

RABV	...S.....S.....	1449
WCBV	...HAL.....SRM..QH.....S.....	1448
SHIBV	...NSL.....A.S.....F.....	1448
MOKV	...NSL.....A.G.....I.....	1448
LBV	...NSL.....I.A.N.....	1448
IRKV	1448
EBLV1	1448
TWBLV	...L.....KR...E.....	1448
DUUV	...V.....KR.....S.....	1448
ARAV	...R.....	1448
EBLV2	...A.....S.I.....S..I.....	1448
KHUVK.....	1448
BBLV	...S.....	1448
ABLV	...I.K.....I.....	1449
GBLV	1448
LLBV	...H.L.....P.L.AKE..L.S..I.....V.....	1447
IKOV	...HS.....SRL..G.....I.....K..V.....	1447

967

968

969

Consensus
 RABV
 WCBV
 SHIBV
 MOKV
 LBV
 IRKV
 EBLV1
 TWBLV
 DUUV
 ARAV
 EBLV2
 KHUV
 BBLV
 ABLV
 GBLV
 LLBV
 IKOV

	LISGVISYILLRLDNHPSLYVMLKEPSLRSEIFSIPQKIPAAAYPTTMKEG	
.....I..R.....G.....	1499
.....K..T.....GM.....	1498
.....E.....	1498
.....K.....I.....E..A.....V.....E.....	1498
.....E.....V.....E.....	1498
.....V.....	1498
.....D.....	1498
.....L.....	1498
.....	1498
.....R.....	1498
.....S.....	1498
.....R.....	1499
.....R.....	1498
.M.....K..S.....M.....SDI.....	1497
.M.....S.....R..LI.....V.....R.....	1497

Consensus
 RABV
 WCBV
 SHIBV
 MOKV
 LBV
 IRKV
 EBLV1
 TWBLV
 DUUV
 ARAV
 EBLV2
 KHUV
 BBLV
 ABLV
 GBLV
 LLBV
 IKOV

	NRSVLCYLQHVLRYERDXITXSPENDWLWIFSDFRSXKMTYLTLLITYQSH	
..I.....EV..A.....S.....	1549
..AI.S...YI...QKEE..R.ESS.L..M.....M.....L.F.T.	1548
.....Q.....SMSS..G..L.....I.....F.A.	1548
.....Q.....SMSFP.G..I.....I.....F.AY	1548
.....Q.....SMSS..GSEL.....I.....A.	1548
.....EA..A.....I.....	1548
.....EA..T.....I.....	1548
.....Q.....EA..A..G.....I.....	1548
.....EA..A..C.....I.....	1548
.....A..A..D.....T.....V.....	1548
.....V..A.....A.....V.....	1548
.....V..A.....T.....V.....	1548
.....M..S..D.....A.....V.....	1548
.....I..S.....M.....	1549
.....EV..A.....NI.....	1548
..AI.S...T...KENLIEGSGKN..V.....S.....F.A.	1547
..A..SH..YT...DK.SLVDGSGSN..V.....S.....T.	1547

970

Consensus
 RABV
 WCBV
 SHIBV
 MOKV
 LBV
 IRKV
 EBLV1
 TWBLV
 DUUV
 ARAV
 EBLV2
 KHUV
 BBLV
 ABLV
 GBLV
 LLBV
 IKOV

	ILLQKIEKNLSKQMRXXLRQLNSLMRQVLGGHGEXXLDSEDIQXLLRDA	
L...RV.R...S..TN...MS.....DT.E..D...R..K.S	1599
.....G.S.....SD..H..T...R...Q..GD...Q..VGR..N.S	1598
LW..R..R.....AK.....ENIE..DE.NS..KE.	1598
LW..RV.R...V.VR.....DTI...DE.LS..KES	1598
LW...V.....AK.....DNVE..DE.HS..KE.	1598
...RV.....VK.....ST.....S...S	1598
...R.DR.....VR.....GT.....G.....	1598
...L..D.G...SK.....NI.E.....G.....	1598
L...DR.....VQ.....GS...AD..HG.....	1598
.....IR...S...R...ET...E...G.....	1598
.....P...IR...S...I...DT...G.....	1598
.....S...IR...S...DS...F.G.....	1598
...L...S...IR...S...DS.E...G.....	1598
.F..R..RS...K..AD..S...DT...G...R.....	1599
...RV.RC...K..AS..MS...ET...R.....	1598
...LRVS...KAD...T...Q..SQSKEIDVD.RI.SE.	1597
L...VG...K.KSD...S...QSDMSMKDVIDID.RVIC..	1597

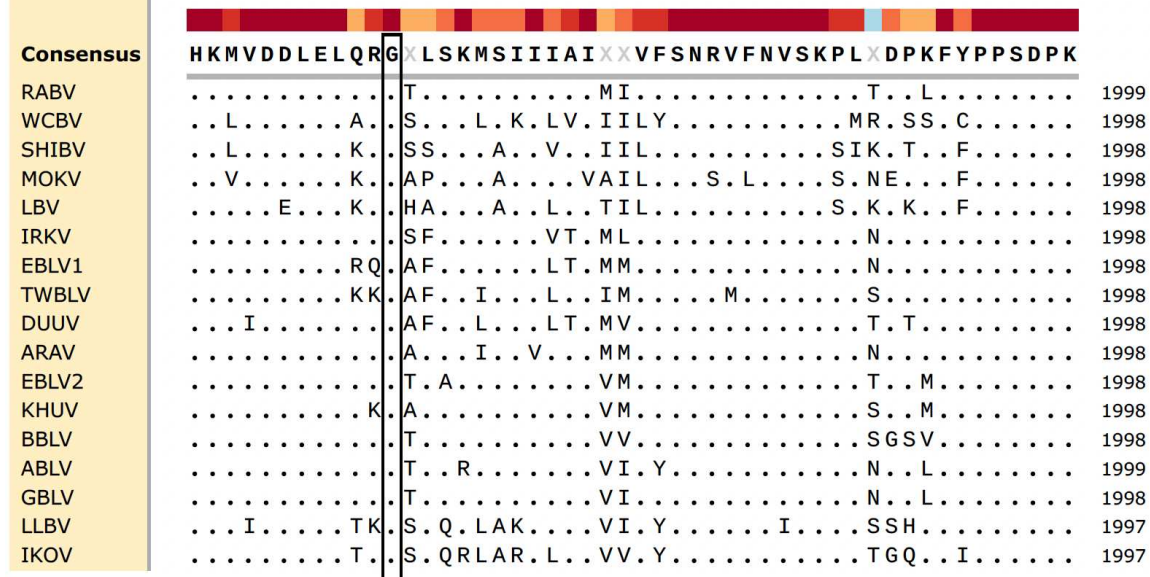
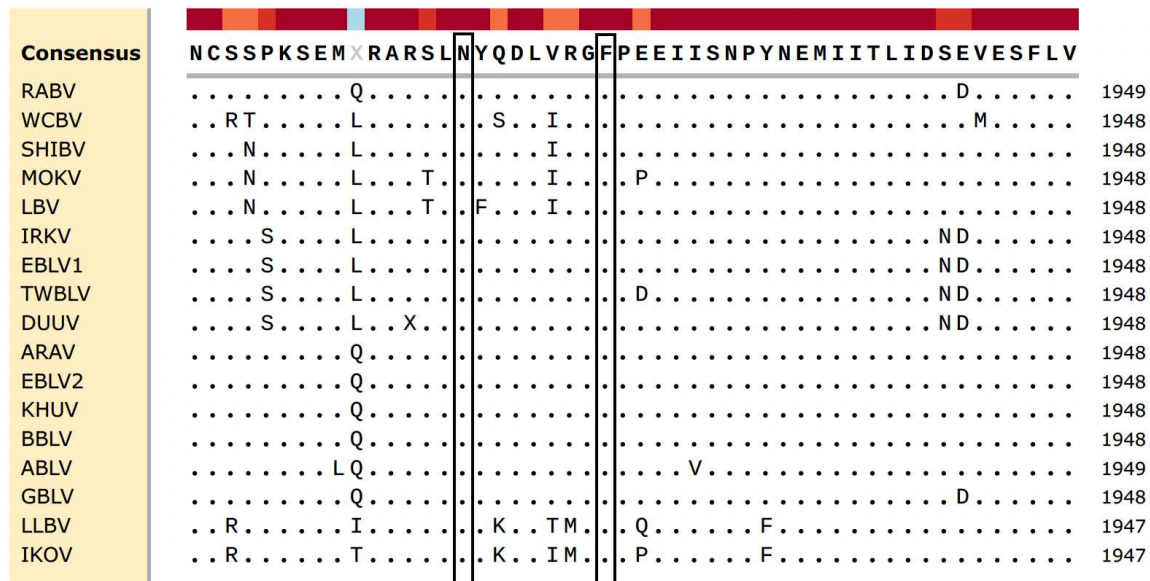
Consensus	LQRTRWVDQEVRRHAAKTMXXDXSPXKKXSRKAGCSEWICSAQQVAISTSS	
RABV	.R.....R..TGGY..N..V.....V.....V...A	1649
WCBV	VR.....SLCKEPL.T..RLCQV..S..L.....	1648
SHIBV	.R.....RP.L..VP.N..I.S.....I.F...L	1648
MOKV	.R.....S.TP.LN.VP.I..RM.S.....I....L	1648
LBV	.R.....EP.LN.APRI...V.S.....I....L	1648
IRKV	.R..K.....TCEY..S..V.....	1648
EBLV1KCEY..S.RV.....V....	1648
TWBLVN.KCEY..SR.T.....R.....	1648
DUUVA.KC.Y..Q.RS...SS.....I....	1648
ARAVSG.H..S.RI.....	1648
EBLV2TG.H..S..V.....	1648
KHUVTG.H..T..V.....G.....	1648
BBLVTG.H..SR.IP..G...V.....	1648
ABLV	I..K.....TN.H..S..T..V.....S....	1649
GBLVR..TG.Y..N.RV.....V.....A	1648
LLBV	IT.VK.....R.LSPCKNSLPTLF.RP.Q.....S.FIT...A	1647
IKOV	IH.VK.I.....ELHRSEDSPPSVF.RSSQ...V..S..L..T..A	1647

Consensus	NPAPXSEXDVRALSRKLQNPPLISGLRVVQWATGAHYKPKPILDDLXXXPX	
RABV	...V..L.I...K.F.....NVF.S	1699
WCBV	..SAYTDM.L.MI..QI.....I.....I..L.QK.DQC.Q	1698
SHIBV	...M.DI.L.L..QF...M.....EVG.S	1698
MOKV	...SA.DI.L.S...QY.....I...N..DVC.C	1698
LBV	...ST.DI.I...QF...M.....I...N..EVC.C	1698
IRKV	...V..M...K.....DFY.T	1698
EBLV1	...I..I.I...K.....N..EAY.T	1698
TWBLV	...HT..I.I.....V.....NE.DSY.T	1698
DUUV	...T..I.I.....NE.DTY.T	1698
ARAV	...T..L...RF.....IDVY.A	1698
EBLV2	...T..M...RF.....N.EAY.S	1698
KHUV	...T..L...F.....ESC.S	1698
BBLV	...M..L.....DAY.S	1698
ABLV	...V..M...T.....C.....N.NTY.S	1699
GBLV	...V..L...T.....NSF.S	1698
LLBV	..SEP.PI..KSV.KR.....I...NT.RFD.K	1697
IKOV	..SHP.PI..K.I.K.....I...NS.QFE.K	1697

Consensus	LCLVVGDGSGGISRXVLSMFPDAKLVFNLSLLEVNDLMASGTHPLPPSALM	
RABVA..N.....I.	1749
WCBV	M.....A..RV...L.....A.....	1748
SHIBV	.S.....T..N..S.....	1748
MOKV	.S..I.....V.....S.....	1748
LBV	FS..I.....V.....S.....	1748
IRKVA.....	1748
EBLV1A.....	1748
TWBLVV..L.....	1748
DUUVA.....S.....V	1748
ARAVV.....S.....IV	1748
EBLV2T.....IV	1748
KHUVT.....R.....S.....I.	1748
BBLVT.....R.....S.....I.	1748
ABLV	F.....T..N.....S.....I.	1749
GBLVA..N.....I.	1748
LLBV	...I.....CI.QF..GTR...Q.....S	1747
IKOV	...I.....CI.QF..GT...QL..M.....S	1747

971

972



976
977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

Supplementary Figure 8: Alignment of amino acids in the L protein of different *Lyssavirus* species and the positions of the studied residues. Black rectangles indicate the position of mutated residues of interest observed in escape mutants. Green rectangles indicate the position of residues interacting with CIM114669 in the three putative binding-sites (see ligplots Figure 3). Burgundy rectangle indicate the position of residues interacting with CIM114116 in the three putative binding-sites (see ligplots Figure S6). Strain THA (RABV) is the reference sequence for this alignment, performed with Clustal Omega. Amino acids identical to the reference sequence are indicated by a dot.

RABV: Rabies Virus 8743THA (GenBank: **EU293111**); WCBV: West Caucasian bat lyssavirus (GenBank: **MZ501949.1**); SHIBV: Shimoni Bat Virus (GenBank: **GU170201.1**); MOKV: Mokola Virus (GenBank: **KF155005.1**); LBV: Lagos Bat Virus (GenBank: **LC717429.1**); IRKV: Irkut Virus (GenBank: **NC_020809.1**); EBLV1: European Bat Lyssavirus 1 (GenBank: **MT374180.1**); TWBLV: Taiwan Bat Lyssavirus (GenBank: **ON437591.1**); DUUV: Duvenhage virus (GenBank: **OU524420.1**); ARAV: Aravan Virus (GenBank: **MZ501949.1**); EBLV2: European Bat Lyssavirus (GenBank: **MG760849.1**); KHUV: Khujand Virus (GenBank: **EF614261.1**); BBLV: Bokeloh Bat Lyssavirus (GenBank: **OU524416.1**); ABLV: Australian Bat Lyssavirus

992 (GenBank: **KJ685548.1**); GBLV: Gannoruwa Bat Lyssavirus (GenBank: **KU244269.2**); LLBV: Lleida Bat
993 Lyssavirus (GenBank: **MG983927.1**); IKOV: Ikoma Lyssavirus (GenBank: **JX193798.1**).

994 **Supplementary Tables**

995

996 **Supplementary Table 1 – List of primers used in the study**

Primer Name	Primer sequence (5' to 3')^a
<i>Primers used to amplify the L gene</i>	
N127	F: ATGTAACACCTCTACAATGG
G3393-AS3	R: CADGGRCCNAGYTTGTCTGGTAT
M220	F: TGGTGTATCAACATGRAYTC
L1	R: GAGTTNAGRRTTGTARTCAGAG
G4836-S3	F: GGRARRGTATATCTTCNTGGGA
L7386-AS3	R: CTRTCBGARTARTADAYCCANGACTT
PVO8	R: GGTCTGATCTRTCWGARYAATA
Taq3long	F: ATGAGAAGTGGAAYAAYCATCA
L9267-S3	F: ATGTTYCAGCCNTTGATGCT
L11872-AS3	R: AAAYAATCAARCARHCAGAGG
<i>Primers used for mutagenesis</i>	
L_F177L-F	CCTCTTATTTGTT <u>G</u> TTCACGTGATTACCC
L_F177L-R	AATATGTATTGGCAAGATACCTCCCG
L_E1893D	TTTTATTCAACTGTAGCAGCCCCAAGAG
L_E1893D	CAAGGCTCAT <u>G</u> TCTCGAAGGGTAGAAG
L_P1485T	GATATTTTCAATA <u>A</u> CCCCAAAAATTCCAGC
L_P1485T	TCTCCTCTAAGAGACGGCTC
L_V1897F	CGAGAGATGAGCCTT <u>T</u> TCTTATTCAACTG
L_V1897F	AAGGGTAGAAGAAGTTAAGTACTCAGCATCTC
P_I222M	GGTCATCAGGGAT <u>G</u> TTCCTGTACAATTTGAG
P_I222M	GGGATGGGA <u>A</u> CTTGTATTTCTTGGAAAAGC

997 ^a F: Forward; R: reverse

998 **Supplementary Table 2 - Mutations recovered in the genome of escape mutants against 7671954**
 999 **compound using NGS analysis.**

Gene	Positions		Non-treated	7671954
	Nucleic base	Amino Acid	Mutation frequency	Mutation frequency
P	A2180G	I222M	0.2 %	4.5 %
M	A2794C	D100A	21.5 %	20.4 %
M	C3051T	L186F	23.0 %	21.8 %
G	C3782A	P156Q	5.2 %	4.0 %
G	G3983A	S223N	0.2 %	11.5 %
G	T4820C	V502A	22 %	4.1 %
L	T5935C	F177L	0.1 %	11.6 %
L	G6070T	V222L	42.5 %	25.5 %
L	A7556G	Q717R	0.1 %	11 %
L	T7853C	I816T	1.5 %	4.8 %
L	T8141C	I912T	0.2 %	7.4 %
L	C8517A	F1037L	0.2 %	10.9 %
L	A9159C	E1251D	0.2 %	13.0 %
L	C9859A	P1485T	0.3 %	12.5 %
L	G11085T	E1893D	< 0.1 %	19.1 %
L	G11095T	V1897F	< 0.1 %	21.7 %

1000 An arbitrary cut-off frequency of 4 % was used to validate variants as significantly different from the
 1001 control. The reference sequence used for the analysis was the one of 8743THA (EVAg collection, Ref-
 1002 SKU: 014V-02106). The amino acid position indicated are given according to the first amino acid of the
 1003 corresponding open reading frame. In bold are indicated the mutations that are the most investigated.
 1004 Highlighted in grey : mutation found in the genome of non-treated viruses.

1007 **Supplementary Table 3 - Percentage of clones with specific mutation, obtained by cloning the L gene**
 1008 **of 7671954 escape mutants.**

Specific mutations position	Number of clones	Percentage of clones
No mutation	11/83	13.2 %
V1897F	20/83	24.1 %
P1485T	9/83	10.8 %
F177L	6/83	7.2 %
E1893D	2/83	2.4 %
F177L + E1893D	11/83	13.3 %
P1485T + E1893D	1/83	1.2 %
E1893D + V1897F	2/83	2.4 %
Q717R + F1037L + E1251D	9/83	10.8 %

1009 The sequence were obtained by Sanger technic. The reference sequence used for the analysis was the
 1010 one of 8743THA (EVAg collection, Ref-SKU: 014V-02106).

1011
 1012
 1013
 1014

1015 **Supplementary Table 4 – IC₅₀ values of Tha-eGFP and recombinant virus obtained with a dose**
 1016 **response curve at 48 h post-infection.**

Recombinant virus	IC ₅₀ (μM)	
	CIM114116	CIM114669
Tha-eGFP	0.3996	0.07787
Tha-eGFP_L-P1485T	0.6195	0.1616
Tha-eGFP_L-E1893D	1.841	0.6574
Tha-eGFP_L-V1897F	0.3996	0.1939
Tha-eGFP_P-I222M	0.3875	0.06339
Tha-eGFP_P-I222M_L-P1485T	0.4696	0.09171
Tha-eGFP_P-I222M_L-E1893D	0.968	0.2012
Tha-eGFP_P-I222M_L-V1897F	0.7909	0.1599

1017 IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
 1018
 1019

1020 **Supplementary Table 5 – Mutations recovered in the genome of viruses after 5 passages of selection**
 1021 **using NGS.**

Position		CIM114116		CIM114669			
Nucleic base	Amino acid	3 x IC ₅₀	5 x IC ₅₀	3 x IC ₅₀	5 x IC ₅₀	7 x IC ₅₀	10 x IC ₅₀
A6665T	K12N						3.9 %
G7542A	G455R			3.5 %			
A7584G	I469V			10.9 %			
A7804G	K542R	2.6 %	4.70 %				5.5 %
T8142C	F655L				10.3 %		
T8659C	I827T			14.5 %			2.3 %
T8874G	L899V	2.7 %					
T10326G	S1383A			3.7 %			
T10740A	S1521T			4.3 %			
T10828G	L1550R	2.1 %	3.7 %				
T11924G	N1915K	3.2 %	10.6 %	2.6 %	2 %	5.5 %	2.3 %
T11946C	F1923L	14.7 %	10.3 %	3.8 %	5.1 %	2.6 %	2.8 %
G12061A	G1961E		2.7 %	2.1 %	2.3 %		2.1 %
C12064A	T1962N		2.6 %				

1022 The sequencing was performed using NGS. The reference sequence used for the analysis was the one
 1023 of 8743THA (EVAg collection, Ref-SKU: 014V-02106).
 1024
 1025
 1026
 1027
 1028
 1029
 1030
 1031
 1032
 1033

1034 **Supplementary Table 6 – Table of pharmacokinetic and brain distribution of CIM114116 and**
 1035 **CIM114669**

Parameters	Single Dose IP PK and BD Study of CIM114669 in Male BALB/c Mice (20 mg/kg b.w.)		Single Dose IP PK and BD Study of CIM114116 in Male BALB/c Mice (20 mg/kg b.w.)	
	Mean Plasma PK Parameters of CIM114669	Mean Brain PK Parameters of CIM114669	Mean Plasma PK Parameters of CIM114116	Mean Brain PK Parameters of CIM114116
EC₅₀ (ng/mL)	108 / (0.22 μM)		137 / (0.33 μM)	
Route of administration	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Intraperitoneal
Dose (mg/kg b.w.)	20	20	20	20
C_{max} (ng/mL)	950.83	220.65	2273.8	2335.11
T_{max} (h)	0.08	1	0.16	0.16
AUC_{last} (h*ng/mL)	2799.39	515.76	918.28	814.68
AUC_{extrap} (%)	5.87	24.56	3.05	3.28
T_{1/2} (h)	7.94	2.27	2.27	0.21
MRT_{last} (h)	4.12	1.44	0.57	0.29
B/P	0.18		0.88	

1036 IP: Intraperitoneal; PK: Pharmacokinetics; BD: Brain Distribution; b. w.: body weight; EC50: Half
 1037 maximal effective concentration; AUC: Area Under the Curve; MRT: Mean Residence Time; T_{1/2}: Half-
 1038 life; B/P: (Brain (AUC_{last})/Plasma (AUC_{last})).

Partie 2

Partie 2

Implication des récepteurs cholinergiques et purinergiques dans l'immunomodulation de la réponse de l'hôte par l'ivermectine lors de l'infection par le SARS-CoV-2

Le laboratoire a montré précédemment que des doses standards d'IVM, un médicament antiparasitaire ayant des activités immunomodulatrices de l'hôte (Heidary and Gharebaghi, 2020; Patil, Verma and Masand, 2022), prévenaient la détérioration clinique, réduisaient le déficit olfactif et limitaient l'inflammation des voies respiratoires supérieures et inférieures chez les hamsters infectés par le SARS-CoV-2 (de Melo, Lazarini, Larrous, et al., 2021). L'une des hypothèses proposées quant à la modulation de l'inflammation par l'IVM serait l'implication des récepteurs cholinergiques nAChR- $\alpha 7$, même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore établis (Krause et al., 1998; Pavlov and Tracey, 2012; Laing, Gillan and Devaney, 2017).

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai démontré l'implication des nAChR- $\alpha 7$ dans la modulation de la réponse inflammatoire chez le hamster doré. En effet, en combinant l'IVM avec des antagonistes de ce récepteur, la mécamylamine ou la méthyllycaconitine (MLA), les animaux infectés présentent des signes cliniques sévères alors qu'à l'inverse, des animaux traités avec d'autres agonistes de ces récepteurs présentent des formes moins sévères proche de ce qui a été observé avec l'IVM. Ces résultats ont été partiellement confirmés en modèle monocellulaire de Vero E6 (cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique permissives au SARS-CoV-2) dans lequel nous avons montré que l'IVM avait un mode d'action conservé sur plusieurs variants du SARS-CoV-2 sans toutefois que l'effet protecteur de l'IVM ne soit totalement inhibé par l'action de l'antagoniste des nAChR- $\alpha 7$, la MLA.

L'IVM n'est pas exclusivement un PAM des nAChR- $\alpha 7$, mais est également un PAM des récepteurs purinergiques P2X4 et P2X7 (Priel et Silberberg, 2004 ; Sattelle et al., 2009 ; Illes et al., 2021). Nous avons utilisé un modèle cellulaire plus complexe de co-culture en système « transwell », où deux lignées cellulaires humaines, A549-ACE2-TMPRSS2 et THP-1, ont été cultivées sans contact direct mais avec un échange au travers du milieu de culture. Les cellules épithéliales basales alvéolaires A549-ACE2-TMPRSS2, surexprimant le récepteur d'entrée du SARS-CoV-2, ACE2 ainsi que la protéase TMPRSS2, ont ainsi été infectées en présence des cellules de monocytes THP-1 prédifférenciées en macrophages. Nous avons ainsi montré que l'IVM permettait la mise en place précoce de la modulation de la réponse de l'hôte à la fois dans les cellules infectées (A549-ACE2-TMPRSS2) mais aussi dans les macrophages (THP-1)

lors d'une infection par le SARS-CoV-2. Lors de cette modulation, l'IVM agit à la fois sur les récepteurs cholinergiques nAChR α 7 et sur les récepteurs purinergiques P2X4 pour contrecarrer l'effet de l'infection par le SARS-CoV-2. CXCL5 et CXCL10 semblent être les chimiokines clefs de cette modulation en permettant un contrôle précoce de l'inflammation par les cellules macrophagiques dans le contexte de l'infection par le SARS-CoV-2.

Ces résultats sont présentés ci-après dans un projet d'article intitulé « *Host response against SARS-COV-2 infection is impacted by allosteric modulator of cholinergic and purinergic receptors* ».

19 **Abstract**

20 The COVID-19 pandemic, which caused nearly seven million deaths since its beginning, leads
21 to a large spectrum of clinical profiles. During SARS-CoV-2 infection, patients can experience an up-
22 regulation of multiple pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, CXCL10, CXCL1, CXCL2 and CXCL5.
23 Previously, we and others have shown that ivermectin (IVM) plays an immunomodulatory role in a
24 hamster model, such as a down-regulation of *Il6/Il10* ratio in lungs, probably explaining the more
25 favourable clinical presentation of treated animals. However, the mechanisms of action of this drug
26 are still unknown. Since IVM is a known positive allosteric modulator of cholinergic receptor, $\alpha 7$ nAChR,
27 and purinergic receptors, P2X4 and P2X7, we investigated the role of those receptors on the
28 modulation of host inflammation observed during IVM treatment. This research was conducted with
29 a hamster model, but also by using various *in vitro* models involving on the one hand Vero E6 cells, and
30 on the other hand human co-cultured of A549-ACE2-TMPRSS2 and THP-1 cells. Combined with high-
31 throughput confocal microscopy, and transcriptomic analysis, these models helped us to demonstrate
32 that the cholinergic and purinergic receptors are involved in the IVM mechanism of action during SARS-
33 CoV-2 infection. These receptors modulate the immune host response with an interplay between cells,
34 which involves a complex dynamic multi-receptor and multi-cytokine mechanism with a more specific
35 role of the modulation of *CXCL10* and *CXCL5* expression.

36

37 **Keywords:**

38 SARS-CoV-2 - $\alpha 7$ nAChR – Purinergic receptors – Immunomodulation – Cells interplay - Hamster model
39 – Transwell

40 Introduction

41 The COVID-19 pandemic, which emerged in December 2019 and is still ongoing, caused nearly
42 800 millions cases worldwide, including almost seven million deaths, since the beginning (WHO,
43 2023b). Once infected, patients can present different clinical profiles, ranging from asymptomatic to
44 severe and even fatal forms. The most common symptoms are not specific to the disease and belong
45 to those of the flu-like syndrome (fever, sore throat, cough, headache, myalgia and asthenia) (WHO,
46 2023a). Some patients with mild symptoms may also experience neurological symptoms such as
47 dizziness, ageusia and anosmia (Chou *et al.*, 2021; de Melo, Lazarini, Levallois, *et al.*, 2021; Klimek *et*
48 *al.*, 2022). During SARS-CoV-2 infection, an up-regulation of multiple pro-inflammatory cytokine (IL-6,
49 CXCL10, CXCL1, CXCL2 and CXCL5) was observed (Khalil, Elemam and Maghazachi, 2021), in which
50 CXCL10 is involved in monocyte stimulation and macrophage chemoattraction (Pandey *et al.*, 2021),
51 and CXCL5 in neutrophil chemotaxis (Koltsova and Ley, 2010).

52 Ivermectin (IVM), an anthelmintic drug, has antiviral and host immunomodulating properties
53 in animals and humans (Patil, Verma and Masand, 2022). We and other have also shown that during
54 SARS-CoV-2 infection, IVM plays an immunomodulatory role, as observed in a hamster model, where
55 the *Il6/Il10* ratio was considerably reduced in lung tissue, probably explaining the more favourable
56 clinical presentation of treated animals (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021). More recently,
57 prophylactic treatment with IVM in a hamster model resulted in a reduction in clinical signs and
58 inflammation (Uematsu *et al.*, 2023). Although IVM underlying mechanism are still unknown (Laing,
59 Gillan and Devaney, 2017), it may involve the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR). $\alpha 7$ nAChR
60 are known to be involved in anti-inflammatory responses, through a reduction of pro-inflammatory
61 cytokines, chemokines and activation of immune cells (Ren *et al.*, 2017).

62 Ivermectin is a type I positive allosteric modulator (PAM) of $\alpha 7$ nAChR (Krause *et al.*, 1998;
63 Sattelle *et al.*, 2009). A type I PAM binds to the allosteric site of the receptor distinct from the
64 orthosteric site, which recognizes the endogenous agonist. A type I PAM can potentiate the receptor
65 response when applied at the same time as agonists, but doesn't slow desensitization, contrary to type
66 II PAM (Grønlien *et al.*, 2007). A desensitized state is associated with channel closure and a decline in
67 the conductance response to the agonist (Cecchini and Changeux, 2022). Another class of PAM are ago-
68 PAM, which can activate the receptor by binding the allosteric site, with or without a bound orthosteric
69 ligand, and can slow desensitization (Brems *et al.*, 2023).

70 Beside, IVM is also a positive allosteric modulator of purinergic receptors P2X4 receptors,
71 facilitating the opening and retarding the closing of the channel in the 100 nM to 3 μ M range (Priel and
72 Silberberg, 2004) and of P2X7 receptors (human, but not rat and mouse), at a similar concentration (3
73 μ M) (Nörenberg *et al.*, 2012).

74 These receptors are activated by extracellular ATP (Surprenant and North, 2009; Illes *et al.*,
75 2021), which can be released by dying cells or lysed cells. In response to the ATP signal, purinergic
76 receptors can consolidate the inflammatory response (Di Virgilio, Sarti and Coutinho-Silva, 2020) and
77 could play a role during SARS-CoV-2 infection. Indeed, to control the inflammation induced by SARS-
78 CoV-2, drugs with inhibitory effects on purinergic receptors are tested, such as lidocaine, an antagonist
79 of P2X7 receptor, or fluoxetine and paroxetine, antidepressants which are P2X4 inhibitors (Zarei, Sahebi
80 Vaighan and Ziai, 2021). Moreover, P2X4 and P2X7 are co-expressed on epithelial, immune and
81 inflammatory cells (Schneider *et al.*, 2017). There are conflicting reports of functional interaction
82 between P2X4 and P2X7 subunits. Currently, despite efforts to determine whether P2X4 and P2X7
83 interact as heterotrimers or homotrimers, there is no definitive evidence in favour of either model
84 (Kanellopoulos *et al.*, 2021). However, several publications showed that functional interactions
85 between P2X4 and P2X7 occurs (Kawano *et al.*, 2012; Sakaki *et al.*, 2013; Zech *et al.*, 2016).

86 Although IVM use in human was never formally proved nor recommended, with clinical studies
87 finding a beneficial effect and others none (Chaccour *et al.*, 2021; Marcolino *et al.*, 2022; Reis *et al.*,
88 2022), the effects in hamsters could easily be explored to understand its mechanism of action.
89 Moreover, it was shown that $\alpha 7$ nAChR, P2X4 or P2X7 receptors can collaborate in rats or mice, through
90 interaction or through Panx1 canals (Patti *et al.*, 2006; Maldifassi *et al.*, 2021; Bono *et al.*, 2023). Those
91 receptors could be involved in SARS-CoV-2 infection (Alves *et al.*, 2023)

92 In this study, we wanted to understand the implication of $\alpha 7$ nAChR in IVM's modulation of the
93 host response during SARS-CoV-2 infection, but also to understand if other receptors were involved.
94 We have confirmed that $\alpha 7$ nAChR are involved in the mechanisms of actions of IVM in the hamster
95 model and *in vitro*. By using two *in vitro* models, with high-throughput confocal microscopy and
96 transcriptomic analysis, we have also found that purinergic receptors P2X4 could play a role in the
97 SARS-CoV-2 infection. Finally, the transcriptomic analysis demonstrated that IVM's immunomodulation
98 is mostly achieved through CXCL10 and CXCL5 pathways and involves a dynamic interplay of cells.

99

100

101 **Material and methods**

102 **Ethics**

103 All animal experiments were performed according to the French legislation and in compliance with the
104 European Communities Council Directives (2010/63/UE, French Law 2013–118, February 6, 2013) and
105 according to the regulations of Institut Pasteur Animal Care Committees. This study (200023;
106 APAFIS#25326-2020050617114340 v2) was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee
107 (CETEA 89) of the Institut Pasteur before experiments were initiated. Hamsters were housed by groups
108 of 4 animals in isolators and manipulated in class III safety cabinets in the Pasteur Institute animal

109 facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents.
110 All animals were handled in strict accordance with good animal practice.

111

112 **Cells**

113 The Vero E6 cells (ATCC #CRL-1586) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,
114 #31966021, Gibco™) medium supplemented with 5 % fetal bovine serum. These cells were used for
115 viral stock production, titration, and infection experiments.

116 The A549-ACE2-TMPRSS2 cells (supplied by the Virus and Immunity Unit hosted by Institut Pasteur and
117 headed by Pr. Olivier Schwartz), overexpressing ACE2 and TMPRSS2, were grown in Ham's F-12K (Kaign)
118 medium (#21127022, Gibco™) supplemented with 10 % fetal bovine serum and 1µg/mL of blasticidine
119 (#A1113903, Gibco™), to select cells expressing ACE2 and TMPRSS2.

120 The THP1 cells (provided by Dr G. Barba-Spaeth, Institut Pasteur) were cultivated in RPMI 1640 medium
121 (Roswell Park Memorial Institute, #21875091, Gibco™) supplemented with 10 % fetal bovine serum.
122 These cells, like the A549-ACE2-TMPRSS2 cells, were used in a co-culture system to study the role of
123 α 7AChRs and P2X receptors.

124 Cells were cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂. All cell lines were passed twice a
125 week.

126

127 **SARS-CoV-2 virus and variants**

128 The isolate BetaCoV/France/IDF00372/2020 (EVAg collection, Ref-SKU: 014V-03890) was kindly
129 provided by Sylvie van der Werf. Alpha/B.1.1.7/IDF-IPP00078/2021 (GISAID ID: EPI_ISL_735391),
130 Beta/B.1.351 (GISAID ID: EPI_ISL_964916) and Delta/B1.617.2 (GISAID ID: EPI_ISL_2029113) variants
131 were supplied by the Virus and Immunity Unit hosted by Institut Pasteur and headed by Olivier
132 Schwartz (Planas, Bruel, *et al.*, 2021; Planas, Veyer, *et al.*, 2021). Viral stocks were produced on Vero
133 E6 cells infected at a multiplicity of infection of 1×10^{-4} PFU/cell. The virus was harvested three days
134 post-infection, clarified and then aliquoted before storage at -80 °C. Viral stocks were titrated on Vero
135 E6 cells by classical plaque assays using semisolid overlays (Avicel, RC581-NFDR080I, DuPont) (Baer and
136 Kehn-Hall, 2014).

137 Wuhan_nLuc recombinant virus expressing Nanoluciferase (nLuc) as a reporter gene was obtained by
138 reverse genetics as previously described (de Melo *et al.*, 2023).

139

140 **SARS-CoV-2 model in Syrian hamsters**

141 Male golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*; RjHan:AURA) of 5-6 weeks of age (average weight
142 60-80 grams) were purchased from Janvier Laboratories and handled under specific pathogen-free
143 conditions. Before any manipulation, animals underwent an acclimation period of one week. The

144 animals were housed and manipulated in isolators in a biosafety level-3 facility, with *ad libitum* access
145 to water and food. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 200 mg/kg ketamine
146 (Imalgène 1000, Merial) and 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer).
147 100 µL of physiological solution containing 6×10^4 PFU of SARS-CoV-2 (Wuhan) was administered
148 intranasally to each animal (50 µL/nostril). Mock-infected animals received the physiological solution
149 only. Infected and mock-infected hamsters were housed in separate isolators and were followed-up
150 daily during four days at which the body weight and the clinical score were noted. The clinical score
151 was based on a cumulative 0-4 scale: ruffled fur, slow movements, apathy, absence of exploration
152 activity. At day 3 post-infection (dpi), animals underwent a food finding test to assess olfaction as
153 previously described (Lazarini *et al.*, 2012; de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021; de Melo *et al.*, 2023).
154 Briefly, 24 hours before testing, hamsters were fasted and then individually placed into a fresh cage (37
155 x 29 x 18 cm) with clean standard bedding for ten minutes. Subsequently, hamsters were placed in
156 another similar cage for two minutes when about five pieces of cereals were hidden in 1.5 cm bedding
157 in a corner of the test cage. The tested hamsters were then placed in the opposite corner and the
158 latency to find the food (defined as the time to locate cereals and start digging) was recorded using a
159 chronometer. The test was carried out during a 15 min period. As soon as food was uncovered,
160 hamsters were removed from the cage. The tests were realized in isolators in a Biosafety level-3 facility
161 that were specially equipped for that. At four dpi, animals were euthanized with an excess of
162 anesthetics (ketamine and xylazine) and exsanguination (AVMA, 2020).

163

164 **Modulators of cholinergic and purinergic receptors**

165 Ivermectin (I8898, Sigma-Aldrich), a PAM for $\alpha 7$ nAChR, P2X4 and P2X7, was used *in vivo* (one single
166 subcutaneous injection) at the classical anti-parasitic dose of 400 µg/kg (Beco, Petite and Olivry, 2001)
167 simultaneously with infection and *in vitro* at a dose of 0.625 µM, 1.25 µM, 2.25 µM and 5 µM.
168 Mecamylamine (M9020, Sigma-Aldrich), a non-competitive $\alpha 7$ nAChR antagonist, was used *in vivo* (one
169 single intraperitoneal injection) at a dose of 1 mg/kg and *in vitro* at a dose of 8 µM, 16 µM and 32 µM.
170 Methyllaconitine (M168, Sigma-Aldrich), a competitive $\alpha 7$ nAChR antagonist, was used *in vivo* (one
171 single intraperitoneal injection) at a dose of 1 mg/kg and *in vitro* at a dose of 0.1 µM, 1 µM and 10 µM.
172 GAT-107 (2621, Axon Medchem), an ago-PAM of $\alpha 7$ nAChR, was used *in vivo* (one single intraperitoneal
173 injection) at a dose of 0.08 mg/kg, 0.4 mg/kg, 2 mg/kg, 10 mg/kg and *in vitro* at a dose of 6.25 µM,
174 12.5 µM and 25 µM. EVP-6124 or Encenicline (HY-15430A/CS, MedChemExpress), an orthosteric
175 agonist of $\alpha 7$ nAChR, was used *in vivo* (one single intraperitoneal injection) at a dose of 400 µg/kg and
176 *in vitro* at a dose of 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM. BX430 (SML1701, Sigma-Aldrich), an antagonist of P2X4,
177 was used *in vitro* at a dose of 5µM. A438079 (A9736, Sigma-Aldrich), an antagonist of P2X7, was used
178 *in vitro* at a dose of 10µM.

179 For the *in vivo* injection, the vehicle used was physiological saline (0.9 % sodium chloride), except for
180 GAT-107, which was diluted in a vehicle composed of 1: 1: 18 [1 volume ethanol / 1 volume Brij98
181 (#347181000, Thermofisher) / 18 volumes of physiological saline].

182

183 **SARS-CoV-2 inhibition assay using Opera Phenix High-Content Screening System**

184 Vero E6 cells were seeded in 96-well plates (655090, Greiner) in DMEM + 5 % SVF and incubated
185 overnight at 37 °C and 5 % CO₂. 50 µL/well of virus were inoculated for 1 h at a multiplicity of infection
186 (MOI) of 0.1. Then, the inoculum was removed and replaced by medium containing various
187 concentrations of α7nAChRs modulators, prepared the same day. After 56 h or 72 h incubation at 37
188 °C and 5 % CO₂, the plates were fixed with 4 % PFA for 30 min at room temperature, then washed with
189 PBS. The cells were then permeabilised for 10 min with 0.5 % Triton X-100 and washed with PBS. To
190 saturate non-specific sites, cells were incubated for 30 min with PBS + 5 % Normal Goat Serum
191 (#10000C, Thermofisher). The SARS-CoV-2 nucleoprotein was labelled overnight at 4 °C with rabbit anti-
192 SARS-CoV-2 Nucleocapsid primary antibody (#GTX135356, Clinisciences). After PBS washing, nuclei
193 were labelled with Hoeschst 33342 (#62249, Thermofisher) for 15 min. Following a final wash, data
194 was acquired using the OPERA Phenix High-Content Screening System to determine the number of cells
195 per well and the percentage of infected cells.

196

197 **Co-culture *in vitro* model using Transwell**

198 THP1 cells were seeded at the bottom of a Transwell plate (#3401, Costar) in RPMI medium + 10 % SVF,
199 in the presence of 100 ng/mL PMA (P1585, Sigma-Aldrich), to differentiate them into macrophages.
200 A549-ACE2-TMPRSS2 cells were seeded in the Transwell inserts, in FK12 Nut Mix + 10 % SVF medium.
201 After 24 h incubation, the medium was removed from the wells and inserts. 900 µL of RPMI medium +
202 10 % SVF was added to THP1 cells and 450 µL to uninfected A549-ACE2-TMPRSS2 cells; 250 µL of nLuc
203 inoculate was added at a MOI of 0.1. After 1 h incubation at 37 °C and 5 % CO₂, the inoculate was
204 removed and 450 µL of RPMI medium + 10 % SVF was added to the inserts containing A549-ACE2-
205 TMPRSS2 cells. Finally, RPMI medium containing various concentrations of α7nAChRs modulators or
206 P2X receptor antagonists, prepared the same day, was added to the wells containing THP1 cells (100
207 µL) and to the inserts containing A549-ACE2-TMPRSS2 cells (50 µL). Infected cells were cultured for 24,
208 48 or 72 h depending of the experiments.

209

210 **Intracellular ATP measurements**

211 In the previous transwell culture, the intracellular ATP was measured at 72 h post-infection (pi), in A549-
212 ACE2-TMPRSS2 cells. The cells were lysed following the protocol of the ATPlite kit (6016941,

213 PerkinElmer), ATP luminescence was measured in white-bottomed 96-well plates (655083, Greiner),
214 using the VICTOR Nivo plate reader (Perkin Elmer).

215

216 **Quantification of the infection in the transwell cultures**

217 The infection by Wuhan_nLuc was quantified by measuring nanoluciferase (nLuc) excreted in the
218 culture medium for each part of the transwell. Twenty microliters of supernatant were mixed with same
219 volume of nLuc substrate as indicated by the manufacturer (#N1110, Promega). nLuc measurement
220 was performed in white-bottomed 96-well plates (655083, Greiner) using the VICTOR Nivo plate reader
221 (Perkin Elmer).

222

223 **Transcriptomic analysis in transwell cultures**

224 Transcriptomic analysis was performed on THP-1 cells only after 72 h of infection and on both THP-1
225 and A549-ACE2-TMPRSS2 after 24- and 48-hours post-infection (hpi). The cells were lysed using RLT
226 buffer (74104, Qiagen) at 72 hpi and the two types of cells were also lysed at 24 hpi and 48 hpi. RNA
227 extraction was carried out using RNA esay kit (74104, Qiagen).

228 Samples were submitted to RT-qPCR. Briefly, RNA was reverse transcribed to first strand cDNA using
229 the SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix (11766050, Invitrogen). qPCR was performed in a final volume
230 of 10 µL per reaction in 384-well PCR plates using a thermocycler (QuantStudio 6 Flex, Applied
231 Biosystems). In brief, 2.5 µL of cDNA (12.5 ng) were added to 7.5 µL of a master mix containing 5 µL of
232 Taqman (11732-020, Applied Biosystems) and 2.5 µL of nuclease-free water containing primer pairs
233 (Table S1). The amplification conditions were as followed: 95 °C for 10 min, 45 cycles of 95 °C for 15 s
234 and 60°C for 1 min; followed by a melt curve, from 60 °C to 95 °C. The *GAPDH* and the *18S* genes were
235 used as reference. Variations in gene expression were calculated as the n-fold change in expression in
236 the tissues from the infected hamsters compared with the tissues of the mock-infected group using the
237 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Pfaffl, 2001).

238

239 **Statistics**

240 Statistical tests were carried out using Prism software (GraphPad Prism, version 10, San Diego, USA),
241 with $p < 0.05$ considered significant. Quantitative data was compared across groups using Kruskal-
242 Wallis followed by the Dunn's multiple comparisons test and Mann-Whitney. Randomization and
243 blinding were not possible due to pre-defined housing conditions (separated isolators between
244 infected and non-infected animals).

245

246

247

248 **Results and Discussion**

249

250 **α 7nAChRs are involved in the modulation of clinical signs in SARS-CoV-2 infected hamsters treated**
251 **with IVM**

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

In agreement with what we have previously demonstrated (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021), IVM strongly reduced the clinical score, the pathology and the manifestation of anosmia in SARS-CoV-2 infected hamsters (Figure 1A, 1C and S1). Following the nicotinic hypothesis (Changeux *et al.*, 2020) and the possible modulation of cholinergic anti-inflammatory pathway by the nicotinic receptors (Mehranfard and Speth, 2022), we sought to determine if IVM modulates hamster's clinical presentation via α 7nAChR. To that aim, we used two different α 7nAChR antagonists: mecamylamine (Meca), a non-competitive α 7nAChR antagonist, and methyllycaconitine (MLA), a competitive α 7nAChR antagonist, highly selective for α 7nAChR, contrary to mecamylamine. When administered concomitant to IVM, the efficiency of IVM is abolished and the animals manifested significantly more severe clinical signs (Figure 1A), and olfactory impairment (37.5 % of dysfunction with IVM vs 75 % and 62.5 % with the IVM and the two antagonists) (Figure 1C). The only exception concerns lung pathology which is not significantly downregulated with IVM (Figure 1B).

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

IVM is a type I PAM, which potentiates α 7nAChRs without modifying the desensitization kinetics (Collins and Millar, 2010). In order to better understand the role of activation of α 7nAChRs, we used the Nicotinic Acetylcholine Receptor Allosteric Ligand Library (ACRALL) (Cecchini, Brando and Changeux, 2023) to select other types of α 7nAChR modulators, including, an ago-PAM, GAT-107 (GAT) (Brems *et al.*, 2023) and an competitive agonist, EVP-6124 (EVP) (Zhao *et al.*, 2021). Competitive agonists bind to the orthosteric sites of the receptor, while ago-PAMs activate the receptor by binding to a topographically distinct allosteric site, with or without a bound ligand at the orthosteric site and can slow down desensitization (Brems *et al.*, 2023). While the median clinical scores were respectively 1 and 2 with IVM and GAT, EVP did not induce the same reduction with a median clinical score of 4, like for the non-treated hamsters (Figure 1D). The LW/BW ratio of hamsters treated with GAT presented a significantly lower ratio compared to the non-treated ones. IVM and EVP followed the same tendency (Figure 1E). In terms of olfactory performance, IVM and GAT induced a reduction in the olfactory dysfunction (37.5 % and 11.1 % vs 68.8 % in the non-treated animals). The effect of EVP is also considerably less pronounced for the olfactory performance, where 62.5 % of animals presented an olfactory dysfunction (Figure 1F). All the modulators of the α 7nAChR did not induce the same results *in vivo*: while type I PAM (IVM) or ago-PAM (GAT) promoted better clinical outcomes in SARS-CoV-2-infected hamsters, treatment with a selective orthosteric agonist (EVP) did not ameliorate the clinical signs or the olfactory performance. These results could be explained by the fact that orthosteric agonist (EVP-6124) and allosteric modulators (IVM and GAT) do not have on the same binding site on α 7nAChR.

284 Thus, these results showed that $\alpha 7nAChR$ are involved in the modulation of clinical outcomes
285 induced by IVM treatment in hamsters infected with SARS-CoV-2.

286 **Modulation of $\alpha 7nAChRs$ is not sufficient to regulate SARS-CoV-2 infection in cellular model**

287 To ethically reduce the use of animals and further study the implication of $\alpha 7nAChR$ and the
288 role of its modulators, we developed a simplified *in vitro* model using Vero E6 cells and tested the same
289 $\alpha 7nAChR$ modulators. Using a High-Content-Screening-System, we measured the survival of cells and
290 the percentage of infected cells with different SARS-CoV-2 variants, including the ancestral virus Wuhan
291 (Figure 2A and 2B) and the variants Alpha, Beta and Delta (Figure S2). A range of IVM, GAT and EVP
292 concentrations were used. These modulators significantly increased the cell survival and significantly
293 reduced the percentage of infected cells, with the most optimal concentration being 5 μM for IVM, 25
294 μM for GAT and 16 μM for EVP (Figure S2), which were used in the following *in vitro* experiments. These
295 effects were also found on the different variants tested, demonstrating that the mechanism involved
296 in this protection is variant independent.

297 Another way of confirming the modulators' effects on the infection was to use a recombinant
298 virus, Wuhan_nLuc, expressing nanoluciferase (nLuc) and to measure at 72 hpi the nLuc present in the
299 supernatant. Concurrently, to validate the modulators' effect on the cell survival or protection, we
300 measured the intracellular ATP level. Indeed, when cell lysis occurs, e. g. with SARS-CoV-2, the ATP is
301 released, and its concentration decreases intracellularly. IVM, GAT or EVP significantly reduced the nLuc
302 luminescence (Figure 2C) and interestingly, the ATP concentration was also higher in cells treated with
303 IVM, GAT or EVP (Figure 2D). These data confirmed that a higher cell survival or protection was ongoing
304 in infected cells treated with the modulators, correlating with the decrease of the nLuc excretion. Unlike
305 Caly et al., we did not find an antiviral effect as such, but rather an increase in cellular protection or
306 survival (Caly *et al.*, 2020). IVM, GAT and EVP having an effect in our *in vitro* model, we finally tested
307 the $\alpha 7nAChR$ antagonists. However, the IVM effect was not abolished with either of the antagonists,
308 MLA or Meca, regardless of the tested concentration (from 0.1 μM to 10 μM for MLA; from 8 μM to 32
309 μM for Meca) (Figure 2E to 2H, and Figure S2).

310 These findings indicate that the $\alpha 7nAChR$ is involved in the effect of IVM treatment during SARS-CoV-2
311 infection, but that other receptors could also be involved to maintain cellular integrity in the *in vitro*
312 model using Vero E6 cells.

313

314 **P2XRs alone cannot provide a protective effect during SARS-CoV-2 infection**

315 The role of $\alpha 7nAChR$ was also evaluated in a more complex cellular model developed to mimic
316 the lung microenvironment. Using Transwells, A549-ACE2-TMPRSS2 cells were co-cultured with

317 differentiated THP-1 cells, and submitted to the different modulators IVM, GAT, and EVP for 72 hours
318 (Figure 3A). First, we measured nLuc in both compartment of the transwell. The modulators induced
319 the same effect on THP-1 and A549-ACE2-TMPRSS2 cells, as in the Vero E6 model, with a decrease of
320 nLuc excretion (Figure 3B and 3C). Furthermore, this decrease was also related to an increase of
321 intracellular ATP (Figure 3D) in treated infected A549-ACE2-TMPRSS2, indicating an increase in cell
322 survival and thus validating our previous results.

323 Experiments on Vero E6 cells suggested that other receptors may be involved in the cell
324 integrity and host response modulation. ATP, which can be released during cell lysis induced by SARS-
325 CoV-2 infection, can activate purinergic receptors such as P2X4 and P2X7 (Illes *et al.*, 2021). IVM being
326 also a PAM of P2X4 and P2X7 receptors (Priel and Silberberg, 2004; Sattelle *et al.*, 2009; Illes *et al.*,
327 2021), we postulated that IVM could play a role on P2X4 and/or P2X7 receptors during SARS-CoV-2
328 infection. We therefore used several antagonists of those two receptors and of $\alpha 7nAChR$ to evaluate
329 their respective impact on cell integrity and host response modulation: MLA a specific antagonist to
330 $\alpha 7nAChR$; BX430 specific to P2X4 receptor; and A438079 specific to P2X7 (Layhadi *et al.*, 2018; Qasem
331 *et al.*, 2023). The presence of P2X4 or P2X7 antagonist alone did not modify nLuc excretion in THP-1 or
332 A549-ACE2-TMPRSS2 cells (Figure 3E and 3F), nor the level of intracellular ATP in A549-ACE2-TMPRSS2
333 cells (Figure 3H). The addition of antagonists in the presence of IVM did not affect the protective effect
334 observed through the decrease of nLuc excretion in THP-1 cells (Figure 3E) or in A549-ACE2-TMPRSS2
335 cells (Figure 3F) and the intracellular ATP concentration (Figure 3G).

336 Thus, our data indicates that the protective effect seen *in vitro* in the 72 h IVM treatment is
337 mainly due to cholinergic $\alpha 7nAChR$ receptors, independently to purinergic receptors P2X4 and P2X7.
338 In order to determine whether purinergic receptors are involved in host cell inflammation, we
339 investigated earlier times of infection.

340

341 **Dynamic interplay between A549-ACE2-TMPRSS2 and THP-1 to modulate host inflammation**

342 The same Transwell model was used to study the host immunomodulation induced by IVM
343 during SARS-CoV-2 infection at earlier timepoints, 24 and 48 hpi. The cultures were submitted to IVM
344 with or without the cholinergic or purinergic antagonists. After 24 hpi and 48 hpi, each cell types'
345 responses were investigated through transcriptomic analysis.

346 Firstly, we controlled the infection by RT-qPCR targeting the RdRp gene. A549-ACE2-TMPRSS2
347 cells, treated or not, were highly infected as early as 24 hpi, without significant increase at 48 hpi
348 (Figure 4A). Viral RNA could also be detected in THP-1 cells but at a very low level (fold-change around
349 10^4) (Figure 4A). However, no treatment effect was observed on viral RNA detection in any of the
350 conditions tested (IVM; IVM + MLA; IVM + BX430; IVM + A438079).

351 Then, transcriptomic analysis was performed on both cell types to discriminate their responses
352 to infection and to the different treatments. Concerning the A549-ACE2-TMPRSS2 cells, IVM treatment
353 significantly increased *CXCL10* mRNA expression at 48 hpi compared to non-treated cells but no
354 significant modulation was observed on other chemokines mRNA expression such as *CXCL5*, *IL6*, *IL10*,
355 *IFNG* and *ISG20* (Figure 4A-H). However, on THP-1 cells, *CXCL10* and also *CXCL5* mRNA expression were
356 significantly up and down regulated respectively at 24 hpi. IVM treatment downregulated also *IL6*
357 mRNA expression in THP-1 cells at 24 hpi, inducing no significant effect on the *IL6/IL10* ratio (Figure 4D-
358 F) conversely to what was observed previously *in vivo* (De melo et al. 2021). No antiviral response was
359 observed in THP-1 cells, conversely to A549-ACE2-TMPRSS2 cells, where *IFNG* and *ISG20* mRNA
360 expression were increased in non-treated or IVM treated conditions (Figure 4F and 4G).

361 The role of *CXCL10* observed in our model could be instrumental in the control of infection.
362 Indeed, the up-regulation of *CXCL10*, observed in A549-ACE2-TMPRSS2 cells in our data, if confirmed
363 *in vivo*, could lead to the activation and chemoattraction of macrophages on the site of the infection
364 and an early control of it (Liu *et al.*, 2011). Furthermore, *CXCL10* is also important in host defence by
365 contributing to the activation of lymphocytes and natural killer (NK) cells, as well as their migration to
366 the site of infection. This activation and migration helped to control infection before the adaptive
367 response was put in place (Trifilo *et al.*, 2004; Elemam, Talaat and Maghazachi, 2022). The action of
368 *CXCL10* could be completed by that of *CXCL5*. Previous studies showed that the expression of *CXCL5*
369 can be modulated by P2X4 receptor, through an ATP-mediated activation in primary human monocyte-
370 derived macrophages (Layhadi *et al.*, 2018). The down-regulation of *CXCL5* mRNA expression observed
371 in THP-1 cells very early after infection should allow a reduction of neutrophil infiltration and a decrease
372 in inflammation, as it was previously described in *CXCL5*^{-/-} mice infected with SARS-CoV-2 (Liang *et al.*,
373 2020).

374 Therefore, IVM treatment seems to induce a faster host response to SARS-CoV-2 infection and
375 preferentially modulates macrophagic inflammatory response through *CXCL10* and *CXCL5* expression
376 via $\alpha 7$ nAChR and P2X4R.

377

378 ***Deciphering the role of $\alpha 7$ nAChR and P2XRs and their mode of action***

379 Co-treatment of IVM with specific antagonist of $\alpha 7$ nAChR, P2X4R or P2X7R were performed in
380 the same model. Blocking the $\alpha 7$ nAChR (with MLA) or the P2X7 (with A438079) receptors in the
381 presence of IVM did not impact the immunomodulatory effect of IVM at either timepoints on both cell
382 type (Figure 4B-H and S3).

383 Interestingly, adding BX430 (antagonist of the P2X4) to IVM significantly modified the mRNA
384 expression of many different genes and for some of them on both cell lines (Figure 4B-H). First, at 24

385 hpi, the *IL6* mRNA expression was decreased in A549-ACE2-TMPRSS2 cells followed by a decreased of
386 the expression of *CXCL10* and *ISG20* mRNA at 48 hpi, compared to IVM treated cells. Furthermore, in
387 THP-1 cells, *IL6* and *ISG20* mRNA expression were significantly downregulated at 24 and 48 hpi
388 respectively, with a decrease in *IL6/IL10* ratio (Figure 4D-H) and thus inhibiting the antiviral response.
389 The decrease of *IL6* expression with BX430 and IVM could be explained by the inhibition of P2X4
390 receptor activation (Li *et al.*, 2014).

391 Conversely, the downregulation of *CXCL5* mRNA expression observed in THP-1 cells during IVM
392 treatment was not abolished by BX430 or A438079 nor MLA. On the contrary, BX430 and A438079
393 exerted both individually a significant additive effect on *CXCL5* downregulation induced by IVM
394 (Figure 4C).

395 The immunomodulation was also explored at a later stage of the infection, at 72 hpi, in THP-1
396 cells, with the cholinergic and purinergic modulators and antagonists (Figure S4 and S5). The same
397 upregulation of *CXCL10* and downregulation of *CXCL5* was observed (Figure S4E and S4F), with a
398 downregulation of the *IL6/IL10* ratio in the presence of IVM or even GAT (Figure S4G). The use of BX430
399 also impacted the IVM effect on *CXCL10* and *CXCL5* expression (Figure S5E and S5F), but at a lower rate.
400 This showed that the effect of IVM on the P2X4 receptors occurred at an early stage and is still observed
401 at 72 hpi, even if the recorded effects are lower. On the contrary, at 72 hpi, P2X7 receptor still does not
402 seem to be directly involved, since no modulation of *NLRP3* and *IL1B* mRNA expression was observed
403 (Figure S3), which are usually up-regulated upon P2X7 activation (Liu *et al.*, 2023). Moreover, inhibiting
404 this receptor did not impact the immunomodulation induced by IVM. This confirms previous results
405 obtained at early time-points (24 and 48 hpi).

406 All these data confirmed a role of P2X4 receptor in the mechanism of action of IVM in regulating
407 the immune host response to SARS-CoV-2 through the modulation of *CXCL10* and *CXCL5* expression.

408

409 ***Proposed alternative mechanism of action of cholinergic and purinergic receptors***

410

411 We can propose that during infection A549-ACE2-TMPRSS2 cells expressed IFNG and therefore
412 IVM induced through P2X4, an early and significantly higher expression of *CXCL10* by THP-1 cells, which
413 is then highly produced by A549-ACE2-TMPRSS2 cells at 48 hpi. IVM induced an increase in cell survival
414 and reduced the extracellular ATP concentration, consequently P2X4 is not ATP-activated, which could
415 modify the profile of *CXCL5* mRNA expression. It was already described that the binding site of IVM and
416 BX430 on P2X4 receptor are not on the same region (Weinhausen *et al.*, 2022). The action of BX430,
417 which inhibits an ATP-dependent activation, may not be able to fully inhibit the activation of P2X4
418 receptor by IVM, which may explain why the activation of some cytokines (IL4, IL10, IL1B, CXCL5, IFNG)
419 are still seen. Finally, the modulation of *CHRNA7*, *P2RX4* and *P2RX7* mRNA expression seen with IVM

420 alone or in combination with BX430 or A438079 at 72 hpi (Figure S4 and S5) could be representative of
421 a collaboration between those three receptors at the cell membranes, as it was previously described
422 (Patti *et al.*, 2006; Maldifassi *et al.*, 2021; Bono *et al.*, 2023).

423

424 **Conclusion**

425 In brief, the immunomodulation induced by IVM through $\alpha 7$ nAChR and P2X4 receptors seems
426 to be mostly linked to *CXCL5* and *CXCL10* mRNA expression, which are the most regulated genes.
427 Moreover, we have seen in the hamster model a reduction of clinical signs and a limitation of the
428 inflammation (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021). *CXCL5* downregulation in our *in vitro* model
429 corroborates these results, however the upregulation of *CXCL10* mRNA expression seems to indicate
430 an increase in the inflammatory response to better control the infection. Moreover, the inhibition of
431 IVM's effect through the inhibition of $\alpha 7$ nAChR with MLA, was not reproduced in our *in vitro* models.
432 Indeed, no modulation of *STAT3* and *SOCS3* mRNA expression (Figure S3), which should be upregulated
433 with $\alpha 7$ nAChR activation (Ren *et al.*, 2017), was observed (Figure S3). In addition, the absence of *IL4*
434 mRNA expression modulation in THP-1 cells (Figure S3) is also not in accordance with the M2-like
435 macrophage population seen in the hamster model (Atri, Guerfali and Laouini, 2018).

436 Moreover, all the models used in this study give converging results. The discrepancies observed
437 between our transcriptomic analysis *in vitro* and the one lead *in vivo* by de Melo, Lazarini, Larrous, *et*
438 *al.*, 2021, could be explained by the fact that the analysis *in vivo* was performed on the whole lung
439 where different cell types cooperated. Here, we focused only on two cell types, epithelial and
440 macrophagic cells, and highlighted the leading role of macrophagic cells among them.

441 In conclusion, we propose that IVM acts on both cholinergic receptors $\alpha 7$ nAChR and purinergic
442 P2X4 receptors to counteract the effect of SARS-CoV-2 infection. *CXCL5* and *CXCL10* seem to be key
443 chemokines in this modulation of the host response by allowing an early control of the inflammation
444 through macrophagic cells in the context of SARS-CoV-2 infection.

445 All in all, targeting these receptors, which modulate the immune response, is a therapeutic strategy
446 that need to be further developed.

447

448 **Declaration of competing interest**

449 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships
450 that could have appeared to influence the work reported in this paper.

451

452 **Data availability**

453 Data will be made available on request.

454 **Acknowledgements**

455 The SARS-CoV-2 strain was supplied by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted
456 by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Pr. Sylvie van der Werf. The human sample from which
457 strain 2019-nCoV/IDF0372/2020 was isolated has been provided by Dr. X. Lescure and Pr. Y.
458 Yazdanpanah from the Bichat Hospital (Paris, France). The isolate BetaCoV/France/IDF00372/2020 was
459 kindly provided by Sylvie van der Werf. Alpha/B.1.1.7/IDF-IPP00078/2021, Beta/B.1.351 and
460 Delta/B1.617.2 variants, and the A549-ACE2-TMPRSS2 cells were supplied by the Virus and Immunity
461 Unit hosted by Institut Pasteur and headed by Pr. Olivier Schwartz.

462 Part of this work was performed at the UtechS Photonic Biolmaging (PBI) platform supported by Institut
463 Pasteur and by Région Ile-de-France.

464 This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant ANRS
465 MIE202112015304). V.P. is recipient of a fellowship from the European Union's Horizon 2020
466 Framework Program for Research and Innovation under Specific Grant Agreement No. 945539 (Human
467 Brain Project SGA3).

468

469 **References**

470 – Alves, V.S. *et al.* (2023) 'SARS-CoV-2 Spike protein alters microglial purinergic signaling', *Frontiers*
471 *in Immunology*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1158460>
472 (Accessed: 5 October 2023).

473 – Atri, C., Guerfali, F.Z. and Laouini, D. (2018) 'Role of Human Macrophage Polarization in
474 Inflammation during Infectious Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), p. 1801.
475 Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

476 – Baer, A. and Kehn-Hall, K. (2014) 'Viral concentration determination through plaque assays: using
477 traditional and novel overlay systems', *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (93), p. e52065. Available
478 at: <https://doi.org/10.3791/52065>.

479 – Beco, L., Petite, A. and Olivry, T. (2001) 'Comparison of subcutaneous ivermectin and oral
480 moxidectin for the treatment of notoedric acariasis in hamsters', *The Veterinary Record*, 149(11), pp. 324–
481 327. Available at: <https://doi.org/10.1136/vr.149.11.324>.

482 – Bono, F. *et al.* (2023) 'Central nervous system interaction and crosstalk between nAChRs and other
483 ionotropic and metabotropic neurotransmitter receptors', *Pharmacological Research*, 190, p. 106711.
484 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106711>.

485 – Brems, B.M. *et al.* (2023) 'Dose-dependent effects of GAT107, a novel allosteric agonist-positive
486 allosteric modulator (ago-PAM) for the $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptor: a BOLD pHMRI and connectivity
487 study on awake rats', *Frontiers in Neuroscience*, 17. Available at:
488 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2023.1196786> (Accessed: 16 September 2023).

489 – Caly, L. *et al.* (2020) 'The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in
490 vitro', *Antiviral Research*, 178, p. 104787. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>.

491 – Cecchini, M., Brando, F. and Changeux, J.-P. (2023) *ACRALL – The Nicotinic Acetylcholine Receptor*
492 *Allosteric Ligand Library (v1)*, *EBRAINS*. Available at: [https://search.kg.ebrains.eu/instances/57cc0b0b-9f4c-](https://search.kg.ebrains.eu/instances/57cc0b0b-9f4c-4408-8907-769d0a0f860c)
493 [4408-8907-769d0a0f860c](https://search.kg.ebrains.eu/instances/57cc0b0b-9f4c-4408-8907-769d0a0f860c) (Accessed: 15 November 2023).

494 – Cecchini, M. and Changeux, J.-P. (2022) 'Nicotinic receptors: From protein allostery to
495 computational neuropharmacology', *Molecular Aspects of Medicine*, 84, p. 101044. Available at:
496 <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101044>.

497 – Chaccour, C. *et al.* (2021) 'The effect of early treatment with ivermectin on viral load, symptoms

498 and humoral response in patients with non-severe COVID-19: A pilot, double-blind, placebo-controlled,
499 randomized clinical trial', *eClinicalMedicine*, 32. Available at:
500 <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100720>.

501 – Changeux, J.-P. *et al.* (2020) 'A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic
502 implications', *Comptes Rendus Biologies*, 343(1), pp. 33–39. Available at: <https://doi.org/10.5802/crbiol.8>.

503 – Chou, S.H.-Y. *et al.* (2021) 'Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients
504 Hospitalized With COVID-19-A Report for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium',
505 *JAMA network open*, 4(5), p. e2112131. Available at:
506 <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.12131>.

507 – Collins, T. and Millar, N.S. (2010) 'Nicotinic Acetylcholine Receptor Transmembrane Mutations
508 Convert Ivermectin from a Positive to a Negative Allosteric Modulator', *Molecular Pharmacology*, 78(2), pp.
509 198–204. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.110.064295>.

510 – Di Virgilio, F., Sarti, A.C. and Coutinho-Silva, R. (2020) 'Purinergic signaling, DAMPs, and
511 inflammation', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 318(5), pp. C832–C835. Available at:
512 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>.

513 – Elemam, N.M., Talaat, I.M. and Maghazachi, A.A. (2022) 'CXCL10 Chemokine: A Critical Player in
514 RNA and DNA Viral Infections', *Viruses*, 14(11), p. 2445. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14112445>.

515 – Grønlien, J.H. *et al.* (2007) 'Distinct Profiles of $\alpha 7$ nAChR Positive Allosteric Modulation Revealed by
516 Structurally Diverse Chemotypes', *Molecular Pharmacology*, 72(3), pp. 715–724. Available at:
517 <https://doi.org/10.1124/mol.107.035410>.

518 – Illes, P. *et al.* (2021) 'Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review
519 30', *British journal of pharmacology*, 178(3), pp. 489–514. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.15299>.

520 – Kanellopoulos, J.M. *et al.* (2021) 'Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An
521 Immunological Perspective', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 645834. Available at:
522 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645834>.

523 – Kawano, A. *et al.* (2012) 'Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of
524 mouse macrophages', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(2), pp. 374–380.
525 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.156>.

526 – Khalil, B.A., Elemam, N.M. and Maghazachi, A.A. (2021) 'Chemokines and chemokine receptors
527 during COVID-19 infection', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, pp. 976–988. Available
528 at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.034>.

529 – Klimek, L. *et al.* (2022) 'Olfactory and gustatory disorders in COVID-19', *Allergo Journal
530 International*, 31(7), pp. 243–250. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40629-022-00216-7>.

531 – Koltsova, E.K. and Ley, K. (2010) 'The mysterious ways of the chemokine CXCL5', *Immunity*, 33(1),
532 pp. 7–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.012>.

533 – Krause, R.M. *et al.* (1998) 'Ivermectin: A Positive Allosteric Effector of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic
534 Acetylcholine Receptor', *Molecular Pharmacology*, 53(2), pp. 283–294. Available at:
535 <https://doi.org/10.1124/mol.53.2.283>.

536 – Laing, R., Gillan, V. and Devaney, E. (2017) 'Ivermectin – Old Drug, New Tricks?', *Trends in
537 Parasitology*, 33(6), pp. 463–472. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>.

538 – Layhadi, J.A. *et al.* (2018) 'ATP Evokes Ca²⁺ Responses and CXCL5 Secretion via P2X4 Receptor
539 Activation in Human Monocyte-Derived Macrophages', *The Journal of Immunology*, 200(3), pp. 1159–1168.
540 Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700965>.

541 – Lazarini, F. *et al.* (2012) 'Early Activation of Microglia Triggers Long-Lasting Impairment of Adult
542 Neurogenesis in the Olfactory Bulb', *The Journal of Neuroscience*, 32(11), pp. 3652–3664. Available at:
543 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6394-11.2012>.

544 – Li, F. *et al.* (2014) 'Inhibition of P2X4 suppresses joint inflammation and damage in collagen-induced
545 arthritis', *Inflammation*, 37(1), pp. 146–153. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9723-y>.

546 – Liang, Y. *et al.* (2020) 'Role of neutrophil chemoattractant CXCL5 in SARS-CoV-2 infection-induced
547 lung inflammatory innate immune response in an in vivo hACE2 transfection mouse model', *Zoological
548 Research*, 41(6), pp. 621–631. Available at: <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.118>.

549 – Liu, J. *et al.* (2023) 'ATP ion channel P2X purinergic receptors in inflammation response',
550 *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, p. 114205. Available at:

551 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114205>.

552 – Liu, M. *et al.* (2011) 'CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic
553 implications', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(3), pp. 121–130. Available at:
554 <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>.

555 – Maldifassi, M.C. *et al.* (2021) 'The interplay between $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, pannexin-
556 1 channels and P2X7 receptors elicit exocytosis in chromaffin cells', *Journal of Neurochemistry*, 157(6), pp.
557 1789–1808. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.15186>.

558 – Marcolino, M.S. *et al.* (2022) 'Systematic review and meta-analysis of ivermectin for treatment of
559 COVID-19: evidence beyond the hype', *BMC Infectious Diseases*, 22, p. 639. Available at:
560 <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07589-8>.

561 – Mehranfard, D. and Speth, R.C. (2022) 'Cholinergic anti-inflammatory pathway and COVID-19',
562 *BiolImpacts : BI*, 12(2), pp. 171–174. Available at: <https://doi.org/10.34172/bi.2022.23980>.

563 – de Melo, G.D., Lazarini, F., Larrous, F., *et al.* (2021) 'Attenuation of clinical and immunological
564 outcomes during SARS-CoV-2 infection by ivermectin', *EMBO Molecular Medicine*, 13(8), p. e14122.
565 Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.202114122>.

566 – de Melo, G.D., Lazarini, F., Levallois, S., *et al.* (2021) 'COVID-19-related anosmia is associated with
567 viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters', *Science
568 Translational Medicine*, 13(596), p. eabf8396. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf8396>.

569 – de Melo, G.D. *et al.* (2023) 'Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon
570 infection with SARS-CoV-2 and its variants', *Nature Communications*, 14(1), p. 4485. Available at:
571 <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40228-7>.

572 – Nörenberg, W. *et al.* (2012) 'Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine
573 P2X7 receptors', *British Journal of Pharmacology*, 167(1), pp. 48–66. Available at:
574 <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x>.

575 – Pandey, V. *et al.* (2021) 'CXCL10/CXCR3 signaling contributes to an inflammatory
576 microenvironment and its blockade enhances progression of murine pancreatic precancerous lesions',
577 *eLife*. Edited by M.G. Vander Heiden, T. Taniguchi, and M. Sherman, 10, p. e60646. Available at:
578 <https://doi.org/10.7554/eLife.60646>.

579 – Patil, V.M., Verma, S. and Masand, N. (2022) 'Prospective mode of action of Ivermectin: SARS-CoV-
580 2', *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 4, p. 100018. Available at:
581 <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2021.100018>.

582 – Patti, L. *et al.* (2006) 'P2X7 receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing
583 presynaptic $\alpha 7$ nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals',
584 *Neuropharmacology*, 50(6), pp. 705–713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.016>.

585 – Pfaffl, M.W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR',
586 *Nucleic Acids Research*, 29(9), p. e45. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.

587 – Planas, D., Veyer, D., *et al.* (2021) 'Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody
588 neutralization', *Nature*, 596(7871), pp. 276–280. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>.

589 – Planas, D., Bruel, T., *et al.* (2021) 'Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants
590 to neutralizing antibodies', *Nature Medicine*, 27(5), pp. 917–924. Available at:
591 <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>.

592 – Priel, A. and Silberberg, S.D. (2004) 'Mechanism of Ivermectin Facilitation of Human P2X4 Receptor
593 Channels', *The Journal of General Physiology*, 123(3), pp. 281–293. Available at:
594 <https://doi.org/10.1085/jgp.200308986>.

595 – Qasem, A.M.A. *et al.* (2023) 'Synthesis and Antagonist Activity of Methyllycaconitine Analogues on
596 Human $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors', *ACS Bio & Med Chem Au*, 3(2), pp. 147–157. Available at:
597 <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.2c00057>.

598 – Reis, G. *et al.* (2022) 'Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with Covid-19', *New
599 England Journal of Medicine*, 386(18), pp. 1721–1731. Available at:
600 <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115869>.

601 – Ren, C. *et al.* (2017) 'The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on
602 Critical Illness and Its Mechanism', *International Journal of Biological Sciences*, 13(1), pp. 46–56. Available
603

604 at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.16404>.

605 – Sakaki, H. *et al.* (2013) 'P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release
606 in mouse bone marrow-derived dendritic cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*,
607 432(3), pp. 406–411. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.135>.

608 – Sattelle, D.B. *et al.* (2009) 'Comparative pharmacology and computational modelling yield insights
609 into allosteric modulation of human α 7 nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 78(7),
610 pp. 836–843. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.06.020>.

611 – Schneider, M. *et al.* (2017) 'Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits', *Frontiers*
612 *in Pharmacology*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00860>
613 (Accessed: 21 July 2023).

614 – Surprenant, A. and North, R.A. (2009) 'Signaling at Purinergic P2X Receptors', *Annual Review of*
615 *Physiology*, 71(1), pp. 333–359. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>.

616 – Trifilo, M.J. *et al.* (2004) 'CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the Central Nervous
617 System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural
618 Killer Cells', *Journal of Virology*, 78(2), pp. 585–594. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.585-594.2004>.

619 – Uematsu, T. *et al.* (2023) 'Prophylactic administration of ivermectin attenuates SARS-CoV-2 induced
620 disease in a Syrian Hamster Model', *The Journal of Antibiotics*, 76(8), pp. 481–488. Available at:
621 <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00623-0>.

622 – Weinhausen, S. *et al.* (2022) 'Extracellular binding sites of positive and negative allosteric P2X4
623 receptor modulators', *Life Sciences*, 311, p. 121143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121143>.

624 – WHO (2023a) *Coronavirus disease (COVID-19)*. Available at: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19> (Accessed: 26 August 2023).

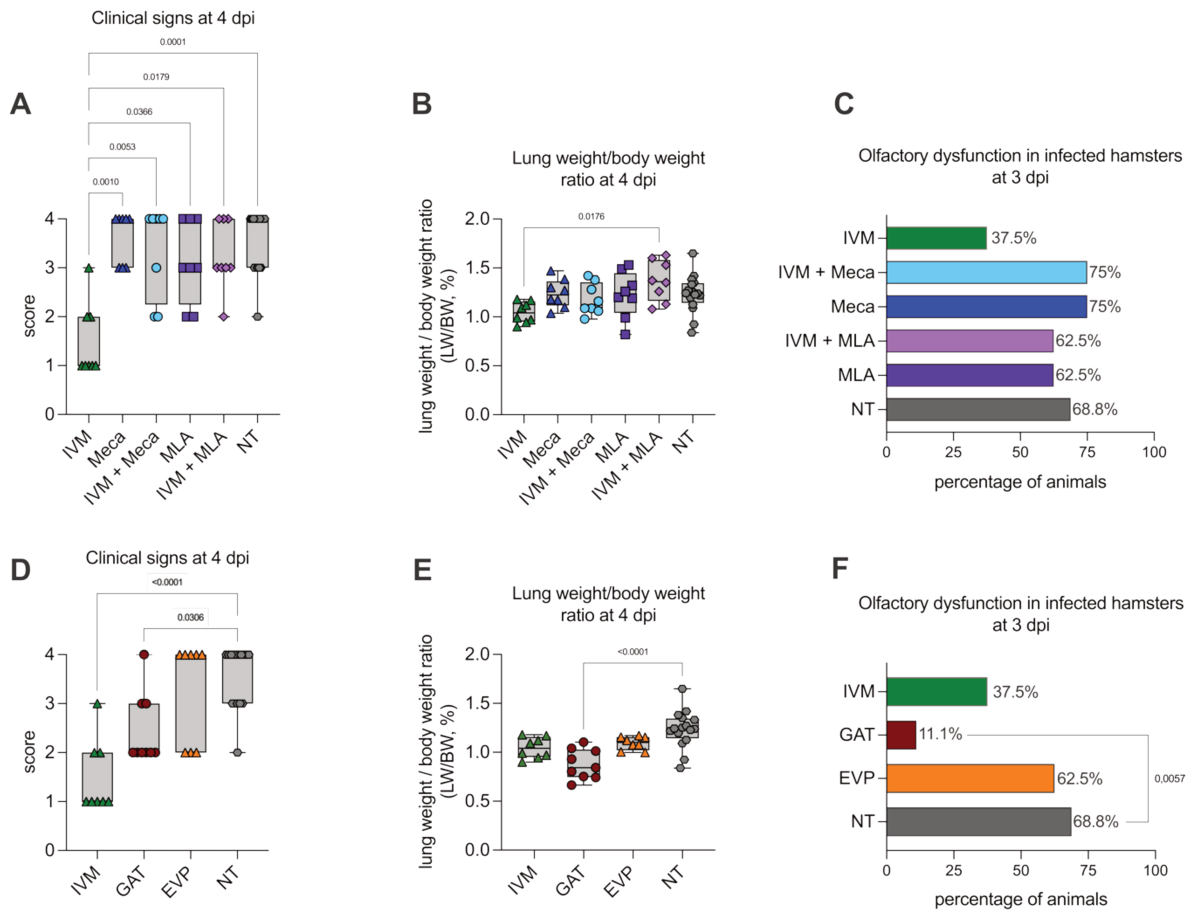
625 – WHO (2023b) *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*
626 *With Vaccination Data*. Available at: <https://covid19.who.int/table> (Accessed: 26 August 2023).

627 – Zarei, M., Sahebi Vaighan, N. and Ziai, S.A. (2021) 'Purinergic receptor ligands: the cytokine storm
628 attenuators, potential therapeutic agents for the treatment of COVID-19', *Immunopharmacology and*
629 *Immunotoxicology*, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1988102>.

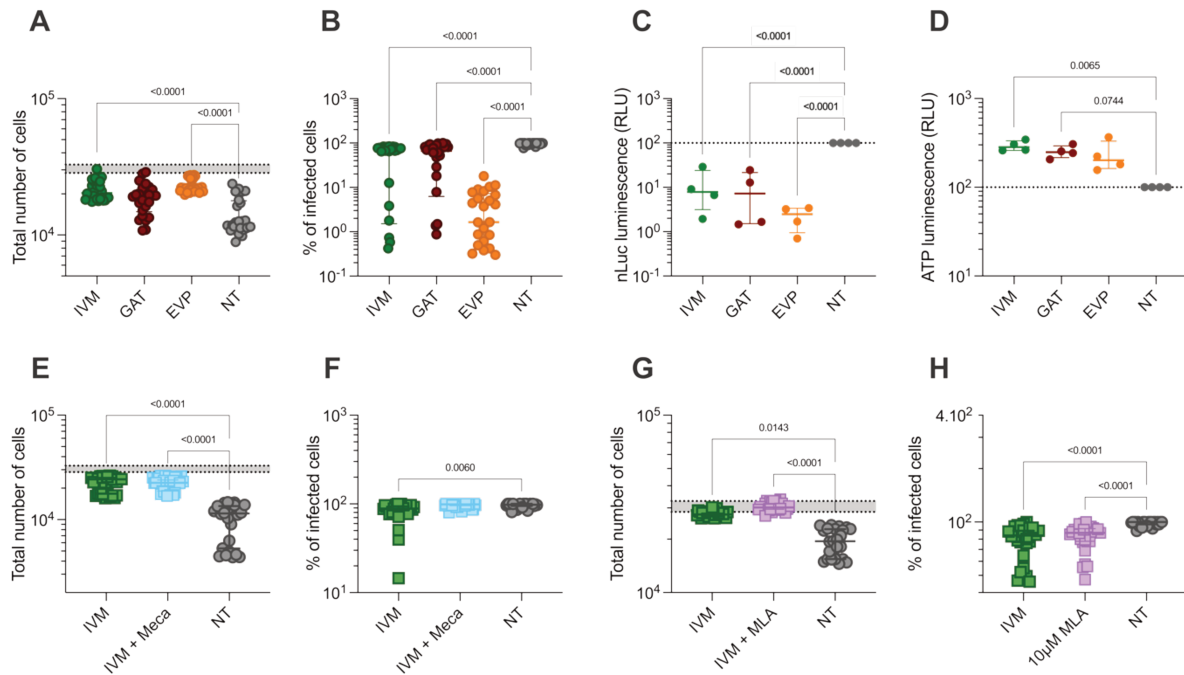
630 – Zech, A. *et al.* (2016) 'P2rx4 deficiency in mice alleviates allergen-induced airway inflammation',
631 *Oncotarget*, 7(49), pp. 80288–80297. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13375>.

632 – Zhao, Y. *et al.* (2021) 'Structural basis of human α 7 nicotinic acetylcholine receptor activation', *Cell*
633 *Research*, 31(6), pp. 713–716. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00509-6>.

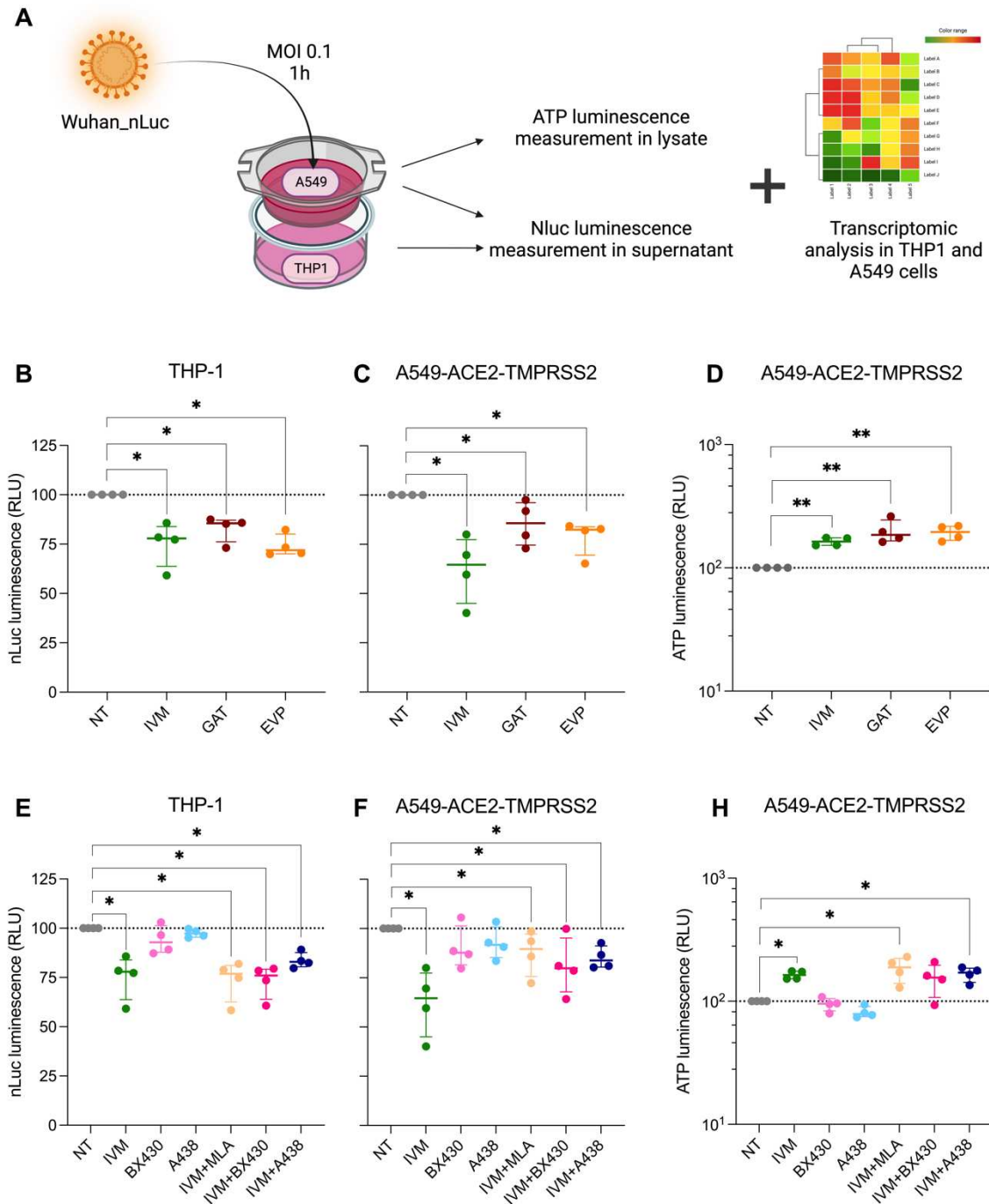
634
635
636



638
 639 **Figure 1: $\alpha 7nAChRs$ are involved in the modulation of clinical signs in SARS-CoV-2 infected hamsters**
 640 **treated with IVM.** Clinical profile of hamsters infected with SARS-CoV-2 and treated with nAChRs
 641 modulators and antagonists. **(A, D)** Clinical score over four days post-infection (dpi) with **(A)** mecamylamine
 642 (Meca) or methyllycaconitine (MLA) treatment or **(D)** GAT-107 (GAT) or EVP-6124 (EVP) treatment. The
 643 clinical score is based on a cumulative 0-4 scale: ruffled fur; slow movements; apathy; and absence of
 644 exploration activity. **(B, E)** Lung weight-to-body weight ratio measured at 4 dpi for hamsters treated with **(B)**
 645 Meca or MLA, or **(E)** with GAT or EVP. **(C, F)** Olfactory dysfunction measured at 3 dpi of hamster either
 646 treated with **(C)** Meca or MLA, or **(F)** with GAT or EVP. The olfaction test is based on the hidden (buried) food
 647 finding test. (n=8 or 9/group). All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile
 648 range. Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test (only the significant values are
 649 shown).

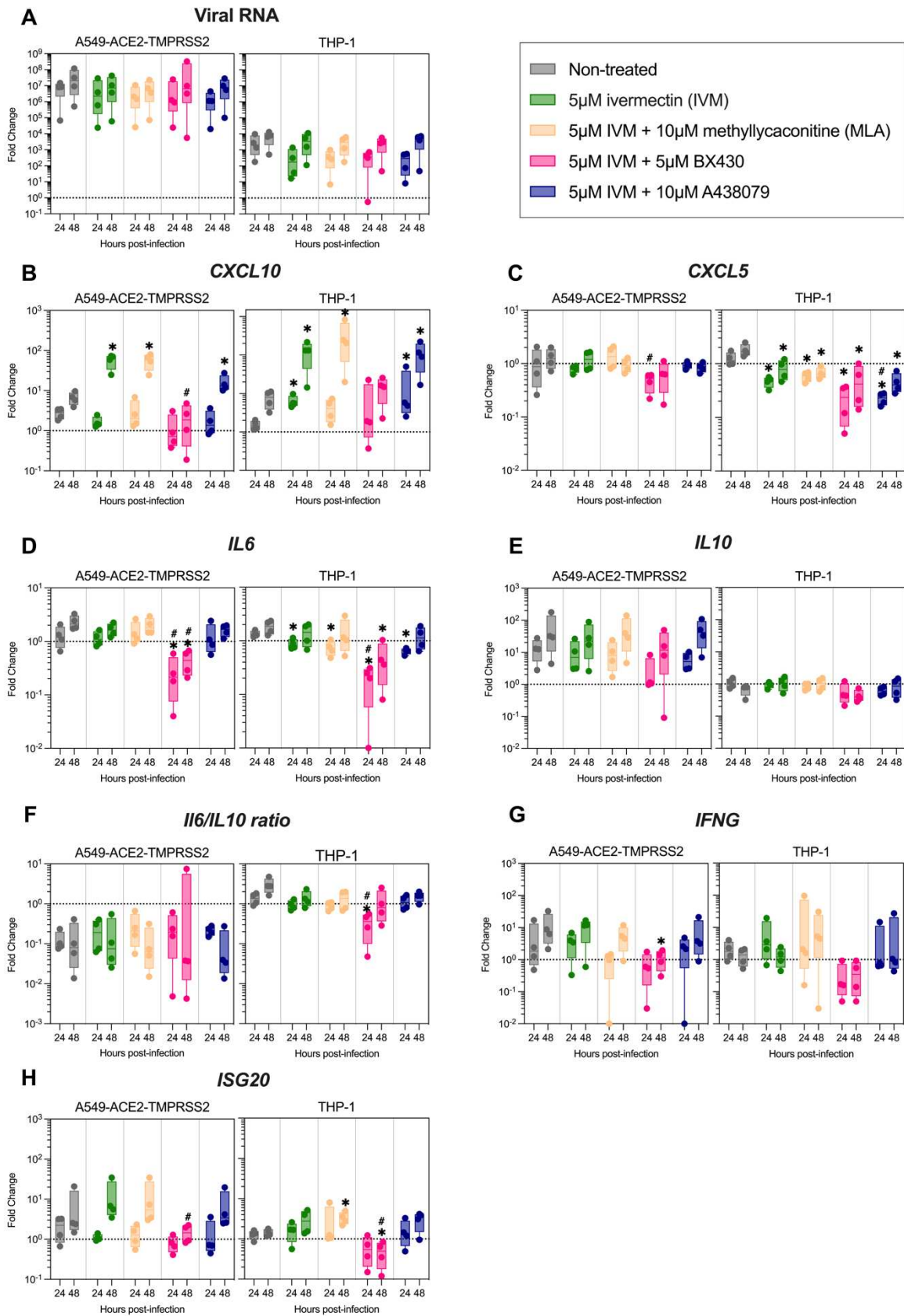


650
651 **Figure 2: Modulation of $\alpha 7$ nAChRs is not sufficient to regulate SARS-CoV-2 infection *in vitro*.** Effects
652 of $\alpha 7$ nAChR modulators or antagonists on monocellular *in vitro* model using Vero E6 cells and the Opera
653 Phenix High Content Screening System technology (only the infected conditions are shown). **(A)** Total
654 number of Vero E6 cells and **(B)** percentage of infected Vero E6 cells present after 56 h of infection (MOI
655 0.1) with the original virus (Wuhan) treated with 5 μ M of ivermectin (IVM), 25 μ M of GAT and 16 μ M of EVP.
656 **(C)** Nanoluciferase (Nluc) luminescence of Vero E6 cells infected with Wuhan_nLuc virus (MOI 0.1)
657 measured 56 hpi. **(D)** ATP luminescence of Vero E6 cells infected with Wuhan_nLuc virus (MOI 0.1)
658 measured 56 hpi. **(E, G)** Total number of cells treated with ivermectin plus **(E)** 32 μ M Meca or **(G)** 10 μ M
659 MLA. **(F, H)** Percentage of infected cells treated with ivermectin plus **(F)** 32 μ M Meca or **(H)** 10 μ M MLA.
660 All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range. Kruskal-Wallis test followed
661 by the Dunn's multiple comparisons test (only the significant values are shown). Three independent
662 experiments with ten technical replicates were performed with the Opera Phenix technology. Four
663 independent experiments in triplicates were performed for the Nluc and ATP luminescence, where the data
664 are normalized on the infected non-treated condition.



665
 666 **Figure 3: α 7nAChR and purinergic receptors are involved in cellular integrity during SARS-CoV-2**
 667 **infection.** In the Transwell model, A549-ACE2-TMPRSS2 cells were infected at an MOI of 0.1 with a
 668 Wuhan-nLuc virus. **(A)** Protocol used in the transwell model (created with BioRender.com). A549 refers
 669 to A549-ACE2-TMPRSS2 cells. **(B, E)** ATP luminescence of infected A549-ACE2-TMPRSS2 cells measured
 670 at 72 hpi in the presence of α 7nAChR **(B)** modulators (5 μ M IVM, 25 μ M GAT or 16 μ M EVP) or **(E)** α 7nAChR
 671 and purinergic antagonists (10 μ M MLA, 5 μ M BX430, 10 μ M A438079). **(C, D, F, H)** nLuc luminescence of
 672 infected **(C, F)** THP-1 cells and **(D, H)** A549-ACE2-TMPRSS2 cells measured at 72 hpi in the presence of
 673 α 7nAChR modulators (5 μ M IVM, 25 μ M GAT or 16 μ M EVP) or α 7nAChR and purinergic antagonists (10
 674 μ M MLA, 5 μ M BX430, 10 μ M A438079). The values are normalized on infected non-treated conditions,
 675 only the infected conditions are shown. The values are normalized on non-infected non-treated conditions,

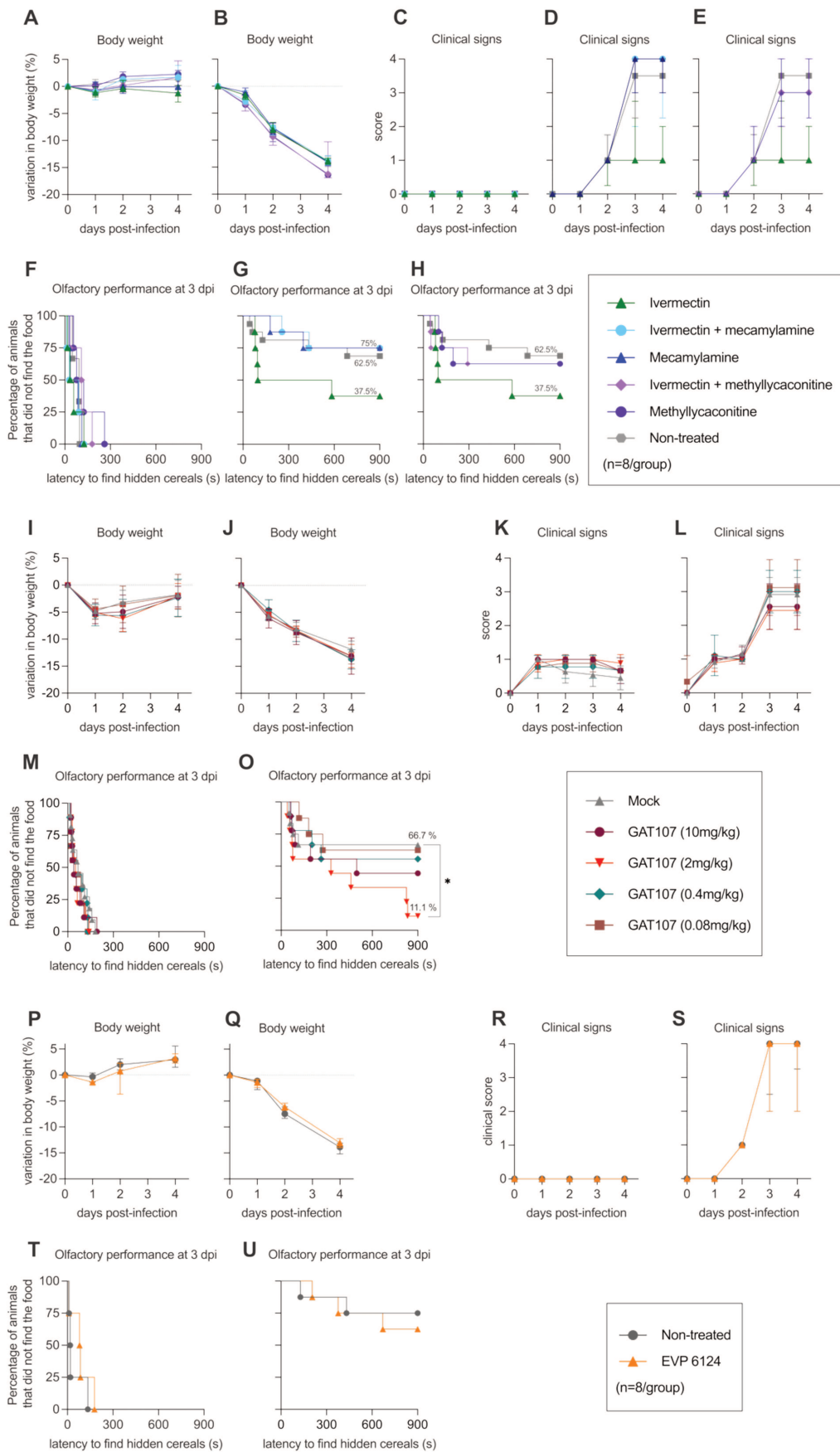
676 only the infected conditions are shown. Four independent experiments were performed in technical
677 triplicate. All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range. Mann-Whitney
678 test was performed (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).



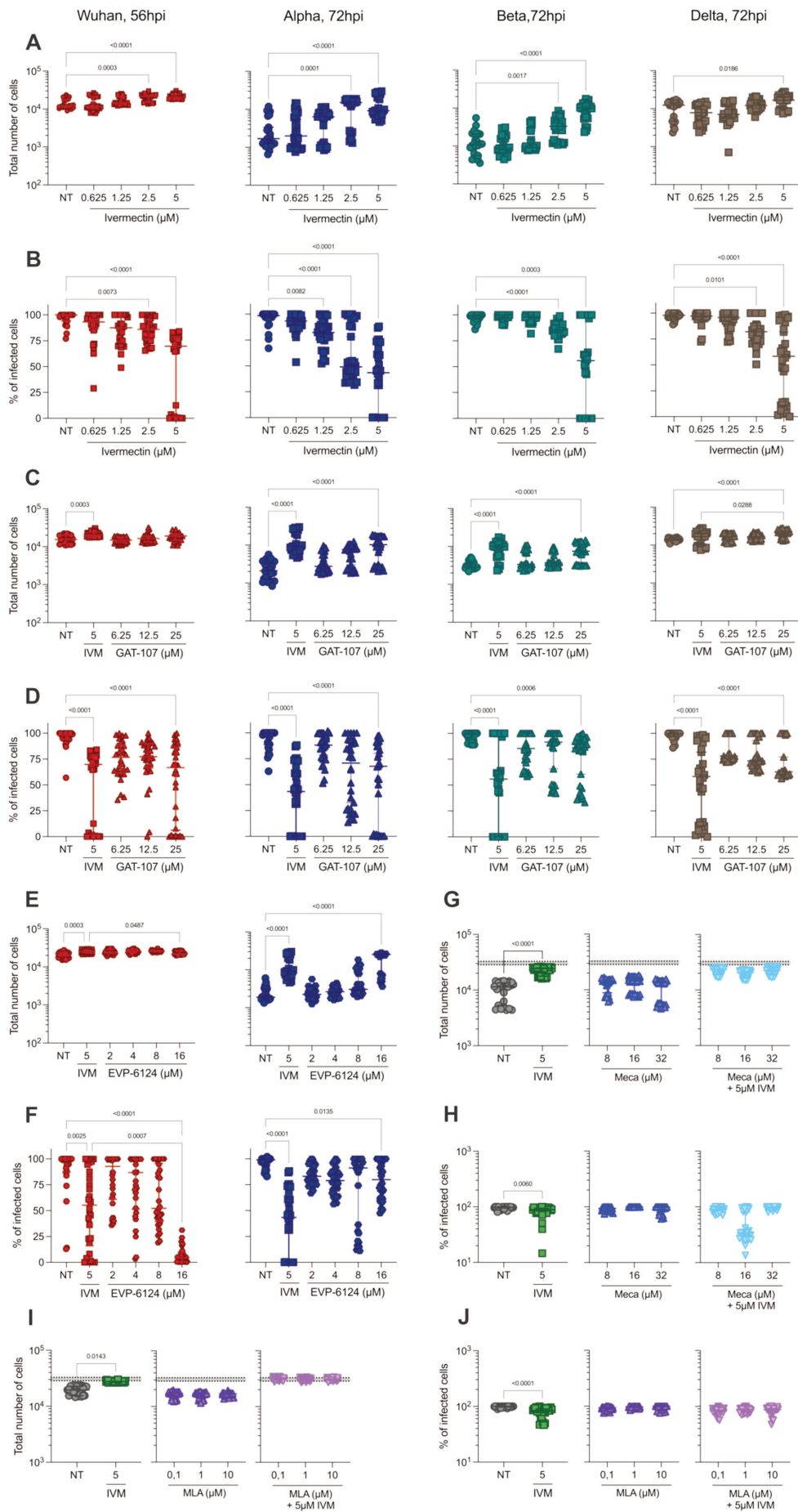
679
680
681
682

Figure 4: Dynamic interplay between A549-ACE2-TMPRSS2 and THP-1 to modulate host inflammation. In the Transwell model, A549-ACE2-TMPRSS2 cells were infected at an MOI of 0.1 with a Wuhan-nLuc virus. Transcriptomic analysis of THP-1 and A549-ACE2-TMPRSS2 cells after 24 hpi and 48

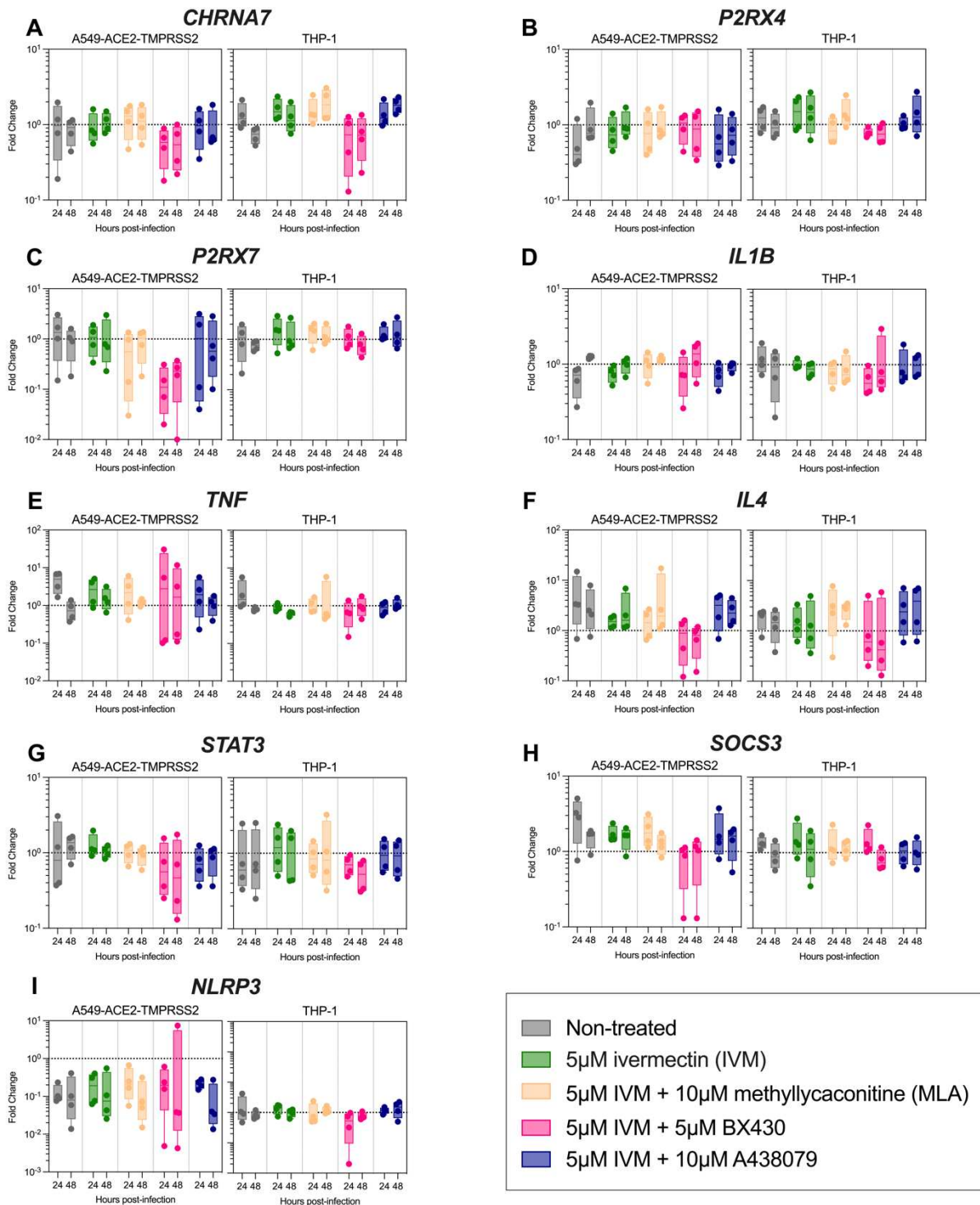
683 hpi with ivermectin (IVM) in combination or not with cholinergic and purinergic antagonists: BX430 (at
684 5 μ M, antagonizing P2X4), A438097 (A438, at 10 μ M, antagonizing P2X7), and methyllycaconitine
685 (MLA, at 10 μ M, antagonizing α 7nAChR). The expression of **(A)** Viral RNA, **(B)** *CXCL10*, **(C)** *CXCL5*, **(D)**
686 *IL6*, **(E)** *IL10*, **(F)** *IL6/IL10 ratio* **(G)** *IFNG*, and **(H)** *ISG20* were measured. The values are normalized on
687 non-infected non-treated conditions, only the infected conditions are shown. Four independent
688 experiments were performed in technical duplicates. All the values are expressed as median, error bars
689 indicate \pm interquartile range. Mann-Whitney test was performed (* $P < 0.05$). The statistical test indicated
690 with * is performed between the non-treated condition and the different treated ones, corresponding to
691 each timepoint. The statistical test indicated with # is performed between the IVM-treated condition and
692 the different treated ones, corresponding to each timepoint.



695 **Supplementary Figure 1: Clinical profile of hamsters infected with SARS-CoV-2 and treated with**
696 **nAChRs antagonists (mecamylamine or methyllycaconitine) or nAChRs agonists (GAT-107 or EVP-**
697 **6124). (AB, IJ, PQ) Body weight variation over four days post-infection (dpi) in (A, I, P) non-infected and**
698 **(B, J, Q) infected hamsters. (C-E, KL, RS) Clinical score over four days post-infection of: (C, K, R) non-**
699 **infected hamsters or (D, E, L, S) infected hamsters treated with mecamylamine, methyllycaconitine,**
700 **GAT-107 or EVP-6124. The clinical score is based on a cumulative 0–4 scale: ruffled fur; slow**
701 **movements; apathy; and absence of exploration activity. (F-H, MO, TU) Olfactory performance**
702 **measured at 3 dpi. The olfaction test is based on the hidden (buried) food finding test. Curves represent**
703 **the olfactory performance of animals during the test either non-infected (F, M, T) or (G, H, O, U)**
704 **infected treated with with mecamylamine, methyllycaconitine, GAT-107 or EVP-6124. Horizontal lines**
705 **indicate median and the interquartile range. Kruskal-Wallis test followed by the Dunn’s multiple**
706 **comparisons test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001). (n=8 or 9/group).**

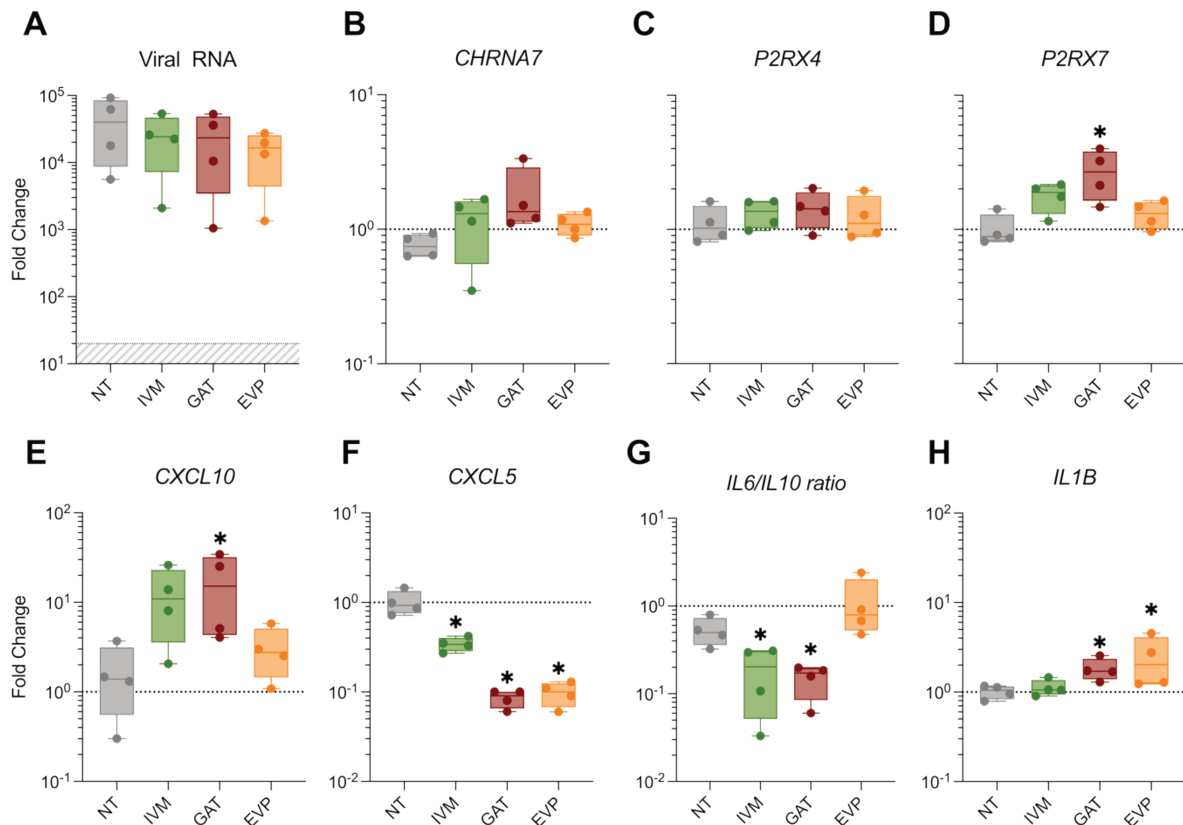


708 **Supplementary Figure 2: Cholinergic receptors modulators effect is variant independent in an *in vitro***
709 **model.** In the Vero E6 *in vitro* model, with the Opera Phenix High Content Screening System technology,
710 **(A, C, E)** total number of cells or **(B, D, F)** percentage of infected cells was measured in the presence of
711 several $\alpha 7$ nAChR modulators at various concentration: ivermectin (IVM, at 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M
712 and 5 μ M), GAT-107 (GAT, at 6.25 μ M, 12,5 μ M and 25 μ M) and EVP-6124 (EVP, at 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M
713 and 16 μ M). Vero E6 cells were infected at an MOI of 0.1 during 56 h for the Wuhan virus or 72 h for
714 Alpha, Beta and Delta variants. These data allowed us the drug's dose with the highest effect on the
715 cell survival and the percentage of infected cell. **(G, I)** Total number of cells in the presence of 5 μ M
716 IVM and a combination of IVM plus **(G)** mecamylamine (Meca, at 8 μ M, 16 μ M, 32 μ M) or **(I)**
717 methyllycaconitine (MLA, at 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M). **(H, J)** Percentage of infected cells in the presence
718 of 5 μ M IVM and a combination of IVM plus **(H)** Meca (8 μ M, 16 μ M, 32 μ M) or **(J)** MLA (0.1 μ M, 1 μ M,
719 10 μ M). All the values are expressed as means, error bars indicate \pm SD. Three independant experiments
720 with ten technical replicates were performed with the Opera Phenix technology. Kruskal-Wallis test
721 followed by the Dunn's multiple comparisons test (only the significant values are shown).

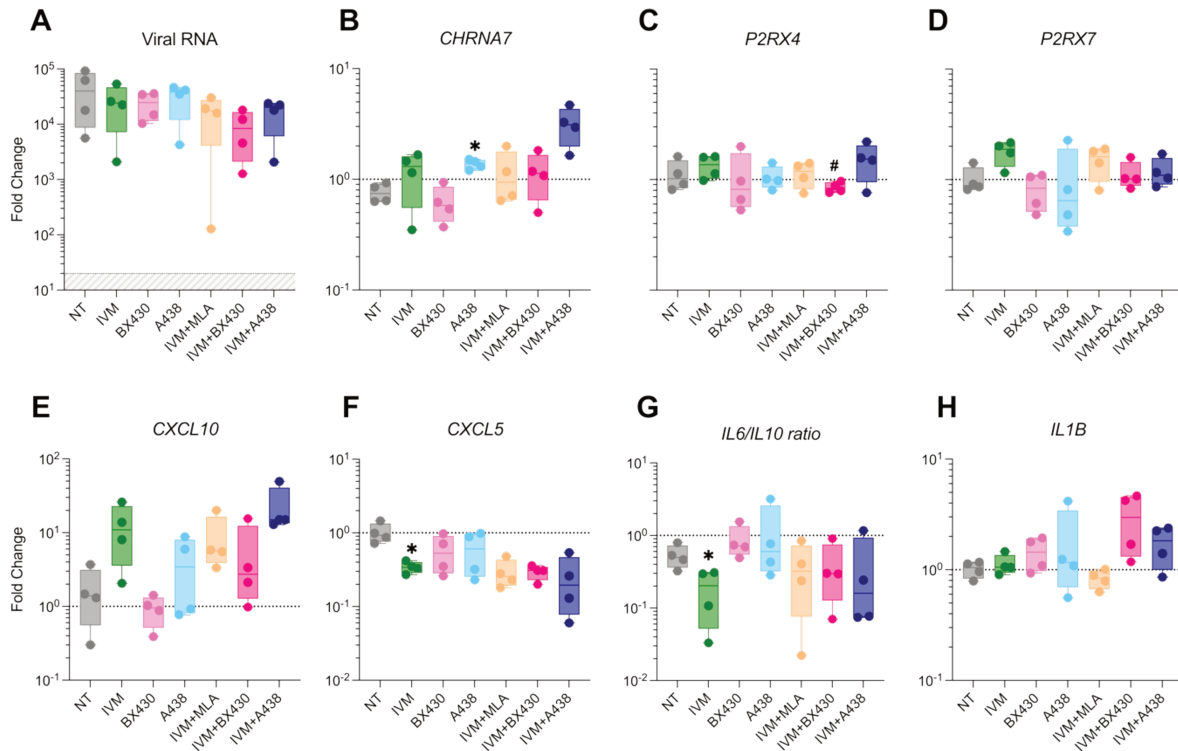


722
723
724
725
726
727
728
729
730
731

Supplementary Figure 3: Interplay between A549-ACE2-TMPRSS2 and THP-1 to modulate host inflammation. Transcriptomic analysis of THP-1 and A549-ACE2-TMPRSS2 cells after 24 hpi and 48 hpi with ivermectin (IVM) in combination or not with cholinergic and purinergic antagonists: BX430 (at 5 μ M, antagonizing P2X4), A438097 (A438, at 10 μ M, antagonizing P2X7), and methyllycaconitine (MLA, at 10 μ M, antagonizing α 7nAChR). The expression of (A) *CHRNA7*, (B) *P2XR4*, (C) *P2XR7*, (D) *IL1B*, (E) *TNF*, (F) *IL4*, (G) *STAT3*, (H) *SOCS3*, and (I) *NLRP3* were measured. The values are normalized on non-infected non-treated conditions, only the infected conditions are shown. Four independent experiments were performed in technical duplicates. All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range.



732
 733 **Supplementary Figure 4: Modulation of α 7nAChR receptors is not sufficient to regulate SARS-CoV-2**
 734 **infection in cellular models.** In the Transwell model, A549-ACE2-TMPRSS2 cells were infected at an
 735 MOI of 0.1 with a Wuhan-nLuc virus. Transcriptomic analysis of THP-1 cells after 72 hpi with α 7nAChR
 736 modulators, ivermectin (IVM, at 5 μ M), GAT-107 (GAT, at 25 μ M) and EVP-6124 (EVP, at 16 μ M). The
 737 mRNA expression of (A) viral RNA, (B) *CHRNA7*, (C) *P2XR4*, (D) *P2XR7*, (E) *CXCL10*, (F) *CXCL5*, (G) *IL6/IL10*
 738 *ratio*, and (H) *IL1B* were measured. The values are normalized on non-infected non-treated conditions,
 739 only the infected conditions are shown. Four independent experiments were performed in technical
 740 duplicates. All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range. All our
 741 negative control values are below the hatched area for the viral RNA. Mann-Whitney test was performed
 742 (*P<0.05). The statistical test is performed between the non-treated condition and the different treated
 743 ones.



744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

Supplementary Figure 5: Modulation of purinergic receptors immunomodulate cells treated with IVM and infected with SARS-CoV-2. In the Transwell model, A549-ACE2-TMPRSS2 cells were infected at an MOI of 0.1 with a Wuhan-nLuc virus. Transcriptomic analysis of THP-1 cells after 72 hpi with 5 μ M IVM in combination or not with cholinergic and purinergic antagonists: BX430 (at 5 μ M, antagonizing P2X4), A438097 (A438, at 10 μ M, antagonizing P2X7), and methyllycaconitine (MLA, at 10 μ M, antagonizing α 7nAChR). The mRNA expression of **(A)** viral RNA, **(B)** *CHRNA7*, **(C)** *P2XR4*, **(D)** *P2XR7*, **(E)** *CXCL10*, **(F)** *CXCL5*, **(G)** *IL6/IL10 ratio*, and **(H)** *IL1B* were measured. The values are normalized on non-infected non-treated conditions, only the infected conditions are shown. Four independent experiments were performed in technical duplicates. All the values are expressed as median, error bars indicate \pm interquartile range. All our negative control values are below the hatched area for the viral RNA. Mann-Whitney test was performed (* $P < 0.05$). The statistical test is performed between the non-treated condition and the different treated ones.

757 **Supplementary Table**

758

759 **Supplementary Table 1: List of primers used in the transcriptomic analysis.**

Gene	Sequence (5'-3') or Qiagen Geneglobe reference number
<i>GAPDH</i>	F: TGG AAG GAC TCA TGA CCA CAG
	R: CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA
<i>18S</i>	F: TGC GAA TGG CTC ATT AAA TCA GT
	R: AGA GGA GCG AGC GAC CAA
Viral RNA (RdRp gene)	F: ATG AGC TTA GTC CTG TTG
	R: CTC CCT TTG TTG TGT TGT
<i>CXCL10</i>	QT01003065
<i>CXCL5</i>	QT00203686
<i>IL6</i>	QT00083720
<i>IL10</i>	QT00041685
<i>IFNG</i>	QT00000525
<i>ISG20</i>	QT00225372
<i>CHRNA7</i>	QT00074732
<i>P2RX4</i>	QT00049693
<i>P2RX7</i>	QT00083643
<i>IL1B</i>	QT00021385
<i>TNF</i>	QT00029162
<i>IL4</i>	QT00012565
<i>STAT3</i>	QT00068754
<i>SOCS3</i>	QT00244580
<i>NLRP3</i>	QT00029771

760 F: Forward; R: Reverse

Partie 3

Partie 3

Anosmie et neuro-invasion lors de l'infection par différents variants du SARS-CoV-2

Depuis le début de la pandémie de la COVID-19, l'émergence de plusieurs variants préoccupants a nécessité une surveillance accrue de la part des systèmes de santé publique de chaque pays (ECDC, 2023b). Avec l'apparition de ces variants, le tableau clinique a également évolué, avec des symptômes souvent moins sévères (Christensen *et al.*, 2022). Ainsi, l'anosmie, précédemment considéré comme un marqueur de la COVID-19, a fortement diminuée chez les patients (Butowt, Bilińska and von Bartheld, 2022).

Au cours de ma thèse, j'ai tout particulièrement étudié les différences cliniques induites par plusieurs variants du SARS-CoV-2 par rapport à la souche ancestrale, Wuhan, dans un modèle de hamsters dorés. Les animaux infectés par la souche Wuhan, ou les variants Gamma, Delta et Omicron/BA.1 ont été suivis pendant 4 jours après l'infection afin d'évaluer la gravité des signes cliniques et de mesurer le déficit olfactif dû à l'infection par chacun de ces variants. Tous les animaux infectés ont présenté une perte de poids progressive, cependant, un effet variant a été observé : les animaux infectés par la souche Wuhan présentent les signes cliniques les plus sévères, suivis par les animaux infectés par Gamma et Delta, tandis que les animaux infectés par Omicron/BA.1 présentent une manifestation retardée de signes légers, cliniquement observables à J4. Nous avons également montré que le déficit olfactif diffère selon les variants : alors que 62,5% des animaux infectés par la souche Wuhan ont présenté une altération de l'odorat, seulement 12,5% des animaux infectés par Gamma l'ont complètement. En revanche, aucun des animaux infectés par Delta et Omicron/BA.1 n'a présenté de signes de déficience olfactive.

Grâce à l'utilisation d'un virus recombinant délété de l'ORF7ab, nous avons montré que cette ORF contribuait à la mise en place de ces troubles olfactifs.

Ce travail, combiné à l'étude de la neuro-invasion du SARS-COV-2, réalisée au sein du laboratoire, a permis la publication d'un article intitulé : « *Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants* » (de Melo *et al.*, 2023) présenté ci-après.

Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants

Received: 17 October 2022

Accepted: 11 July 2023

Published online: 26 July 2023

 Check for updates

Guilherme Dias de Melo ¹, Victoire Perraud ^{1,14}, Flavio Alvarez ^{2,3,14}, Alba Vieites-Prado ^{4,14}, Seonhee Kim ¹, Lauriane Kergoat ¹, Anthony Coleon ¹, Bettina Salome Trüeb⁵, Magali Tichit⁶, Aurèle Piazza⁷, Agnès Thierry⁷, David Hardy⁶, Nicolas Wolff², Sandie Munier⁸, Romain Koszul ⁷, Etienne Simon-Lorière ⁹, Volker Thiel ¹⁰, Marc Lecuit ^{11,12}, Pierre-Marie Lledo¹³, Nicolas Renier ⁴, Florence Larrous ^{1,15} & Hervé Bourhy ^{1,15} ✉

Anosmia was identified as a hallmark of COVID-19 early in the pandemic, however, with the emergence of variants of concern, the clinical profile induced by SARS-CoV-2 infection has changed, with anosmia being less frequent. Here, we assessed the clinical, olfactory and neuroinflammatory conditions of golden hamsters infected with the original Wuhan SARS-CoV-2 strain, its isogenic ORF7-deletion mutant and three variants: Gamma, Delta, and Omicron/BA.1. We show that infected animals develop a variant-dependent clinical disease including anosmia, and that the ORF7 of SARS-CoV-2 contributes to the induction of olfactory dysfunction. Conversely, all SARS-CoV-2 variants are neuroinvasive, regardless of the clinical presentation they induce. Taken together, this confirms that neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon SARS-CoV-2 infection. Using newly generated nanoluciferase-expressing SARS-CoV-2, we validate the olfactory pathway as a major entry point into the brain in vivo and demonstrate in vitro that SARS-CoV-2 travels retrogradely and anterogradely along axons in microfluidic neuron-epithelial networks.

The COVID-19 pandemic remains a major global public health problem. Since the beginning of the pandemic in December 2019, more than 760 million cases have been confirmed, all SARS-CoV-2 variants combined¹. The original SARS-CoV-2 (Wuhan) gave rise to different variants of concern (VoCs) in the first year of the pandemic (Alpha/B.1.1.7, Beta/B.1.351, Gamma/P.1), which were almost totally replaced by the VoC Delta (BL.617.2, AY*) in 2020, by the VoC Omicron and its lineages (e.g. BA.1, BA.2 and BA.5) in 2021-2022 and recombinants (XBB*)¹.

SARS-CoV-2 infects cells of the upper and lower airways, and COVID-19 manifests by a multitude of respiratory and extra-respiratory

symptoms, including neurological manifestations, ranging from headache and dizziness to anosmia, ageusia and even stroke²⁻⁴. The neuropathology of COVID-19 is currently considered to be a consequence of inflammation and hypoxia, rather than direct viral invasion into the CNS^{5,6}. However, with the emergence of the VoCs, and the increasing rate of vaccination or previous infection, the symptomatology of COVID-19 has changed. In this context, the clinical picture induced by the VoC Omicron/BA.1 is less severe or sometimes asymptomatic, with a higher rate of upper airways involvement, sparing the olfactory mucosa and consequently a lower incidence of anosmia, initially considered a hallmark of COVID-19⁷⁻¹³.

A full list of affiliations appears at the end of the paper. ✉ e-mail: herve.bourhy@pasteur.fr

Previously, we determined that the infection of olfactory sensory neurons and loss of cilia in the olfactory mucosa caused by SARS-CoV-2 Wuhan in humans and Syrian hamsters were associated to olfaction loss, as well as to local inflammation and neuroinflammation in the olfactory bulbs, attesting that the golden hamster is a relevant model to study the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection^{14–16}. Other authors reported persistent microgliosis in the olfactory bulbs of infected hamsters¹⁷, and differences in the neuroinvasiveness and neurovirulence of VoCs have been described¹⁸. Additionally, other authors have attempted to compare VoCs pathogenicity in hamsters^{19–21}, but studies relating SARS-CoV-2 brain invasion to neurological symptoms are lacking. In addition to the pathogenicity variation due to mutations in the spike of the variants, other viral proteins may play a role in anosmia and local inflammation, including ORF7, which has been shown to interfere with the host's innate immunity^{22–24}, with cell adhesion in the olfactory mucosa²⁵, and with olfactory receptors²⁶.

Here, we show that SARS-CoV-2 Wuhan and the VoCs Gamma, Delta and Omicron/BA.1 are all capable of invading the brain of Syrian hamsters and of eliciting a tissue-specific inflammatory response. Using reverse genetics-generated bioluminescent viruses, we demonstrate that SARS-CoV-2 infects the olfactory bulbs, but the clinical profile, including the olfactory performance, is highly dependent on the variant. Further, deletion of the ORF7ab sequence in the ancestral virus (Wuhan) reduces the incidence of olfaction loss without affecting the clinical picture nor the neuroinvasiveness via the olfactory bulbs. Accordingly, this work validates that SARS-CoV-2 may travel inside axons and the olfactory pathway as the main entry route by SARS-CoV-2 into the brain and corroborates the neurotropic potential of SARS-CoV-2 variants. Neuroinvasion and anosmia are therefore independent phenomena upon SARS-CoV-2 infection.

Results

SARS-CoV-2 induces a clinical disease in hamsters, with a VoC-related severity difference

We first investigated the differences in the clinical picture induced by different SARS-CoV-2 VoCs in comparison with the ancestral virus (Wuhan). We first tested the *in vitro* growth curves of these viruses in Vero-E6 cells, and found no significant differences (Supplementary Fig. 1A). Then, male golden hamsters were inoculated intranasally with 6×10^4 PFU of SARS-CoV-2 Wuhan, or the VoCs Gamma, Delta or Omicron/BA.1 and followed them up for 4 days post-infection (dpi). All SARS-CoV-2-infected animals presented a progressive loss of weight; however, a variant effect was observed (Kruskal-Wallis $P < 0.0001$, Fig. 1A, B), with SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals presenting the most intense median weight loss (15.8%, interquartile range 'IQR' 3.9%), followed by Gamma-infected animals (11.0%, IQR 2.6%), Delta-infected animals (9.4%, IQR 3.1%) and Omicron/BA.1-infected animals (1.9%, IQR 2.5%). Non-specific sickness-related clinical signs (ruffled fur, slow movement, apathy) followed the same pattern (Kruskal-Wallis $P < 0.0001$, Fig. 1D, E), with SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals presenting the worse clinical picture, followed by Gamma- and Delta-infected animals, while Omicron/BA.1-infected animals presented a delayed manifestation of mild signs, clinically observable at 4 dpi only.

Olfaction loss is a typical clinical sign of SARS-CoV-2 Wuhan-infected hamsters¹⁴, however olfactory deficit differed according to the different VoCs (Chi-square for trend $P < 0.0001$): 62.5% (5/8) of SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals presented loss of olfaction (Log-rank test compared to the mock $P = 0.0012$), only 12.5% (1/8) of Gamma-infected animals lost olfaction completely with 62.5% (5/8) presenting an impaired olfactory performance (i.e. longer time to find the hidden cereals) (Log-rank test compared to the mock $P < 0.0001$). In contrast, none of the Delta- and Omicron/BA.1-infected animals presented signs of olfactory impairment (Fig. 1G, H). All animals found the visible food during the control test, demonstrating that no sickness behavior, visual impairment, or

locomotor deficit was responsible for the delay in finding the hidden food.

Several mutations on the spike distinguish the different VoCs. Furthermore, some VoC isolates also present deletions in the ORF7 sequence^{27–30}, including the Delta isolate used in the present study (deletion spanning positions 27506 to 27540 of the reference SARS-CoV-2 Wuhan genome, which generates a stop codon; Supplementary Fig. 1D). Since a possible link between ORF7b and olfaction loss has been proposed²⁵, we constructed a recombinant SARS-CoV-2 based on the CoV-2/W backbone, where the ORF7ab sequence was replaced by that of GFP (SARS-CoV-2 Wuhan/ Δ ORF7ab) (Supplementary Fig. 4A). Remarkably, the clinical profile exhibited by Wuhan/ Δ ORF7ab-infected hamsters was similar to the one caused by the wild-type SARS-CoV-2 Wuhan (Fig. 1A–F), showing that ORF7ab is not essential for viral infection and replication. However, the olfaction loss incidence decreased significantly; only 25% (2/8) of the infected animals presented signs of anosmia, in contrast to the 62.5% (5/8) observed in CoV-2/SARS-CoV-2 Wuhan-infected hamsters (Fig. 1G, H). Despite this reduction in anosmia incidence, Wuhan/ Δ ORF7ab was still detected in the airways and in the olfactory bulbs of infected animals, with even higher titers (Fig. 2A, B).

Regarding lung pathology, as for the other clinical parameters, lung enlargement and lung weight-to-body weight (LW/BW) ratio were significantly higher in SARS-CoV-2 Wuhan- and in Wuhan/ Δ ORF7ab-infected animals; Gamma- and Delta-infected animals presented intermediate values, whereas Omicron/BA.1-infected animals' values were close to those of the ones of mock-infected animals (Kruskal-Wallis $P < 0.0001$, Fig. 1C, F). Likewise, the histopathological findings in the lungs followed the same tendency: congestion, edema, mononuclear cells infiltration, thickening of the alveolar walls and bronchiolar epithelium desquamation were observed in all infected animals (Supplementary Fig. 2A), along with a diffuse SARS-CoV-2 nucleocapsid staining (Supplementary Fig. 2B), with more severe alterations observed in the lungs of SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals than in Gamma-, Delta-, and Omicron/BA.1-infected hamsters.

In a multivariate analysis of clinical parameters recorded at 4 dpi, the two-first principal components explained 91.9% of sample variability. Body weight loaded negatively to PC1 (principal component) and negatively correlated with the clinical score and the LW/BW ratio, whereas the olfactory performance loaded positively to PC2 (Supplementary Fig. 3A). In the principal component analysis (PCA) plot regarding tissue-related inflammation, the difference among groups was marked: mock and Omicron/BA.1-infected animals loaded homogeneously and relatively close, followed by the Delta-infected animals. SARS-CoV-2 Wuhan-, Wuhan/ Δ ORF7ab-, and Gamma-infected animals loaded in a more dispersed way, far away from the other VoCs, effect of the olfactory performance deficit and clinical severity (Supplementary Fig. 3C).

SARS-CoV-2-infected airways respond to the infection regardless of the viral variants

Next, we measured the viral titer and RNA loads in the upper airways (nasal turbinates), and in the lower airways (lung). Infectious viruses were detected in the nasal turbinates and in the lungs of all infected hamsters regardless of the VoC, however, a variant effect was observed, with the highest values for the Gamma-infected animals, and the lowest values for the Omicron/BA.1-infected animals (Kruskal-Wallis $P < 0.0001$, Fig. 2A). Genomic and sub-genomic SARS-CoV-2 RNA were detected equally in the lungs of all infected animals; but differently in the nasal turbinates, regardless of the positivity of all samples, Delta-infected animals presented the highest viral load (Kruskal-Wallis $P = 0.0023$, Fig. 2B).

Both the upper and lower airways responded to the infection by all VoCs (Fig. 2C, D), but with a tissue-specific inflammatory signature: in the lungs, *Mx2*, *Il-6*, *Cxcl10* and *Il-10* were upregulated for all VoCs,

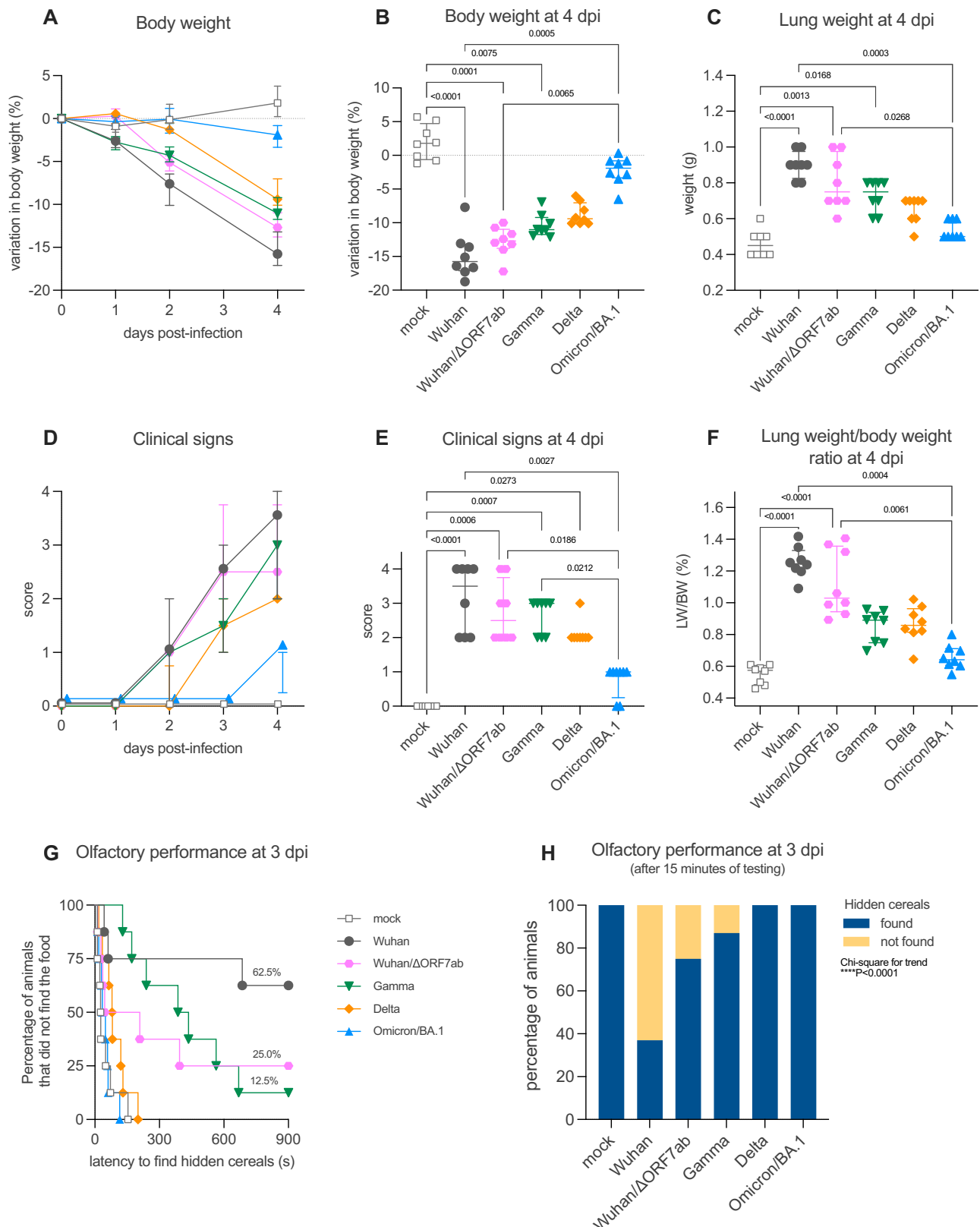
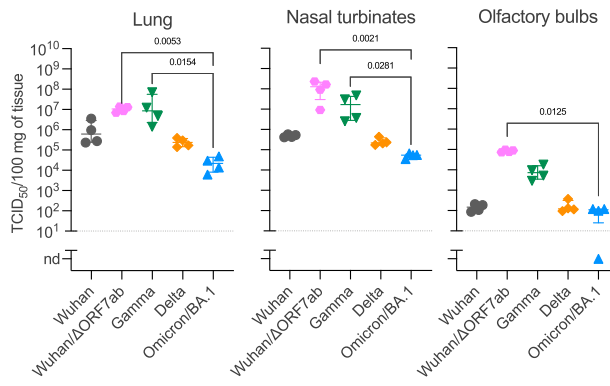


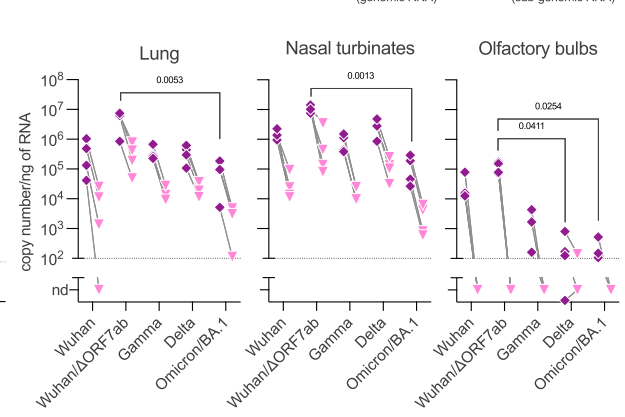
Fig. 1 | Clinical profile of hamsters infected with SARS-CoV-2 original virus (Wuhan), the recombinant Wuhan/ Δ ORF7ab or the variants of concern (VoC) Gamma, Delta, and Omicron/BA.1. A, B Body weight variation over four days post-infection. **C** Lung weight measured at 4 dpi. **D, E** Clinical score over four days post-infection. The clinical score is based on a cumulative 0–4 scale: ruffled fur; slow movements; apathy; and absence of exploration activity. **F** Lung weight-to-body weight ratio measured at 4 dpi. **A–F** Horizontal lines indicate median and the

interquartile range ($n = 8$ /group). **B, C, E, F** Kruskal-Wallis test followed by the Dunn’s multiple comparisons test (the adjusted p value is indicated when significant). **G, H** Olfactory performance measured at 3 days post-infection (dpi). The olfaction test is based on the hidden (buried) food finding test. Curves represent the olfactory performance of animals during the test (**G**) and bars represent the final results (**H**) ($n = 8$ /group). Chi-square test for trend (the adjusted p value is indicated when significant). See Supplementary Figs. 1, 2.

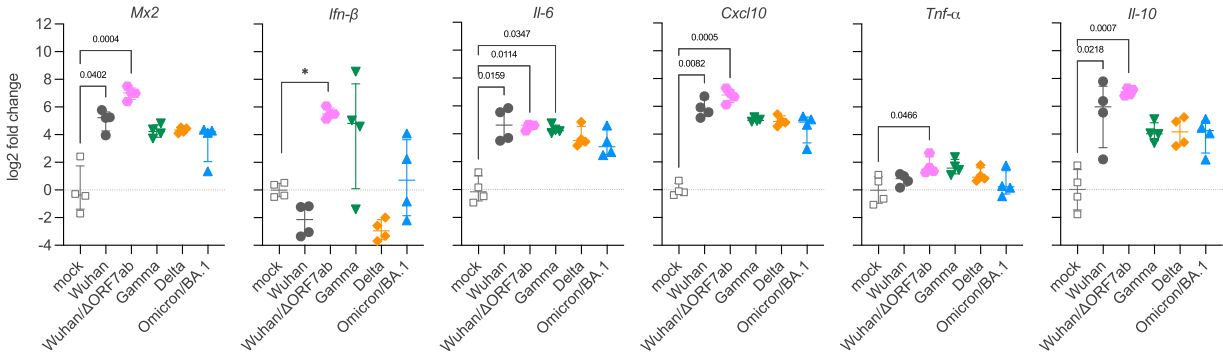
A. Viral titer 4 dpi



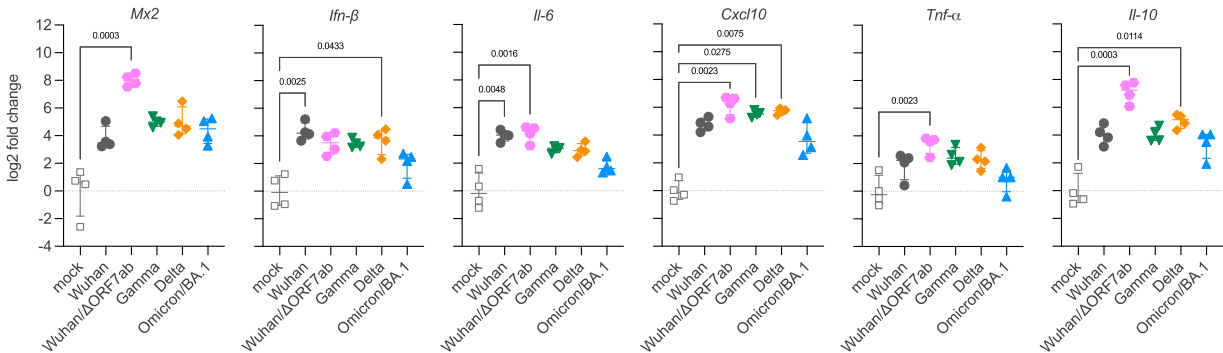
B. Viral RNA load at 4 dpi



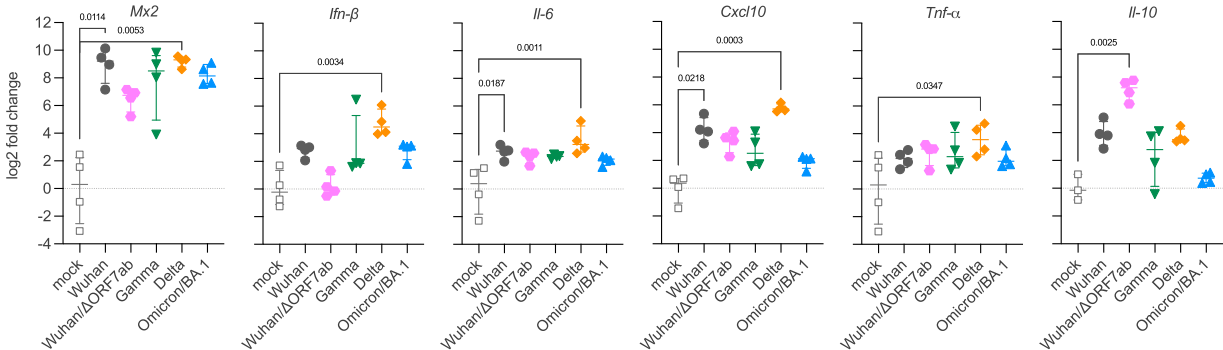
C. Gene expression in the lungs at 4 dpi



D. Gene expression in the nasal turbinates at 4 dpi



E. Gene expression in the olfactory bulbs at 4 dpi



and the highest in SARS-COV-2 Wuhan-infected animals (Fig. 2C). In the nasal turbinates, the gene expression of *Ifn-β* and *Il-6* presented the highest values in SARS-COV-2 Wuhan-infected animals and the lowest in Omicron/BA.1-infected animals. *Mx2*, *Cxcl10* and *Il-10* expression were the highest in Delta-infected animals while Omicron/BA.1-infected animals showed the lowest levels (Fig. 2D). Interestingly, Wuhan/

ΔORF7ab infection induced a different lung inflammatory signature compared to Wuhan or the other VoCs, represented by a higher expression of *Mx2* and *Ifn-β* (Fig. 2C). In the nasal turbinates, Wuhan/ΔORF7ab infection also induced a higher expression of *Mx2*, but also *Il-6*, *Cxcl10*, *Tnf-α* and *Il-10* (Fig. 2D). To better appreciate the tissue- vs. virus-related gene expression, we performed a multivariate analysis of

Fig. 2 | Virologic assessment and gene expression of selected immune mediators in different tissues of hamsters infected with SARS-CoV-2 original virus (Wuhan), the recombinant Wuhan/ΔORF7ab or the variants of concern (VoC) Gamma, Delta, and Omicron/BA.1. A Infectious viral titers in the lung, nasal turbinates, and olfactory bulbs at 4 days post-infection (dpi) expressed as TCID₅₀ per 100 mg of tissue. Horizontal lines indicate median and the interquartile range ($n = 4/\text{group}$). **B** SARS-CoV-2 viral RNA load detected in the lung, nasal turbinates, and olfactory bulbs at 4 dpi. Genomic and sub-genomic viral RNA were assessed

based on the E gene sequence. Horizontal lines indicate median and the interquartile range. Gray lines connect symbols from the same animals ($n = 4/\text{group}$). Gene expression values in the lung (C), nasal turbinates (D) and olfactory bulbs (E) of *Mx2*, *Ifn-β*, *Il-6*, *Cxcl10*, *Tnf-α* and *Il-10* at 4 dpi. A–E Horizontal lines indicate median and the interquartile range ($n = 4/\text{group}$). Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test (the adjusted p value is indicated when significant). nd: not detected. See Supplementary Figs. 1, 2.

these data. Interestingly, the two-first principal components explained 79.5% of sample variability (Supplementary Fig. 3B). In the PCA plots, the nasal turbinates of all infected hamsters were loaded in proximity to each other (Supplementary Fig. 3D), whereas the lungs were separated by an important effect of *Il-6*, *Cxcl10* and *Il-10* (Supplementary Fig. 3D).

SARS-CoV-2 neuroinvasion and neuroinflammation in the olfactory bulbs

After establishing the clinical and inflammatory profile of the infected animals, we aimed to assess the effect of infection on the olfactory bulbs. Remarkably, even if the olfactory performance differed according to the VoCs (Fig. 1G, H), positive viral titers were detected in the olfactory bulbs of animals from all infected groups, with Wuhan/ΔORF7ab and Gamma-infected animals presenting the highest titer at 4 dpi (Kruskal-Wallis $P = 0.0096$, Fig. 2A). These findings were corroborated by the detection of genomic viral RNA in the olfactory bulbs of animals from all infected groups as well, but viral RNA load was higher in SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals (Kruskal-Wallis $P = 0.0104$, Fig. 2B). Conversely, in these samples, the sub-genomic RNA was below the detection limit.

The olfactory bulbs presented an intriguing inflammatory profile. The antiviral *Mx2* gene, along with the inflammatory genes *Ifn-β*, *Il-6* and *Cxcl10* were highly upregulated in the olfactory bulbs of all infected hamsters (Fig. 2E), regardless of their olfactory performance in the food-finding test (Fig. 1G, H), yet *Il-10* expression was highly upregulated in the olfactory bulbs of SARS-CoV-2 Wuhan/ΔORF7ab-infected animals (compared to the mock). Unexpectedly, the gene expression of these selected targets tended to be higher in the olfactory bulbs of Delta-infected animals (Fig. 2E). In a multivariate analysis for tissue- and virus-related gene expression, the olfactory bulbs from SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals tended to load in proximity to the corresponding nasal turbinates (effect of *Il-6*, *Cxcl10* and *Il-10*), whereas olfactory bulbs from Gamma-, Delta- and Omicron/BA.1-infected animals loaded separately, possibly reflecting the impact of *Mx2*, *Tnf-α* and *Ifn-β* differential expression (Supplementary Fig. 3D).

Having detected the virus in the olfactory bulbs using virologic and molecular techniques, we aimed to visualize the infection. We examined the SARS-CoV-2 Wuhan distribution in the whole brain by combining whole-head tissue clearing with light sheet microscopy imaging using iDISCO³¹. At 4 dpi, all Wuhan-infected hamsters displayed a diffuse viral distribution in the nasal cavity: nasal turbinates and olfactory epithelium (Fig. 3A and Supplementary Movie 1). Along the same lines, all SARS-CoV-2 Wuhan-infected animals presented SARS-CoV-2 in the olfactory bulbs in sparse neurons, localized in the proximity of the olfactory nerve entry point (Fig. 3B and Supplementary Movie 1). Using this technique, no infected cells were observed in other areas of the brain and no alteration in the vascular network was detected.

We next used a complementary method to visualize the infection of the olfactory bulbs. To this end, we generated recombinant viruses that express the nanoluciferase by reverse genetics (Wuhan_nLuc, Wuhan/ΔORF7ab_nLuc, and Delta_nLuc; Supplementary Fig. 1B, C and Supplementary Fig. 4A). The disease profile induced by these three novel recombinant viruses was similar to the profile induced by the wild-type parental viruses (Fig. 3C). In vivo imaging of infected

hamsters was performed at 4 dpi using fluorofurimazine (FFz) as substrate. Very low positive signals were observed in the nasal cavity region, possibly due to the thickness of the skin and bones that could block the light emission, but significantly higher in the Wuhan_nLuc than in the Wuhan/ΔORF7ab_nLuc the Delta_nLuc (Kruskal-Wallis $P = 0.0107$, Supplementary Fig. 4BC). More sensitive results were obtained during the ex vivo imaging. After euthanasia, the lungs and brains were collected and imaged. Positive signals in the lungs were obtained at the same intensity for the three viruses (Fig. 3D), and presented a multi-focal/diffuse distribution (Fig. 3E and Supplementary Fig. 4D). The brains were imaged in the ventral position in order to better expose the olfactory bulbs. Intense luminescent signals were recorded from the brains of hamsters infected with all viruses; when placing the ROI (region of interest) exclusively in the olfactory bulbs, intensity was higher in Wuhan_nLuc compared to Delta_nLuc; conversely, when considering the whole brain ventral area, intensity was higher in Delta_nLuc. Wuhan/ΔORF7ab_nLuc induced intermediate values (Fig. 3C and Supplementary Fig. 4D), which might reflect the higher replication rate detected in the olfactory bulbs infected Wuhan (Fig. 2B). Despite intensity differences, the olfactory bulbs were the major infected structure in the brain, and sagittal views of the brain indicate that the origin of the luminescent signal is the ventral part of the olfactory bulbs, which is situated above the olfactory epithelium in the nasal cavity (Fig. 3E and Supplementary Fig. 4E).

Anosmia is not associated with viral load or infection of the olfactory bulbs

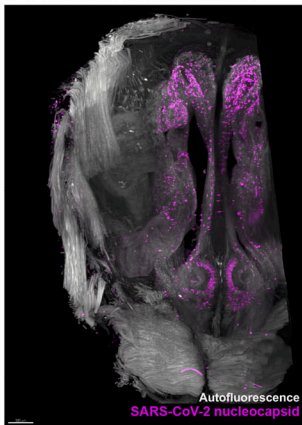
All tested SARS-CoV-2 variants were found to be able to invade the CNS and infect the olfactory bulbs, but the incidence of olfactory dysfunctions varied according to the VoC, with hamsters infected with Delta and Omicron/BA.1 presenting no signs of anosmia (Fig. 1G, H). To test if the viral inoculum could influence the neuroinvasiveness of SARS-CoV-2 and the incidence of olfactory dysfunctions, we infected hamsters with a 2-log lower infectious dose of Wuhan (6×10^2 PFU). These animals were subjected to the same clinical-behavioral tests described above. In the acute phase of the infection, up to 4 dpi, the low infectious dose induced similar body weight loss and clinical score as the animals infected with the initial inoculum (6×10^4 PFU), as well as infectious viral titers in the airways and in the olfactory bulbs (Supplementary Fig. 5). Surprisingly, despite the presence of infectious virus in the olfactory bulbs, animals infected with a lower infectious dose presented a lower incidence of olfactory dysfunction (25%, 2/8).

SARS-CoV-2 travels retrogradely and anterogradely along axons

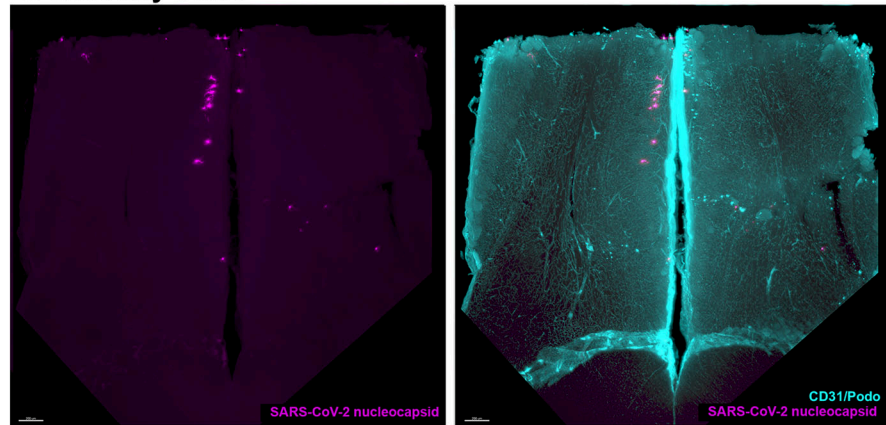
In vitro, the infection of neurons with SARS-CoV-2 is a contradictory subject³². On the one hand, there are descriptions that SARS-CoV-2 can infect hPSC-derived dopaminergic neurons and cause neuronal senescence³³, or that a small subset of iPSC-derived neurons can be subjected to an abortive infection³⁴. On the other hand, it was suggested that the presence of additional permissive cells may be necessary for a successful neuronal infection³⁵. The attempts we made to infect monocultures of hNSC-derived neurons were not positive, and consequently, we developed a co-culture system with hNSC-derived neurons and SARS-CoV-2-receptive epithelial cells (A549-hACE2-TMPRSS2 cells). We grew these co-cultures using axonal diodes in microfluidic devices³⁶ to assess the ability of SARS-CoV-2 to infect

Light sheet imaging at 4 dpi

A. Nasal turbinates

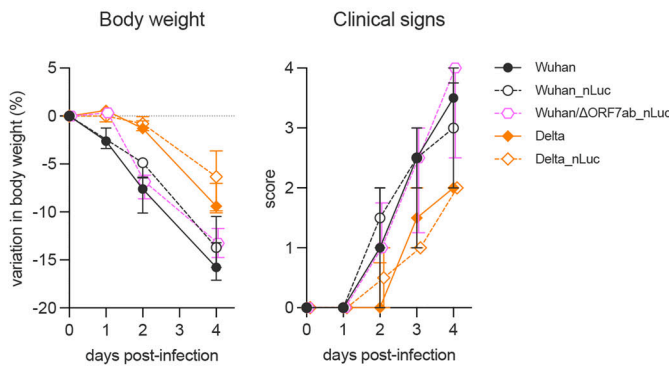


B. Olfactory bulbs

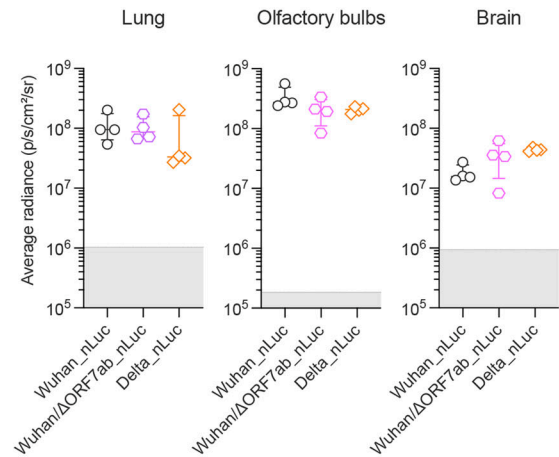


Bioluminescence imaging of recombinant SARS-CoV-2/nLuc at 4 dpi

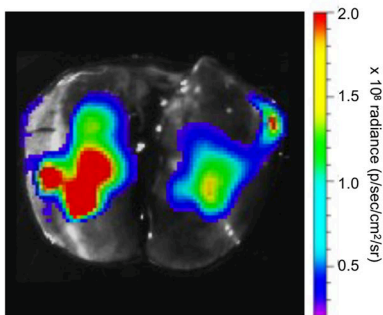
C. Clinical profile



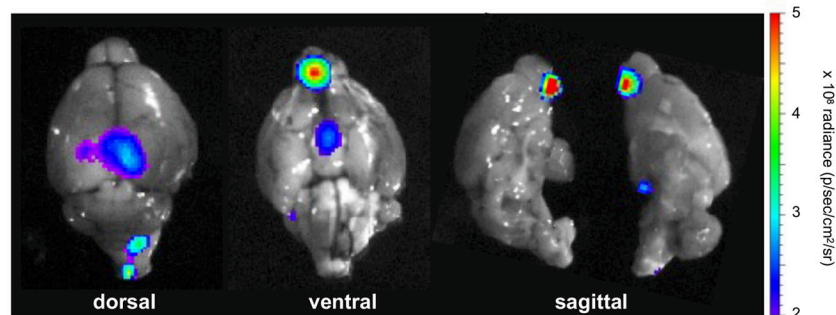
D. Ex vivo bioluminescence



E. Lung



F. Brain



neurons and to move inside axons. In these devices, the co-cultures form neuron-epithelial networks in both the left and the right chambers of the device (Fig. 4A, B), that are connected exclusively via an unidirectional growth of axons from the left towards the right chamber (Fig. 4C). Then, the right or the left chamber of the microfluidic devices was infected with the ancestral virus (Wuhan), the Wuhan/ Δ ORF7ab and the VoCs Gamma, Delta and Omicron/BA.1. At 3 dpi, infected cells were detected in both the right and the left chambers of all devices, attesting that the virus travelled from the right to the left chamber inside the axons (retrograde axonal transport; Fig. 4D, H and Supplementary Fig. 6), and from the left to the right chamber inside the axons

(anterograde axonal transport; Fig. 4I–M and Supplementary Fig. 7). To further confirm the involvement of the axonal transportation of SARS-CoV-2, we used ciliobrevin D, an inhibitor of the cytoplasmic dynein transport machinery which acts on the bidirectional transport of organelles along axons³⁷. When the infection occurred in the presence of ciliobrevin D, the retrograde transport was blocked, and no SARS-CoV-2-infected cell was observed in the left chamber (Supplementary Fig. 8). To quantify the arrival of viral particles via the axons, we infected microfluidic devices in both retrograde and anterograde conditions with the recombinant viruses expressing nanoluciferase Wuhan_nLuc, Wuhan/ Δ ORF7ab_nLuc, and Delta_nLuc, and we

Fig. 3 | Imaging assessment of SARS-CoV-2 neuroinvasion. A, B iDISCO+ whole head clearing and immunolabeling against the SARS-CoV-2 nucleocapsid in hamsters infected with the SARS-CoV-2 original virus (Wuhan) at 4 days post-infection (dpi). **A** Representative nasal turbinate (sagittal section from the skull) showing a diffuse distribution of SARS-CoV-2 (scale bar = 500 μ m). **B** Representative olfactory bulb section stained for SARS-CoV-2 nucleocapsid and for podoplanin (CD31/Podo) to identify the vascular compartment. Note presence of SARS-CoV-2 in olfactory bulb neurons, with no macroscopic alterations in the vascular network of the olfactory bulb. Scale bar: 200 μ m. See Supplementary Movie 1. **C, F** Bioluminescent recombinant SARS-CoV-2 viruses induce a clinical disease with infection of the olfactory bulbs. **C** Clinical profile of hamsters infected with the recombinant viruses SARS-CoV-2 Wuhan_nLuc and Wuhan/ Δ ORF7ab_nLuc (based on the original SARS-CoV-2 Wuhan) and Delta_nLuc (based on the Delta variant). The body weight loss

and the clinical score are comparable with those induced by wild-type viruses ($n = 4$ /group). Horizontal lines indicate median and the interquartile range (See Fig. 1A). The clinical score is based on a cumulative 0–4 scale: ruffled fur; slow movements; apathy; and absence of exploration activity (See Fig. 1D). **D** Ex vivo bioluminescence values from the lungs, the olfactory bulbs (ventral view), the brains (ventral view) at 4 dpi ($n = 4$ /group). Horizontal lines indicate median and the interquartile range. Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test (the adjusted p value is indicated when significant). The gray cross-hatched area corresponds to background signals obtained from the same tissues of a mock-infected hamster. **E, F** Representative ex vivo imaging of a lung (**C**) and a brain (**D**) of a hamster infected with a recombinant SARS-CoV-2 expressing the nLuc at 4 dpi. Note that in the brain, the major bioluminescent focus is localized in the ventral face of olfactory bulbs. See Supplementary Fig. 3.

measured the luminescence in the supernatants on a daily basis (Supplementary Fig. 9). Positive nLuc activity was detected in the supernatants of all receiving chambers from 1 dpi, increasing progressively overtime (Supplementary Fig. 9G, H), indicative of retrograde and anterograde SARS-CoV-2 movement. The luminescence values in the infected chambers were constant and at the maximum limit of detection (Supplementary Fig. 1).

Discussion

The neurotropism of SARS-CoV-2 is still a matter of debate³². While studies on natural infection in humans and experimental infection in animal models reported brain infection by SARS-CoV-2^{14,38–42}, including in in vitro human models of infection^{43–45}, others failed to detect SARS-CoV-2 in the nervous tissue^{5,46}. This inconsistency may be due to the time of infection, as in most cases the available samples are post-mortal, and we have demonstrated, in the hamster model, that viral isolation is time-dependent, with higher viral loads found in acute time-points¹⁴. Despite this open question, the impact of SARS-CoV-2 infection on the brain is undeniable^{2,47–49}. Most of these published data is related to the original SARS-CoV-2 (Wuhan), however, less information concerning VoCs neuropathogenesis is available¹⁰. Here we show that all evaluated SARS-CoV-2 viruses (Wuhan, Gamma, Delta and Omicron/BA.1), including novel generated recombinant SARS-CoV-2, are able to cause neuroinflammation following brain invasion. This is most likely via the olfactory bulb; however, the exact neural route warrants further research.

Despite this shared neuroinvasiveness via the olfactory bulbs, disease profile and airways responses are quite dependent on the SARS-CoV-2 variant. Indeed, we show that all VoCs can infect golden hamsters and promote lung inflammation, including Omicron/BA.1 differently from other reports^{19,50}, probably due to infectious doses or viral isolates. A “variant-effect” in the clinical presentation and in the tissue-related inflammation was evident, with disease severity presenting the following order: SARS-CoV-2 Wuhan > Gamma > Delta > Omicron/BA.1, which supports the hypothesis that Omicron/BA.1 evolution has resulted in a tropism more restricted to the upper respiratory tract, thereby causing a less severe clinical disease^{10,51–53}. Although with different severities, neuroinvasiveness, neurotropism and neurovirulence³² seem to be conserved features among SARS-CoV-2 variants. Indeed, the data presented herein give support to the neuroinvasive ability of SARS-CoV-2, as besides detection of viral RNA and isolation of infectious virus from the olfactory bulbs, we could clearly observe SARS-CoV-2 infected neurons in the brain of hamsters by light sheet microscopy. Nevertheless in hamsters, unlike what has been reported in K18-hACE2 mice which ACE2 expression pattern is non-physiological and ectopic³⁹, detection of SARS-CoV-2-infected cells was restricted to the olfactory bulbs, without evidence of brain vasculature remodeling nor virus associated with blood vessels.

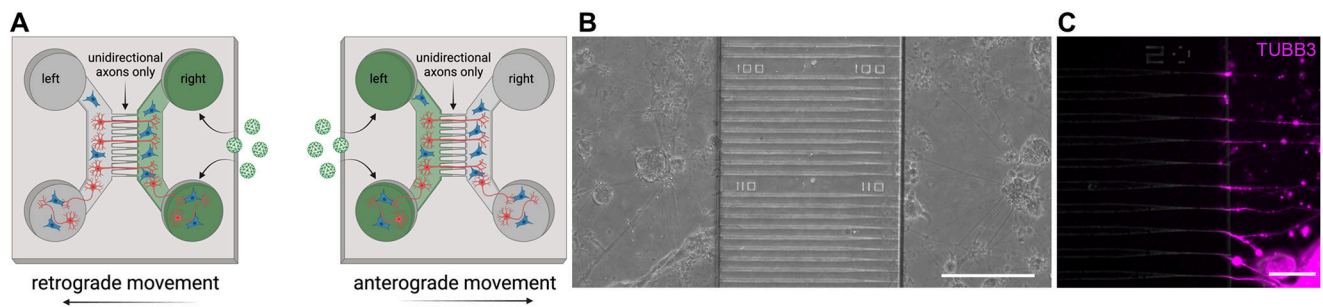
Olfactory bulb infection is therefore a common feature in the SARS-CoV-2 infectious process, regardless of the variant considered. An inflammation response was also observed in this tissue, with a common upregulation of the antiviral gene *Mx2*, regardless of the VoC. The

reason why some VoCs do not cause olfaction loss is still an open question. The infection and inflammation of the olfactory bulbs, if involved in SARS-CoV-2-associated anosmia, does not seem to be enough to cause olfaction loss in the golden hamster. Aggressions to the olfactory mucosa, rather than the olfactory bulb, are indeed likely the main factors contributing to anosmia, as recovery from anosmia has been related to regeneration of the olfactory epithelium in hamsters^{54,55}. Moreover, significant changes in the olfactory epithelium, such as apoptosis, architectural damages, inflammation, downregulation of odorant receptors and functional changes in olfactory sensory neurons, might also contribute, on top of the infection per se, to the occurrence of anosmia^{10,14,56–59}. Therefore, it seems that infection and inflammation of the olfactory mucosa combined are needed to trigger anosmia, and the lower incidence of anosmia observed after infection by some VoCs is therefore linked to lower levels of inflammation.

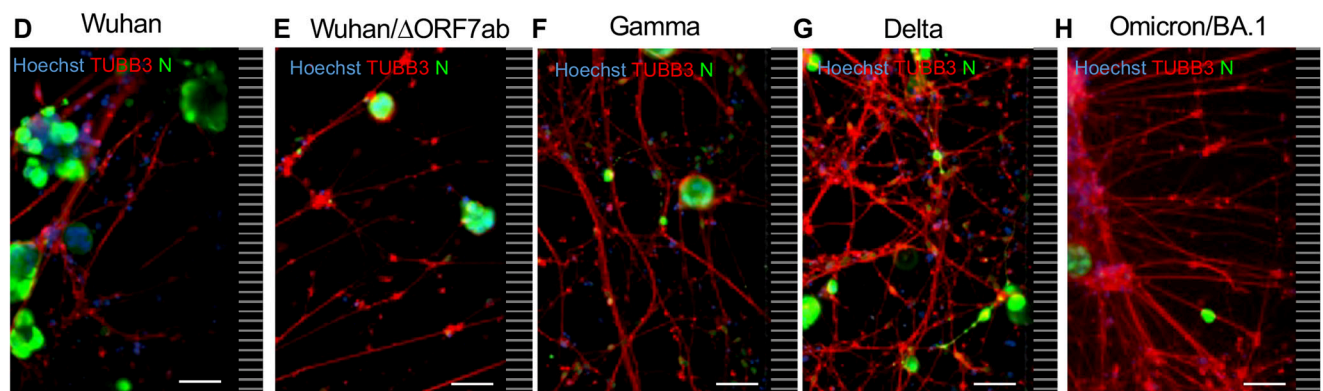
Furthermore, besides mutations in the spike sequence in the SARS-CoV-2 variants genome, additional mutations may be present in other regions of the viral genome, including deletions in the ORF7a and ORF7b sequences^{27–30}. ORF7a and ORF7b have been related to viral-induced apoptosis, and to interference with the innate immunity and the antiviral response^{22–24,60,61}, without, however, being essential to viral infection and replication^{62,63}. Further, ORF7b has the potential to interfere with cell adhesion proteins in the olfactory mucosa²⁵, and interestingly, a binary interaction between ORF7b and the human olfactory receptor OR1D5 has also been reported²⁶. Deletions or mutations in these regions may therefore play an additional role in the induction of olfactory disturbances, by preserving the architecture and structures of the olfactory epithelium. Another important point is that we can observe a similar clinical profile and low incidence of olfactory disturbances as SARS-CoV-2 Wuhan/ Δ ORF7ab by simply reducing the viral inoculum of SARS-CoV-2 Wuhan. Regardless of a comparative evolution of body weight loss and clinical score⁶⁴, anosmia was less frequent in animals infected with a low dose of SARS-CoV-2 Wuhan. This might be related to the less severe initial aggression suffered by the olfactory epithelium due to lower infectious doses^{55,65} and may also explain why other studies did not detect olfaction dysfunction despite detecting inflammatory changes in the brain⁶⁶.

Despite the occurrence or not of anosmia, SARS-CoV-2 can infect olfactory sensory neurons and the olfactory bulb^{10,14}, and we show herein that the virus can infect neurons and travel inside the axons in both retrograde and anterograde directions. SARS-CoV-2 neuroinvasion was hypothesized to occur by axonal transport via cranial nerves (olfactory, vagus, trigeminal) or by the hematogenous route^{32,67,68}. The data presented herein do not support hematogenous diffusion of SARS-CoV-2 towards the brain, but corroborate the hypothesis of the olfactory pathway as a preferential portal of entry towards the olfactory bulbs⁶⁹. Brain infection via the olfactory pathway therefore seems a common feature of coronaviruses^{70,71}, regardless of clinical disease presentations. Finally, this study highlights that neuroinvasion and anosmia are therefore independent phenomena upon SARS-CoV-2 infection.

Neuron-epithelial networks in a microfluidic device



SARS-CoV-2 retrograde movement ←



SARS-CoV-2 anterograde movement →

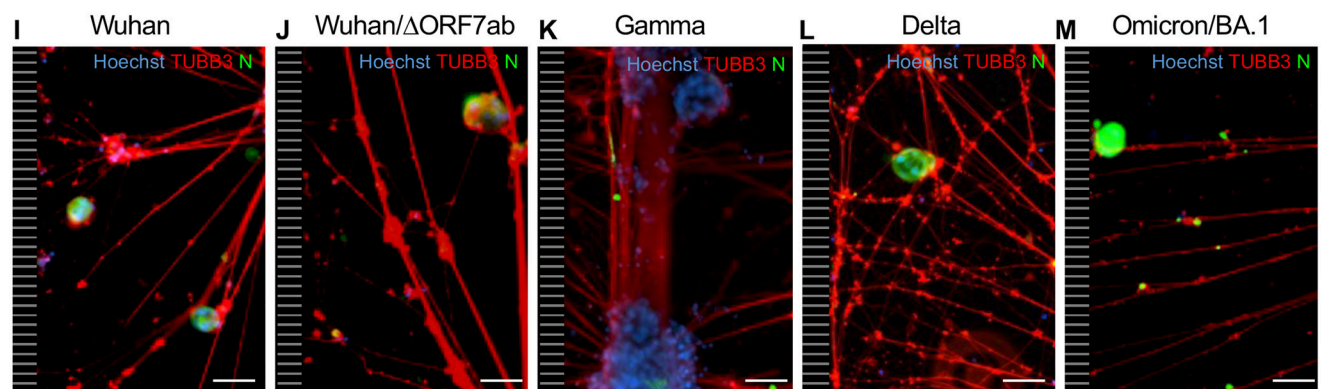


Fig. 4 | SARS-CoV-2 travels inside axons in *in vitro* neuron-epithelial networks.

A Schematic view of an axon diode in a microfluidic device containing neurons and epithelial cells in both the left and right chambers. The chambers are connected exclusively by the axons of neurons whose cell bodies are located in the left chamber. In this study, SARS-CoV-2 was added in the right chamber (to assess the retrograde axonal transport) or in the left chamber (to assess the anterograde axonal transport). **B** Bright field view of a neuron-epithelial network showing neuronal and A549-ACE2-TMPRSS2 co-culture in both chambers, separated by funnel-shaped micro-channels (scale bar = 200 μm). **C** Detail of β -Tubulin III-positive axons crossing the funnel-shaped micro-channels and entering in the right chamber (scale bar = 50 μm). Neuron-epithelial networks infected at the right

chamber with SARS-CoV-2 Wuhan (**D**), Wuhan/ Δ ORF7ab (**E**), Gamma (**F**), Delta (**G**) and Omicron/BA.1 (**H**) showing infected cells in the left chambers (scale bar = 50 μm). Neuron-epithelial networks infected at the left chamber with SARS-CoV-2 Wuhan (**I**), Wuhan/ Δ ORF7ab (**J**), Gamma (**K**), Delta (**L**), and Omicron/BA.1 (**M**) showing infected cells in the right chambers (scale bar = 50 μm). Hoechst: nuclei (blue). TUBB3: β -Tubulin III (red). N: SARS-CoV-2 nucleocapsid (green). The black and white striped zones in the right (**D–H**) and in the left (**I–M**) of the photomicrographs represents the microchannels, which are not accessible during immunostainings. **B–M** These photomicrographs are representative of 3 independent experiments. See Supplementary Figs. 6–9. Panel **A** was created with BioRender.com.

Methods

Ethics

All animal experiments were performed according to the French legislation and in compliance with the European Communities Council

Directives (2010/63/UE, French Law 2013–118, February 6, 2013) and according to the regulations of Institut Pasteur Animal Care Committees. The Animal Experimentation Ethics Committee (CETEA 89) of the Institut Pasteur approved this study (200023; APAFIS#25326-

2020050617114340 v2) before experiments were initiated. Hamsters were housed by groups of 4 animals in isolators and manipulated in class III safety cabinets in the Pasteur Institute animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents. All animals were handled in strict accordance with good animal practice.

SARS-CoV-2 virus and variants

The isolate BetaCoV/France/IDF00372/2020 (EVAg collection, Ref-SKU: 014V-03890) was kindly provided by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Pr. Sylvie van der Werf. The human sample from which strain hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (Brazilian variant, JPN [P.1]) was supplied by the Japanese National Institute of Infectious Diseases (Tokyo, Japan). The isolate SARS-CoV-2 Delta/2021/17.2 200 (Indian variant, GISAID ID: EPI_ISL_2029113) and the isolate SARS-CoV-2 Omicron/B.1.1.529 (Omicron BA.1 variant, GISAID ID: EPI_ISL_6794907) were kindly provided by the Virus and Immunity Unit hosted by Institut Pasteur and headed by Olivier Schwartz^{72,73}. Viral stocks were produced on Vero-E6 cells infected at a multiplicity of infection of 1×10^{-4} PFU/cell. The virus was harvested 3 days post-infection, clarified and then aliquoted before storage at -80°C . Viral stocks were titrated on Vero-E6 cells by classical plaque assays using semisolid overlays (Avicel, RC581-NFDR080I, DuPont)⁷⁴.

Recombinant viruses expressing Nanoluciferase (nLuc) as a reporter gene were obtained by reverse genetics. Wuhan_nLuc was derived from the clone synSARS-CoV-2-GFP-P2A-ORF7a (clone #41) generated as described⁷⁵⁻⁷⁹, where the GFP reporter gene was replaced by the nLuc one. The cloning strategy was optimized to build a complete cDNA of the Delta_nLuc virus on the same backbone than the isolate EPI_ISL_2029113. SARS-CoV-2 Wuhan/ Δ ORF7ab was obtained using the same reverse genetic system by replacing the complete ORF7ab sequence by that of GFP or by nLuc (Wuhan/ Δ ORF7ab_nLuc).

Generation of the complete genome of SARS-CoV-2/Delta_nLuc virus

The viral genome was divided in 11 overlapping fragments around 3 kb each. Those fragments and two fragments coding for different yeast-specific selection genes (His3 and Leu2) were recombined in the yeast centromere plasmid pRS416 to generate the complete genome clone of recombinant virus. The T7 promoter was placed just before the 5'UTR sequence and a unique restriction site EAGI was placed just after the poly(A) tail.

Viral fragments were obtained either by RT-PCR on RNA extracted from Vero-E6 cells infected by Delta using the SuperScript IV VIL0 Master Mix (11756050, ThermoFisher) according to the manufacturer protocol, or using synthetic genes (GeneArt, Life Technologies). All PCR amplifications were performed using PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (F530, ThermoFisher). The PCR product were cloned in Topo-TA vector and their sequences controlled by sanger sequencing. The nLuc gene was inserted upstream ORF7a and separated from it using a GSG linker and a P2A peptide sequence to mediate cleavage between the reporter and the viral protein. It was directly synthesized in the F10-1 fragment.

Yeast recombination

Recombination of the 4 yeast specific fragments and the 11 viral fragments was performed on *S. cerevisiae* BY4741. A yeast culture was carried out from an overnight pre-culture in YPDA medium (2 mL of pre-culture in 50 mL of YPDA medium heated to 30°C) until the exponential growth phase was reached, with an optical density corresponding to approximately 10^8 cells/mL. The yeasts were harvested by centrifugation of 50 mL of culture ($3,000 \times g$ at 4°C during 5 min) before being washed a first time in sterile solution of Tris-EDTA and lithium Acetate TE/LiAc (Tris-HCl pH 7.5 10 mM; EDTA

pH 7.5 0.1 mM; LiAc 100 mM). Cells were resuspended in 500 μL of TE/LiAc solution (2.10^9 cells/mL). The yeast suspension was then incubated at 30°C without stirring during 30 min. During this time, a mix of all DNA fragments in an equimolar proportion was prepared. For each recombination condition, 50 μL of competent cells (10^8 cells) were resuspended in a final volume of 300 μL TE/LiAc/PEG solution (100 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM Lithium Acetate; 40% v/v PEG 3350) with the DNA mix to be recombined and 50 μg of denatured salmon sperm DNA (31149, Sigma) and then cooled on ice for 5 min. The mixture was incubated at 30°C during 30 min without agitation before undergoing a heat shock at 42°C during 20 min. After cooling on ice, the yeasts were pelleted by centrifugation at $500 \times g$ at RT during 5 min and then resuspended and incubated with 500 μL of 5 mM CaCl_2 at RT for 10 min. CaCl_2 was washed by centrifugation at $500 \times g$ at RT during 5 min and cells were resuspended in 200 μL of sterile water before being plated on selective synthetic minimal medium lacking histidine, Uracil and Leucine (SD-His-Ura-Leu-), and incubated at 30°C for 3 days. For each transformation, ten different clones were checked by multiplex PCR (206143, Qiagen) on rapid DNA preparations carried out by the Chellex technique as already described⁷⁵ using specific primers (Supplementary Table 1) to control the presence of the different fragments in the expected orientation. The yeast colony of interest was sub-cultured in 200 mL of SD-His-Ura-Leu- medium and the plasmid extracted using the Qiagen midi prep kit (12143, Qiagen) following manufacturer's instructions.

Rescue of the virus

The plasmid was linearized by EagI-HF (R3505, NEB) digestion, purified by a phenol chloroform process and transcribed in vitro into RNA using the T7 RiboMaxTM Large Scale RNA Production System (P1300, Promega) and the m7G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (#S1411, NEB) kits. Approximately 5 μg of linear DNA were used as template in a reaction volume of 50 μL comprising: 10 μL of 5X T7 transcription buffer; 5 μL of m7G(5')ppp(5')G RNA cap analog structure at 30 mM; 0.75 μL of 100 mM GTP; 3.75 μL of each nucleotide type ATP, CTP; 100 mM UTP; and 5 μL of RNasin T7 RNA polymerase enzyme. The reaction was incubated at 30°C during 3 h then the template DNA was digested at 37°C during 20 min by adding 2 μL of the enzyme RQ1 RNase free DNase. The synthesized RNA was finally purified using a classical phenol chloroform method and precipitated. Twelve μg of complete viral mRNA and 4 μg of plasmid encoding the viral nucleoprotein (N) gene were electroporated on 8×10^6 Vero-E6 cells resuspended in 0.8 mL of Mirus BioTM IngenioTM Electroporation Solution (MIR50114) using the Gene Pulser Xcell Electroporation System (1652660, Biorad) with a pulse of 270 V and 950 μF . The cells were then transferred to a T75 culture flask with 15 mL of DMEM supplemented with 2% FCS (v/v). The electroporated cells were incubated at 37°C , 5% CO_2 for several days until the cytopathic effect (CPE) was observed. Then, the supernatant was harvested, aliquoted and frozen at -80°C until titration. The viral sequence was controlled by NGS.

Viral growth curves

Vero-E6 cells (ATCC CRL-1586) were used to assess the replication kinetics of different SARS-CoV-2 variants and recombinant viruses. The cells were maintained in Dulbecco's modified culture medium (DMEM, 31966-021, Gibco) supplemented with 5% fetal calf serum, at 37°C in 5% CO_2 . On the day before infection, 1×10^6 VeroE6 cells/well were plated onto 6-well plates. On day of infection, the cells were infected with SARS-CoV-2 virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, in independent triplicates, and incubated during 24-, 48- or 72-hours post-infection. The supernatants were collected at each time-point and frozen at -80°C . Viral titers were obtained by classical TCID₅₀ method on Vero-E6 cells after 72 hours post-infection⁸⁰.

SARS-CoV-2 model in golden Syrian hamsters

Male golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*; RjHan:AURA) of 5–6 weeks of age (average weight 60–80 grams) were purchased from Janvier Laboratories and handled under specific pathogen-free conditions. The animals were housed and manipulated in isolators in a biosafety level-3 facility, with *ad libitum* access to water and food. Before any manipulation, animals underwent an acclimation period of one week. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 200 mg/kg ketamine (Imalgène 1000, Merial) and 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer), and 100 μ L of physiological solution containing 6×10^4 PFU of SARS-CoV-2 (wild-type or recombinant) was administered intranasally to each animal (50 μ L/nostril). Mock-infected animals received the physiological solution only. Infected and mock-infected hamsters were housed in separate isolators and were followed-up daily during four days at which the body weight and the clinical score were noted. The clinical score was based on a cumulative 0–4 scale: ruffled fur, slow movements, apathy, absence of exploration activity. At day 3 post-infection (dpi), animals underwent a food finding test to assess olfaction as previously described^{14,81}. Briefly, 24 hours before testing, hamsters were fasted and then individually placed into a fresh cage (37 \times 29 \times 18 cm) with clean standard bedding for 10 minutes. Subsequently, hamsters were placed in another similar cage for 2 minutes when about 5 pieces of cereals were hidden in 1.5 cm bedding in a corner of the test cage. The tested hamsters were then placed in the opposite corner and the latency to find the food (defined as the time to locate cereals and start digging) was recorded using a chronometer. The test was carried out during a 15 min period. As soon as food was uncovered, hamsters were removed from the cage. One minute later, hamsters performed the same test but with visible chocolate cereals, positioned upon the bedding. The tests were realized in isolators in a Biosafety level-3 facility that were specially equipped for that. At 4 dpi, animals were euthanized with an excess of anesthetics (ketamine and xylazine) and exsanguination⁸², and samples of nasal turbinates, lungs and olfactory bulbs were collected and immediately frozen at -80°C . Fragments of lungs were also collected and fixed in 10% neutral-buffered formalin.

SARS-CoV-2 detection in golden hamsters' tissues

Frozen lung fragments, nasal turbinates and olfactory bulbs were weighted and homogenized with 1 mL of ice-cold DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin (15140148, Thermo Fisher) in Lysing Matrix M 2 mL tubes (I16923050-CF, MP Biomedicals) using the FastPrep-24™ system (MP Biomedicals), and the following scheme: homogenization at 4.0 m/s during 20 sec, incubation at 4°C during 2 min, and new homogenization at 4.0 m/s during 20 sec. The tubes were centrifuged at $10,000 \times g$ during 2 min at 4°C , and the supernatants collected. Viral titers were obtained by classical TCID₅₀ method on Vero-E6 cells after 72 hours post-infection⁸⁰. Viral RNA loads were obtained by the quantification of genomic and sub-genomic SARS-CoV-2 RNA based on the E gene⁸³. Briefly, 125 μ L of the supernatants were homogenized with 375 μ L of Trizol LS (10296028, Invitrogen) and total RNA was extracted using the Direct-zol RNA MicroPrep Kit (R2062, Zymo Research: nasal turbinates and olfactory bulbs) or MiniPrep Kit (R2052, Zymo Research: lung). We used the Taqman one-step qRT-PCR (Invitrogen I1732-020) in a final volume of 12.5 μ L per reaction in 384-wells PCR plates using a thermocycler (QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems). Briefly, 2.5 μ L of RNA were added to 10 μ L of a master mix containing 6.25 μ L of 2X reaction mix, 0.2 μ L of MgSO₄ (50 mM), 0.5 μ L of Superscript III RT/Platinum Taq Mix (2 UI/ μ L) and 3.05 μ L of nuclease-free water containing 400 nM of primers and 200 nM of probe. To detect the genomic RNA, we used the E_sarbeco primers and probe (E_Sarbeco_F1 5'-ACAGGTACGTTA ATAGTTAATAGCGT-3'; E_Sarbeco_R2 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACA CA-3'; E_Sarbeco_Probe FAM-5'-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTC G-3'-TAMRA). The detection of sub-genomic SARS-CoV-2 RNA was

achieved by replacing the E_Sarbeco_F1 primer by the CoV2sgLead primer (CoV2sgLead-Fw 5'-CGATCTCTTGATCTGTCTC-3'). A synthetic gene encoding the PCR target sequences was ordered from Thermo Fisher Scientific. A PCR product was amplified using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) and *in vitro* transcribed by means of Ribomax T7 kit (Promega). RNA was quantified using Qubit RNA HS Assay kit (Thermo Fisher scientific), normalized, and used as a standard to quantify RNA absolute copy number. The amplification conditions were as follows: 55°C for 20 min, 95°C for 3 minutes, 50 cycles of 95°C for 15 s and 58°C for 30 s; followed by 40°C for 30 s.

Transcriptomics analysis in golden hamsters' tissues

RNA preparations from lungs, nasal turbinates and olfactory bulbs collected at 4 dpi were submitted to RT-qPCR. Briefly, RNA was reverse transcribed to first strand cDNA using the SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix (11766050, Invitrogen). qPCR was performed in a final volume of 10 μ L per reaction in 384-well PCR plates using a thermocycler (QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems) and its related software (QuantStudio Real-time PCR System, v.1.2, Applied Biosystems). Briefly, 2.5 μ L of cDNA (12.5 ng) were added to 5 μ L of Taqman Fast Advanced master mix (444457, Applied Biosystems) and 2.5 μ L of nuclease-free water containing golden hamster's primer pairs (Supplementary Table 2). The amplification conditions were as follows: 95°C for 20 s, and 45 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. The *γ -actin* and the *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase) genes were used as reference. Variations in gene expression were calculated as the n-fold change in expression in the tissues from the infected hamsters compared with the tissues of the mock-infected group using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method⁸⁴.

Sample staining and iDISCO+ clearing

For iDISCO+, three male and three female hamsters were infected with 6×10^4 PFU of SARS-CoV-2 Wuhan and followed up as described above. At 4 dpi, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (200 mg/kg; Imalgène 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg; Rompun, Bayer), and we performed a transcardial perfusion with DPBS containing heparin (5×10^3 U/mL) followed by 4% neutral-buffered formaldehyde. The whole heads were collected and stored in 4% neutral-buffered formaldehyde during one week before analysis. SARS-CoV-2 nucleocapsid was detected *in toto* in the snout and brain of infected hamsters using the iDISCO+ protocol previously published⁸⁵ with minimal modifications. All buffers were supplemented with 0.01% of sodium azide (Sigma-Aldrich). The snout, containing the olfactory mucosa and the olfactory nerve, and the brain were dissected and processed separately to optimize tissue manipulation.

All samples were first dehydrated in methanol (Sigma-Aldrich) using 20-40-60-80-100-100% dilutions in distilled water (1 h to 2 h each concentration). Complex lipid removal was achieved incubating the samples in a 2:1 mixture of dichloromethane (Sigma-Aldrich) and methanol overnight. Samples were then washed twice in methanol 100% and bleached overnight using a H₂O₂ 5% solution in methanol. Then all samples were rehydrated using a methanol series (80-60-40-20%). To increase bone permeability, the snouts were decalcified by incubation in the Morse's solution (formic acid 45% and sodium citrate 20%). Finally, all the samples (brains and snouts) were washed in PBS, then PBS-T (PBS with 0.2% Triton X-100 [Sigma-Aldrich]) and incubated in permeabilization buffer (20% DMSO [Sigma-Aldrich] and 2.3% glycine [Sigma-Aldrich] in PBS-T) at 37°C overnight. Before immunostaining, samples were blocked (0.2% Gelatin [Sigma-Aldrich] in PBS-T) at 37°C for 24 h. To reveal SARS-CoV-2 and vasculature, three primary antibodies were combined: Rabbit anti-SARS CoV2 nucleocapsid antibody (GTX135357, GeneTex) diluted 1:1000; Goat anti-CD31 (AF3628, R&D Systems) diluted 1:300; and Rat anti-Podocalyxin

(MAB1556, R&D Systems) diluted 1:1000. After a 2-weeks incubation in primary antibody, the samples were washed (PBS supplemented with 0,2% tween-20 [Sigma-Aldrich] and 2 U/mL heparin [Sigma-Aldrich]) and incubated 10 days with the following secondary antibodies: Donkey anti-Rabbit Alexa 555 (A-31572, Thermo Fisher Scientific), Donkey anti-Goat Alexa 647 (A-21447, Thermo Fisher Scientific) and Chicken anti-Rat Alexa 647 (A-21472, Thermo Fisher Scientific) all diluted at 1:500. All antibodies were diluted in blocking solution and incubated at 37 °C with gentle shaking. After immunostaining, the samples were washed, dehydrated in methanol (20-40-60-80-100-100%), incubated for 3 h in a 2:1 mixture of dichloromethane and methanol, washed twice (15 min each) in dichloromethane 100% and cleared by immersion in dibenzyl ether.

Light sheet imaging

Brain and snout samples were imaged using a LaVision Ultramicroscope II equipped with infinity-corrected objectives, laser lines OBIS-561nm 100 mW and OBIS-639nm 70 mW, and 595/40 and 680/30 filters for Alexa 555 and Alexa 647 respectively. The olfactory bulbs were imaged with a 4×0,35NA objective, using a laser NA of 0,3 and a step size of 2 μm obtaining images with 1,63 × 1,63 × 2 μm/pixel resolution. The snouts were imaged with a 1,3X objective, adjusting the laser NA to 0,3 and step size of 5 μm obtaining images with a 5 × 5 × 5 μm/pixel resolution. All acquisitions were done with ImSpector software (v.7.0.127.0, Lavisision Biotec GmbH). The 3D stacks obtained were analyzed using Bitplane Imaris 9.2 (Oxford instruments).

In vivo and ex vivo bioluminescence imaging

At 4 dpi, animals infected with SARS-CoV-2/Wuhan_nLuc, Wuhan/ΔORF7ab_nLuc and SARS-CoV-2/Delta_nLuc were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (200 mg/kg; Imalgène 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg; Rompun, Bayer). Next, 0.45 μmoles of the nLuc substrate (Nano-Glo® in vivo substrate, CS320501, Promega) fluorofurimazine (FFz) were injected interperitoneally and the animals were placed in a confinement box and imaged using an IVIS® Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer) within 5 minutes of FFz injection. Two-dimensional bioluminescence images were recorded, and photon emission was quantified (p/s/cm²/sr) in a region of interest defined using Living Image software (v. 4.7.4, PerkinElmer). After in vivo imaging, animals were euthanized, the lungs and the brains were collected and quickly placed in a six-wells plate. The plates were placed in a confinement box and imaged as described above.

Histopathology and Immunohistochemistry

Lung fragments fixed 7 days in 10% neutral-buffered formalin were embedded in paraffin. Four-μm-thick sections were cut and stained with hematoxylin and eosin staining. IHC were performed on Leica Bond RX using anti SARS Nucleocapsid Protein antibody (1:500, NB100-56576, Novus Biologicals) and biotinylated goat anti-rabbit Ig secondary antibody (1:600, E0432, Dako, Agilent). Slides were then scanned using Axioscan Z1 slide scanner (Zeiss) and images were analyzed with the Zen 2.6 software (Zeiss).

Neuron-epithelial networks in microfluidic chambers

Human neural stem cells (hNSC, ENStem-A, SCC003, EMD-Millipore) were maintained in geltrex-coated 6-well plates (A1413302, Gibco) in a density of 4.5 × 10⁵ cells/cm² in CTS Knock-out DMEM/F12 medium (A1370801, Gibco) supplemented with 2% StemPro neural supplement (A1050801, Gibco), 2 mM glutamax (35050038, Gibco), 20 ng/mL FGFb (PHG0026, Gibco) and 20 ng/mL EGF (PHG0311, Gibco) at 37 °C in 5% CO₂. A549-ACE2-TMPRSS2 cells (kindly provided by Pr. Olivier Schwartz, Institut Pasteur) were maintained in F12K Nut Mix medium (21127022, Gibco) supplemented with 10% bovine calf serum and 10 μg/mL blasticidine (12172530, Gibco) at 37 °C in 5% CO₂. To generate the neuron-epithelial networks, we used microfluidic chips purchased

from MicroBrain Biotech (Brainies™, Cat#: MBBT5; Marly le Roi, France). Brainies™ MBBT5 is a chip containing 4 neuronal diodes. One neuronal diode includes 2 rectangular culture chambers (volume -1 μL) each connected to 2 reservoirs and separated by a series of 500 μm-long asymmetrical micro-channels (3 μm high, tapering from 15 μm to 3 μm)³⁶. Brainies™ were coated with poly-L-ornithine (P4957, Sigma-Aldrich) and laminin (L2020, Sigma-Aldrich) and 1 × 10⁵ hNSCs were seeded in both the right and the left chambers and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 hours. The medium was then replaced by a neuronal differentiation medium composed of neurobasal medium (10888022, Gibco) supplemented with 2% B27 supplement (17504044, Gibco), 1% CultureOne supplement (A3320201, Gibco), 2 mM glutamax (35050038, Gibco), and 200 μM ascorbic acid (A4403, Sigma Aldrich) and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 14 days, replacing half of the medium every other day. Finally, 2 × 10⁴ A549-ACE2-TMPRSS2 cells were added over the neurons in both the right and the left chambers in neuronal differentiation medium at 37 °C in 5% CO₂ for 48 hours. To assess the SARS-CoV-2 retrograde axonal movement, the right chambers were infected at a MOI of 1 of SARS-CoV-2 Wuhan, Wuhan/ΔORF7ab, Gamma, Delta, or Omicron/BA.1, and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 72 hours. To assess the SARS-CoV-2 anterograde axonal movement, the left chambers were infected in the same above-mentioned conditions. To prevent passive diffusion of assemblies, hydrostatic pressure was applied by adding medium excess in the reservoirs of recipient chambers⁸⁶. To block the axonal retrograde transport, 100 μM of ciliobrevin D (250401, Calbiochem) was added in the medium during infection and throughout the incubation period. The cells were then fixed with 4% PFA (15444459, Thermo Scientific), washed in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 during 10 minutes, washed once in PBS, blocked with 10% normal goat serum (10000 C, Invitrogen) during 30 minutes followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies: mouse anti-β-Tubulin III (neuronal) antibody (1:1000, T8578, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibody (1:1000, GTX135361, GeneTex). The cells were then washed in PBS and incubated with the following secondary antibodies: goat anti-mouse AlexaFluor 647 (1:1000, A21235, Invitrogen) and goat anti-rabbit AlexaFluor 546 (1:1000, A11035, Invitrogen) for 2 hours at 4 °C. The cells were then washed, the nuclei were stained with 20 μM Hoechst 33342 (62249, Thermo Scientific) and stored in PBS. Images were obtained using the EVOS FL cell imaging system (Thermo Scientific) with the objectives 10x or 20x and the fluorescence cubes DAPI, RFP and CY5.5. Using the same described method, neuron-epithelial networks in microfluidics devices were also infected with the recombinant viruses Wuhan_nLuc, Wuhan/ΔORF7ab_nLuc, and Delta_nLuc at a MOI of 0.5 (maximum volume limitation due to stock viral titer). The nanoluciferase activity in the supernatants was evaluated sequentially at 1, 2 and 3 dpi. Briefly, 20 μL of supernatant was mixed with 20 μL of nLuc substrate (N1110, Promega) in a white 96-wells plate and the luminescence, expressed as Relative light Unit (RLU), was acquired during 100 ms using the VICTOR Nivo Plate reader, and the Victor Nivo control software (v.4.0.7, Perkin Elmer).

Statistics and reproducibility

Statistical analysis was performed using Prism 9 (GraphPad, version 9.5.1, San Diego, USA), with *p* < 0.05 considered significant. Quantitative data was compared across groups using Log-rank test, two-tailed Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test. Multivariate statistical analyses on clinical parameters and on tissue inflammation were achieved using Principal Component Analysis. Randomization and blinding were not possible due to pre-defined housing conditions (separated isolators between infected and non-infected animals). Ex vivo and in vitro analyses were blinded (coded samples). For in vivo experiments, 2 independent replicates with 4 animals each were performed; for in vitro experiments, 3 independent replicates were performed.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All relevant data supporting the key findings of this study are available within the main manuscript and its Supplementary Information. Source data are provided with this paper.

References

- WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/> (2022).
- Paterson, R. W. et al. The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. *Brain: a J. Neurol.* **143**, 3104–3120 (2020).
- Chou, S. H.-Y. et al. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19—A Report for the GCS-NeuroCOVID Consortium and the ENERGY Consortium. *JAMA Netw. Open* **4**, e2112131 (2021).
- Klimek, L. et al. Olfactory and gustatory disorders in COVID-19. *Allerg. J. Int.* **31**, 243–250 (2022).
- Thakur, K. T. et al. COVID-19 neuropathology at Columbia University Irving Medical Center/New York Presbyterian Hospital. *Brain: a J. Neurol.* **144**, 2696–2708 (2021).
- Ruz-Caracuel, I. et al. Neuropathological findings in fatal COVID-19 and their associated neurological clinical manifestations. *Pathology* **54**, 738–745 (2022).
- Christensen, P. A. et al. Signals of Significantly Increased Vaccine Breakthrough, Decreased Hospitalization Rates, and Less Severe Disease in Patients with Coronavirus Disease 2019 Caused by the Omicron Variant of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Houston, Texas. *Am. J. Pathol.* **192**, 642–652 (2022).
- Garrett, N. et al. High Rate of Asymptomatic Carriage Associated with Variant Strain Omicron. medRxiv, 2021.2012.2020.21268130 (2022).
- Vihta, K.-D. et al. Omicron-associated changes in SARS-CoV-2 symptoms in the United Kingdom. *Clin. Infect. Dis.* **76**, e133–e141 (2023).
- Chen, M. et al. Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. bioRxiv, 2022.2004.2012.487379 (2022).
- Boscolo-Rizzo, P. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related smell and taste impairment with widespread diffusion of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Omicron variant. *Int. Forum Allerg. Rhinol.* **12**, 1273–1281 (2022).
- Cardoso, C. C. et al. Olfactory Dysfunction in Patients With Mild COVID-19 During Gamma, Delta, and Omicron Waves in Rio de Janeiro, Brazil. *JAMA* **328**, 582–583 (2022).
- Butowt, R., Bilińska, K. & von Bartheld, C. Why Does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **226**, 1304–1308 (2022).
- de Melo, G. D. et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci. Transl. Med.* **13**, eabf8396 (2021).
- Chan, J. F. et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2428–2446 (2020).
- Sia, S. F. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* **583**, 834–838 (2020).
- Käufer, C. et al. Microgliosis and neuronal proteinopathy in brain persist beyond viral clearance in SARS-CoV-2 hamster model. *eBioMedicine* **79**, 103999 (2022).
- Bauer, L. et al. Differences in neuroinflammation in the olfactory bulb between D614G, Delta and Omicron BA.1 SARS-CoV-2 variants in the hamster model. *bioRxiv*, 2022.2003.2024.485596 (2022).
- Halfmann, P. J. et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature* **603**, 687–692 (2022).
- Mohandas, S. et al. Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron (R346K) variant in Syrian hamsters and its cross-neutralization with different variants of concern. *eBioMedicine* **79**, 103997 (2022).
- McMahan, K. et al. Reduced pathogenicity of the SARS-CoV-2 omicron variant in hamsters. *Med* **3**, 262–268.e264 (2022).
- Hayn, M. et al. Systematic functional analysis of SARS-CoV-2 proteins uncovers viral innate immune antagonists and remaining vulnerabilities. *Cell Rep.* **35**, 109126 (2021).
- Aliyari, S. R. et al. The Evolutionary Dance between Innate Host Antiviral Pathways and SARS-CoV-2. *Pathogens* **11**, 538 (2022).
- Su, C.-M., Wang, L. & Yoo, D. Activation of NF- κ B and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **11**, 13464 (2021).
- Fogeron, M.-L. et al. SARS-CoV-2 ORF7b: is a bat virus protein homologue a major cause of COVID-19 symptoms? *bioRxiv*, 2021.2002.2005.428650 (2021).
- Kim, D.-K. et al. A proteome-scale map of the SARS-CoV-2-human contactome. *Nat. Biotechnol.* **41**, 140–149 (2023).
- Mazur-Panasiuk, N. et al. Expansion of a SARS-CoV-2 Delta variant with an 872 nt deletion encompassing ORF7a, ORF7b and ORF8, Poland, July to August 2021. *Eur. Surveill.* **26**, 2100902 (2021).
- Panzer, Y. et al. A deletion in SARS-CoV-2 ORF7 identified in COVID-19 outbreak in Uruguay. *Transbound. Emerg. Dis.* **68**, 3075–3082 (2021).
- Jelley, L. et al. Genomic epidemiology of Delta SARS-CoV-2 during transition from elimination to suppression in Aotearoa New Zealand. *Nat. Commun.* **13**, 4035 (2022).
- Pyke, A. T. et al. Replication Kinetics of B.1.351 and B.1.1.7 SARS-CoV-2 Variants of Concern Including Assessment of a B.1.1.7 Mutant Carrying a Defective ORF7a Gene. *Viruses* **13**, 1087 (2021).
- Renier, N. et al. iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).
- Bauer, L. et al. The neuroinvasiveness, neurotropism, and neurovirulence of SARS-CoV-2. *Trends Neurosci.* **45**, 358–368 (2022).
- Chen, S. et al. SARS-CoV-2 Infection Causes Dopaminergic Neuron Senescence. *Res Sq* **version 1** (2021).
- Bauer, L. et al. Replication Kinetics, Cell Tropism, and Associated Immune Responses in SARS-CoV-2- and H5N1 Virus-Infected Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Models. *mSphere* **6**, e00270–00221 (2021).
- Pepe, A., Pietropaoli, S., Vos, M., Barba-Spaeth, G. & Zurzolo, C. Tunneling nanotubes provide a route for SARS-CoV-2 spreading. *Sci. Adv.* **8**, eabo0171 (2022).
- Peyrin, J.-M. et al. Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab a Chip* **11**, 3663–3673 (2011).
- Sainath, R. & Gallo, G. The dynein inhibitor Ciliobrevin D inhibits the bidirectional transport of organelles along sensory axons and impairs NGF-mediated regulation of growth cones and axon branches. *Dev. Neurobiol.* **75**, 757–777 (2015).
- Matschke, J. et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol.* **19**, 919–929 (2020).
- Song, E. et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* **218**, e20202135 (2021).
- Meinhardt, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as part of Central Nervous System entry in COVID-19 patients. *Nat. Neurosci.* **24**, 168–175 (2021).

41. Rutkai, I. et al. Neuropathology and virus in brain of SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat. Commun.* **13**, 1745 (2022).
42. Ferren, M. et al. Hamster organotypic modeling of SARS-CoV-2 lung and brainstem infection. *Nat. Commun.* **12**, 5809 (2021).
43. Pellegrini, L. et al. SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* **27**, 951–961.e955 (2020).
44. Ramani, A. et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J.* **39**, e106230 (2020).
45. Kong, W. et al. Neuropilin-1 Mediates SARS-CoV-2 Infection of Astrocytes in Brain Organoids, Inducing Inflammation Leading to Dysfunction and Death of Neurons. *mBio* **13**, e0230822 (2022).
46. Khan, M. et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* **184**, 5932–5949 (2021).
47. Helms, J. et al. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2268–2270 (2020).
48. Yang, A. C. et al. Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19. *Nature* **595**, 565–571 (2021).
49. Douaud, G. et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* **604**, 697–707 (2022).
50. Abdelnabi, R. et al. The omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant of concern does not readily infect Syrian hamsters. *Antivir. Res.* **198**, 105253 (2022).
51. Yuan, S. et al. Pathogenicity, transmissibility, and fitness of SARS-CoV-2 Omicron in Syrian hamsters. *Science* **377**, 428–433 (2022).
52. Hui, K. P. Y. et al. SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature* **603**, 715–720 (2022).
53. Armando, F. et al. SARS-CoV-2 Omicron variant causes mild pathology in the upper and lower respiratory tract of hamsters. *Nat. Commun.* **13**, 3519 (2022).
54. Reyna, R. A. et al. Recovery of anosmia in hamsters infected with SARS-CoV-2 is correlated with repair of the olfactory epithelium. *Sci. Rep.* **12**, 628 (2022).
55. Urata, S. et al. Regeneration Profiles of Olfactory Epithelium after SARS-CoV-2 Infection in Golden Syrian Hamsters. *ACS Chem. Neurosci.* **12**, 589–595 (2021).
56. Messlinger, K., Neuhuber, W. & May, A. Activation of the trigeminal system as a likely target of SARS-CoV-2 may contribute to anosmia in COVID-19. *Cephalalgia* **42**, 176–180 (2022).
57. Kishimoto-Urata, M. et al. Prolonged and extended impacts of SARS-CoV-2 on the olfactory neurocircuit. *Sci. Rep.* **12**, 5728 (2022).
58. Zazhytska, M. et al. Non-cell-autonomous disruption of nuclear architecture as a potential cause of COVID-19-induced anosmia. *Cell* **185**, 1052–1064.e1012 (2022).
59. Bourgon, C. et al. Neutrophils initiate the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *bioRxiv*, 2022.2003.2015.484439 (2022).
60. Schaecher, S. R., Touchette, E., Schriewer, J., Buller, R. M. & Pekosz, A. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Gene 7 Products Contribute to Virus-Induced Apoptosis. *J. Virol.* **81**, 11054–11068 (2007).
61. Timilsina, U., Umthong, S., Ivey, E. B., Waxman, B. & Stavrou, S. SARS-CoV-2 ORF7a potentially inhibits the antiviral effect of the host factor SERINC5. *Nat. Commun.* **13**, 2935 (2022).
62. Schaecher, S. R. et al. An immunosuppressed Syrian golden hamster model for SARS-CoV infection. *Virology* **380**, 312–321 (2008).
63. Silvas, J. A. et al. Contribution of SARS-CoV-2 Accessory Proteins to Viral Pathogenicity in K18 Human ACE2 Transgenic Mice. *J. Virol.* **95**, e00402–e00421 (2021).
64. Imai, M. et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 16587–16595 (2020).
65. Bryche, B. et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav. Immun.* **89**, 579–586 (2020).
66. Frere, J. J. et al. SARS-CoV-2 infection in hamsters and humans results in lasting and unique systemic perturbations post recovery. *Sci. Transl. Med.* **0**, eabq3059 (2022).
67. Bulfamante, G. et al. Brainstem neuropathology in two cases of COVID-19: SARS-CoV-2 trafficking between brain and lung. *J. Neurol.* **268**, 4486–4491 (2021).
68. DosSantos, M. F. et al. Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review. *Front. Neuroanat.* **14**, 37 (2020).
69. Ueha, R. et al. Oral SARS-CoV-2 Inoculation Causes Nasal Viral Infection Leading to Olfactory Bulb Infection: An Experimental Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 924725 (2022).
70. Dubé, M. et al. Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron Propagation of Human Coronavirus OC43. *J. Virol.* **92**, e00404-18 (2018).
71. Shi, J. et al. PHEV infection: A promising model of betacoronavirus-associated neurological and olfactory dysfunction. *PLoS Pathog.* **18**, e1010667 (2022).
72. Planas, D. et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* **596**, 276–280 (2021).
73. Planas, D. et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature* **602**, 671–675 (2022).
74. Baer, A. & Kehn-Hall, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *JoVE.* **93**, e52065 (2014).
75. Thi Nhu Thao, T. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* **582**, 561–565 (2020).
76. Kouprina, N. & Larionov, V. Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology. *Chromosoma* **125**, 621–632 (2016).
77. Kouprina, N., Noskov, V. N. & Larionov, V. Selective isolation of large segments from individual microbial genomes and environmental DNA samples using transformation-associated recombination cloning in yeast. *Nat. Protoc.* **15**, 734–749 (2020).
78. Noskov, V. N. et al. A general cloning system to selectively isolate any eukaryotic or prokaryotic genomic region in yeast. *BMC Genomics* **4**, 16 (2003).
79. Noskov, V. N., Lee, N. C. O., Larionov, V. & Kouprina, N. Rapid generation of long tandem DNA repeat arrays by homologous recombination in yeast to study their function in mammalian genomes. *Biol. Proced. Online* **13**, 8 (2011).
80. Lindenbach, B. D. Measuring H. C. V. Infectivity Produced in Cell Culture and In Vivo. in *Hepatitis C: Methods and Protocols* (ed. Tang, H.) 329–336 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009).
81. Lazarini, F., Gabellec, M.-M., Torquet, N. & Lledo, P.-M. Early Activation of Microglia Triggers Long-Lasting Impairment of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* **32**, 3652–3664 (2012).
82. AVMA. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition**, (American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, 2020).
83. Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eur. Surveill.* **25**, 2000045 (2020).
84. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
85. Renier, N. et al. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* **165**, 1789–1802 (2016).
86. Gribaudo, S. et al. Propagation of alpha-Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Rep.* **12**, 230–244 (2019).

Acknowledgements

The SARS-CoV-2 strain was supplied by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and

headed by Pr. Sylvie van der Werf. The human sample from which strain 2019-nCoV/IDF0372/2020 was isolated has been provided by Pr. X. Lescure and Pr. Y. Yazdanpanah from the Bichat Hospital (Paris, France). The human sample from which strain hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (Gamma variant, JPN [P.1]) was supplied by the Japanese National Institute of Infectious Diseases (Tokyo, Japan). The isolate SARS-CoV-2 Delta/2021/17.2 200 (Delta variant, GISAID ID: EPI_ISL_2029113), the isolate SARS-CoV-2 Omicron/B.1.1.529 (Omicron BA.1 variant, GISAID ID: EPI_ISL_6794907) and the A549-ACE2-TMPRSS2 cells were supplied by the Virus and Immunity Unit hosted by Institut Pasteur and headed by Pr. Olivier Schwartz. We thank Sanjay Vashee from the J. Craig Venter Institute (Rockville, MD, USA) for the YCpBAC-his3 plasmid. This work was supported by Institut Pasteur's Task Force SARS-CoV-2 (NeuroCovid Project), by SARS-CoV-2 joint call Institut Pasteur - Paris Brain Institute (CoVessel Project), by Institut Pasteur's Programme Fédérateur de Recherche 1 (PFR-1 - Reverse Genetics). G.D.M. acknowledges funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (grant ANRS MIE202112015304). V.P. is recipient of a fellowship from the European Union's Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation under Specific Grant Agreement No. 945539 (Human Brain Project SGA3). F.A. is recipient of a fellowship from Institut Pasteur's Programme Fédérateur de Recherche 5 (PFR-5 - Functional Genomics of the Viral Cycle). A.C. acknowledges funding from the Institut Pasteur's 2022-2023 Brain Axis SRA3 M2 Master Student Call. E.S.L. and R.K. acknowledge support from the Institut Pasteur's Task Force (project SABSOS). E.S.L. acknowledges funding from the INCEPTION programme (Investissements d'Avenir grant ANR-16-CONV-0005). We would like to acknowledge Yves Jacob for the fruitful discussions about SARS-CoV-2 ORF7. We thank Etienne Jacotot for his insights on neuronal cultures in microfluidic chambers, as well as Bernadette Bung from MicroBrain Biotech. We also thank Johan Bedel for the help with histopathology, and Emeline Perthame for her insights on statistical analyses. Part of this work was performed at the UtechS Photonic Bioluminescence (PBI) platform supported by Institut Pasteur and by Région Ile-de-France (program DIM1Health).

Author contributions

Conceptualization: G.D.M., F.L., and H.B. Methodology: G.D.M., R.K., V.T., N.R., and F.L. Investigation: G.D.M., V.P., F.A., A.V.P., S.K., L.K., A.C., M.T., A.P., and A.T. Funding Acquisition: G.D.M., M.L., P.M.L., N.R., F.L.,

and H.B. Resources: B.S.T., D.H., N.W., S.M., R.K., E.S.L., N.R., V.T., and F.L. Supervision: H.B. Writing—Original Draft: G.D.M., and H.B. Writing—Review & Editing: all authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40228-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Hervé Bourhy.

Peer review information *Nature Communications* thanks Rouhollah Habibey and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. A peer review file is available.

Reprints and permissions information is available at <http://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) 2023, corrected publication 2023

¹Institut Pasteur, Université Paris Cité, Lyssavirus Epidemiology and Neuropathology Unit, F-75015 Paris, France. ²Institut Pasteur, Université Paris Cité, Channel Receptors Unit, F-75015 Paris, France. ³Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France. ⁴Institut du Cerveau et de la Moelle Épine, Laboratoire de Plasticité Structurale, Sorbonne Université, INSERM U1127, CNRS UMR7225, 75013 Paris, France. ⁵Institute of Virology and Immunology (IVI), Bern, Switzerland; Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland. ⁶Institut Pasteur, Université Paris Cité, Histopathology Platform, F-75015 Paris, France. ⁷Institut Pasteur, Université Paris Cité, Spatial Regulation of Genomes Laboratory, F-75015 Paris, France. ⁸Institut Pasteur, Université Paris Cité, Molecular Genetics of RNA viruses Unit, F-75015 Paris, France. ⁹Institut Pasteur, Université Paris Cité, Evolutionary Genomics of RNA Viruses Group, F-75015 Paris, France. ¹⁰Multidisciplinary Center for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland. ¹¹Institut Pasteur, Université Paris Cité, Inserm U1117, Biology of Infection Unit, 75015 Paris, France. ¹²Necker-Enfants Malades University Hospital, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, APHP, Institut Imagine 75006 Paris, France. ¹³Institut Pasteur, Université Paris Cité, Perception and Memory Unit, F-75015 Paris, France; CNRS UMR3571, 75015 Paris, France. ¹⁴These authors contributed equally: Victoire Perraud, Flavio Alvarez, Alba Vieites-Prado. ¹⁵These authors jointly supervised this work: Florence Larrous, Hervé Bourhy. ✉ e-mail: herve.bourhy@pasteur.fr

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

L'ensemble de mon travail de thèse a porté sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les virus (ré)-émergents et/ou négligés et pour cela j'ai travaillé sur deux virus : le SARS-CoV-2 et le virus de la rage. Les maladies émergentes et négligées représentent un important problème de santé publique pour de nombreux pays et pour certaines maladies, aucun traitement n'est encore disponible. C'est le cas de la COVID-19 et de la rage, respectivement des maladies émergentes et négligées. Bien que de nombreuses mesures aient été prises pour lutter contre la COVID-19, peu de traitements efficaces sont actuellement disponibles. Malgré la prophylaxie vaccinale, le SARS-CoV-2 reste un problème de santé mondial, en raison d'une protection vaccinale provisoire et de l'émergence régulière de nouveaux variants. La rage, fatale dans 100 % des cas après l'apparition de symptômes neurologiques, peut être efficacement prévenue par l'utilisation d'une PPE. Néanmoins, l'accès à cette prophylaxie dans les pays endémique de l'Asie et de l'Afrique reste limité en raison de problèmes d'organisation nationale au niveau de la santé et de problèmes économiques. Une surveillance continue et une intervention rapide sont cruciales pour relever le défi posé par ces maladies. Le développement et le déploiement efficaces de vaccins et de thérapies antivirales sont impératifs dans les pays endémiques. Il est également crucial de disposer de l'infrastructure nécessaire et du personnel qualifié pour un diagnostic rapide, ainsi que d'une recherche continue pour aider au développement de contre-mesures efficaces (Nii-Trebi, 2017). En plus de ces mesures, la grande variabilité génétique dont font preuve certains virus nécessite une surveillance continue des pandémies potentielles par la mise à jour des vaccins disponibles devenus obsolètes en raison de l'émergence de nouvelles souches virales (Gonçalves *et al.*, 2021).

Au cours de ce travail, j'ai abordé le développement de thérapies virales ciblant soit la réplication virale, soit la réponse de l'hôte via la modulation de la réponse inflammatoire.

I. Développement d'une approche thérapeutique ciblant la réplication du RABV

L'utilisation de petites molécules comme potentiel traitement contre le RABV semble être une stratégie thérapeutique prometteuse. En effet, de nombreuses molécules chimiques ont déjà été identifiées comme de potentiels inhibiteurs de la réplication virale mais aucune d'entre elles n'a prouvé son efficacité *in vivo* (Jochmans and Neyts, 2019). C'est le cas de la

Ribavirine (Anindita et al., 2018), du favipiravir ou T-705 (Virojanapirom et al., 2016; Yamada et al., 2016), et de la pyriméthamine (Rogée et al., 2019).

Le complexe de réplication viral : cible privilégiée des dérivés de Phtalazinone

C'est dans le cadre du projet européen SILVER (Small-molecule Inhibitor Leads Versus emerging and neglected RNA viruses ; 7th framework programme, Grant agreement ID: 260644) qu'a été initié au laboratoire le crible d'une banque de petites molécules chimiques qui pourraient présenter une capacité à inhiber l'infection par le RABV. Plus de 30 000 composés chimiques ont été testés sur une souche sauvage de RABV. Ainsi, une famille de composés, les dérivés de Phtalazinone, a été identifiée pour ses propriétés d'inhibition de la croissance de plusieurs souches de RABV et plus généralement des *Lyssavirus*.

Pour tenter d'identifier la cible moléculaire de ces composés, différentes approches ont été menées en parallèle. La sélection de mutants de résistance a révélé que la polymérase (L) et la phosphoprotéine (P), les principaux composants du complexe de réplication virale, étaient les cibles des inhibiteurs identifiés. Plusieurs mutations ont été observées dans la protéine L en fonction des composés utilisés (V1897F, P1485T, E1893D ou K542R, N1915K, F1923L et G1961), toutes situées dans le domaine méthyltransférase de la protéine (Paesen et al., 2015). Ceci est en corrélation avec les données obtenues sur le système miniréplicon montrant que les composés sont actifs sur le complexe de réplication du RABV mais aussi sur celui d'un autre membre de la famille des *Mononegavirales*, le virus de la rougeole. Les expériences de RMN et de STD (« Saturation transfer difference », ou différence de transfert de saturation) réalisées directement sur des extraits cellulaires exprimant le complexe de réplication du virus Tha, ont confirmé que ces composés interagissent avec l'ensemble du complexe NPL. L'interaction de ces composés avec le complexe L-P a été modélisée à l'aide de DiffDock ce qui a permis de mettre en évidence trois sites de fixation dans la protéine L dont deux situés dans le domaine polymérase de la L. Il est particulièrement intéressant de noter que le composé CIM114669, qui présente une IC_{50} de l'ordre de la dizaine de nanomolaire, est en interaction directe avec l'asparagine du site catalytique du domaine de polymérisation (GDN), qui est un site conservé au sein de tous les virus à ARN de polarité négative. Ceci expliquerait pourquoi ce composé est également très actif contre le virus de la rougeole. Cependant, ces données de modélisation et de docking *in silico*, devrait être confirmé expérimentalement, à l'aide de virus recombinants par exemple. À l'inverse, aucune des mutations apparues au cours de la sélection par passages successifs en présence des composés n'est présente dans les différents sites de liaison. Dans le cadre des expériences de

miniréplicons, nous avons pu constater que les différentes mutations induisaient une augmentation de l'activité du complexe de réplication (deux à quatre fois plus actif que le complexe de type sauvage). Ces mutations d'échappement permettraient alors d'améliorer le fonctionnement de la polymérase, soit en modifiant la structure globale du domaine catalytique, soit en augmentant la capacité de réplication de celle-ci et en compensant l'effet inhibiteur du composé lors de sa fixation à proximité immédiate du domaine de polymérisation.

Les dérivés Phtalazinone : une piste thérapeutique prometteuse contre la rage

Ces dérivés ouvrent donc la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques, à la fois en tant qu'inhibiteurs du RABV et, plus largement, des infections à *Lyssavirus* et à d'autres membres des *Mononegavirales*, comme nous avons pu le voir avec le virus de la rougeole. Dans le cas de l'infection par le RABV, des expériences *in vivo* ont montré des applications thérapeutiques envisageables malgré des difficultés en lien avec les conditions de solubilité de ces produits. Leur utilisation *in vivo* a permis de retarder l'apparition des signes cliniques chez les souris infectées malgré un temps de demi-vie réduit et un passage de la barrière hémato-encéphalique relativement faible. Les multiples injections réalisées chaque jour chez la souris n'ont pas permis une délivrance optimale du composé. De nouvelles expériences pourraient être menées grâce à des pompes osmotiques qui administreraient les molécules à des débits continus et contrôlés sur une période définie. Cela permettrait ainsi d'éviter les injections répétées qui ne sont pas recommandées pour le bien-être animal. Cependant, la faible solubilité de ces composés rend difficile l'utilisation de ces pompes car elles sont rapidement colmatées. Dans un premier temps, il pourrait être envisagé de modifier la salinité des composés ou de les complexer avec des cyclodextrines (Sareen, Mathew and Joseph, 2012; Kalepu and Nekkanti, 2015). La complexation avec la β -cyclodextrine semble être l'option la plus intéressante, avec un coût réduit qui pourrait améliorer leur biodisponibilité et leur solubilisation (Khadka *et al.*, 2014) et permettrait ainsi leur utilisation dans les pompes osmotiques.

Les dérivés de phtalazinone sont donc des composés thérapeutiques prometteurs, dont certains ont déjà été décrits pour leur capacité à inhiber différentes maladies parasitaires négligées (Salado *et al.*, 2020) ou infections virales (Lu *et al.*, 2018; Zang *et al.*, 2022). Dans le cas de la dengue, un dérivé de phtalazinone a été identifié comme un puissant inhibiteur de la réplication de l'ARN DENV-2 *in vitro* (Lu *et al.*, 2018), tandis que dans le cas du VHB, le dérivé de phtalazinone cible la protéine centrale du virus (Zang *et al.*, 2022). Concernant la rage, de

nouvelles expérimentations sont encore nécessaires afin d'améliorer les propriétés de biodisponibilité de ces composés. Une utilisation combinée, par exemple, avec le cocktail d'anticorps monoclonaux RVC20 et RVC58, qui a déjà fait ses preuves pour traiter des animaux infectés même lorsque les premiers signes cliniques étaient apparus (de Melo *et al.*, 2020), reste une possibilité encourageante.

2. Moduler la réponse inflammatoire de l'hôte pour réduire les signes cliniques de la COVID-19

L'investissement de la recherche mondiale lors de la pandémie de la COVID-19 a permis le développement rapide de vaccins, dont les deux principaux sont Comirnaty® de Pfizer/BioNTech et Spikevax® de Moderna. Cependant, ces vaccins n'offrent pas une protection complète contre l'infection mais préviennent principalement l'émergence de formes sévères. C'est pourquoi le SARS-CoV-2 a continué à circuler au sein de la population mondiale et à acquérir de nombreuses mutations, entraînant l'apparition de nouveaux variants.

Variants du SARS-CoV-2 et signes cliniques

Nous avons pu observer dans un modèle d'infection de hamster par le SARS-CoV-2, un effet « variant-dépendant » dans l'apparition des signes cliniques et la mise en place de l'anosmie (de Melo *et al.*, 2023). En effet, les hamsters infectés par le variant Omicron/BA.1 ne présentaient que peu de signes cliniques et une absence de déficience olfactive par rapport aux animaux infectés par la souche originelle de Wuhan ou par les autres variants Gamma et Delta. Ces résultats soutiennent également l'hypothèse que l'évolution du variant Omicron/BA.1 a abouti à un tropisme plus limité aux voies respiratoires supérieures, provoquant ainsi une maladie clinique moins grave (Armando *et al.*, 2022; Hui *et al.*, 2022). Cette diminution de l'anosmie engendrée par le variant Omicron a été également observée chez l'Homme, en comparaison des précédents variants en circulation (von Bartheld and Wang, 2023).

Pistes thérapeutiques contre la COVID-19

Le développement de thérapie contre le SARS-CoV-2 reste un enjeu important. Cette infection induisant une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, cibler la modulation de la réponse de l'hôte, pour réduire ses effets délétères semble une piste thérapeutique prometteuse. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, cette modulation peut

se faire à l'aide d'anticorps monoclonaux, (Alzghari and Acuña, 2020; Sanders *et al.*, 2020; Scavone *et al.*, 2020), ou bien d'inhibiteurs de la voie JAK (W. Zhang *et al.*, 2020).

Après avoir observé que le statut de fumeur semblait protéger contre l'infection par le SARS-CoV-2, Changeux *et al.* ont émis l'hypothèse que les nAChR jouaient un rôle critique dans la physiopathologie du SARS-CoV-2 (Changeux *et al.*, 2020). Néanmoins, la nicotine étant une drogue addictive, responsable de la dépendance au tabac, d'autres approches cliniques ont donc été testées comme l'utilisation de modulateurs des nAChR- $\alpha 7$, tels que l'IVM, mais aussi des récepteurs purinergiques. De nombreux essais cliniques ont été réalisés pour tester l'action de l'IVM chez l'homme en tant que traitement contre l'infection par le SARS-CoV-2 (Marcolino *et al.*, 2022). L'IVM est plus utilisé en tant qu'anthelminthique, mais a également des propriétés de PAM du nAChR- $\alpha 7$. Néanmoins, les essais cliniques réalisés avec l'IVM sont assez controversés. En effet, Chaccour *et al.* a montré que l'anosmie était réduite lorsque l'IVM était administrée 72h après l'apparition des symptômes, mais qu'elle n'avait aucun effet sur la charge virale (Chaccour *et al.*, 2021) ; à l'inverse, Reis *et al.* n'a observé aucun effet clinique lorsque l'IVM était administré dans les sept jours après l'apparition de symptômes (Reis *et al.*, 2022). L'implication des récepteurs purinergiques pour contrôler l'inflammation contre le SARS-CoV-2 a également été déjà exploré avec plusieurs essais cliniques chez l'homme utilisant des inhibiteurs de P2X, telles que la lidocaïne, un antagoniste des récepteurs P2X7 ou bien la fluoxétine et la paroxétine des antidépresseurs inhibant le récepteur P2X4 (Zarei, Sahebi Vaighan and Ziai, 2021). Au cours de ma thèse, je me suis donc attachée à déterminer quels étaient les récepteurs impliqués dans la modulation de l'inflammation en lien avec l'administration de l'IVM et quels étaient les mécanismes cellulaires aboutissant à cette régulation de la réponse de l'hôte.

Les nAChR- $\alpha 7$ sont impliqués dans l'immunomodulation induite par l'IVM in vivo

Dans le modèle d'hamsters infectés, nous avons déjà montré que l'IVM induisait une immunomodulation de la réponse de l'hôte et une diminution des signes cliniques (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021). Dans ce travail, nous avons évalué le rôle des récepteurs cholinergiques dans la modulation de la réponse inflammatoire par l'IVM lors de l'infection par SARS-CoV-2. Différents antagonistes du nAChR- $\alpha 7$ (la mécamylamine ou la méthyllycaconitine) ont été testés en présence d'IVM et ont permis d'inhiber l'effet protecteur de cette dernière. Les résultats ainsi obtenus ont donc montré l'implication de ce récepteur dans la modulation de la réponse inflammatoire par l'IVM. De la même manière, le traitement *in vivo* ou *in vitro* en présence d'autres modulateurs allostériques des nAChR- $\alpha 7$ (GAT-107 ou

EVP-6124) induit des réponses similaires à l'IVM. *In vitro*, l'effet variant-dépendant précédemment observé chez le hamster, n'impacte pas l'effet protecteur induit par l'IVM. Cependant, dans les deux modèles utilisés *in vitro*, en Vero E6 ou en co-culture de cellules épithéliales (A549-ACE2-TMPRSS2) avec des macrophages différenciés (THP-1), le co-traitement IVM-MLA ne modifie pas le phénotype d'infection et de transcriptomique induit par l'IVM seule, suggérant l'implication d'autres types de récepteurs dans son mécanisme d'action. D'autre part, lors de l'activation des nAChR- $\alpha 7$ de multiples voies de signalisation peuvent induire des mécanismes anti-inflammatoires en lien avec les voies JAK2-STAT3-NF- κ B (Ren *et al.*, 2017 ; Piovesana *et al.*, 2021). Néanmoins, dans notre étude, nous n'avons observé aucune modulation de l'expression des ARNm *STAT3* et *SOCS3* à 24 ou 48 hpi à la fois dans les cellules épithéliales sensibles à l'infection ou dans les cellules macrophagiques (THP-1 prédifférenciées en macrophages).

In vivo, nous avons mis en évidence que le ratio *IL6/IL10* était important dans la résolution des signes cliniques (de Melo, Lazarini, Larrous, *et al.*, 2021). *In vitro*, l'expression des ARNm *IL6* est significativement diminuée dans les THP-1, alors que plus tardivement, à 72h c'est l'expression de *IL10* qui est fortement augmentée. Ainsi le ratio *IL6/IL10* est toujours en faveur d'une résolution de l'infection, à la fois à des temps précoces ou sur des temps plus tardifs.

Protection cellulaire et immunomodulation de l'IVM in vitro

Les modèles cellulaires utilisés ont montré que l'IVM induit une protection des cellules en limitant le relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire, sans toutefois induire une diminution significative de la charge virale. Au niveau transcriptomique, les deux voies les plus différenciellement régulées concernent l'expression des ARNm *CXCL10* et *CXCL5*. À 24 hpi, une expression précoce de *CXCL10* est observée dans les macrophages traités avec de l'IVM, précédant la surexpression par les cellules épithéliales à 48 h. Plusieurs études ont montré que *CXCL10* était exprimé dans différents tissus à la suite d'infections virales. Cette chimiokine est importante dans la défense de l'hôte en contribuant à l'activation des macrophages, lymphocytes et cellules NK, ainsi qu'à leur migration sur le site de l'infection. Ceci permet de contrôler l'infection avant la mise en place de la réponse adaptative (Trifilo *et al.*, 2004; Elemam, Talaat and Maghazachi, 2022). L'IVM amplifierait donc cette activation qui serait un point clef dans la modulation de la réponse de l'hôte.

L'expression de *CXCL5* est fortement inhibée en présence d'IVM ou des autres modulateurs des nAChR- $\alpha 7$. Layhadi *et al.* a montré que l'IVM, via l'activation des récepteurs

P2X4 médiée par l'ATP, augmentait la sécrétion de CXCL5 dans les macrophages primaires humains dérivés de monocytes (Layhadi *et al.*, 2018). En augmentant la survie cellulaire, l'IVM réduit donc la concentration extracellulaire d'ATP ce qui pourrait expliquer la baisse d'expression de CXCL5 observée *in vitro*. Les récepteurs P2X4 seraient donc également impliqués dans la modulation de la réponse de l'hôte induite lors du traitement par l'IVM.

Récepteurs purinergiques et immunomodulation *in vitro*

Tous ces éléments nous ont conduit à étudier d'autres voies de modulation de la réponse inflammatoire en lien avec les récepteurs purinergiques P2X4 et P2X7 avec lesquels l'IVM peut interagir (Zarei, Sahebi Vaighan and Ziai, 2021). Nous avons dans un premier temps utilisé des antagonistes des récepteurs P2X4 et P2X7 dans le modèle d'infection transwell pour caractériser le profil d'infection des cellules. Les traitements par le BX430, un antagoniste spécifique des P2X4 ou le A438079, un antagoniste spécifique des P2X7 ne permettent pas comme l'IVM de protéger les cellules (concentration d'ATP des cellules épithéliales identiques au contrôle non traité) ni de limiter l'excrétion de la nLuc produite par le virus. De même, ces deux antagonistes ne modifient pas l'effet de l'IVM lorsqu'ils sont ajoutés conjointement.

Au niveau transcriptomique, lorsque les cultures transwell sont traitées avec l'IVM et les antagonistes respectifs des nAChR- $\alpha 7$, P2X4 et P2X7 (MLA, BX430 ou A438079), seul le BX430 est capable d'annuler l'effet de l'IVM sur les temps précoces de l'infection à 24 et à 48 hpi. En effet, lors du traitement IVM + BX430, l'expression de CXCL10 dans les THP-1 reste au niveau du contrôle non traité. Le même effet est également observé au niveau des A549 à 48 hpi. Les THP-1 traitées par BX430 ou A438079, à 72 hpi, ne sont pas capables de surexprimer ni CXCL10 ni l'IL10. Au niveau des cellules épithéliales et macrophagiques, ce double traitement induit une diminution de la réponse antivirale cellulaire avec une diminution de l'expression de l'IFNG et de l'ISG20. L'expression de CXCL5 n'est quant à elle pas impactée par l'ajout des différents antagonistes en présence de l'IVM. Dans tous les cas, l'expression de CXCL5 est diminuée significativement par rapport au contrôle non traité. L'ajout des inhibiteurs de P2X4 et P2X7, BX430 ou A438079, semblent même avoir un effet additif avec l'IVM sur l'expression de CXCL5.

Il apparait donc que l'immunomodulation induite par l'IVM est un mécanisme complexe, qui pourrait impliquer une coopération entre le nAChR- $\alpha 7$ et le récepteur P2X4 au niveau de la membrane cellulaire. En outre, les récepteurs P2X4 sont présent dans la cellule soit sous forme d'homodimères soit sous forme d'hétérodimères P2X4/P2X7 (Schneider *et al.*, 2017). Il est connu que les récepteurs P2X7 et nAChR- $\alpha 7$ coexistent et interagissent (Patti *et al.*,

2006) mais les interactions déjà décrites entre ces récepteurs se font au travers d'un couplage fonctionnel avec les canaux PANX-1 (Inoue *et al.*, 2021; Maldifassi *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous avons démontré le rôle du récepteur P2X4, ce qui nous laisse envisager que l'IVM agirait sur le complexe hétérodimérique P2X4/P2X7 avec les nAChR- α 7.

Enfin, des différences sont observées entre nos modèles *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, la MLA inhibe l'effet protecteur du nAChR- α 7 induit par l'IVM, tandis qu'*in vitro*, aucun effet de la MLA n'est observé. En outre, un RNAseq sur les poumons de hamsters a montré une augmentation de l'expression de *CXCL5*, qui n'est pas observé *in vitro*. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait qu'en condition physiologique, dans un environnement présentant un grand nombre de types cellulaires différents, il est difficile de voir le rôle spécifique d'un type cellulaire, dans notre étude le macrophage. Aux vues de l'importance des récepteurs P2X4 dans la mise en place de la réponse cytokinique par les macrophages, il serait intéressant d'étudier dans le modèle de hamster, la combinaison IVM et BX430 ou BX430 seul lors d'une infection par le SARS-CoV-2 afin d'évaluer, *in vivo*, l'implication du récepteur P2X4.

L'immunomodulation induite par l'IVM implique donc plusieurs récepteurs, répondant à un dialogue dynamique entre différents types cellulaires. Nous avons pu l'observer avec les cellules macrophagiques qui répondent de façon précoce à 24 hpi avec une augmentation de l'expression de *CXCL10*, précédant l'augmentation de *CXCL10* dans les cellules épithéliales à 48 hpi (Figure 28).

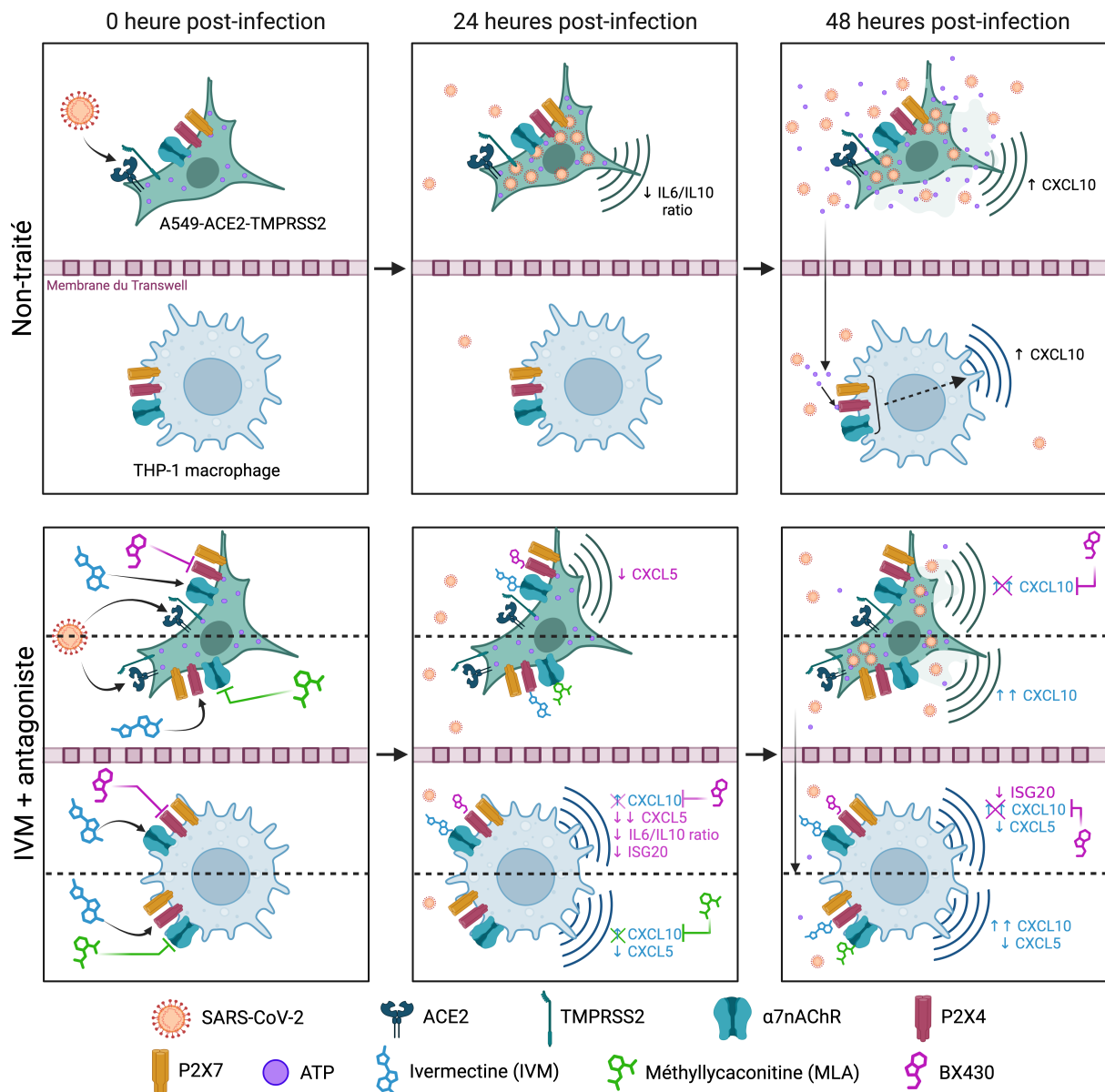


Figure 28 : Dialogue modulant la réponse inflammatoire entre les cellules A549-ACE2-TMPRSS2 et les cellules THP-1 dans un modèle de co-culture.

L'ivermectine agit précocement sur les récepteurs nACh-α7 et P2X4 en induisant une augmentation de l'expression de *CXCL10*. Une action plus tardive de l'IVM implique les récepteurs P2X4 exclusivement. L'ivermectine va permettre la mise en place d'une réponse macrophagique plus précoce ainsi qu'une augmentation de l'expression de *CXCL10* permettant alors une protection et une meilleure survie cellulaire.

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques reste un processus complexe, comme nous avons pu le voir dans ce travail de thèse. L'utilisation de molécules ayant un effet *in vitro* ne permet pas de prédire leurs effets *in vivo*. Cela a été le cas avec CIM114116 et CIM114669, qui, bien qu'efficaces *in vitro*, n'ont pu être suffisamment étudiées *in vivo* du fait de leur solubilité trop faible.

La difficulté de trouver le modèle adéquat pour étudier le mécanisme d'action d'une molécule peut être un autre frein. Nous avons pu l'observer pour l'ivermectine, qui bien qu'étant étudiée pour ces divers effets (antiparasitaire, antitumorale, antivirale), l'obtention d'un modèle spécifique de l'infection par le SARS-CoV-2 pour étudier son rôle d'immunomodulateur fut complexe.

Ainsi, j'ai pu montrer au cours de ma thèse, que cibler le complexe de réplication du RABV à l'aide de petite molécule est une piste thérapeutique qui reste prometteuse. De même, une utilisation combinée de modulateurs allostériques des nAChR- $\alpha 7$ et des récepteurs P2X4 pourrait être une piste thérapeutique intéressante à poursuivre contre le SARS-CoV-2 afin de moduler la réponse immunitaire de l'hôte, en réduisant l'inflammation provoquée par le virus.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelnabi, R. et al.** (2020) 'Novel Class of Chikungunya Virus Small Molecule Inhibitors That Targets the Viral Capping Machinery', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), pp. e00649-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00649-20>.
- Abonyi, M.E. and Lakatos, P.L.** (2005) 'Ribavirin in the treatment of hepatitis C', *Anticancer Research*, 25(2B), pp. 1315–1320.
- Adamson, P.B.** (1977) 'The spread of rabies into Europe and the probable origin of this disease in antiquity', *Journal of the Royal Asiatic Society*, 109(2), pp. 140–144. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0035869X00133829>.
- Ahmadi, K. et al.** (2021) 'Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor peptide, can act as a potent SARS-CoV-2 fusion inhibitor: an in silico drug repurposing study', *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1871958>.
- Ainscow, E.K. et al.** (2002) 'Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K⁺ channels', *The Journal of Physiology*, 544(2), pp. 429–445. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.022434>.
- Albertini, A.A.V. et al.** (2006) 'Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex', *Science*, 313(5785), pp. 360–363. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1125280>.
- Albertini, A.A.V., Ruigrok, R.W.H. and Blondel, D.** (2011) 'Chapter 1 - Rabies Virus Transcription and Replication', in A.C. Jackson (ed.) *Advances in Virus Research*. Academic Press (Research Advances in Rabies), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00001-9>.
- Alberto, A.V.P. et al.** (2022) 'Physiologic roles of P2 receptors in leukocytes', *Journal of Leukocyte Biology*, 112(5), pp. 983–1012. Available at: <https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0421-226RR>.
- Albuquerque, E.X. et al.** (2009) 'Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function', *Physiological reviews*, 89(1), pp. 73–120. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>.
- Ali, S.O. et al.** (2018) 'Evaluation of MEDI8852, an Anti-Influenza A Monoclonal Antibody, in Treating Acute Uncomplicated Influenza', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11), p. 10.1128/aac.00694-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.00694-18>.
- Alifano, M. et al.** (2020) 'Renin-angiotensin system at the heart of COVID-19 pandemic', *Biochimie*, 174, pp. 30–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.04.008>.
- Alturki, Sana O. et al.** (2020) 'The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development', *Frontiers in Immunology*, 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01880> (Accessed: 16 August 2023).
- Alves, L.A. et al.** (2014) 'Structural and Molecular Modeling Features of P2X Receptors', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), pp. 4531–4549. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms15034531>.
- Alzghari, S.K. and Acuña, V.S.** (2020) 'Supportive Treatment with Tocilizumab for COVID-19: A Systematic Review', *Journal of Clinical Virology*, 127, p. 104380. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104380>.

Anantpadma, M. et al. (2016) 'Large-Scale Screening and Identification of Novel Ebola Virus and Marburg Virus Entry Inhibitors', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), pp. 4471–4481. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.00543-16>.

Andre, F. et al. (2008) 'Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide', *Bulletin of the World Health Organization*, 86(2), pp. 140–146. Available at: <https://doi.org/10.2471/BLT.07.040089>.

Anindita, P.D. et al. (2018) 'Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward rabies virus', *Antiviral Research*, 154, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.011>.

dos Anjos, F. et al. (2020) 'Potential Therapeutic Role of Purinergic Receptors in Cardiovascular Disease Mediated by SARS-CoV-2', *Journal of Immunology Research*, 2020, p. 8632048. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/8632048>.

Appolinario, C.M. and Jackson, A.C. (2015) 'Antiviral Therapy for Human Rabies', *Antiviral Therapy*, 20(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3851/IMP2851>.

Arenas, M. et al. (2018) 'Mutation and recombination in pathogen evolution: Relevance, methods and controversies', *Infection, Genetics and Evolution*, 63, pp. 295–306. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.029>.

Arias, H.R., Bhumireddy, P. and Bouzat, C. (2006) 'Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(8), pp. 1254–1276. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.01.006>.

Armando, F. et al. (2022) 'SARS-CoV-2 Omicron variant causes mild pathology in the upper and lower respiratory tract of hamsters', *Nature Communications*, 13, p. 3519. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31200-y>.

Arya, R. et al. (2021) 'Structural insights into SARS-CoV-2 proteins', *Journal of Molecular Biology*, 433(2), p. 166725. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>.

Ashraf, W. et al. (2013) 'Transcript analysis of P2X receptors in PBMCs of chronic HCV patients: an insight into antiviral treatment response and HCV-induced pathogenesis', *Viral Immunology*, 26(5), pp. 343–350. Available at: <https://doi.org/10.1089/vim.2013.0044>.

Báez-Pagán, C.A., Delgado-Vélez, M. and Lasalde-Dominicci, J.A. (2015) 'Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation', *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 10(3), pp. 468–476. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9601-5>.

Bagdas, D. et al. (2016) 'The $\alpha 7$ nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain', *British Journal of Pharmacology*, 173(16), pp. 2506–2520. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.13528>.

Ballester, L.Y. et al. (2012) 'Up-regulation of the Neuronal Nicotinic Receptor $\alpha 7$ by HIV Glycoprotein 120', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(5), pp. 3079–3086. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262543>.

Bansal, M. (2020) 'Cardiovascular disease and COVID-19', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14(3), pp. 247–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.03.013>.

Bantia, S. et al. (2001) 'Comparison of the Anti-Influenza Virus Activity of RWJ-270201 with Those

of Oseltamivir and Zanamivir', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), pp. 1162–1167. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1162-1167.2001>.

Banyard, A.C. et al. (2020) 'Chapter 7 - Bat rabies', in A.R. Fooks and A.C. Jackson (eds) *Rabies (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press, pp. 231–276. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00007-8>.

Barbiero, V.K. (2020) 'Ebola: A Hyperinflated Emergency', *Global Health: Science and Practice*, 8(2), pp. 178–182. Available at: <https://doi.org/10.9745/GHSP-D-19-00422>.

Bar-On, Y.M. et al. (2020) 'SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers', *eLife*, 9, p. e57309. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>.

Barr, J.N. et al. (2008) 'The VSV Polymerase can initiate at mRNA start sites located either up or downstream of a transcription termination signal but size of the intervening intergenic region affects efficiency of initiation', *Virology*, 374(2), pp. 361–370. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.023>.

Barrera, N.P. et al. (2005) 'Atomic Force Microscopy Imaging Demonstrates that P2X2 Receptors Are Trimers but That P2X6 Receptor Subunits Do Not Oligomerize*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp. 10759–10765. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M412265200>.

Barrett, S. et al. (2011) 'Real Time Enzyme Inhibition Assays Provide Insights into Differences in Binding of Neuraminidase Inhibitors to Wild Type and Mutant Influenza Viruses', *PLOS ONE*, 6(8), p. e23627. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023627>.

von Bartheld, C.S. and Wang, L. (2023) 'Prevalence of Olfactory Dysfunction with the Omicron Variant of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Cells*, 12(3), p. 430. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12030430>.

Bastard, P. et al. (2021) 'Insufficient type I IFN immunity underlies life-threatening COVID-19 pneumonia', *Comptes Rendus. Biologies*, 344(1), pp. 19–25. Available at: <https://doi.org/10.5802/crbio.36>.

Baum, A. et al. (2020) 'REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters', *Science (New York, N.y.)*, 370(6520), pp. 1110–1115. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abe2402>.

Belot, L., Albertini, A. and Gaudin, Y. (2019) 'Structural and cellular biology of rhabdovirus entry', *Advances in Virus Research*, 104, pp. 147–183. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.003>.

Bencherif, M. et al. (2011) 'Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(6), pp. 931–949. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0525-1>.

Benmansour, F. et al. (2017) 'Discovery of novel dengue virus NS5 methyltransferase non-nucleoside inhibitors by fragment-based drug design', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, pp. 865–880. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.007>.

Berche, P. (2022) 'The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: A coronavirus?', *Presse Medicale (Paris, France : 1983)*, 51(3), p. 104111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104111>.

Bertier, J. (1995) 'Aristote. Histoire des animaux. Traduction', *L'Antiquité Classique*, 64(1), pp. 457–458. Available at: https://www.persee.fr/doc/antiq_0770-2817_1995_num_64_1_1237_t1_0290_0000_2 (Accessed: 10 June 2023).

- Bertrand, D. and Gopalakrishnan, M.** (2007) 'Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 74(8), pp. 1155–1163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.011>.
- Blumberg, B.M., Leppert, M. and Kolakofsky, D.** (1981) 'Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication', *Cell*, 23(3), pp. 837–845. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90448-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90448-7).
- Bonny, V. et al.** (2020) 'COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages', *La Revue De Medecine Interne*, 41(6), pp. 375–389. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.
- Bono, F. et al.** (2023) 'Central nervous system interaction and crosstalk between nAChRs and other ionotropic and metabotropic neurotransmitter receptors', *Pharmacological Research*, 190, p. 106711. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106711>.
- Boriskin, Y.S., Pécheur, E.-I. and Polyak, S.J.** (2006) 'Arbidol: a broad-spectrum antiviral that inhibits acute and chronic HCV infection', *Virology Journal*, 3(1), p. 56. Available at: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-56>.
- Borovikova, L.V. et al.** (2000) 'Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin', *Nature*, 405(6785), pp. 458–462. Available at: <https://doi.org/10.1038/35013070>.
- Both, L. et al.** (2012) 'Passive immunity in the prevention of rabies', *The Lancet Infectious Diseases*, 12(5), pp. 397–407. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70340-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70340-1).
- Bourhy, H. et al.** (2010) 'Rabies, Still Neglected after 125 Years of Vaccination', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), p. e839. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000839>.
- Bourlière, M. et al.** (2015) 'Sofosbuvir plus ledipasvir in combination for the treatment of hepatitis C infection', *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 9(12), pp. 1483–1494. Available at: <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1111757>.
- Bowie, A.G. and Unterholzner, L.** (2008) 'Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling', *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp. 911–922. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2436>.
- Bracci, L. et al.** (1992) 'Binding of HIV-1 gp120 to the nicotinic receptor', *FEBS Letters*, 311(2), pp. 115–118. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81380-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81380-5).
- Brandão, P.E. et al.** (2007) 'Short-interfering RNAs as antivirals against rabies', *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11, pp. 224–225. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200011>.
- Brant, A.C. et al.** (2021) 'SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication', *Cell & Bioscience*, 11(1), p. 136. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>.
- Brisse, M. et al.** (2020) 'Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development', *Frontiers in Immunology*, 11, p. 583077. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583077>.
- Brown, E.L. and Lyles, D.S.** (2003) 'Organization of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein into Membrane Microdomains Occurs Independently of Intracellular Viral Components', *Journal of Virology*, 77(7), pp. 3985–3992. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.7.3985-3992.2003>.
- Bule, M., Khan, F. and Niaz, K.** (2019) 'Antivirals: Past, Present and Future', *Recent Advances in Animal Virology*, pp. 425–446. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-13-9073-9_22.

- Burnstock, G.** (2014) 'Purinergic signalling: from discovery to current developments', *Experimental Physiology*, 99(1), pp. 16–34. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>.
- Burnstock, G.** (2016) 'P2X ion channel receptors and inflammation', *Purinergic Signalling*, 12(1), pp. 59–67. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9493-0>.
- Burnstock, G. and Boeynaems, J.-M.** (2014) 'Purinergic signalling and immune cells', *Purinergic Signalling*, 10(4), pp. 529–564. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9427-2>.
- Burnstock, G. and Knight, G.E.** (2004) 'Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems', in *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 31–304. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- Butowt, R., Bilińska, K. and von Bartheld, C.** (2022) 'Why Does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease 2019', *The Journal of Infectious Diseases*, 226(8), pp. 1304–1308. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac113>.
- Callaway, H.M. et al.** (2022) 'Structure of the rabies virus glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody', *Science Advances*, 8(24), p. eabp9151. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abp9151>.
- Campbell, W.C.** (2012) 'History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocytic Lactone Antiparasitic Agents', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), pp. 853–865. Available at: <https://www.eurekaselect.com/article/41838> (Accessed: 22 July 2023).
- Cao, B. et al.** (2020) 'A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19', *The New England Journal of Medicine*, p. NEJMoa2001282. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001282>.
- Cao, K. et al.** (2022) 'A Single Vaccine Protects against SARS-CoV-2 and Influenza Virus in Mice', *Journal of Virology*, 96(4), pp. e01578-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.01578-21>.
- Capó-Vélez, C.M., Delgado-Vélez, M., et al.** (2018) 'Nicotinic Acetylcholine Receptors in HIV: Possible Roles During HAND and Inflammation', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(7), pp. 1335–1348. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0603-8>.
- Capó-Vélez, C.M., Morales-Vargas, B., et al.** (2018) 'The alpha7-nicotinic receptor contributes to gp120-induced neurotoxicity: implications in HIV-associated neurocognitive disorders', *Scientific Reports*, 8, p. 1829. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20271-x>.
- CDC** (2017) SARS | *Basics Factsheet*. Available at: <https://www.cdc.gov/sars/about/fs-sars.html> (Accessed: 10 June 2023).
- CDC** (2019a) 1957-1958 Pandemic (H2N2 virus) | *Pandemic Influenza (Flu)*. Available at: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1957-1958-pandemic.html> (Accessed: 10 June 2023).
- CDC** (2019b) 1968 Pandemic (H3N2 virus) | *Pandemic Influenza (Flu)*. Available at: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1968-pandemic.html> (Accessed: 10 June 2023).
- CDC** (2019c) 2009 H1N1 Pandemic, *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html> (Accessed: 10 June 2023).
- Cecchini, M. and Changeux, J.-P.** (2015) 'The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation', *Neuropharmacology*, 96, pp.

137–149. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.006>.

Cecchini, M. and Changeux, J.-P. (2022) ‘Nicotinic receptors: From protein allostery to computational neuropharmacology’, *Molecular Aspects of Medicine*, 84, p. 101044. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101044>.

Cekic, C. and Linden, J. (2016) ‘Purinergic regulation of the immune system’, *Nature Reviews Immunology*, 16(3), pp. 177–192. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>.

Chaccour, C. et al. (2021) ‘The effect of early treatment with ivermectin on viral load, symptoms and humoral response in patients with non-severe COVID-19: A pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial’, *eClinicalMedicine*, 32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100720>.

Chalmers, J.D. et al. (2021) ‘Management of hospitalised adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a European Respiratory Society living guideline’, *European Respiratory Journal*, 57(4). Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00048-2021>.

Changeux, J.-P. et al. (2020) ‘A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications’, *Comptes Rendus Biologies*, 343(1), pp. 33–39. Available at: <https://doi.org/10.5802/crbiol.8>.

Changeux, J.-P. (2020) ‘Discovery of the First Neurotransmitter Receptor: The Acetylcholine Nicotinic Receptor’, *Biomolecules*, 10(4), p. 547. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom10040547>.

Changeux, J.-P. and Christopoulos, A. (2016) ‘Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation’, *Cell*, 166(5), pp. 1084–1102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.015>.

Changeux, J.-P., Kasai, M. and Lee, C.-Y. (1970) ‘Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(3), pp. 1241–1247. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1241>.

Chao, T.-Y. et al. (2017) ‘SYN023, a novel humanized monoclonal antibody cocktail, for post-exposure prophylaxis of rabies’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), p. e0006133. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006133>.

Charrel, R.N. et al. (2011) ‘Arenaviruses and hantaviruses: From epidemiology and genomics to antivirals’, *Antiviral Research*, 90(2), pp. 102–114. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.02.009>.

Chen, L. et al. (2011) ‘HIV-1gp120 induces neuronal apoptosis through enhancement of 4-aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents’, *PloS One*, 6(10), p. e25994. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025994>.

Chen, Q. et al. (2016) ‘The P2X7 Receptor Involved in gp120-Induced Cell Injury in BV2 Microglia’, *Inflammation*, 39(5), pp. 1814–1826. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0417-0>.

Chenik, M. et al. (1998) ‘Mapping the Interacting Domains between the Rabies Virus Polymerase and Phosphoprotein’, *Journal of Virology*, 72(3), pp. 1925–1930. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109484/> (Accessed: 20 July 2023).

Choudhury, P.R. et al. (2022) ‘Cross-species virus transmission and its pandemic potential’, *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), p. 18. Available at: <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00701-7>.

Christensen, P.A. et al. (2022) ‘Signals of Significantly Increased Vaccine Breakthrough, Decreased

Hospitalization Rates, and Less Severe Disease in Patients with Coronavirus Disease 2019 Caused by the Omicron Variant of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Houston, Texas', *The American Journal of Pathology*, 192(4), pp. 642–652. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.01.007>.

Church, D.L. (2004) 'Major factors affecting the emergence and re-emergence of infectious diseases', *Clinics in Laboratory Medicine*, 24(3), pp. 559–586. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2004.05.008>.

Cieślak, M., Komoszyński, M. and Wojtczak, A. (2008) 'Adenosine A2A receptors in Parkinson's disease treatment', *Purinergic Signalling*, 4(4), pp. 305–312. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9100-8>.

Clinton, G.M. et al. (1978) 'The matrix (M) protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription', *Cell*, 15(4), pp. 1455–1462. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90069-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90069-7).

Collo, G. et al. (1997) 'Tissue distribution of the P2X7 receptor', *Neuropharmacology*, 36(9), pp. 1277–1283. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00140-8).

Cong, Z. et al. (2021) 'Molecular insights into ago-allosteric modulation of the human glucagon-like peptide-1 receptor', *Nature Communications*, 12(1), p. 3763. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24058-z>.

Conzelmann, K.K. and Schnell, M. (1994) 'Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins.', *Journal of Virology*, 68(2), pp. 713–719. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236507/> (Accessed: 20 July 2023).

Corradi, J. and Bouzat, C. (2016) 'Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery', *Molecular Pharmacology*, 90(3), pp. 288–299. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>.

Corrêa, G. et al. (2016) 'The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes', *Immunobiology*, 221(7), pp. 794–802. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.02.003>.

Corsi-Zuelli, F.M. das G. et al. (2017) 'Neuroimmune Interactions in Schizophrenia: Focus on Vagus Nerve Stimulation and Activation of the Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 618. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00618>.

Dancho, B. et al. (2009) 'Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Mutations That Affect Association with Host Membranes and Viral Nucleocapsids', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), pp. 4500–4509. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M808136200>.

Dawson, C.R., Epstein, M.A. and Hummeler, K. (1965) 'Cytochemical and Electron Microscopical Observations on the Presence and Origin of Adenosine Triphosphatase-Like Activity at the Surface of Two Myxoviruses', *Journal of Bacteriology*, 89(6), pp. 1526–1532. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.89.6.1526-1532.1965>.

De Benedictis, P. et al. (2016) 'Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis', *EMBO Molecular Medicine*, 8(4), pp. 407–421. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.201505986>.

De Clercq, E. and Field, H.J. (2006) 'Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy', *British Journal of Pharmacology*, 147(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706446>.

- Dewdney, T.G. et al.** (2013) 'Reduced HIV-1 integrase flexibility as a mechanism for raltegravir resistance', *Journal of Structural Biology*, 184(2), pp. 245–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.07.008>.
- Di Virgilio, F. et al.** (2017) 'The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation', *Immunity*, 47(1), pp. 15–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.
- Di Virgilio, F. et al.** (2020) 'A rationale for targeting the P2X7 receptor in Coronavirus disease 19', *British Journal of Pharmacology*, 177(21), pp. 4990–4994. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.15138>.
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.-M. and Robson, S.C.** (2009) 'Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity', *Current opinion in pharmacology*, 9(4), pp. 507–513. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.021>.
- Dietzschold, B.** (1994) 'Monoclonal Antibodies in Rabies Therapy', *Clinical Immunotherapeutics*, 1(4), pp. 245–249. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF03259250>.
- Duan, L. et al.** (2018) 'P2X7 receptor is involved in lung injuries induced by ischemia-reperfusion in pulmonary arterial hypertension rats', *Molecular Immunology*, 101, pp. 409–418. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.027>.
- DuPont, V., Plemper, R.K. and Schnell, M.J.** (2019) 'Status of Antiviral Therapeutics against Rabies Virus and Related Emerging Lyssaviruses', *Current opinion in virology*, 35, pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.009>.
- Duraffour, S. et al.** (2015) 'ST-246 is a key antiviral to inhibit the viral F13L phospholipase, one of the essential proteins for orthopoxvirus wrapping', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), pp. 1367–1380. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dku545>.
- ECDC** (2023a) *Clinical features and sequelae*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/z-disease-list/covid-19/facts/clinical-features-and-sequelae> (Accessed: 12 July 2023).
- ECDC** (2023b) *SARS-CoV-2 variants of concern as of 1 June 2023*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (Accessed: 10 June 2023).
- ECDC** (2023c) *SARS-CoV-2 variants of concern as of 21 September 2023*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (Accessed: 2 October 2023).
- Echevarría, J.E. et al.** (2019) 'Current Rabies Vaccines Do Not Confer Protective Immunity against Divergent Lyssaviruses Circulating in Europe', *Viruses*, 11(10), p. 892. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11100892>.
- Elemam, N.M., Talaat, I.M. and Maghazachi, A.A.** (2022) 'CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections', *Viruses*, 14(11), p. 2445. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14112445>.
- Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V. and Robson, S.C.** (2012) 'Purinergic Signaling during Inflammation', *The New England journal of medicine*, 367(24), pp. 2322–2333. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205750>.
- Embregts, C.W.E. et al.** (2021) 'Street RABV Induces the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway in Human Monocyte-Derived Macrophages by Binding to nAChR $\alpha 7$ ', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 622516. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622516>.
- Enright, J.B. et al.** (1970) 'The effects of corticosteroids on rabies in mice', *Canadian Journal of*

Microbiology, 16(8), pp. 667–675. Available at: <https://doi.org/10.1139/m70-115>.

Epstein, M.A. and Holt, S.J. (1963) 'Electron microscope observations on the surface adenosine triphosphatase-like enzymes of HeLa cells infected with Herpes virus', *Journal of Cell Biology*, 19(2), pp. 337–347. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.19.2.337>.

Eriani, G. and Martin, F. (2022) 'Viral and cellular translation during SARS-CoV-2 infection', *FEBS Open Bio*, 12(9), pp. 1584–1601. Available at: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13413>.

Eriksson, B., Oberg, B. and Wahren, B. (1982) 'Pyrophosphate analogues as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 696(2), pp. 115–123. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(82\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0167-4781(82)90018-5).

Falzone, L. et al. (2021) 'Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 47(6), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4933>.

Fätkenheuer, G. et al. (2005) 'Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1', *Nature Medicine*, 11(11), pp. 1170–1172. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1319>.

FDA (2021) *Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Additional Monoclonal Antibody for Treatment of COVID-19*, FDA. Available at: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-monoclonal-antibody-treatment-covid-19> (Accessed: 8 July 2023).

Feige, L. et al. (2021) 'Transcriptome Profile During Rabies Virus Infection: Identification of Human CXCL16 as a Potential New Viral Target', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, p. 761074. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.761074>.

Feraoun, Y. et al. (2021) 'COVID-19, des vaccins à la vitesse de l'éclair', *médecine/sciences*, 37(8–9), pp. 759–772. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2021094>.

Ferrari, D. et al. (2018) 'Purinergic Signaling: A New Pharmacological Target Against Viruses?', *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(11), pp. 926–936. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.09.004>.

Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1997) 'Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions.', *Journal of Virology*, 71(10), pp. 7281–7288. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC192070/> (Accessed: 20 July 2023).

Fooks, A.R. et al. (2017) 'Rabies', *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>.

Fooks, A.R. and Jackson, A.C. (2020) *Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management*. 4th edn. London: Academic Press.

Forssmann, W.-G. et al. (2010) 'Short-Term Monotherapy in HIV-Infected Patients with a Virus Entry Inhibitor Against the gp41 Fusion Peptide', *Science Translational Medicine*, 2(63), pp. 63re3–63re3. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001697>.

Franciosi, M.L.M. et al. (2021) 'Possible role of purinergic signaling in COVID-19', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(8), pp. 2891–2898. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04130-4>.

Fredholm, B.B. et al. (2001) 'International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and

Classification of Adenosine Receptors', *Pharmacological reviews*, 53(4), pp. 527–552. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9389454/> (Accessed: 30 June 2023).

Fung, T.S. and Liu, D.X. (2019) 'Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction', *Annual Review of Microbiology*, 73(1), pp. 529–557. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>.

Furuta, Y., Komeno, T. and Nakamura, T. (2017) 'Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase', *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93(7), pp. 449–463. Available at: <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>.

Gaillard, V. et al. (2017) 'A Short Double-Stapled Peptide Inhibits Respiratory Syncytial Virus Entry and Spreading', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), p. 10.1128/aac.02241-16. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.02241-16>.

Gao, H. et al. (2017) 'Targeted P2X7R shRNA delivery attenuates sympathetic nerve sprouting and ameliorates cardiac dysfunction in rats with myocardial infarction', *Cardiovascular Therapeutics*, 35(2), p. e12245. Available at: <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12245>.

Gao, Z. et al. (2021) 'Vagal- α 7nAChR signaling is required for lung anti-inflammatory responses and arginase I expression during an influenza infection', *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(10), pp. 1642–1652. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00579-z>.

Gastka, M., Horvath, J. and Lentz, T.L. (1996) 'Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor α subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay', *Journal of General Virology*, 77(10), pp. 2437–2440. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2437>.

Gazon, H. et al. (2018) 'Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL', *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02686> (Accessed: 5 July 2023).

Ge, P. et al. (2010) 'CryoEM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus', *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), pp. 689–693. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1181766>.

Geraghty, R.J., Aliota, M.T. and Bonnac, L.F. (2021) 'Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues', *Viruses*, 13(4), p. 667. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13040667>.

Gibson, S.J. et al. (2002) 'Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod', *Cellular Immunology*, 218(1), pp. 74–86. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(02\)00517-8](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(02)00517-8).

Gill, J.K. et al. (2012) 'A Series of α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Allosteric Modulators with Close Chemical Similarity but Diverse Pharmacological Properties', *Molecular Pharmacology*, 81(5), pp. 710–718. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.111.076026>.

Gogtay, N.J. et al. (2018) 'Comparison of a Novel Human Rabies Monoclonal Antibody to Human Rabies Immunoglobulin for Postexposure Prophylaxis: A Phase 2/3, Randomized, Single-Blind, Noninferiority, Controlled Study', *Clinical Infectious Diseases*, 66(3), pp. 387–395. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/cix791>.

Gombault, A., Baron, L. and Couillin, I. (2013) 'ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation', *Frontiers in Immunology*, 3, p. 414. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00414>.

Gonçalves, B.C. et al. (2021) 'Antiviral therapies: advances and perspectives', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 35(2), pp. 305–320. Available at: <https://doi.org/10.1111/fcp.12609>.

Gong, S. and Bao, L. (2018) 'The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models', *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), pp. 125–133. Available at: <https://doi.org/10.1002/ame2.12017>.

Graham, S.C. et al. (2008) 'Rhabdovirus Matrix Protein Structures Reveal a Novel Mode of Self-Association', *PLOS Pathogens*, 4(12), p. e1000251. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000251>.

Green, T.J. and Luo, M. (2009) 'Structure of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid in complex with the nucleocapsid-binding domain of the small polymerase cofactor, P', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), pp. 11713–11718. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903228106>.

Greenwood, B. (2014) 'The contribution of vaccination to global health: past, present and future', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645), p. 20130433. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0433>.

Grein, J. et al. (2020) 'Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19', *The New England Journal of Medicine*, p. NEJMoa2007016. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>.

Grønlien, J.H. et al. (2007) 'Distinct Profiles of $\alpha 7$ nAChR Positive Allosteric Modulation Revealed by Structurally Diverse Chemotypes', *Molecular Pharmacology*, 72(3), pp. 715–724. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.107.035410>.

de Groot, R.J. et al. (2009) *Family: ICTV Ninth Report, Taxonomy Release, Coronaviridae | ICTV*. Available at: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae (Accessed: 10 June 2023).

Grossi, P. and Baldanti, F. (1997) 'Treatment of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus infection', *Journal of Nephrology*, 10(3), pp. 146–151.

Gudima, G. et al. (2023) 'Antiviral Therapy of COVID-19', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), p. 8867. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24108867>.

Gundavarapu, S. et al. (2013) 'HIV gp120 Induces Mucus Formation in Human Bronchial Epithelial Cells through CXCR4/ $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors', *PLoS ONE*, 8(10), p. e77160. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077160>.

Guo, C. et al. (2007) 'Evidence for Functional P2X4/P2X7 Heteromeric Receptors', *Molecular Pharmacology*, 72(6), pp. 1447–1456. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.107.035980>.

de Haan, C.A.M. and Rottier, P.J.M. (2005) 'Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses', *Advances in Virus Research*, 64, pp. 165–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64006-7).

Habermacher, C. et al. (2016) 'Molecular structure and function of P2X receptors', *Neuropharmacology*, 104, pp. 18–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.032>.

Hall, P.R. et al. (2007) 'Characterization and NMR Solution Structure of a Novel Cyclic Pentapeptide Inhibitor of Pathogenic Hantaviruses', *Chemical Biology & Drug Design*, 69(3), pp. 180–190. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00489.x>.

Hall, P.R. et al. (2008) 'Multivalent Presentation of Antihantavirus Peptides on Nanoparticles Enhances Infection Blockade', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), pp. 2079–2088. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.01415-07>.

- Hampson, K. et al.** (2015) 'Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), p. e0003709. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>.
- Hartenian, E. et al.** (2020) 'The molecular virology of coronaviruses', *The Journal of Biological Chemistry*, 295(37), pp. 12910–12934. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>.
- HAS** (2021) *Symptômes prolongés suite à une Covid-19 de l'adulte - Diagnostic et prise en charge*, Haute Autorité de Santé. Available at: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3237041/fr/symptomes-prolonges-suite-a-une-covid-19-de-l-adulte-diagnostic-et-prise-en-charge (Accessed: 10 June 2023).
- Hazleton, J.E., Berman, J.W. and Eugenin, E.A.** (2012) 'Purinergic Receptors are Required for HIV-1 Infection of Primary Human Macrophages', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(9), pp. 4488–4495. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102482>.
- Heald-Sargent, T. and Gallagher, T.** (2012) 'Ready, Set, Fuse! The Coronavirus Spike Protein and Acquisition of Fusion Competence', *Viruses*, 4(4), pp. 557–580. Available at: <https://doi.org/10.3390/v4040557>.
- Hechler, B. and Gachet, C.** (2015) 'Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(11), pp. 2307–2315. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>.
- Heffernan, C.** (2018) 'Climate change and multiple emerging infectious diseases', *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 234, pp. 43–47. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.021>.
- Heidary, F. and Gharebaghi, R.** (2020) 'Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen', *The Journal of Antibiotics*, 73(9), pp. 593–602. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0336-z>.
- Hellenbrand, W. et al.** (2005) 'E-alert 18 February: Cases of rabies in Germany following organ transplantation', *Weekly releases (1997–2007)*, 10(8), p. 2917. Available at: <https://doi.org/10.2807/esw.10.08.02917-en>.
- Heming, J.D., Conway, J.F. and Homa, F.L.** (2017) 'Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging', *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 223, pp. 119–142. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-53168-7_6.
- Henderson, D.A.** (2011) 'The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future', *Vaccine*, 29 Suppl 4, pp. D7-9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>.
- Hennessy, C. and McKernan, D.P.** (2021) 'Anti-Viral Pattern Recognition Receptors as Therapeutic Targets', *Cells*, 10(9), p. 2258. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10092258>.
- Hillaker, E. et al.** (2020) 'Delayed Initiation of Remdesivir in a COVID-19-Positive Patient', *Pharmacotherapy*, 40(6), pp. 592–598. Available at: <https://doi.org/10.1002/phar.2403>.
- Ho, T.N.T., Abraham, N. and Lewis, R.J.** (2020) 'Structure-Function of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived From Natural Toxins', *Frontiers in Neuroscience*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.609005> (Accessed: 28 June 2023).
- Hoffmann, M. et al.** (2022) 'The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic', *Cell*, 185(3), pp. 447-456.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.032>.
- Holden, C.P. et al.** (1999) 'Role of Na⁺/H⁺ exchangers, excitatory amino acid receptors and voltage-

operated Ca²⁺ channels in human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated increases in intracellular Ca²⁺ in human neurons and astrocytes', *Neuroscience*, 91(4), pp. 1369–1378. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00714-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00714-3).

Holthausen, D.J. et al. (2017) 'An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses', *Immunity*, 46(4), pp. 587–595. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.018>.

Honda, K. et al. (2005) 'Regulation of the type I IFN induction: a current view', *International Immunology*, 17(11), pp. 1367–1378. Available at: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh318>.

Hooper, D.C. (2005) 'The role of immune responses in the pathogenesis of rabies', *Journal of NeuroVirology*, 11(1), pp. 88–92. Available at: <https://doi.org/10.1080/13550280590900418>.

Hopkins, D. (2003) 'The Greatest Killer: Smallpox in History', *Bibliovault OAI Repository, the University of Chicago Press* [Preprint].

Horwitz, J.A. et al. (2020) 'Structure of a rabies virus polymerase complex from electron cryo-microscopy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(4), pp. 2099–2107. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1918809117>.

Howley, P.M. et al. (2023) *Fields virology - Fundamentals*. 7th edition. Philadelphia.

Howley, P.M. and Knipe, D.M. (2022) *Fields virology, RNA viruses*. 7th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.

Howley, P.M. and Knipe, D.M. (2023) *Fields Virology - Fundamentals*. 7th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. Available at: <https://oec.ovid.com/book?serialcode=02205991> (Accessed: 21 July 2023).

Hu, S. et al. (2022) 'P2X7 receptor in inflammation and pain', *Brain Research Bulletin*, 187, pp. 199–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.07.006>.

Huang, K. et al. (2010) 'Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion', *Journal of Virology*, 84(16), pp. 8132–8140. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02699-09>.

Huang, Y. et al. (2018) 'Assessing the Efficacy of Lopinavir/Ritonavir-Based Preferred and Alternative Second-Line Regimens in HIV-Infected Patients: A Meta-Analysis of Key Evidence to Support WHO Recommendations', *Frontiers in Pharmacology*, 9, p. 890. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00890>.

Huang, Z. et al. (2021) 'From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>.

Hui, K.P.Y. et al. (2022) 'SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo', *Nature*, 603(7902), pp. 715–720. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04479-6>.

Hurst, R.S. et al. (2005) 'A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization', *Journal of Neuroscience*, 25(17), pp. 4396–4405. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5269-04.2005>.

ICTV (2022) Genus: *Lyssavirus*. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/lyssavirus> (Accessed: 19 July 2023).

- Iliina, E.N. et al.** (2018) 'Recombinant monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis', *Biochemistry (Moscow)*, 83(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0006297918010017>.
- Illes, P. et al.** (2021) 'Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30', *British journal of pharmacology*, 178(3), pp. 489–514. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.15299>.
- Inoue, H. et al.** (2021) 'Functional Coupling between the P2X7 Receptor and Pannexin-1 Channel in Rat Trigeminal Ganglion Neurons', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), p. 5978. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22115978>.
- Jackson, A.C. et al.** (2007) 'Therapy with Minocycline Aggravates Experimental Rabies in Mice', *Journal of Virology*, 81(12), pp. 6248–6253. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00323-07>.
- Jenni, S. et al.** (2022) 'Visualizing molecular interactions that determine assembly of a bullet-shaped vesicular stomatitis virus particle', *Nature Communications*, 13(1), p. 4802. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32223-1>.
- Jeong, Y.H. et al.** (2020) 'Mice lacking the purinergic receptor P2X5 exhibit defective inflammasome activation and early susceptibility to *Listeria monocytogenes*', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(3), pp. 760–766. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901423>.
- Jiang, R., Taly, A. and Grutter, T.** (2013) 'Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors', *Trends in Biochemical Sciences*, 38(1), pp. 20–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.10.006>.
- Jiang, S. et al.** (2011) 'Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel 5-((Arylfuran/1H-pyrrol-2-yl)methylene)-2-thioxo-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)thiazolidin-4-ones as HIV-1 Fusion Inhibitors Targeting gp41', *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(2), pp. 572–579. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm101014v>.
- Jiang, S. and Lu, L.** (eds) (2022) *Virus Entry Inhibitors: Stopping the Enemy at the Gate*. Singapore: Springer (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-981-16-8702-0>.
- Jiang, Y. et al.** (2015) 'miR-210 mediates vagus nerve stimulation-induced antioxidant stress and anti-apoptosis reactions following cerebral ischemia/reperfusion injury in rats', *Journal of Neurochemistry*, 134(1), pp. 173–181. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.13097>.
- Jochmans, D. and Neyts, J.** (2019) 'The path towards effective antivirals against rabies', *Vaccine*, 37(33), pp. 4660–4662. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.051>.
- Jones, B.E. et al.** (2021) 'The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates', *Science Translational Medicine*, 13(593), p. eabf1906. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf1906>.
- Jones, K.E. et al.** (2008) 'Global trends in emerging infectious diseases', *Nature*, 451(7181), pp. 990–993. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Jong, E.C. and Stevens, D.L.** (2012) *Netter's Infectious Disease*. 1st edn. Philadelphia: Saunders.
- Jurk, M. et al.** (2002) 'Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848', *Nature Immunology*, 3(6), pp. 499–499. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni0602-499>.
- Kabanova, A. et al.** (2014) 'Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L

subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), pp. 17965–17970. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1415310111>.

Kadam, R.U. and Wilson, I.A. (2017) 'Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), pp. 206–214. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1617020114>.

Kalepu, S. and Nekkanti, V. (2015) 'Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), pp. 442–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.

Kallewaard, N.L. et al. (2016) 'Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes', *Cell*, 166(3), pp. 596–608. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073>.

Kanellopoulos, J.M. et al. (2021) 'Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 645834. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645834>.

Kawano, A. et al. (2012) 'Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(2), pp. 374–380. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.156>.

Kawashima, K. et al. (2015) 'Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs', *International Immunopharmacology*, 29(1), pp. 127–134. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015>.

Ke, Z. et al. (2020) 'Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions', *Nature*, 588(7838), pp. 498–502. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>.

Kessels, J. et al. (2019) 'Rabies post-exposure prophylaxis: A systematic review on abridged vaccination schedules and the effect of changing administration routes during a single course', *Vaccine*, 37, pp. A107–A117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.041>.

Khadka, P. et al. (2014) 'Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability', *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(6), pp. 304–316. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>.

Khaitov, M. et al. (2023) 'Treatment of COVID-19 patients with a SARS-CoV-2-specific siRNA-peptide dendrimer formulation', *Allergy*, 78(6), pp. 1639–1653. Available at: <https://doi.org/10.1111/all.15663>.

Khakh, B.S. et al. (1999) 'Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), pp. 7289–7299. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-17-07289.1999>.

Khakh, B.S. (2001) 'Molecular physiology of p2x receptors and atp signalling at synapses', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), pp. 165–174. Available at: <https://doi.org/10.1038/35058521>.

Khakh, B.S. et al. (2005) 'An Angstrom Scale Interaction between Plasma Membrane ATP-Gated P2X2 and $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Channels Measured with Fluorescence Resonance Energy Transfer and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy', *Journal of Neuroscience*, 25(29), pp. 6911–6920. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0561-05.2005>.

Khakh, B.S. and North, R.A. (2012) 'Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in

the CNS', *Neuron*, 76(1), pp. 51–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>.

Khalil, B.A., Elemam, N.M. and Maghazachi, A.A. (2021) 'Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, pp. 976–988. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.034>.

Kim, C.U. et al. (1998) 'Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(14), pp. 2451–2460. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm980162u>.

Kim, P.K. et al. (2021) 'A broad-spectrum and highly potent human monoclonal antibody cocktail for rabies prophylaxis', *PLOS ONE*, 16(9), p. e0256779. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256779>.

Kim, Y.K., Shin, J.-S. and Nahm, M.H. (2016) 'NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases', *Yonsei Medical Journal*, 57(1), pp. 5–14. Available at: <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>.

Knipe, D.M., Baltimore, D. and Lodish, H.F. (1977) 'Separate pathways of maturation of the major structural proteins of vesicular stomatitis virus.', *Journal of Virology*, 21(3), pp. 1128–1139. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515654/> (Accessed: 20 July 2023).

Knobel, D.L. et al. (2022) 'A One Medicine Mission for an Effective Rabies Therapy', *Frontiers in Veterinary Science*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.867382> (Accessed: 7 July 2023).

Koch, A. et al. (2019) 'Earth system impacts of the European arrival and Great Dying in the Americas after 1492', *Quaternary Science Reviews*, 207, pp. 13–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.12.004>.

Kohn, G.C. (2007) *Encyclopedia of Plague and Pestilence: From Ancient Times to the Present*. Infobase Publishing.

Koyama, S. et al. (2008) 'Innate immune response to viral infection', *Cytokine*, 43(3), pp. 336–341. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>.

Kozal, M. et al. (2020) 'Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection', *New England Journal of Medicine*, 382(13), pp. 1232–1243. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902493>.

Krause, R.M. et al. (1998) 'Ivermectin: A Positive Allosteric Effector of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor', *Molecular Pharmacology*, 53(2), pp. 283–294. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.53.2.283>.

Kristensson, K. et al. (1996) 'Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 22(3), pp. 179–187. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1996.tb00893.x>.

Krosky, P.M., Baek, M.-C. and Coen, D.M. (2003) 'The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress', *Journal of Virology*, 77(2), pp. 905–914. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.905-914.2003>.

Krupovic, M. and Koonin, E.V. (2017) 'Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), pp. E2401–E2410. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621061114>.

Kumar, A. et al. (2021) 'COVID-19 Mechanisms in the Human Body—What We Know So Far',

Frontiers in Immunology, 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.693938> (Accessed: 10 June 2023).

Kumar, P. et al. (2014) 'Intralesional injection of Mycobacterium w vaccine vs imiquimod, 5%, cream in patients with anogenital warts: a randomized clinical trial', *JAMA dermatology*, 150(10), pp. 1072–1078. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.794>.

Lahaye, X. et al. (2009) 'Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication', *Journal of Virology*, 83(16), pp. 7948–7958. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-09>.

Laing, R., Gillan, V. and Devaney, E. (2017) 'Ivermectin – Old Drug, New Tricks?', *Trends in Parasitology*, 33(6), pp. 463–472. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>.

Lalo, U. et al. (2012) 'P2X receptor-mediated synaptic transmission', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(3), pp. 297–309. Available at: <https://doi.org/10.1002/wmts.28>.

Lan, J. et al. (2020) 'Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor', *Nature*, 581(7807), pp. 215–220. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.

Larson, R.S. et al. (2005) 'Peptide Antagonists That Inhibit Sin Nombre Virus and Hantaan Virus Entry through the β 3-Integrin Receptor', *Journal of Virology*, 79(12), pp. 7319–7326. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.12.7319-7326.2005>.

Layhadi, J.A. et al. (2018) 'ATP Evokes Ca²⁺ Responses and CXCL5 Secretion via P2X4 Receptor Activation in Human Monocyte-Derived Macrophages', *The Journal of Immunology*, 200(3), pp. 1159–1168. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700965>.

Lazzarin, A. et al. (2003) 'Efficacy of Enfuvirtide in Patients Infected with Drug-Resistant HIV-1 in Europe and Australia', *New England Journal of Medicine*, 348(22), pp. 2186–2195. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035211>.

Leão Batista Simões, J. et al. (2021) 'Targeting purinergic receptors to suppress the cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection in pulmonary tissue', *International Immunopharmacology*, 100, p. 108150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108150>.

Leão-Ferreira, L.R. et al. (2002) 'Inhibition of vaccinia virus replication by adenosine in BSC-40 cells: involvement of A2 receptor-mediated PKA activation', *Archives of Virology*, 147(7), pp. 1407–1423. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0795-5>.

Lee, B.H. et al. (2012) 'Activation of P2X7 Receptor by ATP Plays an Important Role in Regulating Inflammatory Responses during Acute Viral Infection', *PLoS ONE*, 7(4), p. e35812. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035812>.

Lehrer, S. and Rheinstein, P.H. (2020) 'Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2', *In Vivo*, 34(5), pp. 3023–3026. Available at: <https://doi.org/10.21873/invivo.12134>.

Lenard, J. and Vanderoef, R. (1990) 'Localization of the membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe I25I-TID.', *Journal of Virology*, 64(7), pp. 3486–3491. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249613/> (Accessed: 18 July 2023).

Lentz, T.L. et al. (1983) 'The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus.', *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 56(4), pp. 315–322. Available at:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2589619/> (Accessed: 7 July 2023).

Letsinger, A.C., Gu, Z. and Yakel, J.L. (2022) 'α7 nicotinic acetylcholine receptors in the hippocampal circuit: taming complexity', *Trends in Neurosciences*, 45(2), pp. 145–157. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.11.006>.

Leung, J.M. and Sin, D.D. (2020) 'Smoking, ACE-2 and COVID-19: ongoing controversies', *The European Respiratory Journal*, 56(1), p. 2001759. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.01759-2020>.

Lewis, C. et al. (1995) 'Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons', *Nature*, 377(6548), pp. 432–435. Available at: <https://doi.org/10.1038/377432a0>.

Leyva-Grado, V.H. et al. (2017) 'Contribution of the Purinergic Receptor P2X7 to Development of Lung Immunopathology during Influenza Virus Infection', *mBio*, 8(2), pp. e00229-17. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00229-17>.

Li, F. (2016) 'Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins', *Annual Review of Virology*, 3(1), pp. 237–261. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>.

Li, J. et al. (2011) 'Role of α7 nicotinic acetylcholine receptors in regulating tumor necrosis factor-α (TNF-α) as revealed by subtype selective agonists', *Journal of Neuroimmunology*, 239(1–2), pp. 37–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.08.007>.

Li, J., Fontaine-Rodriguez, E.C. and Whelan, S.P.J. (2005) 'Amino Acid Residues within Conserved Domain VI of the Vesicular Stomatitis Virus Large Polymerase Protein Essential for mRNA Cap Methyltransferase Activity', *Journal of Virology*, 79(21), pp. 13373–13384. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13373-13384.2005>.

Li, R. et al. (2014) 'Extracellular UDP and P2Y6 Function as a Danger Signal To Protect Mice from Vesicular Stomatitis Virus Infection through an Increase in IFN-β Production', *The Journal of Immunology*, 193(9), pp. 4515–4526. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301930>.

Li, W. et al. (1998) 'Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(3), pp. 647–653. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.3.647>.

Lian, M., Hueffer, K. and Weltzin, M.M. (2022) 'Interactions between the rabies virus and nicotinic acetylcholine receptors: A potential role in rabies virus induced behavior modifications', *Heliyon*, 8(9), p. e10434. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10434>.

Liang, Y. et al. (2020) 'Role of neutrophil chemoattractant CXCL5 in SARS-CoV-2 infection-induced lung inflammatory innate immune response in an in vivo hACE2 transfection mouse model', *Zoological Research*, 41(6), pp. 621–631. Available at: <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.118>.

Limapichat, W., Dougherty, D.A. and Lester, H.A. (2014) 'Subtype-Specific Mechanisms for Functional Interaction between α6β4* Nicotinic Acetylcholine Receptors and P2X Receptors', *Molecular Pharmacology*, 86(3), pp. 263–274. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.114.093179>.

Lischka, P. et al. (2010) 'In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), pp. 1290–1297. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01596-09>.

Liu, H. et al. (2023) 'α7 Nicotinic acetylcholine receptor: a key receptor in the cholinergic anti-

inflammatory pathway exerting an antidepressant effect', *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), p. 84. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02768-z>.

Liu, J. et al. (2023) 'ATP ion channel P2X purinergic receptors in inflammation response', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, p. 114205. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114205>.

Liu, S. et al. (2004) 'Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors', *The Lancet*, 363(9413), pp. 938–947. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15788-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15788-7).

Lonberg, N. (2005) 'Human antibodies from transgenic animals', *Nature Biotechnology*, 23(9), pp. 1117–1125. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt1135>.

Lopez, L. et al. (2020) 'Dysregulated Interferon Response Underlying Severe COVID-19', *Viruses*, 12(12), p. 1433. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12121433>.

Lu, D. et al. (2018) 'Discovery and optimization of phthalazinone derivatives as a new class of potent dengue virus inhibitors', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, pp. 328–337. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.008>.

Lu, L. et al. (2014) 'Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor', *Nature Communications*, 5(1), p. 3067. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms4067>.

MacDougall, D.S. (1997) 'Update on cidofovir for CMV retinitis', *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*, 3(5), pp. 18–24.

Mackey, T.K. and Liang, B.A. (2012) 'Threats from emerging and re-emerging neglected tropical diseases (NTDs)', *Infection Ecology & Epidemiology*, 2, p. 10.3402/iee.v2i0.18667. Available at: <https://doi.org/10.3402/iee.v2i0.18667>.

Madu, I.G. et al. (2018) 'A potent Lassa virus antiviral targets an arenavirus virulence determinant', *PLoS Pathogens*, 14(12), p. e1007439. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007439>.

Major, J. et al. (2020) 'Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection', *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), pp. 712–717. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abc2061>.

Maldifassi, M.C. et al. (2021) 'The interplay between $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, pannexin-1 channels and P2X7 receptors elicit exocytosis in chromaffin cells', *Journal of Neurochemistry*, 157(6), pp. 1789–1808. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.15186>.

Manganaro, R. et al. (2020) 'Synthesis and antiviral effect of novel fluoxetine analogues as enterovirus 2C inhibitors', *Antiviral Research*, 178, p. 104781. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104781>.

Manzoor, S. et al. (2016) 'Ionotropic Purinergic Receptors P2X4 and P2X7: Proviral or Antiviral? An Insight into P2X Receptor Signaling and Hepatitis C Virus Infection', *Viral Immunology*, 29(7), pp. 401–408. Available at: <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0008>.

Marcolino, M.S. et al. (2022) 'Systematic review and meta-analysis of ivermectin for treatment of COVID-19: evidence beyond the hype', *BMC Infectious Diseases*, 22, p. 639. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07589-8>.

Markham, A. (2021) 'REGN-EB3: First Approval', *Drugs*, 81(1), pp. 175–178. Available at:

<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01452-3>.

Matsuyama, T. et al. (2020) 'An aberrant STAT pathway is central to COVID-19', *Cell Death and Differentiation*, 27(12), pp. 3209–3225. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00633-7>.

Matta, J.A. et al. (2021) 'Nicotinic acetylcholine receptor redux: Discovery of accessories opens therapeutic vistas', *Science*, 373(6556), p. eabg6539. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abg6539>.

Mavrakis, M. et al. (2003) 'Isolation and Characterisation of the Rabies Virus N^o-P Complex Produced in Insect Cells', *Virology*, 305(2), pp. 406–414. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1748>.

Mavrakis, M. et al. (2004) 'Structure and Function of the C-terminal Domain of the Polymerase Cofactor of Rabies Virus', *Journal of Molecular Biology*, 343(4), pp. 819–831. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.071>.

McCormick, J.B. et al. (1986) 'Lassa Fever', *New England Journal of Medicine*, 314(1), pp. 20–26. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198601023140104>.

McCreedy, B.J., McKinnon, K.P. and Lyles, D.S. (1990) 'Solubility of vesicular stomatitis virus M protein in the cytosol of infected cells or isolated from virions.', *Journal of Virology*, 64(2), pp. 902–906. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249187/> (Accessed: 20 July 2023).

McDonald, S.M. et al. (2016) 'Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes', *Nature Reviews. Microbiology*, 14(7), pp. 448–460. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.46>.

Mecha, M. et al. (2013) 'Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: A role for A2A receptors', *Neurobiology of Disease*, 59, pp. 141–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.016>.

Mécs, I. (1968) 'The effect of purine and pyrimidine compounds on the virus-host cell interaction. II. The effect on interferon action', *Acta Virologica*, 12(6), pp. 491–496.

de Melo, G.D. et al. (2020) 'A combination of two human monoclonal antibodies cures symptomatic rabies', *EMBO Molecular Medicine*, 12(11), p. e12628. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.202012628>.

de Melo, G.D., Lazarini, F., Larrous, F., et al. (2021) 'Attenuation of clinical and immunological outcomes during SARS-CoV-2 infection by ivermectin', *EMBO Molecular Medicine*, 13(8), p. e14122. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.202114122>.

de Melo, G.D., Lazarini, F., Levallois, S., et al. (2021) 'COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters', *Science Translational Medicine*, 13(596), p. eabf8396. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf8396>.

de Melo, G.D. et al. (2022) 'Monoclonal antibodies against rabies: current uses in prophylaxis and in therapy', *Current Opinion in Virology*, 53, p. 101204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101204>.

de Melo, G.D. et al. (2023) 'Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants', *Nature Communications*, 14(1), p. 4485. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40228-7>.

Merck Sharp & Dohme LLC (2022) *Efficacy and Safety of Molnupiravir (MK-4482) in Non-Hospitalized Adult Participants With COVID-19 (MK-4482-002) - Study Results - ClinicalTrials.gov*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04575597> (Accessed: 8 July 2023).

Mercorelli, B., Palù, G. and Loregian, A. (2018) 'Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We?', *Trends in Microbiology*, 26(10), pp. 865–876. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.004>.

Miledi, R., Molinoff, P. and Potter, L.T. (1971) 'Biological sciences: Isolation of the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue', *Nature*, 229(5286), pp. 554–557. Available at: <https://doi.org/10.1038/229554a0>.

Mitsuya, H. et al. (1985) '3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), pp. 7096–7100. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>.

Monção-Ribeiro, L.C. et al. (2014) 'P2X7 Receptor Modulates Inflammatory and Functional Pulmonary Changes Induced by Silica', *PLoS ONE*, 9(10), p. e110185. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110185>.

Morens, D.M. and Fauci, A.S. (2020) 'Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19', *Cell*, 182(5), pp. 1077–1092. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>.

Morin, B., Rahmeh, A.A. and Whelan, S.P. (2012) 'Mechanism of RNA synthesis initiation by the vesicular stomatitis virus polymerase', *The EMBO Journal*, 31(5), p. 1320. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.483>.

Mues, M.B. et al. (2015) 'Dynasore Disrupts Trafficking of Herpes Simplex Virus Proteins', *Journal of Virology*, 89(13), pp. 6673–6684. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00636-15>.

Müller, T. et al. (2009) 'Development of a Mouse Monoclonal Antibody Cocktail for Post-exposure Rabies Prophylaxis in Humans', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(11), p. e542. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000542>.

Müller, T. et al. (2017) 'The purinergic receptor subtype P2Y2 mediates chemotaxis of neutrophils and fibroblasts in fibrotic lung disease', *Oncotarget*, 8(22), pp. 35962–35972. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16414>.

Müller, T. and Idzko, M. (2012) 'P2Y receptors in lung inflammation', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6), pp. 755–762. Available at: <https://doi.org/10.1002/wmts.69>.

Münch, J. et al. (2007) 'Discovery and Optimization of a Natural HIV-1 Entry Inhibitor Targeting the gp41 Fusion Peptide', *Cell*, 129(2), pp. 263–275. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.042>.

Murray, E.J. et al. (2010) 'A Low-Molecular-Weight Entry Inhibitor of both CCR5- and CXCR4-Tropic Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Targets a Novel Site on gp41', *Journal of Virology*, 84(14), pp. 7288–7299. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.00535-10>.

Mustafa, S.J. et al. (2009) 'Adenosine Receptors and the Heart: Role in Regulation of Coronary Blood Flow and Cardiac Electrophysiology', *Handbook of experimental pharmacology*, (193), pp. 161–188. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_6.

Mwacalimba, K.K. and Green, J. (2015) "One health" and development priorities in resource-constrained countries: policy lessons from avian and pandemic influenza preparedness in Zambia',

Health Policy and Planning, 30(2), pp. 215–222. Available at: <https://doi.org/10.1093/heapol/czu001>.

Nadeali, Z. et al. (2022) 'Possible role of pannexin 1 channels and purinergic receptors in the pathogenesis and mechanism of action of SARS-CoV-2 and therapeutic potential of targeting them in COVID-19', *Life Sciences*, 297, p. 120482. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120482>.

Nakazawa, K. (1994) 'ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(2), pp. 740–750. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00740.1994>.

Neurath, A.R. et al. (1992) 'Rapid Prescreening for Antiviral Agents against HIV-1 Based on Their Inhibitory Activity in Site-Directed Immunoassays. II. Porphyrins Reacting with the V3 Loop of gp120', *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 3(1), pp. 55–63. Available at: <https://doi.org/10.1177/095632029200300108>.

Nii-Trebi, N.I. (2017) 'Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges', *BioMed Research International*, 2017, p. 5245021. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/5245021>.

Nikolic, J. et al. (2017) 'Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles', *Nature Communications*, 8, p. 58. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00102-9>.

Nikolova, M. et al. (2011) 'CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression', *PLOS Pathogens*, 7(7), p. e1002110. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002110>.

Nörenberg, W. et al. (2012) 'Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors', *British Journal of Pharmacology*, 167(1), pp. 48–66. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x>.

North, R.A. (2002) 'Molecular Physiology of P2X Receptors', *Physiological Reviews*, 82(4), pp. 1013–1067. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.

Ochoa-Cortés, F. et al. (2010) 'Functional interactions between nicotinic and P2X receptors in celiac ganglia neurons', *Autonomic Neuroscience*, 154(1), pp. 59–65. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.11.007>.

Ogino, M. et al. (2019) 'A dual-functional priming-capping loop of rhabdoviral RNA polymerases directs terminal de novo initiation and capping intermediate formation', *Nucleic Acids Research*, 47(1), pp. 299–309. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1058>.

Ogino, T. et al. (2005) 'Sendai Virus RNA-dependent RNA Polymerase L Protein Catalyzes Cap Methylation of Virus-specific mRNA*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), pp. 4429–4435. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M411167200>.

Ogino, T. and Banerjee, A.K. (2007) 'Unconventional Mechanism of mRNA Capping by the RNA-Dependent RNA Polymerase of Vesicular Stomatitis Virus', *Molecular Cell*, 25(1), pp. 85–97. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.013>.

Ogino, T. and Green, T.J. (2019) 'Transcriptional Control and mRNA Capping by the GDP Polyribonucleotidyltransferase Domain of the Rabies Virus Large Protein', *Viruses*, 11(6), p. 504. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11060504>.

Olival, K.J. et al. (2017) 'Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals', *Nature*, 546(7660), pp. 646–650. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature22975>.

Oliveira, M.C.G. et al. (2009) 'Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X₃,2/3 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia', *PAIN*, 141(1), p. 127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.10.024>.

OMS (2004) *Maladies émergentes*, World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean. Available at: <http://www.emro.who.int/fr/health-topics/emerging-diseases/Page-1.html> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2017) « Une seule santé ». Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/one-health> (Accessed: 16 August 2023).

OMS (2018a) *Nouveau plan stratégique mondial pour éliminer la rage humaine d'origine canine d'ici à 2030*. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/commentaries/detail/new-global-strategic-plan-to-eliminate-dog-mediated-rabies-by-2030> (Accessed: 15 July 2023).

OMS (2018b) *WHO expert consultation on rabies: third report*. World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364> (Accessed: 7 July 2023).

OMS (2020) *Maladies à transmission vectorielle*. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2021a) 'Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis', *JAMA*, 326(6), pp. 499–518. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.11330>.

OMS (2021b) *Ending NTDs: together towards 2023*. Available at: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/ending-ntds-together-towards-2030/pillar1> (Accessed: 11 June 2023).

OMS (2021c) *Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19): comment se transmet la COVID-19 ?* Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2021d) *Rabies, Presence of dog-transmitted human rabies: 2021*. Available at: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/rabies/rabies.html (Accessed: 11 June 2023).

OMS (2022) *Preliminary Report for the Scientific Advisory Group for the Origins of Novel Pathogens (SAGO)*. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/scientific-advisory-group-on-the-origins-of-novel-pathogens-report> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2023a) *Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. Available at: <https://covid19.who.int> (Accessed: 30 September 2023).

OMS (2023b) *Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19): ce qu'il faut savoir*. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2023c) *MERS outbreaks*, World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean. Available at: <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2023d) *Neglected tropical diseases*. Available at: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases> (Accessed: 10 June 2023).

OMS (2023e) *Principaux repères de l'OMS sur la rage*. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/rabies> (Accessed: 11 June 2023).

OMS (2023f) *Therapeutics and COVID-19: Living guideline*. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-therapeutics-2023.1> (Accessed: 8 July 2023).

OMSA (2022) *Une seule santé, OMSA - Organisation mondiale de la santé animale*. Available at: <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/initiatives-mondiales/une-seule-sante/> (Accessed: 16 August 2023).

Ono, E.A.D. et al. (2013) 'In vitro and in vivo inhibition of rabies virus replication by RNA interference', *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, pp. 879–882. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000050>.

Orellana, J.A. et al. (2011) 'ATP and glutamate released via astroglial connexin43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin I hemichannels', *Journal of Neurochemistry*, 118(5), pp. 826–840. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07210.x>.

Ostrander, M. and Cheng, Y.C. (1980) 'Properties of herpes simplex virus type 1 and type 2 DNA polymerase', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 609(2), pp. 232–245. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(80\)90234-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(80)90234-8).

Ouizougun-Oubari, M. and Fearn, R. (2023) 'Structures and Mechanisms of Nonsegmented, Negative-Strand RNA Virus Polymerases', *Annual Review of Virology*, 10(1), p. null. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-111821-102603>.

Owen, D.R. et al. (2021) 'An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19', *Science*, 374(6575), pp. 1586–1593. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aba4784>.

Pacheco, P.A. et al. (2014) 'Putative roles of purinergic signaling in human immunodeficiency virus-1 infection', *Biology Direct*, 9, p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-9-21>.

Pacheco, P.A.F. et al. (2018) 'Purinergic receptors and neglected tropical diseases: why ignore purinergic signaling in the search for new molecular targets?', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(4), pp. 307–313. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9761-0>.

Paesen, G.C. et al. (2015) 'X-ray structure and activities of an essential Mononegavirales L-protein domain', *Nature Communications*, 6, p. 8749. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms9749>.

Pantaleo, G. et al. (2022) 'Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress', *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(9), pp. 676–696. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00495-3>.

Papke, R.L. et al. (2009) 'Activation and Desensitization of Nicotinic $\alpha 7$ -type Acetylcholine Receptors by Benzylidene Anabaseines and Nicotine', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(2), pp. 791–807. Available at: <https://doi.org/10.1124/jpet.108.150151>.

Pappaioanou, M. and Spencer, H. (2008) "'One Health" Initiative and ASPH', *Public Health Reports*, 123(3), p. 261. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2289976/> (Accessed: 10 June 2023).

Park, Y.-J. et al. (2022) 'Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages', *bioRxiv*, p. 2022.05.08.491108. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.05.08.491108>.

Patil, V.M., Verma, S. and Masand, N. (2022) 'Prospective mode of action of Ivermectin: SARS-CoV-2', *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 4, p. 100018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2021.100018>.

Patterson, K.D. (1992) 'Yellow fever epidemics and mortality in the United States, 1693-1905', *Social Science & Medicine (1982)*, 34(8), pp. 855–865. Available at: [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(92\)90255-o](https://doi.org/10.1016/0277-9536(92)90255-o).

Patterson, K.D. and Pyle, G.F. (1991) 'The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic', *Bulletin of the History of Medicine*, 65(1), pp. 4–21.

Patti, L. et al. (2006) 'P2X7 receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic $\alpha 7$ nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals', *Neuropharmacology*, 50(6), pp. 705–713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.016>.

Pavlov, V.A. and Tracey, K.J. (2006) 'Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway', *Biochemical Society Transactions*, 34(6), pp. 1037–1040. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST0341037>.

Pavlov, V.A. and Tracey, K.J. (2012) 'The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism', *Nature reviews. Endocrinology*, 8(12), pp. 743–754. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.189>.

Pavlov, V.A. and Tracey, K.J. (2017) 'Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation', *Nature Neuroscience*, 20(2), pp. 156–166. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.4477>.

Perregaux, D. and Gabel, C.A. (1994) 'Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity.', *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), pp. 15195–15203. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36591-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36591-2).

Piccinotti, S., Kirchhausen, T. and Whelan, S.P.J. (2013) 'Uptake of Rabies Virus into Epithelial Cells by Clathrin-Mediated Endocytosis Depends upon Actin', *Journal of Virology*, 87(21), pp. 11637–11647. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01648-13>.

Pichlmair, A. and Reis e Sousa, C. (2007) 'Innate recognition of viruses', *Immunity*, 27(3), pp. 370–383. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.012>.

Piovesana, R. et al. (2021) 'Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4912. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22094912>.

Pollard, A.J. and Bijker, E.M. (2021) 'A guide to vaccinology: from basic principles to new developments', *Nature Reviews Immunology*, 21(2), pp. 83–100. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.

Poulsen, S.A. and Quinn, R.J. (1998) 'Adenosine receptors: new opportunities for future drugs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(6), pp. 619–641. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(98\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(98)00038-8).

Priel, A. and Silberberg, S.D. (2004) 'Mechanism of Ivermectin Facilitation of Human P2X4 Receptor Channels', *The Journal of General Physiology*, 123(3), pp. 281–293. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.200308986>.

Prusoff, W.H. (1963) 'Discussion of the possible mechanisms of action of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU, IUDR) and chymotrypsin in the treatment of Herpes simplex keratitis', *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 67,

pp. 707–709.

Pungartnik, P.C. et al. (2023) 'The interfaces between One Health and Global Health: A scoping review', *One Health*, 16, p. 100573. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100573>.

Rahmeh, A.A. et al. (2009) 'Ribose 2'-O Methylation of the Vesicular Stomatitis Virus mRNA Cap Precedes and Facilitates Subsequent Guanine-N-7 Methylation by the Large Polymerase Protein', *Journal of Virology*, 83(21), pp. 11043–11050. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.01426-09>.

Ralevic, V. (2021) 'History of Geoff Burnstock's research on P2 receptors', *Biochemical Pharmacology*, 187, p. 114358. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114358>.

Ramesh, N. (2021) *Types of Vaccines Infographics | Epidemiology COVID-19 Response Corps*. Available at: <https://sites.bu.edu/covid-corps/projects/science-communication/types-of-vaccines-infographics/> (Accessed: 19 July 2023).

Rathmacher, J.A. et al. (2012) 'Adenosine-5'-triphosphate (ATP) supplementation improves low peak muscle torque and torque fatigue during repeated high intensity exercise sets', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), p. 48. Available at: <https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-48>.

RECOVERY Collaborative Group (2020) 'Lopinavir–ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial', *Lancet (London, England)*, 396(10259), pp. 1345–1352. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32013-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32013-4).

Reis, G. et al. (2022) 'Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with Covid-19', *New England Journal of Medicine*, 386(18), pp. 1721–1731. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115869>.

Rejdak, K. and Grieb, P. (2020) 'Adamantanes might be protective from COVID-19 in patients with neurological diseases: multiple sclerosis, parkinsonism and cognitive impairment', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 42, p. 102163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102163>.

Rémy, V., Zöllner, Y. and Heckmann, U. (2015) 'Vaccination: the cornerstone of an efficient healthcare system', *Journal of Market Access & Health Policy*, 3, p. 10.3402/jmahp.v3.27041. Available at: <https://doi.org/10.3402/jmahp.v3.27041>.

Ren, C. et al. (2017) 'The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism', *International Journal of Biological Sciences*, 13(1), pp. 46–56. Available at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.16404>.

Reys, L.G. et al. (2013) 'Uncovering the neuroenteric–pulmonary axis: Vagal nerve stimulation prevents acute lung injury following hemorrhagic shock', *Life Sciences*, 92(13), pp. 783–792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.009>.

Ribeiro, D.E. et al. (2021) 'Hyperactivation of P2X7 receptors as a culprit of COVID-19 neuropathology', *Molecular Psychiatry*, 26(4), pp. 1044–1059. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00965-3>.

Ribeiro, E. de A. et al. (2009) 'Binding of rabies virus polymerase cofactor to recombinant circular nucleoprotein-RNA complexes', *Journal of Molecular Biology*, 394(3), pp. 558–575. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.042>.

Richman, D.D. and Nathanson, N. (2016) 'Chapter 20 - Antiviral Therapy', in M.G. Katze et al. (eds) *Viral Pathogenesis (Third Edition)*. Boston: Academic Press, pp. 271–287. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800964-2.00020-3>.

Rodrigues, R.J. et al. (2016) 'Presynaptic P2X1-3 and α 3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus', *Neuropharmacology*, 105, pp. 241–257. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.022>.

Rogée, S. et al. (2019) 'Pyrimethamine inhibits rabies virus replication in vitro', *Antiviral Research*, 161, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.016>.

Rohaim, M.A. et al. (2021) 'Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses', *Microbial Pathogenesis*, 150, p. 104641. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104641>.

Rokic, M.B. and Stojilkovic, S.S. (2013) 'Two open states of P2X receptor channels', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, p. 215. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00215>.

Romanowski, V. (2013) *Current Issues in Molecular Virology: Viral Genetics and Biotechnological Applications*. BoD – Books on Demand.

Rosas-Ballina, M. and Tracey, K.J. (2009) 'Cholinergic control of inflammation', *Journal of internal medicine*, 265(6), pp. 663–679. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x>.

Rossato, M. et al. (2020) 'Current smoking is not associated with COVID-19', *The European Respiratory Journal*, 55(6), p. 2001290. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.01290-2020>.

Rouse, B.T. and Sehrawat, S. (2010) 'Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome?', *Nature Reviews Immunology*, 10(7), pp. 514–526. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2802>.

Ruch, T.R. and Machamer, C.E. (2012) 'The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond', *Viruses*, 4(3), pp. 363–382. Available at: <https://doi.org/10.3390/v4030363>.

Ryoden, Y. et al. (2020) 'Functional Expression of the P2X7 ATP Receptor Requires Eros', *The Journal of Immunology*, 204(3), pp. 559–568. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900448>.

Sacks, S.L. and Wilson, B. (1999) 'Famciclovir/penciclovir', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 458, pp. 135–147. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4743-3_13.

Sajjanar, B. et al. (2017) 'Nicotinic acetylcholine receptor alpha 1(nAChR α 1) subunit peptides as potential antiviral agents against rabies virus', *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, pp. 180–188. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.179>.

Sakaki, H. et al. (2013) 'P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(3), pp. 406–411. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.135>.

Sakmann, B. and Neher, E. (1995) *Single-Channel Recording*. Boston: Springer Science & Business Media.

Salado, I.G. et al. (2020) 'Lead Optimization of Phthalazinone Phosphodiesterase Inhibitors as Novel Antitrypanosomal Compounds', *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(7), pp. 3485–3507. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00985>.

Sallard, E. et al. (2020) 'Retrouver les origines du SARS-CoV-2 dans les phylogénies de coronavirus', *médecine/sciences*, 36(8–9), pp. 783–796. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2020123>.

Sanders, J.M. et al. (2020) 'Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19):

A Review', *JAMA*, 323(18), pp. 1824–1836. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>.

Santé Publique France (2023) *Coronavirus: circulation des variants du SARS-CoV-2*. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-circulation-des-variants-du-sars-cov-2> (Accessed: 10 June 2023).

Sareen, S., Mathew, G. and Joseph, L. (2012) 'Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion', *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), pp. 12–17. Available at: <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96921>.

Sattelle, D.B. et al. (2009) 'Comparative pharmacology and computational modelling yield insights into allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 78(7), pp. 836–843. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.06.020>.

Saxena, S.K. et al. (2010) 'Emerging Trends, Challenges and Prospects in Antiviral Therapeutics and Drug Development for Infectious Diseases', 6.

Scavone, C. et al. (2020) 'Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next?', *British Journal of Pharmacology*, 177(21), pp. 4813–4824. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.15072>.

Schaeffer, H.J. et al. (1978) '9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group', *Nature*, 272(5654), pp. 583–585. Available at: <https://doi.org/10.1038/272583a0>.

Schmid, R. and Evans, R.J. (2019) 'ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles', *Annual Review of Physiology*, 81, pp. 43–62. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114259>.

Schneider, M. et al. (2017) 'Interaction of Purinergic P2X4 and P2X7 Receptor Subunits', *Frontiers in Pharmacology*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00860> (Accessed: 21 July 2023).

Schnell, M.J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K.K. (1994) 'Infectious rabies viruses from cloned cDNA.', *The EMBO Journal*, 13(18), pp. 4195–4203. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395346/> (Accessed: 20 July 2023).

Schoeman, D. and Fielding, B.C. (2019) 'Coronavirus envelope protein: current knowledge', *Virology Journal*, 16(1), p. 69. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>.

Schoggins, J.W. (2019) 'Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do?', *Annual Review of Virology*, 6(1), pp. 567–584. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>.

Schoggins, J.W. and Rice, C.M. (2011) 'Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions', *Current Opinion in Virology*, 1(6), pp. 519–525. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>.

Schroder, K. and Tschopp, J. (2010) 'The Inflammasomes', *Cell*, 140(6), pp. 821–832. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.

Schwartz, T.W. and Holst, B. (2006) 'Ago-Allosteric Modulation and Other Types of Allostery in Dimeric 7TM Receptors', *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 26(1–2), pp. 107–128. Available at: <https://doi.org/10.1080/10799890600567570>.

Sen Gupta, P.S. et al. (2020) 'Binding mechanism and structural insights into the identified protein target of COVID-19 and importin- α with in-vitro effective drug ivermectin', *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1839564>.

- Séror, C. et al.** (2011) 'Extracellular ATP acts on P2Y₂ purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(9), pp. 1823–1834. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20101805>.
- Seth, R.B., Sun, L. and Chen, Z.J.** (2006) 'Antiviral innate immunity pathways', *Cell Research*, 16(2), pp. 141–147. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310019>.
- Shah, M. et al.** (2016) 'Advances in Antiviral Therapies Targeting Toll-like Receptors', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25(4), pp. 437–453. Available at: <https://doi.org/10.1517/13543784.2016.1154040>.
- Shchelkunov, S.N.** (2011) 'Emergence and reemergence of smallpox: The need for development of a new generation smallpox vaccine', *Vaccine*, 29, pp. D49–D53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.037>.
- Si, L. et al.** (2018) 'Triterpenoids manipulate a broad range of virus-host fusion via wrapping the HR2 domain prevalent in viral envelopes', *Science Advances*, 4(11), p. eaau8408. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8408>.
- Sloan, S.E. et al.** (2007) 'Identification and characterization of a human monoclonal antibody that potently neutralizes a broad panel of rabies virus isolates', *Vaccine*, 25(15), pp. 2800–2810. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.031>.
- Smieszek, S.P., Przychodzen, B.P. and Polymeropoulos, M.H.** (2020) 'Amantadine disrupts lysosomal gene expression: A hypothesis for COVID19 treatment', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(6), p. 106004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106004>.
- Smith, S.P. et al.** (2019) 'Trying to treat the untreatable: experimental approaches to clear rabies virus infection from the CNS', *Journal of General Virology*, 100(8), pp. 1171–1186. Available at: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001269>.
- Smreczak, M. et al.** (2019) 'The effect of selected molecules influencing the detrimental host immune response on a course of rabies virus infection in a murine model', *Vaccine*, 37(33), pp. 4715–4723. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.098>.
- Sonwane, A.A. et al.** (2012) 'Inhibition of rabies virus multiplication by siRNA delivered through adenoviral vector in vitro in BHK-21 cells and in vivo in mice', *Research in Veterinary Science*, 93(1), pp. 498–503. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.008>.
- Sparrow, E. et al.** (2019) 'Recent advances in the development of monoclonal antibodies for rabies post exposure prophylaxis: A review of the current status of the clinical development pipeline', *Vaccine*, 37, pp. A132–A139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.004>.
- Su, X. et al.** (2007) 'Activation of the $\alpha 7$ nAChR Reduces Acid-Induced Acute Lung Injury in Mice and Rats', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(2), pp. 186–192. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0240OC>.
- Sudre, C.H. et al.** (2021) 'Attributes and predictors of long COVID', *Nature Medicine*, 27(4), pp. 626–631. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01292-y>.
- Sun, L., Liu, S. and Chen, Z.J.** (2010) 'SnapShot: Pathways of Antiviral Innate Immunity', *Cell*, 140(3), pp. 436–436.e2. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.041>.
- Sun, Z. et al.** (2023) 'Activated P2X receptors can up-regulate the expressions of inflammation-related genes via NF- κ B pathway in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)', *Frontiers in Immunology*,

14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1181067> (Accessed: 5 July 2023).

Surprenant, A. and North, R.A. (2009) 'Signaling at Purinergic P2X Receptors', *Annual Review of Physiology*, 71(1), pp. 333–359. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>.

Sweiti, H. et al. (2017) 'Repurposed Therapeutic Agents Targeting the Ebola Virus: A Systematic Review', *Current Therapeutic Research*, 84, pp. 10–21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2017.01.007>.

Taefehshokr, S. et al. (2017) 'Early growth response 2 and Egr3 are unique regulators in immune system', *Central European Journal of Immunology*, 42(2), pp. 205–209. Available at: <https://doi.org/10.5114/ceji.2017.69363>.

Taly, A. et al. (2009) 'Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system', *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), pp. 733–750. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd2927>.

Taly, A. et al. (2014) 'Allosteric regulation of pentameric ligand-gated ion channels: An emerging mechanistic perspective', *Channels*, 8(4), pp. 350–360. Available at: <https://doi.org/10.4161/chan.29444>.

Tan, D.H.S. et al. (2011) 'Comparison of Abacavir/Lamivudine and Tenofovir/Emtricitabine Among Treatment-Naive HIV-Infected Patients Initiating Therapy', *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 58(1), p. 38. Available at: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182282cfc>.

Tang, N. et al. (2020) 'Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(4), pp. 844–847. Available at: <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.

Taylor, J.M. and Han, Z. (2010) 'Purinergic Receptor Functionality Is Necessary for Infection of Human Hepatocytes by Hepatitis Delta Virus and Hepatitis B Virus', *PLOS ONE*, 5(12), p. e15784. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015784>.

Tazerji, S.S. et al. (2022) 'An Overview of Anthropogenic Actions as Drivers for Emerging and Re-Emerging Zoonotic Diseases', *Pathogens*, 11(11), p. 1376. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens11111376>.

Tewari, M. et al. (2015) 'Astrocytes mediate HIV-1 Tat-induced neuronal damage via ligand-gated ion channel P2X7R', *Journal of Neurochemistry*, 132(4), pp. 464–476. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.12953>.

Thames, J.E. et al. (2020) 'Synthesis and biological evaluation of novel flexible nucleoside analogues that inhibit flavivirus replication in vitro', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(22), p. 115713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115713>.

The IMPact-RSV Study Group (1998) 'Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants', *Pediatrics*, 102(3), pp. 531–537. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.102.3.531>.

Thompson, R.J. et al. (2021) 'Purinergic Receptors in the Airways: Potential Therapeutic Targets for Asthma?', *Frontiers in Allergy*, 2. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/falgy.2021.677677> (Accessed: 23 July 2023).

Tian, L. et al. (2022) 'Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19', *Frontiers in Immunology*, 13, p. 855496. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496>.

Tompa, D.R. et al. (2021) 'Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs', *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, pp. 524–541. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.076>.

Torres, G.E., Egan, T.M. and Voigt, M.M. (1999) 'Hetero-oligomeric Assembly of P2X Receptor Subunits: SPECIFICITIES EXIST WITH REGARD TO POSSIBLE PARTNERS *', *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), pp. 6653–6659. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6653>.

Tracey, K.J. (2007) 'Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway', *Journal of Clinical Investigation*, 117(2), pp. 289–296. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI30555>.

Trifilo, M.J. et al. (2004) 'CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the Central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells', *Journal of Virology*, 78(2), pp. 585–594. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.585-594.2004>.

Tsai, C.-Y. et al. (2015) 'Type I IFNs and IL-18 Regulate the Antiviral Response of Primary Human $\gamma\delta$ T Cells against Dendritic Cells Infected with Dengue Virus', *The Journal of Immunology*, 194(8), pp. 3890–3900. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303343>.

Tuffereau, C. et al. (1998) 'Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus.', *The EMBO Journal*, 17(24), pp. 7250–7259. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7250>.

Turner, T.L. et al. (2014) 'Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options', *ClinicoEconomics and outcomes research: CEOR*, 6, pp. 217–225. Available at: <https://doi.org/10.2147/CEOR.S60710>.

Uematsu, T. et al. (2023) 'Prophylactic administration of ivermectin attenuates SARS-CoV-2 induced disease in a Syrian Hamster Model', *The Journal of Antibiotics*, 76(8), pp. 481–488. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00623-0>.

UNAIDS (2021) *Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet*. Available at: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (Accessed: 10 June 2023).

Vaccins et vaccination (2022). Available at: <https://www.who.int/fr/health-topics/vaccines-and-immunization> (Accessed: 11 June 2023).

Van Herrewege, Y. et al. (2008) 'CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), pp. 818–826. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn042>.

Vanderheiden, A. et al. (2020) 'Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures', *Journal of Virology*, 94(19), pp. e00985-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20>.

Virgilio, F.D. et al. (2003) 'Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation', *Drug Development Research*, 59(1), pp. 171–174. Available at: <https://doi.org/10.1002/ddr.10191>.

Virojanapirom, P. et al. (2016) 'T-705 as a Potential Therapeutic Agent for Rabies', *The Journal of Infectious Diseases*, 214(3), pp. 502–503. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw174>.

Vitiello, L. et al. (2012) 'Immunoregulation through extracellular nucleotides', *Blood*, 120(3), pp. 511–518. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406496>.

- V'kovski, P. et al.** (2021) 'Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2', *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), pp. 155–170. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- Wang, Hong et al.** (2003) 'Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation', *Nature*, 421(6921), pp. 384–388. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01339>.
- Wang, J. et al.** (2018) 'Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus', *PLoS Pathogens*, 14(7), p. e1007189. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007189>.
- Wang, J. et al.** (2021) 'Mechanisms underlying antidepressant effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on CUMS model rats based on hippocampal $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B signal pathway', *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), p. 291. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02341-6>.
- Wang, J., Kuryatov, A. and Lindstrom, J.** (2015) 'Expression of cloned $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors', *Neuropharmacology*, 96, pp. 194–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.009>.
- Wang, W. et al.** (2019) 'Antigenic variations of recent street rabies virus', *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), pp. 1584–1592. Available at: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1683436>.
- Wang, X. et al.** (2020) 'The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro', *Cell Discovery*, 6(1), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0169-8>.
- Wang, Y. et al.** (2011) 'G glycoprotein amino acid residues required for human monoclonal antibody RAB1 neutralization are conserved in rabies virus street isolates', *Antiviral Research*, 91(2), pp. 187–194. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.06.002>.
- Weber, F.** (2021) 'Antiviral Innate Immunity: Introduction', *Encyclopedia of Virology*, pp. 577–583. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21290-9>.
- Weir, D.L. et al.** (2014) 'Host cell virus entry mediated by Australian bat lyssavirus G envelope glycoprotein occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway that requires actin and Rab5', *Virology Journal*, 11, p. 40. Available at: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-40>.
- de Wit, E. et al.** (2016) 'SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses', *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), pp. 523–534. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.
- Wu, F. et al.** (2020) 'A new coronavirus associated with human respiratory disease in China', *Nature*, 579(7798), pp. 265–269. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
- Wu, J. et al.** (2021) 'Clofazimine: A Promising Inhibitor of Rabies Virus', *Frontiers in Pharmacology*, 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.598241> (Accessed: 7 July 2023).
- Wutzler, P.** (2008) 'Antiviral Therapy of Herpes simplex and Varicella-zoster Virus Infections', *Intervirology*, 40(5–6), pp. 343–356. Available at: <https://doi.org/10.1159/000150567>.
- Xia, S. et al.** (2020) 'Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein', *Cellular & Molecular Immunology*, 17(7), pp. 765–767. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>.
- Xia, X.** (2021) 'Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design', *Viruses*, 13(1), p. 109. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13010109>.
- Xu, C. et al.** (2021) 'Immunogenicity after pre- and post-exposure rabies vaccination: A systematic review and dose-response meta-analysis', *Vaccine*, 39(7), pp. 1044–1050. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.023>.

Yamada, K. et al. (2016) 'Efficacy of Favipiravir (T-705) in Rabies Postexposure Prophylaxis', *The Journal of Infectious Diseases*, 213(8), pp. 1253–1261. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv586>.

Yang, G. et al. (2005) 'An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge', *Journal of Virology*, 79(20), pp. 13139–13149. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.13139-13149.2005>.

Yang, S.N.Y. et al. (2020) 'The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β heterodimer', *Antiviral Research*, 177, p. 104760. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104760>.

Yegutkin, G.G. (2008) 'Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(5), pp. 673–694. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>.

Yin, S. et al. (2018) 'Trilobatin as an HIV-1 entry inhibitor targeting the HIV-1 Gp41 envelope', *FEBS Letters*, 592(13), pp. 2361–2377. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13113>.

Yoneyama, M. et al. (2004) 'The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses', *Nature Immunology*, 5(7), pp. 730–737. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1087>.

Yoshimoto, F.K. (2020) 'The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COVID-19), the Cause of COVID-19', *The Protein Journal*, 39(3), pp. 198–216. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>.

Yu, M. et al. (2014) 'Discovery of Pentacyclic Triterpenoids as Potential Entry Inhibitors of Influenza Viruses', *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), pp. 10058–10071. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm5014067>.

Yuan, Y. et al. (2023) 'The development of COVID-19 treatment', *Frontiers in Immunology*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1125246> (Accessed: 8 July 2023).

Zaidi, A.K. and Dehgani-Mobaraki, P. (2022) 'The mechanisms of action of ivermectin against SARS-CoV-2—an extensive review', *The Journal of Antibiotics*, 75(2), pp. 60–71. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00491-6>.

van der Zanden, E.P. et al. (2012) 'Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Susceptibility to Cholinergic Immunomodulation in Human Monocytes of Smoking Individuals', *Neuroimmunomodulation*, 19(4), pp. 255–265. Available at: <https://doi.org/10.1159/000335185>.

Zang, J. et al. (2022) 'A molecular simulation study of hepatitis B virus core protein and the nuclear protein allosteric modulators of phthalazinone derivatives', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(38), pp. 23209–23225. Available at: <https://doi.org/10.1039/D2CP02946D>.

Zarei, M., Sahebi Vaighan, N. and Ziai, S.A. (2021) 'Purinergic receptor ligands: the cytokine storm attenuators, potential therapeutic agents for the treatment of COVID-19', *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1988102>.

Zech, A. et al. (2016) 'P2rx4 deficiency in mice alleviates allergen-induced airway inflammation', *Oncotarget*, 7(49), pp. 80288–80297. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13375>.

Zeiler, F.A. and Jackson, A.C. (2016) 'Critical Appraisal of the Milwaukee Protocol for Rabies: This

Failed Approach Should Be Abandoned', *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 43(1), pp. 44–51. Available at: <https://doi.org/10.1017/cjn.2015.331>.

Zhang, B. et al. (2015) 'Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is required for blood-brain barrier injury-related CNS disorders caused by *Cryptococcus neoformans* and HIV-1 associated comorbidity factors', *BMC Infectious Diseases*, 15, p. 352. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1075-9>.

Zhang, C. et al. (2017) 'Virus-Triggered ATP Release Limits Viral Replication through Facilitating IFN- β Production in a P2X7-Dependent Manner', *The Journal of Immunology*, 199(4), pp. 1372–1381. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700187>.

Zhang, J. et al. (2018) 'Transmission of rabies through solid organ transplantation: a notable problem in China', *BMC Infectious Diseases*, 18, p. 273. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3112-y>.

Zhang, W. et al. (2020) 'The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China', *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 214, p. 108393. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.

Zhang, X. et al. (2008) 'Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice', *Inflammation Research*, 57(11), pp. 524–529. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8007-8>.

Zhang, Z. et al. (2020) 'A comparative study on the time to achieve negative nucleic acid testing and hospital stays between danoprevir and lopinavir/ritonavir in the treatment of patients with COVID-19', *Journal of Medical Virology*, 92(11), pp. 2631–2636. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.26141>.

Zhao, H. et al. (2020) 'A broad-spectrum virus- and host-targeting peptide against respiratory viruses including influenza virus and SARS-CoV-2', *Nature Communications*, 11(1), p. 4252. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17986-9>.

Zhao, X. et al. (2021) 'Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ameliorates HIV-associated neurology and neuropathology', *Brain*, 144(11), pp. 3355–3370. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awab251>.

Zhao, Y. et al. (2016) 'Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein', *Nature*, 535(7610), pp. 169–172. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature18615>.

Zheng, Q. et al. (2019) 'Viral neutralization by antibody-imposed physical disruption', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(52), pp. 26933–26940. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1916028116>.

Zimmermann, H., Zebisch, M. and Sträter, N. (2012) 'Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases', *Purinergic Signalling*, 8(3), pp. 437–502. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>.

Zoli, M., Pistillo, F. and Gotti, C. (2015) 'Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain', *Neuropharmacology*, 96, pp. 302–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>.

Zwart, R. et al. (2002) '5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices', *Neuropharmacology*, 43(3), pp. 374–384. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00094-1).

