



**HAL**  
open science

# Rôle des cyclophilines dans la réplication des Coronavirus

Manon Delaplace

► **To cite this version:**

Manon Delaplace. Rôle des cyclophilines dans la réplication des Coronavirus. Biologie moléculaire. AgroParisTech, 2021. Français. NNT : 2021AGPT0023 . tel-03601237

**HAL Id: tel-03601237**

**<https://pastel.hal.science/tel-03601237v1>**

Submitted on 8 Mar 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

**Docteur d'AgroParisTech**

**Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire**

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

*par*

**Manon DELAPLACE**

## Rôle des cyclophilines dans la réplication des Coronavirus

Directrice de thèse : **Sophie LE PODER**

Co-encadrant de thèse : **Hakim AHMED-BELKACEM**

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort le 17 décembre 2021

**Composition du jury :**

Raphael GAUDIN, Chargé de recherche, CNRS Montpellier  
Jean DUBUISSON, Directeur de recherche, CNRS Lille  
Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université de Paris  
Sophie LE PODER, Professeur, EnvA  
Hakim AHMED-BELKACEM, Ingénieur de recherche, Inserm

Rapporteur & Examineur  
Rapporteur & Examineur  
Examineur  
Directrice de thèse  
Co-Encadrant de thèse

**UMR1161 Virologie ENVA-ANSES-INRAE**  
7 avenue du Général De Gaulle -94700 Maisons-Alfort



# Remerciements

Je souhaite avant tout remercier ma directrice de thèse, le Pr. Sophie Le Poder. Merci pour toutes les opportunités qu'elle m'a offertes et qui ont beaucoup enrichi cette thèse. Merci également pour tout le temps qu'elle m'a consacré, même lorsqu'une pandémie a légèrement bousculé nos emplois du temps. Merci pour ses conseils avisés tout au long de ce travail, sa patience et bienveillance et pour son implication dans mon projet. Enfin, je la remercie pour toutes les discussions passionnantes que nous avons pu avoir (incluant les anecdotes vétos), et d'avoir partagé avec moi ses connaissances sans fond sur les coronavirus. Je suis toujours impressionnée trois ans plus tard.

Je remercie également mon co-encadrant, le Dr. Hakim Ahmed-Belkacem pour son aide et ses connaissances dans le domaine des inhibiteurs et de la biochimie. Je le remercie également de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre de ces travaux.

J'adresse tous mes remerciements au Pr. Jean Dubuisson et au Dr. Raphael Gaudin pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour leur relecture enrichissante de ce manuscrit.

Je remercie également le Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de mon jury.

Je souhaiterais également remercier les Dr. Marie Flamand et Jean Millet pour le temps qu'ils m'ont consacré lors des comités de suivi, et pour leurs précieux conseils.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Paul Brown qui m'a accueilli au sein de son équipe, conseillé et guidé lors de notre collaboration sur le projet IBV. Je souhaite également remercier Chantal Allée. Sa présence et son expertise sur le modèle aviaire ont été des atouts majeurs sur ce travail.

Mille mercis aux membres de l'équipe Coronavirus qui s'est agrandie au fur et à mesure. Je remercie le Dr. Hélène Huet pour ses conseils, et son soutien, notamment

pour les titrages, mais bien plus encore. Je remercie également Adèle Gambino, arrivée dans cette équipe en tant que stagiaire M1 et qui est maintenant en thèse. Je la remercie pour sa confiance et pour son aide et lui souhaite le meilleur pour sa thèse. Bienvenue aussi à Maxime dans l'équipe. Un grand merci également aux autres membres de l'équipe VEBE présents et passés.

Je tiens à remercier tous les membres de l'UMR. Travailler à leur cotés pendant ces trois ans a été un grand plaisir. Je souhaite remercier en particulier l'équipe I<sup>5</sup> pour leur aide matériel et scientifique sur les expériences d'interactions, et pour toutes nos discussions, qu'elles soient scientifiques ou non. Je vous laisse trouver un référant Wikipédia de remplacement pour ces dernières.

J'adresse toute ma gratitude aux doctorants, post-docs et ingénieure qui ont fait de cette période de ma vie un bonheur. Merci pour votre aide, de la relecture d'email aux discussions d'optimisation de RTqPCR. Merci aussi pour toutes les pauses thés et café, les multiples missions Truffaut et bien d'autres choses.

Je remercie enfin mes amis et ma famille pour leur soutien sans faille pendant ces années de thèse, pour m'avoir motivé ou changé les idées selon les jours, ce qui a été fort utile ces trois dernières années.

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
I. Généralités sur les Coronavirus .....	13
A. Classification des Coronavirus et phylogénie .....	13
B. Histoire des Coronavirus .....	15
C. Principaux Coronavirus d'intérêt vétérinaire .....	18
D. Franchissement de la barrière d'espèces .....	21
E. Biologie des Coronavirus.....	29
F. Cycle des Coronavirus .....	45
II. Le coronavirus félin .....	56
A. Biotypes FeCV et FIPV .....	56
B. Formes cliniques.....	57
C. Sérotypes du coronavirus félin .....	59
D. Mesures de lutte contre le virus de la péritonite infectieuse féline .....	59
III. Cyclophilines.....	80
A. Généralités sur les cyclophilines.....	80
B. Les inhibiteurs de cyclophilines.....	83
C. Cyclophilines et virus.....	86
D. Cyclophilines et Nidovirus.....	99
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>107</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>109</b>
I. Etude de l'effet antiviral des inhibiteurs de cyclophilines sur le coronavirus félin .....	109
A. Matériel et analyses des résultats .....	109
B. Infection de FIPV en présence de SM-CypI.....	111
II. Etudes des interactions des protéines virales et cyclophilines .....	114
A. Cellules .....	114

B.	Construction des banques de plasmides exprimant les protéines d'intérêt .....	114
C.	Transfection.....	119
D.	Tests des interactions.....	119
III.	Etudes de l'effet antiviral des inhibiteurs de cyclophilines sur d'autres coronavirus.....	122
A.	Virus de la bronchite infectieuse (IBV) .....	122
B.	Etude <i>in vivo</i> de l'efficacité de la molécule 83233 dans le modèle d'infection du hamster doré par le SARS-CoV-2 .....	124
<b>Résultats</b>	.....	<b>127</b>
I.	Etude de l'effet antiviral des inhibiteurs de cyclophilines sur le coronavirus félin .....	127
A.	Inhibiteurs de cyclophilines .....	127
B.	Résultats complémentaires .....	155
C.	Conclusion.....	158
II.	Etudes des interactions des protéines virales et cyclophilines .....	160
A.	Etat de l'art.....	160
B.	Tests d'interaction entre les protéines virales du FIPV et la Cyclophiline A feline .....	161
C.	Conclusion.....	166
III.	Etudes de l'effet antiviral des inhibiteurs de cyclophilines sur d'autres coronavirus.....	167
A.	Etude des inhibiteurs de cyclophilines dans le cycle viral de la bronchite infectieuse aviaire (IBV).....	167
B.	SARS-CoV-2 : Test <i>in vivo</i> de l'action antivirale de la molécule 83233 dans un modèle de hamsters dorés.....	173
C.	Conclusion.....	179
<b>Discussion</b>	.....	<b>181</b>
<b>Conclusion générale</b>	.....	<b>197</b>
<b>Bibliographie</b>	.....	<b>201</b>
<b>Annexes</b>	.....	<b>235</b>

# Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Coronavirus.....	20
Figure 2 : Emergence des Tegacovirus.....	22
Figure 3 : Origines animales des Coronavirus humains. ....	26
Figure 4 : Particules, génome et ARNm de FCoV.....	31
Figure 5 : Schéma de l'organisation des polyprotéines pp1a et pp1ab.....	32
Figure 6 : Schéma de la structure de la protéine S.....	35
Figure 7 : Structure de la protéine E.....	37
Figure 8 : Représentation de la protéine M. ....	39
Figure 9 : Structure de la protéine N.....	41
Figure 10 : Transcription des ARNs génomiques et sous génomiques des Coronavirus. ....	52
Figure 11 :Photo de cellules CRFK infectées par FIPV.....	54
Figure 12 : Schéma du cycle de réplication des Coronavirus. ....	55
Figure 13 : Lésions associées à la forme humide et sèche de la PIF. ....	58
Figure 14 : Structure de CypA basée sur la structure PDB 10CA.....	81
Figure 15 : Mécanisme d'inhibition de NFAT par CsA.....	84
Figure 16 : Structure des principaux inhibiteurs de cyclophilines ....	86
Figure 17 : Fonctions des cyclophilines dans le cycle du VIH.....	88
Figure 18 : Rôle des cyclophilines dans la réplication des Flaviviridae.....	91
Figure 19 : Schéma récapitulatif des interactions Cyp/CoV.....	104
Figure 20 : Résumé de l'expérience d'addition des SM-CypI à différents temps post-infection .....	112
Figure 21 : Résumé de l'expérience de l'effet antiviral des SM-CypI sur l'étape d'attachement.....	113
Figure 22 : Protocole de l'expérience de préincubation des SM-CypI sur l'infection FIPV .....	113
Figure 23 : Principe du système de clonage Gateway.....	117
Figure 24 : Banques de plasmides d'expression construites par clonage Gateway.....	118
Figure 25 : Principe des complémentation fonctionnelle de Nanoluciférase.....	119
Figure 26 : Principe du test de ligation de proximité.....	121
Figure 27 : Représentation schématique des inhibiteurs de cyclophilines utilisés .....	128
Figure 28 : Etude de la réversibilité de l'action antivirale des SM-CypI sur les particules infectieuses .....	155
Figure 29 : Etude de la réversibilité de l'action antivirale des SM-CypI sur les ARN viraux intracellulaires.....	156

Figure 30 : Quantification des ARN génomiques et sous génomiques lors d'une expérience d'ajout des SM-cypI à différents temps post-infection.....	157
Figure 31 : Etapes du cycle viral du coronavirus félin potentiellement ciblées par les SM-CypI....	159
Figure 32 : Visualisation de l'interaction de la protéine N du coronavirus félin et la CypA féline par PLA.....	163
Figure 33 : Test d'interaction par complémentation fonctionnelle des protéines recombinantes de SARS-CoV-2 et de la cyclophiline A.....	166
Figure 34 : Comparaison des séquences protéiques de cyclophiline A de différentes espèces.....	168
Figure 35 : Test de l'effet antiviral de différentes concentrations de la molécule 83233 sur IBV. ....	170
Figure 36 : Test des molécules SM-CypI sur le virus IBV. ....	172
Figure 37 : Principe de l'expérience <i>in vivo</i> .....	174
Figure 38 : Poids perdus par les hamsters infectés par SARS-CoV-2 traités avec la molécule 83233 .....	175
Figure 39 : Mesure de l'appétit des hamsters.. .....	176
Figure 40 : Titrage des particules infectieuses présentes dans les écouvillons nasaux à J1 et J2 post infection.....	177
Figure 41 : Quantité d'ARN viral normalisée par rapport au gène cellulaire 18S.....	178
Figure 42 : Différents facteurs d'hôtes associés au franchissement de barrière d'espèce. ....	192
Figure 43 : Résumé du rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus. ....	198

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Phylogénie des Coronavirus.....	14
Tableau 2 : Résumé des fonctions des protéines non structurales.....	33
Tableau 3 : Récepteurs et voies d'entrée connus des Coronavirus.....	48
Tableau 4 : Molécules ayant un effet antiviral sur FCoV .....	76
Tableau 5 : Résumé des interactions cyclophilines/virus.....	98
Tableau 6 : Effet de la cyclosporine A sur les Coronavirus et Artérovirus.....	100
Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet de déplétion en cyclophilines sur la réplication des Nidovirus. .....	102
Tableau 8 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour les qPCR .....	110
Tableau 9 : Amorces utilisées pour la construction des banques de plasmides.....	116

# Liste des abréviations

aa	Acides aminés
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
ADE	"Antibody Dependant Enhancement"/ Facilitation par les Anticorps
ADNc	ADN complémentaire
APN	Aminopeptidase-N
ARN	Acide ribonucléotidique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNv	ARN viral/viraux
AvCoV	Coronavirus aviaire
BCoV	Coronavirus Bovin
CC50	Dose cytotoxique pour 50% des cellules
CCoV	Coronavirus Canin
CEACAM1	Cecarcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CM	Membranes convolutées
CoV	Coronavirus
CoVID19	Coronavirus Disease 2019
CRFK	Cellules Crandall-Rees de rein félin
CS	Séquence core
CsA	Cyclosporine A
CTD/NTD	Domaine C-terminal/ N-terminal
Cyp	Cyclophiline
CypI	Inhibiteur de Cyclophilines
DLA	Domaine de liaison à l'ARN
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMV	Vésicule à double membrane

ERGIC	Compartiment Intermédiaire réticulum endoplasmique Golgi
ExoN	Exoribonucléase
FCoV	Coronavirus Félin
FECV	Coronavirus Félin Entérique
FIPV	Virus de la Péritonite Infectieuse Féline
GST	Glutathion-S-Transférase
HCoV	Coronavirus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HE	Hemmaglutinine Esterase
HRP	Horse Radish Peroxydase
IBV	Virus de la Bronchite Infectieuse
IC50	Dose d'inhibition de 50% de l'infection
ICTV	International Comitee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interféron
ISG	Gene Stimulé par l'Interféron
kDa	kiloDalton
MAVS	Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MERS	Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient
MHV	Virus de l'Hépatite Murine
MOI	Multiplicité d'infection
N-/C-ter	<i>N-/C-terminal</i>
NendoU	Uridylate-specific endoribonuclease
NFkB	Nuclear factor-kappa B
nsp	Protéine non-structurale
nt	Nucléotides
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Cadre de lecture ouvert
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne

PDCoV	Deltacoronavirus Porcin
PEDV	Virus de la diarrhée entérique porcine
PFA	Paraformaldéhyde
PHEV	Virus Hémagglutinant de l'Encéphalomyélite Porcine
PIF	Péritonite Infectieuse Féline
PLA	Test de ligation par proximité
pp1a/pp1ab	Polyprotéine 1a/1ab
PPI	Peptidyl-prolyl isomérase
RBD	Domaine de liaison au récepteur
RdRp	RNA dépendant RNA polymérase
RE	Réticulum endoplasmique
RNP	Ribonucléocapside
RTC	Replication Transcription Complexe
RTqPCR	PCR quantitative à transcription inverse
SADS	Syndrome de la Diarrhée Porcine Aigue
SARS	Syndrome Respiratoire Aigu Severe
TGEV	Virus de la Gastroenterite Porcine
TM	Transmembranaire
TRS	Transcription Regulation Sequence
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP	Particules pseudo-virales

# Introduction

## I. GENERALITES SUR LES CORONAVIRUS

---

### A. CLASSIFICATION DES CORONAVIRUS ET PHYLOGENIE

Les Coronavirus (CoV) sont des virus enveloppés à ARN simple brin positif infectant un grand nombre de mammifères et d'oiseaux

Les Coronavirus appartiennent au domaine des *Riboviria*, au royaume des *Orthovirinae*, au phylum des *pisuviricota*, la classe des *psoniviricetes*, à l'ordre des *Nidovirales*, le sous-ordre des *cornidovirineae*, à la famille des *Coronaviridae* et la sous-famille des *orthocoronavirinae* (Tableau 1). Ils se divisent en quatre genres *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma*, et *Deltacoronavirus*. Les *alpha-* et *betacoronavirus* sont des coronavirus infectant des mammifères, tandis que les *gamma* et *delta-* sont très majoritairement des coronavirus infectant des espèces aviaires, bien que des exceptions existent.

Tableau 1 : Phylogénie des Coronavirus. D'après le rapport 2020 de l'ICTV.

Domaine	<b>Riboviria</b>			
Règne	<b>Orthornavirinae</b>		Pararnavirinae	
Phylum	Kitrinoviricota	<b>Pisuviricota</b>	Lenarviricota	Negarnaviricota
	Duplornaviricota			
Classe	Duploviricetes	<b>Pisoniviricetes</b>	Stelpaviricetes	
Ordre	Sobelivirales	<b>Nidovirales</b>	Picornavirales	
Sous-ordre	Abnidovirineae	<b>Cornidovirineae</b>	Monidovirineae	Ronidovirineae
	Arnidovirineae	Mesnidovirineae	Nanidovirineae	Tornidovirineae
Famille	<b>Coronaviridae</b>			
Sous-famille	Letovirinae	<b>Orthocoronavirinae</b>		
Genre	<b>Alphacoronavirus</b>	<b>Betacoronavirus</b>	<b>Gammacoronavirus</b>	<b>Deltacoronavirus</b>
Sous-genre	Colacovirus Decacovirus Duvinacovirus Luchacovirus Minacovirus Minunacovirus Myotacovirus	Nyctacovirus Pedacovirus Rhinacovirus Setracovirus Soracovirus Sunacovirus Tegacovirus	Embecovirus Hibecovirus Merbecovirus Nobecovirus Sarbecovirus	Brangacovirus Cegacovirus Igacovirus Andecovirus Buldecovirus Herdecovirus

## B. HISTOIRE DES CORONAVIRUS

Les coronavirus animaux ont été découverts avant les coronavirus humains. Le premier coronavirus à avoir été identifié fut l'IBV (Infectious Bronchitis Virus) un *gammacoronavirus* affectant les poulets, en 1931 [1]. IBV a été isolé sur cellules de poulet embryonnées en 1937, donnant la souche Beaudette qui est toujours utilisée comme modèle de laboratoire [2]. IBV a aussi été le premier coronavirus dont le génome a été entièrement séquencé [3].

En 1949, le virus de l'hépatite murine (MHV), un *betacoronavirus* de souris a été identifié [4]. Ce *betacoronavirus* reste un des grands modèles de laboratoire encore utilisé.

Le premier coronavirus porcine fut celui de la gastroentérite transmissible porcine TGEV (pour Transmissible Gastro Enteritis Virus), découvert en 1946 aux Etats-Unis [5]. Le virus de la diarrhée épidémique porcine, PEDV, fut découvert en 1977 en Angleterre [6]. Les virus TGEV et PEDV appartiennent au genre *Alphacoronavirus*.

Le Coronavirus félin (FCoV), un autre *alphacoronavirus*, n'a été caractérisé qu'en 1968 [7], bien que la pathologie induite par ce virus ait été décrite quelques années avant, en 1963 [8].

Les coronavirus humains (HCoV) HCoV-229E et HCoV-OC43, découverts en 1966 [9] et 1967 [10] ont été les premiers coronavirus identifiés chez l'Homme. Ils appartiennent respectivement aux *alpha-* et *betacoronavirus* (voir Figure 1).

Jusque dans les années 2000, l'intérêt pour les coronavirus concernait principalement la médecine vétérinaire. Les CoV aviaires [11] et porcins [12] sont en effet responsables de grandes pertes économiques chaque année. Les Coronavirus humains alors connus (HCoV-229E et HCoV-OC43) étaient responsables d'infections respiratoires peu pathogènes [13].

En 2002, émergea un nouveau coronavirus, le SARS-CoV [14], agent responsable de l'épidémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) qui a débuté en Chine avant de se répandre dans 29 autres pays [15]. Dans les six pays les plus touchés, les premières infections concernaient des voyageurs revenant de Chine, puis des transmissions inter-individus principalement de manière nosocomiale se sont produites. Il y a eu 8439 cas d'infections dues au SARS-CoV dont approximativement 20% concernant le personnel soignant et un total de 812 morts [16]. Cette épidémie a attiré l'attention sur l'importance des coronavirus en médecine humaine. En 2004 et 2005, l'*alphacoronavirus* HCoV-NL63 [17] et le *betacoronavirus* HKU1 [18], deux nouveaux coronavirus humains furent isolés. Comme HCoV-229E et HCoV-OC43, ces CoV provoquent des infections des voies respiratoires supérieures (rhinites) et plus rarement des voies inférieures (pneumonies) [19].

Des études phylogéniques ont permis de montrer que les chauves-souris seraient les hôtes ancestraux d'un certain nombre de ces coronavirus humains, avec souvent un hôte intermédiaire avant transmission à l'Homme. De nombreuses études ont donc porté sur la caractérisation des CoV infectant les chauves-souris et plus généralement la faune sauvage et ont permis d'identifier un grand nombre de coronavirus distincts [20,21], indiquant qu'une grande diversité de coronavirus encore inconnus circulent dans le monde. Les Coronavirus sont la famille la plus représentée parmi les virus de chauves-souris. Pour exemple, 3796 séquences de coronavirus infectant des chauves-souris sont disponibles [22].

En 2012, dix ans après les premiers cas de SARS-CoV, une nouvelle épidémie de syndrome de détresse respiratoire a émergé en Arabie-Saoudite. Appelé Middle Eastern Respiratory Syndrome CoV, MERS-CoV, ce virus [23] est responsable à ce jour de plus de 2574 cas confirmés, dont 886 décès associés [24]. La transmission interhumaine du MERS-CoV est limitée mais une centaine de cas est répertoriée chaque année, essentiellement au Moyen-Orient avec un taux de mortalité d'environ 30%. En 2015, la Corée du Sud dut faire face à une épidémie de MERS-CoV qui

provoqua 186 cas d'infections, dues en partie à une transmission nosocomiale. Le MERS-CoV peut induire des pneumonies fulminantes menant à des défaillances multi viscérales dans certains cas [24].

En décembre 2019, une épidémie de pneumonie (maladie nommée a posteriori Covid19) s'est déclarée dans la région du Guangdong en Chine, épice de l'épidémie de SARS-CoV dix-sept ans plus tôt. Le 9 janvier 2020, l'agent infectieux responsable est identifié comme étant un coronavirus distinct du SARS-CoV, et est nommé SARS-CoV-2 [25]. Dès le 13 janvier, le premier cas d'infection en dehors de Chine est signalé en Thaïlande. Au 31 janvier 2020, plus de vingt pays recensent des cas sur leur territoire, principalement des voyageurs revenant de Chine, mais aussi les premiers cas de transmissions interhumaines en dehors de Chine. Le 11 mars, l'épidémie de Covid-19 est déclarée pandémie par l'OMS. Au 11 octobre 2021, 237 Millions de cas de SARS-CoV-2 avaient été notifiés à l'OMS, incluant 4,8 Millions de morts dans le monde [26]. Le virus peut être transmis par des objets inertes et manuportage, mais la voie majeure de transmission est due aux aérosols. Différents types de vaccins ont été récemment mis au point et approuvés par les diverses autorités. Ils sont actuellement distribués à travers le monde [27].

Cette pandémie a incité un grand nombre de chercheurs à s'intéresser aux Coronavirus, à la recherche de traitement ou vaccins notamment. La littérature sur les Coronavirus a fortement augmenté. Entre 1949 et 2019, un total de 14 811 articles correspondant au mot clé « coronavirus » est recensé sur Pubmed. De 2020 au 26 juillet 2021, 56 460 nouveaux articles sont indexés [28], quadruplant presque la littérature disponible.

Des études rétrospectives ont notamment été menées sur des cas d'infections pulmonaires non-élucidés et ont permis la découverte d'un nouveau coronavirus appelé CCoV HuPn-2018. Celui-ci a été isolé à partir de prélèvements nasopharyngés d'enfants souffrant d'une pneumonie en Malaisie en 2018. La pathologie (s'il y en a une) causée par ce virus n'est pas connue à l'heure actuelle [29]. Ce Coronavirus est

apparenté à l'*alphacoronavirus* canin CCoV, indiquant qu'il y aurait pu avoir un passage de la barrière d'espèces du chien vers l'Homme.

### C. PRINCIPAUX CORONAVIRUS D'INTERET VETERINAIRE

Tous les coronavirus aviaires appartiennent aux *gammacoronavirus* et *deltacoronavirus* [30]. Les *deltacoronavirus* aviaires ne sont actuellement associés à aucune pathologie. Chez les *gammacoronavirus* en revanche, on trouve des coronavirus d'intérêt vétérinaire majeur. IBV est extrêmement répandu dans les élevages de poulets à travers le monde, causant des millions d'euros de pertes à l'industrie de la volaille chaque année. IBV induit différentes pathologies selon les souches virales infectant les poulets. Certaines sont respiratoires, d'autres avec un tropisme génital et les plus pathologiques ont un tropisme néphrétique. La transmission se fait par voie aérienne et éventuellement digestive. La ponte peut être affectée avec une détérioration de la qualité des œufs et du rythme de ponte, ce qui induit des pertes économiques importantes. L'hypervariabilité génétique de la protéine S cause régulièrement l'émergence de nouveaux sérotypes qui contribuent au maintien d'IBV dans les élevages de poulet [31] et limite l'efficacité des vaccins disponibles. D'autres *gammacoronavirus* aviaires ont été décrits chez la dinde (TCoV) [32] ou la pintade (GFCoV) [33] notamment, provoquant des pertes économiques importantes pour les éleveurs.

Chez le porc, cinq coronavirus ont été décrits pour l'instant. Trois sont des *alphacoronavirus* : TGEV, PEDV et le coronavirus du syndrome de la diarrhée aigue sévère (SADS-CoV). Ces virus provoquent des pathologies digestives comme des diarrhées qui sont responsable de mortalité chez les porcelets [34]. Il existe aussi le coronavirus respiratoire porcin (PRCoV), le variant respiratoire de TGEV, qui ne provoque pas de pathologie et le virus SeCoV (pour swine enteritis coronavirus), qui est un virus recombinant, constitué d'un génome de TGEV dans lequel le gène S est remplacé par celui du PEDV. En plus de ces *alphacoronavirus*, on retrouve des

coronavirus porcins parmi les *betacoronavirus*, avec le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (PHEV), responsable de la maladie du vomissement et du dépérissement (PHEV), et chez les *deltacoronavirus* avec le deltacoronavirus porcine, nommé PDCoV HKU15 [35] (figure 2).

Tous les coronavirus de ruminants découverts à ce jour appartiennent à la même espèce *betacoronavirus* 1 et sont très proches génétiquement du coronavirus bovin (BCoV). Ces coronavirus "BCoV-like" sont retrouvés chez de très nombreux ruminants domestiques comme sauvages (girafe, wapiti, buffle, antilopes, etc.). Chez les bovins, le BCoV est responsable de diarrhées chez les veaux mais un vaccin existe. Le coronavirus bovin peut aussi provoquer des symptômes respiratoires chez le veau et les jeunes adultes. Chez les caprins et les ovins, des souches "BCoV-like" sont parfois observées et pourraient être associées à des diarrhées néonatales [36], mais leur importance est moindre par rapport au BCoV.

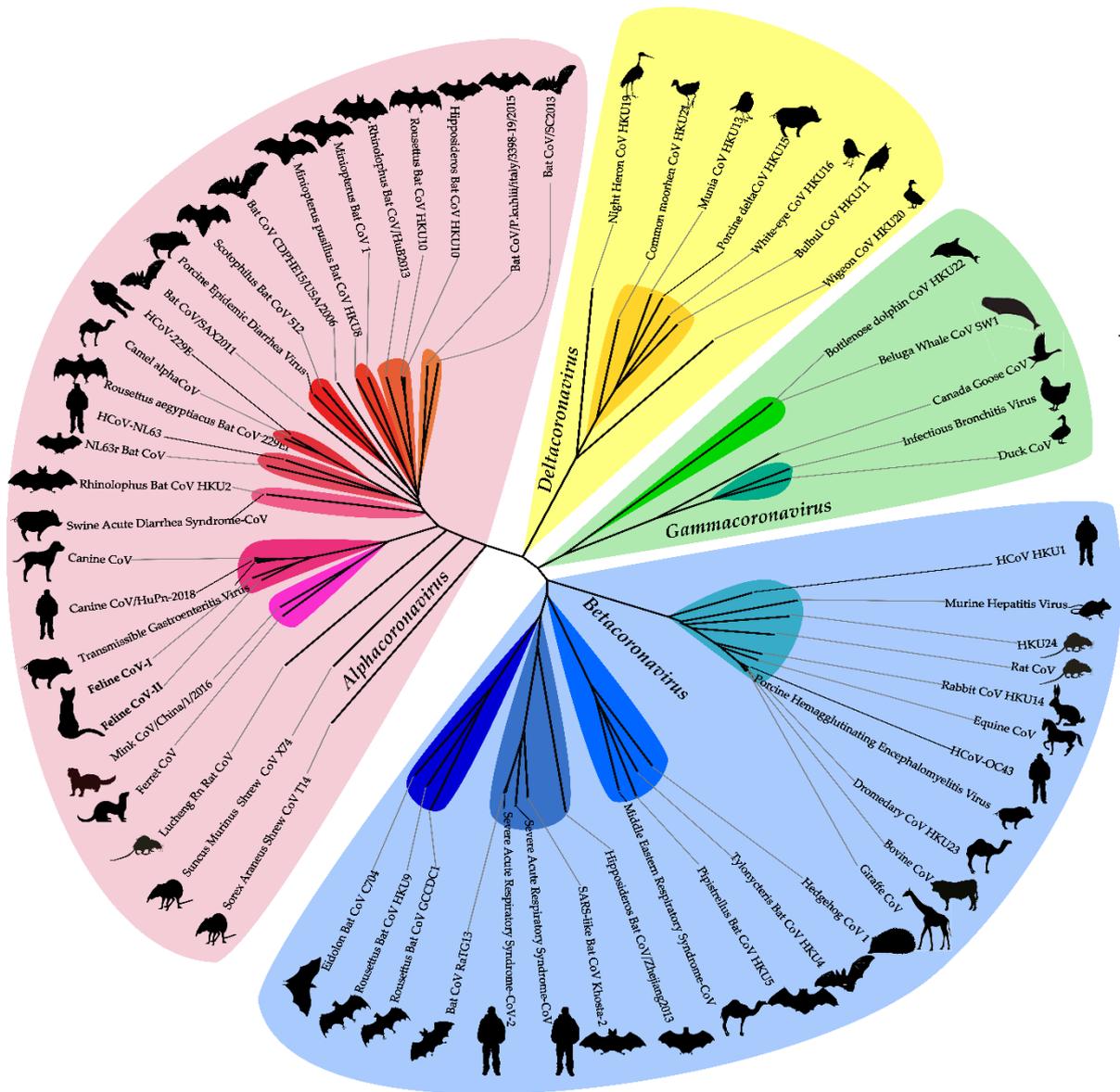


Figure 1 : Arbre phylogénétique des Coronavirus. Les genres et les sous-genres regroupant plusieurs espèces de virus, sont indiqués en couleur. Les hôtes des coronavirus sont indiqués par les silhouettes.

Le *betacoronavirus* MHV est un coronavirus murin d'intérêt vétérinaire limité mais qui sert aussi de souche prototypique pour beaucoup d'études scientifiques. Les symptômes associés varient selon les souches, avec des souches plus (MHV-A59) ou moins (MHV-1) virulentes. Chez des souris adultes immunocompétentes, les souches de MHV entérotropiques peuvent avoir des manifestations sous cliniques tandis qu'ils provoquent des diarrhées sévères chez les souriceaux qui peuvent être mortelles. MHV peut aussi causer des hépatites chez la souris [37]. Bien que BCoV, et son large

spectre d'hôte, et MHV soit génétiquement proches, MHV semble avoir un spectre d'hôte restreint aux souris.

On retrouve aussi des coronavirus d'intérêt chez les carnivores domestiques et sauvages [35]. Deux coronavirus canins existent : le coronavirus respiratoire canin (CRCoV) qui est un *betacoronavirus* et le coronavirus entérique canin (CCoV). Ce dernier appartient à l'espèce alphacoronavirus 1 qui comprend aussi TGEV et le coronavirus félin FCoV. FCoV et SARS-CoV-2 sont les deux seuls coronavirus connus infectant naturellement les chats à ce jour. FCoV étant le principal modèle de cette thèse, une partie plus conséquente lui est dédiée (voir partie 2, page 42).

La diversité des hôtes des coronavirus, et la présence de souches proches de coronavirus chez des espèces assez différentes (comme le PDCoV et les *deltacoronavirus* aviaires) s'expliquent par des franchissements de la barrière d'espèces fréquent.

## **D. FRANCHISSEMENT DE LA BARRIERE D'ESPECES**

Les coronavirus sont connus pour l'émergence de nouveaux virus à la suite d'un franchissement de barrière d'espèces. Des exemples ont été documentés dans les quatre genres de coronavirus.

### **1. Au sein des *Alphacoronavirus***

Le sous-genre des *Tegacovirus* comprend les alphacoronavirus 1. Les alphacoronavirus 1 regroupent le coronavirus canin CCoV, félin FCoV et porcine TGEV et sont considérés comme étant une même espèce virale par l'ICTV. CCoV et FCoV sont divisés en deux génotypes I et II. La protéine S de CCoV-I partage 80 % d'identité avec FCoV-I, mais seulement 54% avec CCoV-II. FCoV-II serait en fait issu de deux événements de recombinaisons entre FCoV-I et CCoV-II. CCoV-II lui-même serait le produit d'une recombinaison entre CCoV-I et un coronavirus non identifié. TGEV aurait pour origine CCoV-II. Un nouveau sous-type de CCoV-II, nommé CCoV-IIb (en opposition au sous-type classique CCoV-IIa) a été caractérisé chez des chiens, et serait issu d'une

recombinaison entre les virus TGEV et CCoV-II au niveau N-terminal de la protéine S [38] (Figure 2).

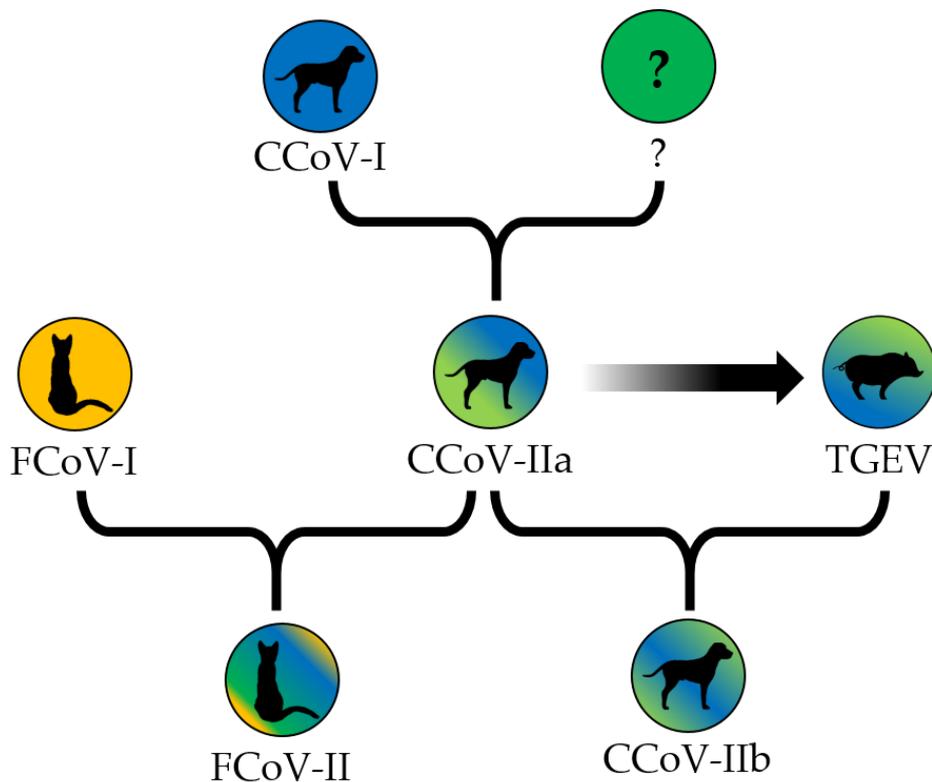


Figure 2 : Emergence des Tegacovirus. Les noms des différents virus sont indiqués. Les silhouettes représentent les hôtes des virus. Les événements de recombinaisons sont indiqués par une accolade. L'émergence de TGEV à partir de CCoV est indiquée par une flèche.

Tous ces événements de recombinaison témoignent de transmissions interspécifiques de ces virus entre les espèces canines, félines et porcines.

HCoV-229E est un coronavirus humain provoquant des rhumes et des pathologies respiratoires souvent bénignes. Cet *alphacoronavirus* saisonnier, présent dans le monde entier, circule principalement en hiver [39]. C'est un des CoV modèles parmi les *alphacoronavirus*. HCoV-229E utilise l'aminopeptidase (APN) humaine comme récepteur. Des virus apparentés au HCoV-229E ont été découverts chez des chauves-souris de la famille des *Hipposideridae* (Figure 3), lors d'études de surveillance au Kenya et au Ghana. En 2007, un nouvel *alphacoronavirus* a été identifié lors d'une épidémie de maladie respiratoire chez des alpagas aux Etats-Unis. Les analyses phylogénétiques du CoV de l'alpaga ont montré que ce virus peut être considéré comme un

intermédiaire entre les virus apparentés au HCoV-229E des chauves-souris et le HCoV-229E de l'Homme [40] [41] (Figure 3).

HCoV-NL63 aurait pour origine un CoV de chauves-souris de l'espèce *Triaenops afer* et pourrait être issu de la recombinaison au niveau de la protéine S entre ce CoV et un autre CoV infectant des chauves-souris de l'espèce *Hipposideros* apparenté à HCoV-229E. De manière intéressante, les CoV de chauves-souris apparenté à HCoV-229E et HCoV-NL63 sont pourvus d'une protéine accessoire supplémentaire, nommée ORF8/ORFX, qui est absente des deux CoV humains [42].

Les CoVs porcins PEDV [43] et SADS-CoV [44], responsables d'entérites parfois graves chez les porcelets, proviendraient respectivement des virus des espèces de chauves-souris *scotophilus* et *rhinolophus*, en raison de leurs proximités génétiques avec les souches BtCoV 512/2005 et SADSr-CoV 141388.

Des transmissions inter-espèces ont aussi été démontrées entre espèces de chauves-souris [42]. Par exemple, BatCoV HKU10, un *alphacoronavirus* présent originellement chez les Roussettes de Leschenault (*Rousettus leschenaulti*), des chauves-souris frugivores, a été transmis à des *Hipposideros pomona*, des chauves-souris insectivores d'un sous-ordre différent [45].

## 2. Au sein des *Betacoronavirus*

Au sein des *betacoronavirus*, le sous-genre des *Embecovirus* se caractérise par la présence d'une protéine structurale supplémentaire, l'hémagglutinine-estérase (voir détail ci-dessous). Ce sous-genre viral est dépourvu de virus infectant les chauves-souris [46]. Il a été estimé que des coronavirus infectant les rongeurs seraient en fait les ancêtres de ces virus. Le BCoV fait partie de ce sous-genre. Le Coronavirus humain HCoV-OC43 serait une adaptation du BCoV à l'Homme qui se serait produite à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Cette émergence dans la population humaine aurait été à l'origine de l'épidémie de grippe « russe », décrite à cette époque. Deux ont également été identifiés chez le chien (CRCoV) et l'Homme. Le CoV porcine PHEV et le coronavirus respiratoire canin

(CRCoV) aurait également pour origine le coronavirus bovin BCoV [47]. Un Coronavirus, nommé Puffinosis coronavirus, appartenant aux *embecovirus* et apparenté au MHV, aurait été isolé d'un puffin des Anglais, un oiseau marin. Ce virus pourrait être un cas de transmission d'un *betacoronavirus* d'un mammifère à un oiseau, mais étant donné que ce virus a été isolé sur des cerveaux de souriceaux et qu'il est très similaire à MHV, une contamination avec une souche de MHV n'est pas exclue [48].

Le SARS-CoV responsable d'une épidémie entre 2002 et 2003 démarrant de la province du Guangdong en Chine, et ayant touché 30 pays différents appartient au sous-genre *sarbecovirus*. La civette palmée est reconnue comme l'hôte intermédiaire de la transmission du SARS-CoV à l'Homme mais il aurait pour origine un coronavirus de chauves-souris rhinolophe. L'épidémie s'est ensuite répandue par transmission interhumaine. En plus de la civette palmée et des humains, les primates non-humains, les chiens viverrins *Nyctereutes procyonoides*, les chats, les furets et les hamsters dorés peuvent être infectés expérimentalement par SARS-CoV [49]. De manière intéressante, des différences majeures entre le SARS-CoV infectant la civette et le SARS-CoV humain, ont été observées. Les mutations sur le domaine de liaison au récepteur cellulaire de la spicule (K479N et S487T) retrouvées sur le SARS-CoV sont associées à une meilleure affinité au récepteur ACE2 humain [50]. Des délétions de 29nt dans l'ORF8, donnant deux sous-produits ORF8a et ORF8b, sont caractéristiques des isolats humains. Le CoV de chauves-souris le plus proche, SARS-related (SARSr) BatCoV Rs3367, trouvé chez les chauves-souris *Rhinolophus sinicus*, possède 95% d'identité avec SARS-CoV sur le génome complet. En revanche leurs ORF8 ne possèdent que 33% d'identité. Une étude suggère que l'ORF8 du SARS-CoV infectant la civette (puis humain) pourrait en fait provenir d'une recombinaison entre SARSr-Rs-BatCoV Rs3367 et le coronavirus SARSr-Rf-BatCoV YNLF\_31C, un CoV infectant *Rhinolophus ferrumequinum*, une autre espèce de chauves-souris [51].

Le SARS-CoV-2, un autre *Sarbecovirus*, partage environ 80 % d'identité avec SARS-CoV et 96 % avec le « SARS-like » coronavirus de chauves-souris *Rhinolophus affinis* RaTG13 [52]. Bien que la présence de SARS-CoV-2 n'ait pas été trouvée dans des chauves-souris à ce jour, il est généralement admis que celles-ci sont probablement les hôtes ancestraux et pourraient être un réservoir naturel de ce virus. Des coronavirus retrouvés chez des pangolins partagent une très forte similarité avec SARS-CoV-2 (85.5-92.4%) [53] et il a été suggéré que cet animal pourrait être l'hôte intermédiaire à partir duquel SARS-CoV-2 aurait pu être transmis aux humains. Cependant, des analyses phylogénétiques montrent que la séquence du domaine d'attachement au récepteur portée par la protéine de spicule n'est pas adaptée à l'Homme. A ce jour, l'hôte intermédiaire ayant permis la transmission du SARS-CoV-2 des chauves-souris à l'Homme n'est pas identifié. Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si des espèces animales sont aussi susceptibles à l'infection par le SARS-CoV-2. Les chats domestiques [54] ainsi que des grands félins (lions, tigres, léopard des neiges, pumas) peuvent aussi être infectés par ce virus.

Des infections naturelles ont également été observées dans des élevages de visons, chez des chiens de propriétaires et des primates non-humains en zoo et chez le cerf de Virginie aux USA. Ces infections sont considérées comme anthroponotiques, mais des transmissions entre chats et entre furets ont été observées expérimentalement. Il a été montré que les visons pouvaient également se transmettre l'infection, et même infecter des chats et des humains [55]. Ces infections sont pour la plupart asymptomatiques, avec quelques exceptions chez les chats et les visons, chez qui des symptômes respiratoires et une mortalité accrue peuvent être observés [56].

Certains variants du SARS-CoV-2, les variants Beta (aussi appelé 501.V2 ou B.1.351) et Gamma (aussi appelé P.1), pourraient avoir un spectre d'hôte plus étendu. En effet, il a été montré expérimentalement que ces variants infectaient les souris, ce qui n'est pas possible avec les autres variants [57].

Le MERS-CoV fait partie des *Merbecovirus*. MERS-CoV aurait pour hôte ancestral un CoV de chauves-souris, et son hôte intermédiaire est le dromadaire. Un certain nombre de transmissions directes du dromadaire vers l'Homme a été observé [58] et des transmissions interhumaines sont aussi possibles. L'épidémie de MERS-CoV en 2014 en Corée [59] était le résultat de transmissions interhumaines, pour partie nosocomiale. Beaucoup des cas récents de MERS-CoV seraient le résultat d'une transmission zoonotique de dromadaires vers des hommes vivant au contact de ces animaux (dans des fermes et élevages.). Des études ont aussi démontré qu'il était possible d'infecter expérimentalement des primates non-humains, des alpacas ainsi que des lapins mais que les souris, hamsters et furets étaient résistants à l'infection [60].

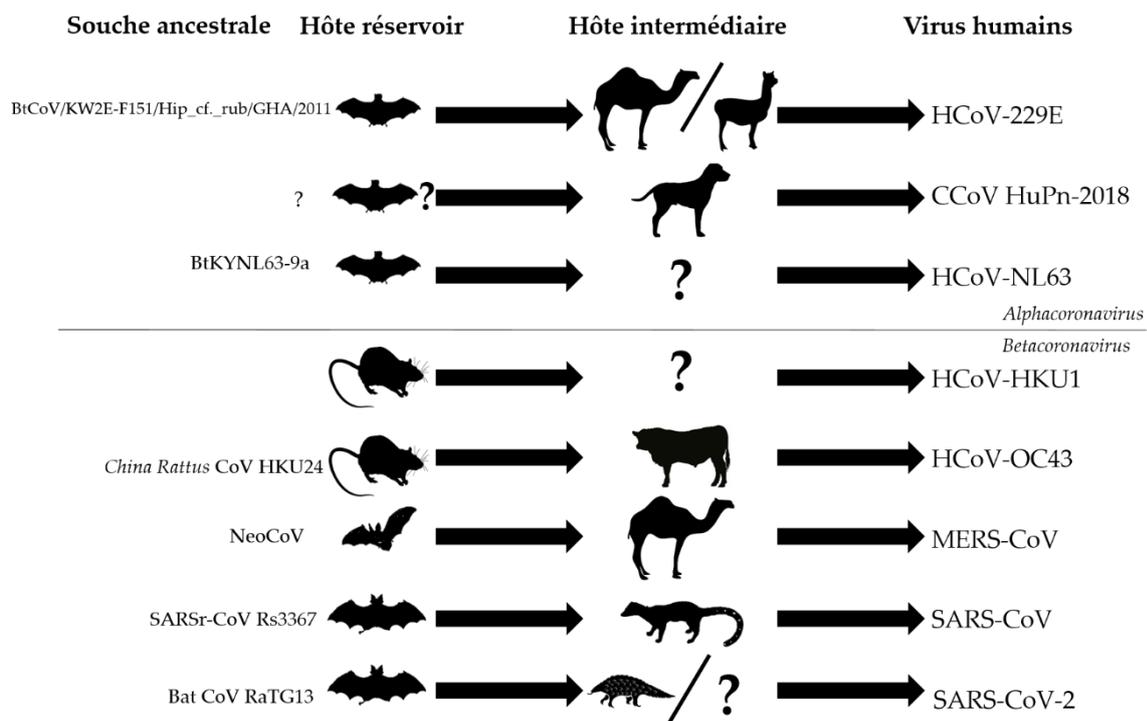


Figure 3 : Origines animales des Coronavirus humains. Les souches de coronavirus des hôtes réservoirs les plus proches des coronavirus humains sont indiquées à gauche.

### 3. Au sein des *Gammacoronavirus*

Les *gammacoronavirus* sont constitués de trois sous-genres : les *Brangacovirus* et les *Igacovirus* contiennent des CoV aviaires tandis que les *Cegacovirus* comprennent des

coronavirus de beluga (BWCoV SW1) et de dauphin (BdCoV HKU22). Les *Brangacovirus* et *Cegacovirus* sont génétiquement plus proches, et sont dépourvus d'homologues des protéines accessoires 3a et 3c présentes chez les *Igacovirus*. Les *Cegacovirus* auraient pour origine un CoV aviaire, proche des *Brangacovirus* [61] qui aurait franchi la barrière d'espèces aviaire/mammifère [62,63].

Les *Igacovirus* contiennent les AvCoV qui regroupent un grand nombre de virus considérés avant 2018 comme plusieurs espèces virales par l'ICTV. Ces virus, dont le plus connu est IBV, infectent des Gallinacés comme les poulets, dindes, faisans, pintades, cailles, perdrix et paons. IBV a aussi été retrouvé chez des oiseaux n'appartenant pas aux gallinacés comme des pigeons et des canards Sarcelles. D'autres AvCoV ont été détectés chez des oies et canards ainsi que chez des oiseaux sauvages comme les cygnes chanteurs, les bécasseaux maubèches ou les huitriers [64]. Les AvCoV possèdent un « squelette » commun, avec des séquences génomiques relativement proches à l'exception de la protéine S. Des recombinaisons entre IBV et d'autres CoV non identifiés au niveau de la spicule auraient permis l'émergence des AvCoV chez les dindes (Turkey CoV ou TCoV) et les pintades (Guinea fowl coronavirus) [32].

#### **4. Au sein des *Deltacoronavirus***

Les *deltacoronavirus* sont tous des coronavirus aviaires à l'exception du Porcine *deltacoronavirus* (PDCoV) HKU15 et d'Asian Leopard Coronavirus (ALC). Ce dernier a été retrouvé chez des blaireaux-furets de Chine (*Melogale moschata*) et des Chats-léopards d'Asie (*Prionailurus bengalensis*) et seule une séquence partielle de son génome est disponible [65]. PDCoV est pour l'instant le seul *deltacoronavirus* à avoir été isolé.

Le PDCoV est un coronavirus porcine qui provoque des diarrhées aqueuses et des vomissements chez les porcelets, avec un taux de mortalité conséquent [66]. Le PDCoV a été découvert pour la première fois en 2012 à Hong Kong, puis a été introduit aux Etats-Unis en 2014, avant de se répandre dans de nombreux pays. Les veaux, les

poulets et les dindonneaux seraient également sensibles expérimentalement au PDCoV [67]. PDCoV partage 85 % d'identité de son génome complet avec un *deltacoronavirus* de moineau (SpCoV HKU17) et 83 % avec celui d'une autre espèce de passereau (BuCoV HKU11). Il a été estimé que PDCoV serait issu d'une recombinaison entre ces deux CoV au niveau de la séquence de S. Contrairement à la plupart des *deltacoronavirus*, y compris HKU17 et HKU11, PDCoV ne code pas pour deux protéines accessoires 7b et 7c, ce qui a pu jouer un rôle dans leur passage d'un hôte aviaire à un hôte mammifère [35].

Les Coronavirus de Houbarde HKU28, de Pigeon HKU27 et de Faucon HKU29 seraient issus d'une recombinaison entre un CoV de passereau (White eye CoV HKU16) et le CoV de Moineau HKU17 au niveau de S, ce qui aurait potentiellement mené au franchissement de barrière d'espèces. De manière intéressante, des virus très proches de ces trois virus ont été identifiés chez des *Charadriiformes* comme des mouettes ou Rynchops. Encore plus surprenant, un virus de la même espèce a été détecté chez des pingouins de la péninsule antarctique [68]. Cette découverte ainsi que les résultats d'une étude récente menée sur le territoire américain ayant identifié un grand nombre de *deltacoronavirus* chez des oiseaux marins sans aucune pathologie associée, mais très peu chez des oiseaux terrestres, permet de suggérer que les oiseaux marins, pourraient servir de réservoirs naturels des *deltacoronavirus*, tandis que les oiseaux terrestres pourraient servir d'hôtes intermédiaires [69]. En effet, les coronavirus retrouvés dans les oiseaux terrestres subissent plus souvent des événements de recombinaisons (qui peuvent permettre le franchissement de la barrière d'espèces) tandis que les coronavirus d'oiseaux marins ont une spécificité d'espèce d'hôte plus importante.

Chez tous les Coronavirus, les franchissements de barrières d'espèces sont souvent accompagnés de modifications de la protéine S ainsi que des protéines accessoires. Les recombinaisons entre deux CoVs différents ont souvent lieu au niveau de la spicule, l'ORF de S contenant des sites privilégiés de recombinaisons. Ce

phénomène a été observé chez les *Sarbecovirus*, MERS-CoV et IBV [70–72] . Pour les *Sarbecovirus*, d’autres sites privilégiés se situeraient au niveau des protéines accessoires [72] et de la nucléocapside N [70]. Les recombinaisons ont été montrées comme étant un facteur particulièrement important dans l’évolution des *Sarbecovirus* [72]. Pour les protéines accessoires, ce sont souvent des délétions ou des troncations qui sont observées lors de ces changements d’hôtes [51,73].

La méthode unique de répllication des coronavirus et les séquences de régulation de la répllication présentent sur leur génome pourraient jouer un rôle dans les évènements de recombinaison homologues des CoVs [74–76].

## E. BIOLOGIE DES CORONAVIRUS

Les Coronavirus (CoV) sont des virus enveloppés à ARN simple brin positif. Ils possèdent un des plus grands génomes à ARN existant (27 à 32kb). Leurs particules sont pléomorphes, avec un diamètre d’environ 80-120nm en moyenne [77]. Les virions sont composés d’au moins quatre protéines structurales (voir figure 4). La protéine de Spicule (S) qui est une protéine de grande taille et forme une “couronne” (corona en latin, donnant le nom des Coronavirus) de spicule visible en microscopie électronique, caractéristique des CoV, la protéine de membrane (ou matrice) M et la protéine d’enveloppe E sont toutes présentes dans l’enveloppe du virus. La ribonucléocapside hélicoïdale est composée de la protéine de nucléocapside N et de l’ARN génomique (ARNg) viral. Une protéine structurale supplémentaire est présente chez quelques *Embecovirus*, l’Hémagglutinine Estérase (HE) [78].

En plus des protéines structurales, les CoV encodent deux autres types de protéines : Les protéines non-structurales (nsp) sont codées par deux ORFs ; ORF1a et ORF1ab. Ces ORFs codent des polyprotéines qui sont ensuite maturées et clivées en 16 protéines distinctes. Les protéines accessoires qui ont souvent un rôle dans le tropisme et la virulence et ne sont pas toujours nécessaires à la répllication *in vitro*. Ces protéines sont spécifiques à chaque espèce virale.

## 1. Organisation du génome

Le génome des Coronavirus est un ARN de sens positif simple brin non segmenté. Il est coiffé à l'extrémité 5' et possède une queue polyA en 3'. Les ORFs sont toujours situées dans le même ordre, avec ORF1a/bB à l'extrémité 5' du génome, suivi des gènes S, E, M et N (Figure 4). Les ORFs des protéines accessoires sont toujours situées en 3' d'ORF1a/b et s'intercalent entre et/ou dans les ORFs codant les protéines de structures. Dans la région 5' non traduite se trouve une région d'environ 65nt appelée séquence leader. Cette séquence protège les ARNm de clivages endonucléolytiques viro-induits et sa séquence complémentaire, présente sur les ARNs viraux négatifs pourrait aussi jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse des brins positifs [79].

Les ORFs sont précédées d'une région non transcrite de 275 à 500 nucléotides (nt). Ces régions contiennent une séquence de régulation de la transcription (TRS). Les TRS contiennent une séquence core appelée CS qui est conservée au sein des genres ou sous-genres. Un article (en preprint) montre que les CS des *alphacoronavirus* serait : 5'-AACUAAAC-3' [76]. De manière intéressante, la séquence 5'-AACUAAAC-3' n'est présente qu'à certains endroits du génome de FCoV, en 3' de toutes les ORFs des protéines structurales, de la protéine accessoire 3c et dans la séquence leader 5' et est donc absente des abords des gènes codant les protéines accessoires [80]. Il est possible que ces protéines soient traduites grâce à un mécanisme non classique (voir exemples page 53-54) tel que le balayage défaillant, appelé "leaky scanning" à l'instar de l'ORF7b de SARS-CoV [81].

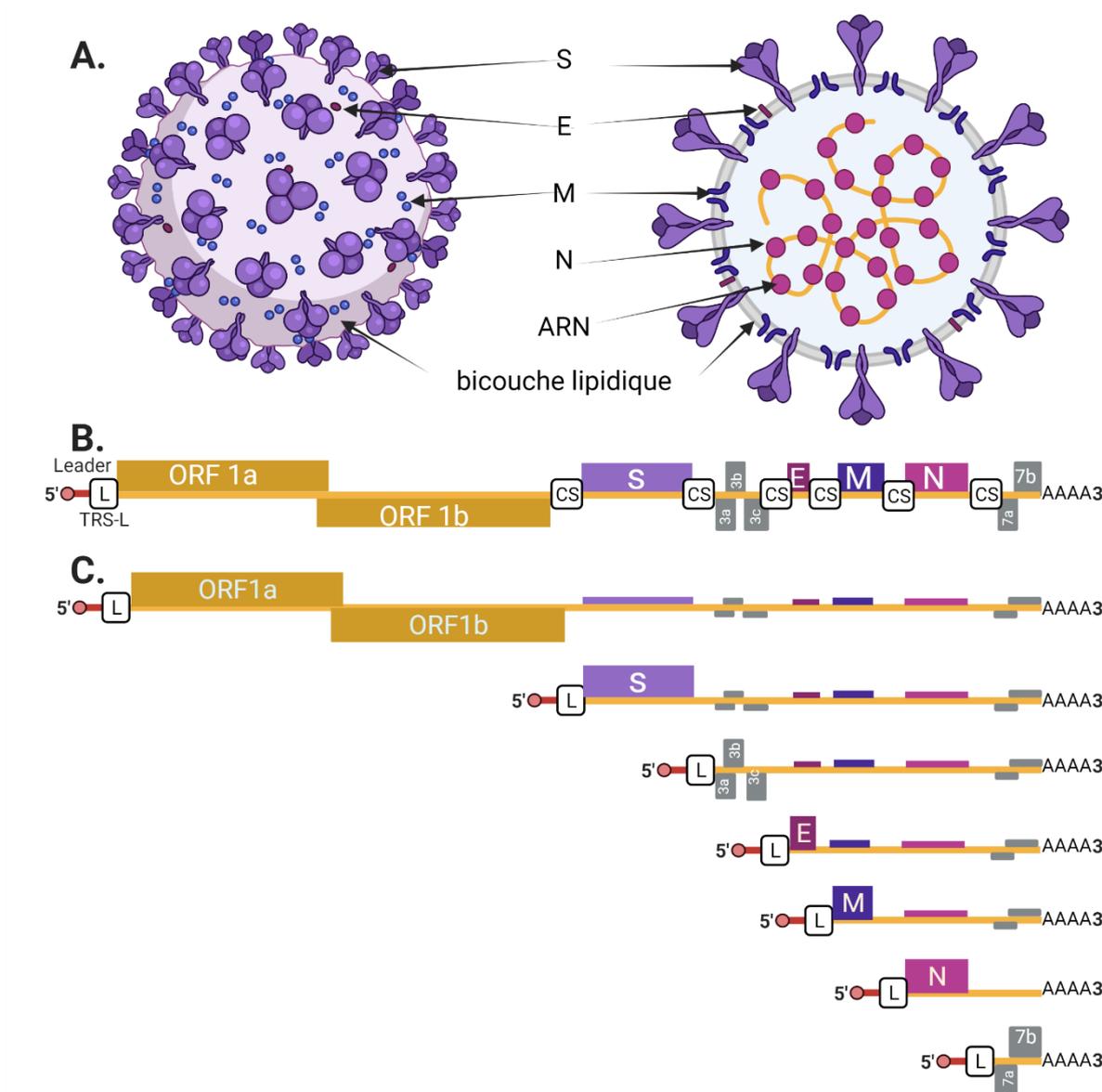


Figure 4 : Particules, génome et ARNm de FCoV. (A.) Schéma de la particule FCoV. (B.) Représentation schématique du génome de FCoV. Chaque ORF est représenté par un rectangle. (C.) ARN messagers du FCoV. Les ARNs sont coiffés et polyadénylés. Les ORFs des protéines structurales sont en violet et rose, les protéines accessoires en gris et les protéines non structurales en orange. TRS : séquence de régulation de la transcription, L : leader, CS : séquence core. Figure réalisée sur Biorender.

## 2. Protéines non-structurales

L'ARN génomique est un ARNm qui est traduit immédiatement après son relargage dans la cellule. Deux cadres de lectures ouverts (ORFs) sont traduits : le premier ORF1a donne la polyprotéine 1a (pp1a) qui est ensuite clivée en protéines non-structurales (nsp) nsp1 à nsp11. Lors de la traduction de l'ARNm, un décalage du cadre de lecture

à lieu au niveau des séquences correspondant à nsp11. La lecture est décalée de -1 nucléotide, permettant la traduction d'une nouvelle polyprotéine, avec une séquence identique à pp1a en N-terminal, puis la traduction de nsp12 au lieu de nsp11, ainsi que les protéines nsp13 à nsp16. Cette deuxième polyprotéine est appelée pp1ab. Ces polyprotéines sont ensuite clivées par des protéases virales pour former les protéines non-structurales (nsp) (voir figure 5). Finalement, pp1a est clivée en 11 protéines (nsp1-11) et pp1ab en 16 protéines (nsp1-10 et nsp12-nsp16).

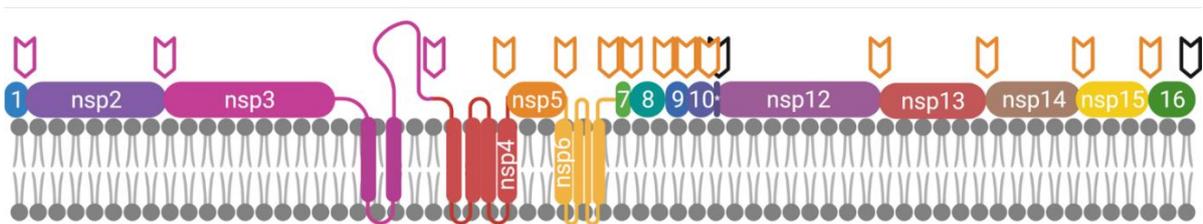


Figure 5 : Schéma de l'organisation des polyprotéines pp1a et pp1ab. Les sites de clivages des protéines matures sont représentés par les flèches, la couleur indiquant la protéase responsable du clivage (rose pour nsp3/Peptidase C16 et orange pour nsp5/3CLpro). Les domaines transmembranaires sont représentés. Les flèches noires indiquent l'arrêt de la traduction des ORF1a ou ORF1ab. \* : nsp11  
Figure créée avec Biorender.

Ces protéines non-structurales remplissent différents rôles du cycle viral (cf. Tableau 2). Parmi ces nsp, certaines forment le complexe de réplication/transcription (RTC). Ainsi nsp12, l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), nsp13, une hélicase, la primase nsp8, nsp14 l'exoribonucléase et nsp15, une endoribonucléase N endoU [82] y sont inclus. La protéine nsp14 est responsable de la fidélité observée dans la réplication des ARNg des coronavirus, qui est supérieure à celle des autres virus à ARN. Les autres nsp sont considérées comme jouant un rôle de support à la formation du RTC. Certaines, comme nsp3 et nsp4, jouent un rôle dans la déformation du Réticulum Endoplasmique (RE) en Membranes Convolutées (CM) et vésicules à doubles membranes (DMV). D'autres, comme nsp1, inhiberaient les voies de l'immunité innée de l'hôte. De manière intéressante, certains *gammacoronavirus* comme IBV sont dépourvus de nsp1.

Tableau 2 : Résumé des fonctions des protéines non structurales.

Nsp1	Clivage endonucléolytique des ARNm cellulaires Inhibition de la machinerie de traduction cellulaire Inhibition de la production d'IFN I	[83,84]
Nsp2	Présent dans les RTC et endosomes Non-essentielle pour la réplication Pourrait enrichir les RTC en ribosomes ou interférer avec la voie endosomale	[85]
Nsp3	Déformation du RE et induction des DMV, formation de pore dans les DMV Rôle dans la formation du RTC Interagit avec les ARN viraux et cellulaires Protéase, Clivage de nsp1, nsp2 et nsp3 Modification post-traductionnelle de protéine hôtes Inhibe la réponse immunitaire de l'hôte	[86–88]
Nsp4	Déformation du RE et induction des DMV	[86,87]
Nsp5	Protéase majeur 3CLpro, clive nsp4-16 Clive protéines cellulaires de la voie IFN	[89,90]
Nsp6	Induction de vésicules périnucléaires autour du centre organisateur des microtubules (MTOC) Activation de l'autophagie	[87,91]
Nsp7	Co-facteur de nsp12 et nsp8	[92–94]
Nsp8	Co-facteur de nsp12 Primase	[92–94]
Nsp9	Dimérisation Liaison à l'ARN et nsp8 Transfert de nucleotidyl-monophosphate (NMP) par nsp12	[95,96]

Nsp10	Facteur de stimulation de l'activité MethyTransferase de nsp16 Régulateur de la fonction réplicase	[97,98]
Nsp11	Pas de fonction connue Clivage nsp10/nsp11 essentielle à la réplication	[99]
Nsp12	ARN polymérase ARN dépendante Domaine enzymatique NMPylation	[92-94]
Nsp13	Activité nucléoside triphosphate hydrolase (NTP)ase Hélicase ARN Antagoniste de la voie IFN- $\beta$	[100,101]
Nsp14	Activité correctrice pendant la synthèse du génome via le domaine 3'- to-5' exoribonucléase (ExoN) Coiffage des ARNv via le domaine guanine-N7-methyltransferase (N7- MTase) Antagoniste de la voie IFN- $\beta$	[101,102]
Nsp15	Uridylate-specific endoribonuclease (NendoU) Antagoniste de la voie IFN- $\beta$ Échappement aux senseurs ARNdb	[101,103]
Nsp16	Coiffage des ARNv via le domaine 2'-O-MT, 2'-O-methyl transferase (2'-O-Mtase)	[104]

### 3. Protéines structurales

#### a. Spicule

La glycoprotéine S est une glycoprotéine transmembranaire de type I avec une taille comprise entre 180 à 200 kDa. Elle est présente à la surface des particules virales, ainsi qu'à la surface des cellules infectées et permet l'attachement des virus à la cellule, et la fusion des membranes virales et cellulaires.

La protéine S appartient à la classe I des protéines de fusion. S est divisée en deux domaines S1 et S2. S1 contient le domaine de liaison au récepteur cellulaire, et S2 les



présents sur S1 pourraient servir de bouclier pour protéger les épitopes de S d'une reconnaissance par le système immunitaire [109].

### ***b. Protéine E***

La protéine d'enveloppe E est une protéine de 76 à 109 acides aminés (aa) (82 aa pour FCoV), pour un poids de 8,4 à 12 kDa. C'est la protéine structurale la moins abondante au sein du virion, bien qu'elle soit abondamment produite lors de l'infection.

Elle possède deux domaines cytoplasmiques encadrant un domaine transmembranaire (TM) (voir Figure 7). Les localisations respectives des domaines N-ter et C-ter dans le cytoplasme ou la lumière de l'appareil de Golgi sont encore très débattues. Diverses méthodes de prédiction semblent donner des réponses contradictoires, et les observations diffèrent selon l'espèce virale et la méthode [110].

Le domaine cytoplasmique en position C-ter d'environ 20 aa est légèrement hydrophobique. Chez les *betacoronavirus* et les *gammacoronavirus*, le domaine C-ter contient un résidu proline conservé au sein d'un motif  $\beta$ -hélice- $\beta$  qui fonctionnerait comme signal de rétention à l'appareil de Golgi. Le domaine C-terminal de la protéine E du SARS-CoV contient un domaine de liaison au domaine PDZ (pour Post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (Dlg1), et Zonula occludens-1 protein (zo-1), trois ligands des domaines PDZ) présent sur de nombreuses protéines cellulaires. La liaison de protéines cellulaires sur ce domaine jouerait un rôle dans la pathogenèse des coronavirus comme SARS-CoV [111]. La protéine M et E interagissent via leur domaine C-ter. L'expression et l'interaction de M et E est suffisante pour créer des particules pseudo-virales (VLP). Il est possible que les protéines E et N interagissent également via leurs domaines C-ter, et la coexpression de N avec M et E augmente le nombre de VLP produites [112].

Deux études suggéraient que la protéine E de SARS-CoV serait aussi capable d'interagir avec S [113] et la protéine accessoire 7a [114], sans que l'importance de ces interactions soit décrite.

Le domaine N-terminal de 7-12 aa est hydrophile. Le domaine N-ter de la protéine E de SARS-CoV pourrait aussi contenir un signal de transport/de rétention au Golgi.

Le domaine TM central de 25 aa est un domaine transmembranaire qui permet entre autres l'oligomérisation des protéines E. La protéine E est retrouvée sous forme de monomères et d'oligomères. Ces formes auraient des rôles différents dans le cycle viral. Les oligomères de E sont capables de former un canal fonctionnant comme une viroporine (voir figure 7). Cette viroporine est décrite chez plusieurs CoV comme les *betacoronavirus* MHV, MERS-CoV et SARS-CoV, l'*alphacoronavirus* HCoV-229E ou le *gammacoronavirus* IBV [115]. Les mutations en position N15A et V25F de la protéine E du SARS-CoV suffisent à empêcher la formation des canaux avec un rôle particulièrement important de V25F dans l'oligomérisation de E. Les oligomères seraient nécessaires à l'assemblage de virions. [116]

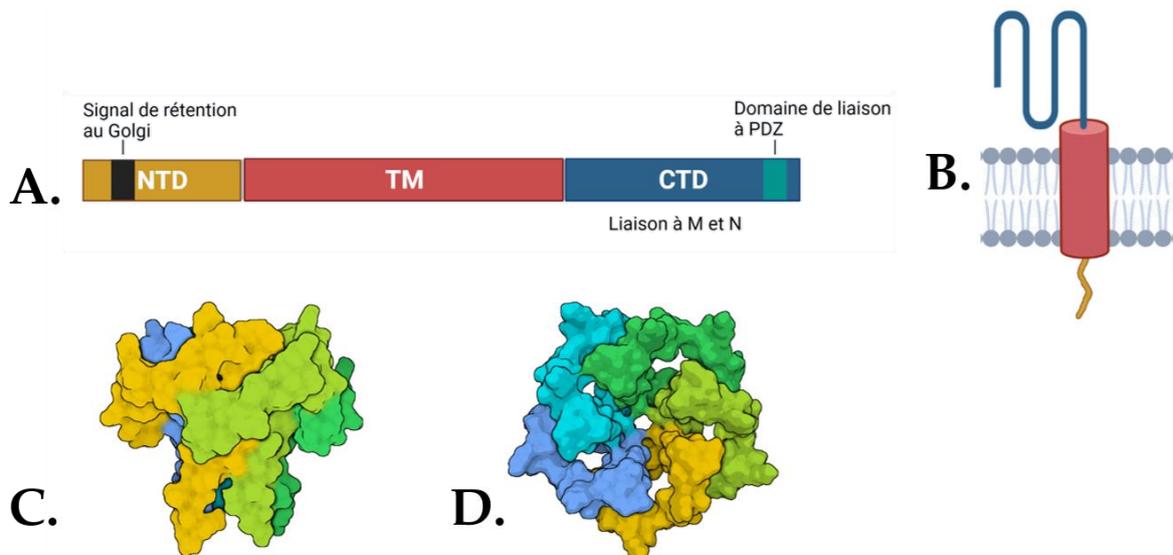


Figure 7 : Structure de la protéine E. A. Schéma des différents domaines de E. Représentation schématique de E. C et D. Représentation d'un canal ionique formé par un pentamère de E de SARS-CoV vue de côté (C.) et de dessus (D.) à partir de la structure PDB 5X29E. Chaque monomère est représenté par une couleur différente. Figure créée sur Biorender. NTD : Domaine N-terminal, CTD : Domaine C-terminal, TM : Domaine Transmembranaire.

La protéine E de IBV, SARS-CoV et MHV est palmitoylée. Il semblerait que cette palmitoylation soit importante pour la formation des virions et la stabilité de E chez certains Coronavirus comme MHV [117]. En revanche, la palmitoylation de la protéine

E n'a pas d'effet sur la production de VLP de SARS-CoV, suggérant qu'elle pourrait être facultative pour certains CoV [112].

Chez SARS-CoV, la protéine E est aussi ubiquitinylée et est retrouvée associée avec le domaine N-terminal ubiquitine-like de la protéine nsp3. Le résidu Lys 66 est glycosylé et empêche l'oligomérisation d'une partie des protéines E [110] expliquant l'existence simultanée des monomères et oligomères de cette protéine.

Il a été suggéré que E pourrait jouer un rôle dans la courbure des membranes et/ou la scission des particules virales à partir du ERGIC. L'utilité de la protéine E pour l'assemblage et la sécrétion des virions semble variable selon les virus : la délétion de la protéine E atténue SARS-CoV *in vitro* et *in vivo* [118] ainsi que MHV [119]. La protéine E est en revanche essentielle pour la réplication de TGEV, et sa délétion conduit à la production de particules virales immatures et non-infectieuses qui ne sont pas secrétées dans le milieu extracellulaire [120].

### *c. Protéine M*

M, la protéine de membrane ou matrice est la protéine structurale la plus abondante au sein des virions. La protéine M fait 25-30kDa (30kDa pour FCoV) et comprend une région d'environ 85aa, composée de trois domaines transmembranaires [121]. Le domaine N-ter de M serait orienté vers l'extérieur du virion, et le domaine C-ter vers l'intérieur. Un peptide signal est localisé entre les deux premiers domaines transmembranaires, ce qui le protégerait potentiellement d'un clivage. Une région localisée du codon 94 à 114 pourrait être responsable des interactions avec la protéine N et l'ARNv [122] (Voir Figure 8).

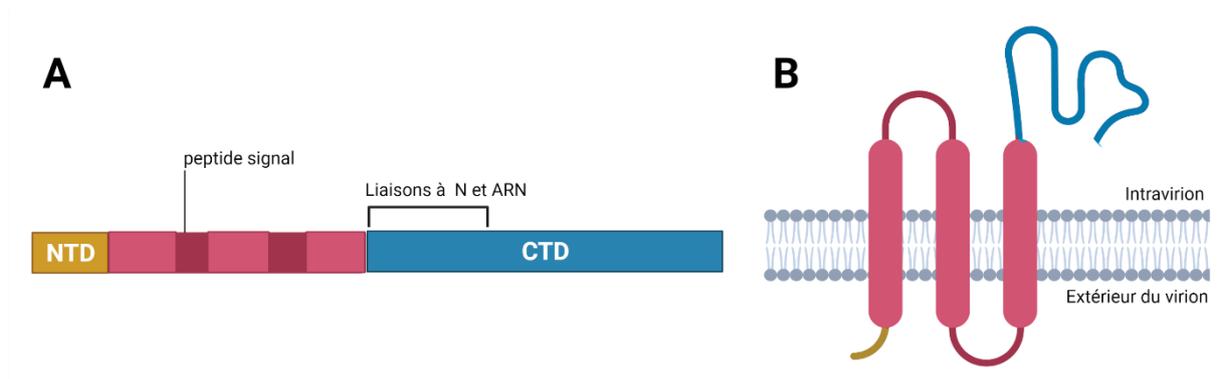


Figure 8 : Représentation de la protéine M. A. Organisation de M. B. Schéma de la protéine M. NTD : Domaine N-terminal, CTD : Domaine C-terminal.

M pourrait promouvoir la fusion des membranes virales et cellulaires ainsi que l'entrée des virus en favorisant la liaison de la protéine S avec le récepteur cellulaire [122]. La protéine M est retrouvée dans l'appareil de Golgi au cours du cycle viral des virus SARS-CoV, MHV, BCoV, FCoV, TGEV et IBV. M peut interagir avec N, S, E et elle-même. Les interactions M-M forment un réseau dans la membrane cellulaire qui serait capable d'exclure certaines protéines cellulaires. La protéine M permettrait notamment de retenir la ribonucléocapside et les trimères de la protéine de spicule au site de bourgeonnement. M est capable d'interagir directement avec l'ARN génomique, qui porte un signal d'empaquetage.

M serait présente sous deux conformations. Le conformère M allongé est associé à une rigidité et une faible courbature de la membrane cellulaire ainsi qu'à une présence en quantité importante de protéines S tandis que le conformère M compact est associé à une faible densité de S et une certaine flexibilité de la membrane. Les interactions de M avec S, N et l'ARN génomique permettent de réguler la taille et la forme des virions [123], avec soit de petits virions comprenant des protéines de spicules et des conformères M allongés, soit des virions plus larges et dépourvus de spicules. Les interactions avec S, N et l'ARNg favoriseraient la formation de la première forme de virions [123].

#### *d. Protéine N*

La protéine N s'assemble avec l'ARNv en ribonucléocapside (RNP) de forme hélicoïdale, formant des hélices de 9-16 nm de diamètre avec un creux intérieur de 3-4 nm [124]. La protéine N peut être divisée en trois régions : les domaines N-ter (NTD) et C-ter (CTD), qui sont structurés, encadrant un domaine de liaison à l'ARN qui lui est désordonné (DLA) (Voir Figure 9). Le domaine N-ter varie d'un coronavirus à l'autre au niveau de sa séquence et de sa longueur. Son extrémité N-ter peut s'associer à l'extrémité 3' du génome viral au niveau d'une structure tige-boucle. Il a été montré chez MHV que les séquences virales TRS sont capable de se lier à N sur une région correspondant au NTD et/ou à l'extrémité N-ter du DLA. Cette région est également capable de déstabiliser les ARNdb entre le TRS du brin matrice et le TRS du brin complémentaire, ce qui indiquerait un rôle de N dans la transcription discontinue des ARNsg. Ce mécanisme pourrait aussi jouer un rôle dans l'empaquetage de l'ARN dans les capsides. La protéine N est aussi considérée comme une protéine chaperonne importante pour l'hybridation des brins d'ARN.

Le NTD de la nucléocapside d'IBV contient un signal d'export nucléaire, ainsi qu'un signal de localisation et rétention nucléolaire. Le rôle de cette localisation pour N n'est pas clairement défini mais différentes hypothèses ont été avancées : La localisation de N dans le noyau pourrait être associée à la synthèse des ARNsg par le recrutement de facteurs cellulaires présent à cet endroit.

Une autre hypothèse est que, en tant que protéine se liant à l'ARN, N pourrait simplement être attirée par cette zone riche en ARN cellulaire.

Enfin, la présence de N dans le nucléole est aussi associée à une interférence de la machinerie cellulaire pouvant mener à l'apoptose [125].

Le DLA possède un domaine riche en Arginine et Serine (domaine SR) qui est impliqué dans la signalisation cellulaire. Ce domaine porte des sites de phosphorylation qui amélioreraient la liaison de N à la protéine M, l'ARN et à elle-même. Le DLA correspond aussi au domaine d'interaction entre nsp3 et N. Cette interaction pourrait induire des changements conformationnels du DLA et réguler la localisation

intracellulaire de N et/ou d'autres fonctions de liaison à l'ARN. Les protéines de nucléocapside seraient notamment recrutées aux complexes de réplication par nsp3 [126].

Le domaine C-terminal (CTD) de N est un domaine hydrophobe, riche en domaine hélice et dont la longueur varie d'une espèce de coronavirus à l'autre. Ce domaine permet la formation des homodimères et homo-oligomères. L'oligomérisation de N est nécessaire à sa stabilité. Le domaine d'oligomérisation semble conservé chez les Coronavirus de différents genres.

Le CTD de N interagit avec le facteur d'élongation 1 $\alpha$  (EIF1 $\alpha$ ), induisant un arrêt de la traduction. Ainsi, la protéine N peut moduler le cycle cellulaire en régulant l'activité cycline-CDK, arrêtant le cycle pendant la progression de la phase S. N est aussi capable d'inhiber la production d'Interféron (IFN) de type I via son domaine CTD.

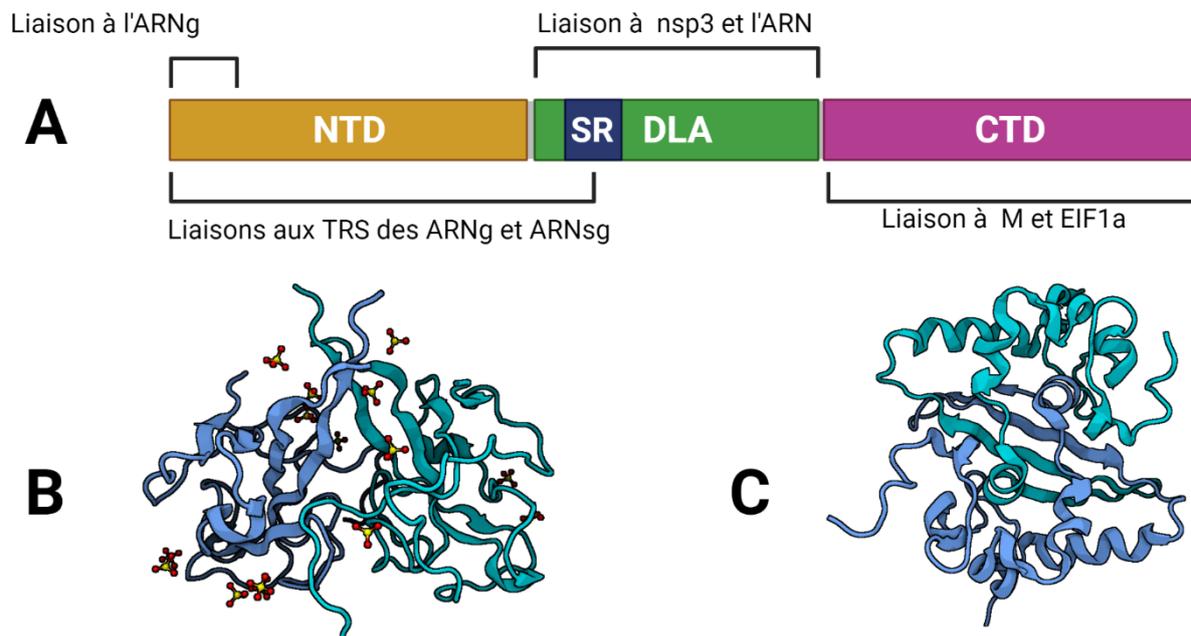


Figure 9 : Structure de la protéine N. A. Organisation de la protéine N. B et C. représentation de dimère des domaines NTD (B. basé sur la structure PDB 5X4K) et CTD (C. basé sur la structure PDB 2CJR). Chaque monomère est représenté d'une couleur différente, et les ions disulfides sont en rouge/jaune. Figure créée sur Biorender. NTD : domaine N-terminal, CTD : Domaine C-terminal, SR : région riche en sérine, DLA : domaine de liaison à l'ARN, TRS : séquence de régulation de la transcription

L'oligomérisation de N en octamère forme un espace chargé positivement (dû aux aa 248-280 pour SARS-CoV) dans lequel l'ARNv (chargé négativement) vient se fixer. Le CTD a une plus forte affinité pour l'ARN que le NTD et peut se lier à de petits acides nucléiques (ARNsb, ADNsb ou ADNdb). La protéine N est capable de se lier à des ARN cellulaires, comme le microARN 9 (miR-9) [127].

La nucléocapside virale est formée d'octamère formant un supercomplexe hélicoïdale avec une surface positive permettant à l'ARN de s'enrouler autour de l'hélice. Le domaine CTD interagirait aussi avec M permettant le recrutement de la nucléocapside aux lieux d'assemblage des virions. Une autre hypothèse est que M, qui est capable d'interagir spécifiquement avec les ARNg viraux, recruterait d'abord ceux-ci et que la RNP se formerait ensuite sur ces ARN liés à M. N peut se lier à tous les ARN, y compris les ARNsg, mais a une plus grande affinité pour les ARNg. La nucléocapside est localisée dans le cytoplasme, mais peut aussi être retrouvée dans le nucléole pour certains coronavirus.

N est aussi un antigène majeur, et des anticorps dirigés contre N peuvent protéger des souris d'une infection par MHV [128].

#### *e. Hémagglutinine Estérase*

L'Hémagglutinine Estérase (HE) est une protéine structurale présente seulement chez certains *embecovirus* comme MHV, HCoV-OC43 etc... Cette protéine aurait pour origine un transfert latéral de gène d'un virus de la grippe de lignée C et a subi des changements importants par rapport aux HE des virus de grippe. Notamment, elle forme des trimères chez le virus de la grippe et des dimères chez les coronavirus [129]. Les protéines HE comportent un domaine lectine de liaison aux récepteur cellulaires spécifiques des acides sialiques O-acétylé, ainsi qu'un domaine sialate-O-acetylestérase de destruction de récepteurs. Les HE participeraient avec S à la fixation des virus sur les cellules. L'activité sialate-O-acetylestérase de HE est nécessaire à la réplication de BCoV et HCoV-OC43 [78]. De manière intéressante, le domaine lectine des HE des deux *betacoronavirus* humains HCoV-OC43 et HCoV HKU1 ont perdu leur

fonction. Cette perte, due à de multiples mutations permettrait une adaptation de ces virus au sialoglycome des voies respiratoires humaines [130].

#### **4. Protéines accessoires**

Les protéines accessoires sont des protéines spécifiques à chaque coronavirus. Ces protéines ne sont pas essentielles à la réplication *in vitro*, mais sont généralement considérées comme importantes pour la réplication *in vivo*. Elles sont nommées en fonction de leur emplacement dans le génome qui varie mais est toujours situé en 3' de l'ORF1ab. Du fait de cette nomenclature, plusieurs protéines accessoires peuvent avoir le même nom entre différents coronavirus (ex : ORF3a de FCoV et d'IBV) bien qu'elles ne partagent aucune similarité. Les fonctions ces protéines restent encore inconnues pour la plupart, mais quelques protéines ont été caractérisées.

Un certain nombre de Coronavirus, comme beaucoup de virus, perturbe la réponse immunitaire innée, et notamment la voie interféron. Comme décrit précédemment certaines protéines structurales et nsp peuvent remplir ces fonctions, mais un certain nombre de protéines accessoires peuvent aussi remplir ce rôle. Les protéines ORF4a, ORF5 et ORF8b de MERS-CoV [131] ainsi que l'ORF6 de PDCoV [132] sont capables de diminuer ou inhiber la reconnaissance de l'ARN double brin par les senseurs cellulaires RIG-I ou MDA5.

L'ORF9b [133] de SARS-CoV interfère avec la protéine MAVS, tandis que l'ORF9b de SARS-CoV2 [134] cible la protéine NEMO, deux protéines clés de la voie de stimulation de l'interféron. D'autres protéines accessoires ciblent les protéines de la cascade de l'induction de la voie IFN : l'ORF7a PDCoV empêche l'activation d'IRF3 et TRAF3 en se liant à IKK $\epsilon$  [135]. Les ORF3b, ORF6 [136], ORF8b et ORF8ab [137] du SARS-CoV interfèrent avec IRF3 et NF $\kappa$ B. L'ORF4b de MERS-CoV empêche la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau en se fixant à la karyophérine- $\alpha$ 4, la protéine cellulaire responsable de l'importation de NF $\kappa$ B dans le noyau [138].

Les protéines accessoires ciblent également la voie de la réponse immunitaire des gènes stimulés par l'IFN (ISG). C'est le cas de l'ORF2 [139] ainsi que l'ORF4b de MERS-CoV [140] qui inhibent l'ISG oligoadenylate-RNase L.

Une étude a démontré que FCoV devenait sensible à la réponse IFN si la protéine accessoire 7a était délétée. De manière intéressante, une transfection de 7a permettait de restaurer la résistance de virus délété de l'ORF7a et 7b à la réponse IFN mais pas de virus délété des ORF7ab et des ORF3abc, indiquant que la protéine 7a antagonise la réponse IFN, seulement lorsque l'ORF3abc est présente. Les auteurs ont également déterminé que cette action avait lieu en aval de la synthèse d'IFN- $\alpha$  [141].

Les protéines accessoires pourraient également jouer un rôle dans l'induction des cytokines, responsables des pathologies inflammatoires observées lors de l'infection par certains CoV. Par exemple, l'ORF3a de SARS-CoV [142] active la transcription et la maturation de l'Interleukine-1  $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire.

En plus de leur rôle dans la régulation de l'immunité cellulaire, les protéines accessoires peuvent impacter diverses fonctions cellulaires.

Par exemple, l'ORF6 [143] de SARS-CoV active l'apoptose des cellules en induisant un stress du réticulum endoplasmique. Certaines protéines accessoires comme l'ORF3 de PEDV [144], l'ORF4a de HCoV-229E [145] ou ns12.9/ORF5 de HCoV-OC43 [146] fonctionneraient comme des viroporines qui facilitent la libération des nouvelles particules infectieuses.

De manière intéressante, la protéine accessoire ORF5b de IBV induit un arrêt de la traduction des protéines de l'hôte [147], rôle normalement tenu par la protéine nsp1 [148] mais dont les *gammacoronavirus* sont dépourvus.

Chez FCoV, en plus du rôle antagoniste de la voie IFN de l'ORF7a en synergie avec ORF3abc, l'ORF3c du FCoV aurait un rôle dans le tropisme tissulaire de FCoV : l'ORF3a est intact chez les chats infectés naturellement qui ne développent pas de symptômes mais est fréquemment muté et non fonctionnel chez les chats développant

des formes cliniques graves [149]. L'infection expérimentale de chats avec un virus délété de cette ORF3c, montre une diffusion du virus en dehors du tractus digestif qui peut ensuite favoriser l'apparition de symptômes chez l'animal. A contrario, chez les animaux inoculés avec un virus comprenant l'ORF3c intact, le tropisme entérique du FCoV est maintenu. Cet ORF donc est nécessaire pour maintenir la réplication du FCoV dans le tractus entérique [150]. L'ORF3c induirait aussi une réplication virale moins efficace, ce qui pourrait être corrélée avec une virulence plus faible du virus [151].

Toutes ces protéines jouent des rôles plus ou moins essentiels dans le cycle de réplication des coronavirus.

## F. CYCLE DES CORONAVIRUS

### 1. Entrée dans la cellule et décapsidation

L'entrée des Coronavirus dans les cellules est médiée par des interactions entre les récepteurs cellulaires et la protéine S et aboutit à la fusion des membranes virales et cellulaires [107]. Dans certains cas, les Coronavirus peuvent se lier à des protéines leur servant simplement de facteur d'attachement. Il a été montré que MERS-CoV [152], HCoV-HKU1 [153] et HCoV-OC43 [154] utilisent des acides sialiques comme facteurs d'attachement tandis que HCoV-NL63 utilise des héparane-sulfates [155]. Les récepteurs des Coronavirus varient selon les espèces. L'aminopeptidase N (APN) sert de récepteur à un certain nombre d'*alphacoronavirus* comme HCoV-229E [156], FCoV-II, TGEV [157], PEDV [158] ainsi que d'autres *alphacoronavirus* infectant les chauves-souris (*Rhinolophus* bat coronavirus HKU2, *Scotophilus* bat coronavirus 512/05, *Miniopterus* bat coronavirus 1, *Miniopterus* bat coronavirus HKU8) [107]. Le *deltacoronavirus* PDCoV utilise aussi l'APN porcin comme récepteur [159]. Les *betacoronavirus* SARS-CoV [160], SARS-CoV-2 [161] et d'autres SARS-like coronavirus de chauves-souris [162] ainsi que l'*alphacoronavirus* HCoV-NL63 [163] utilisent l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) comme récepteur (Voir Tableau 3).

De manière intéressante, il semble que certains coronavirus soient capables d'utiliser plusieurs récepteurs. PEDV et TGEV sont par exemple capables d'infecter des cellules porcines sans utiliser l'APN [164].

Les virions des Coronavirus peuvent fusionner directement à la membrane plasmique ou entrer par endocytose (voir Tableau 3). Il existe plusieurs voies d'endocytose utilisées par les coronavirus [165]. Elle peut se faire de manière Clathrine-dépendante, Cavéoline-dépendante ou via des radeaux lipidiques. SARS-CoV entrerait dans les cellules par un mécanisme clathrine- et cavéoline-indépendant, potentiellement par les radeaux lipidiques [166,167] tandis que HCoV-NL63 [168] entrerait dans les cellules par endocytose clathrine- et dynamine-dépendante et HCoV-OC43, par la voie caveoline-1 dépendante et dynamine dépendante [169].

FCoV entre dans les monocytes via une endocytose clathrine et cavéoline indépendante [170]. Le virus FIPV de sérotype II entre par endocytose de manière bien moins efficace dans les cellules de rein de chat (CrFK) que dans les monocytes, suggérant qu'un autre mécanisme serait utilisé par le virus pour l'entrée dans ces cellules [171].

En cas d'endocytose, la particule fusionne avec la membrane après acidification de l'endosome et clivage de la protéine virale S par des protéases cellulaires.

Il a été montré qu'un certain nombre de Coronavirus est capable de fusion directe à la membrane et d'endocytose selon les types cellulaires et/ou la présence de protéase dans le milieu extracellulaire. Le coronavirus bovin (BCoV) par exemple fusionne directement à la membrane plasmique [172]. La souche MHV A59 entre par fusion directe [173] à la membrane tandis que d'autres souches comme MHV-2 entre par endocytose médiée par la clathrine [174]. Les souches de laboratoire de HCoV-229E entrent dans les cellules par endocytose mais il a été suggéré que les isolats cliniques de HCoV-229E peuvent entrer par fusion directe à la membrane [175].

Une fois la membrane virale fusionnée à la membrane cellulaire, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. La décapsidation qui suit permet la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme au niveau du réticulum endoplasmique et le début de la réplication. La décapsidation pourrait être liée à des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine N [176].

Tableau 3 : Récepteurs et voies d'entrée connus des Coronavirus .

	Récepteur	Voie d'entrée	
<b>SARS-CoV</b>	ACE2	Endocytose (Clathrine, autre)	[107,177]
<b>HCoV-229E</b>	APN	Endocytose (Lysosome, Caveoline-1) Fusion à la membrane plasmique	[107,175]
<b>MERS-CoV</b>	DDP4 Acides sialiques (attachement)	?	[178]
<b>FCoV-II</b>	APN	Endocytose (raft lipidique)	[107] [170]
<b>IBV</b>	Acides sialiques	Endocytose (Clathrine)	[179,180]
<b>MHV</b>	CEACAM1	Endocytose (Clathrine) Fusion à la membrane plasmique	[107,181,182]
<b>SARS-CoV-2</b>	ACE2	Endocytose (Clathrine)	[183,184]
<b>CRCoV</b>	Acides sialiques (attachement) HLA I	Endocytose (Caveoline-1)	[185,186]
<b>PEDV</b>	APN	Endocytose (Cavéoline, Clathrine, radeau lipidique)	[107,187]
<b>HCoV-NL63</b>	ACE2	Endocytose (Clathrine)	[107,168]
<b>BCoV</b>	Acides sialiques (attachement) HLA I	?	[185]
<b>HCoV-OC43</b>	Acides sialiques	Endocytose (Caveoline-1)	[169,185]

## 2. Réplication du génome viral

Une fois libérée de la capside, l'ARN génomique viral est traduit directement par les ribosomes. Deux ORFs sont traduits depuis l'ARN génomique : l'ORF 1a et l'ORF 1b. La protéine pp1ab est le résultat d'un décalage de lecture ribosomal de -1 nucléotide qui entraîne un décalage du cadre de lecture entre les ORFs 1a et 1b. Ce décalage serait dû à la présence d'une structure tige boucle de l'ARN sur la région correspondant à nsp11 [188]. D'autres structures tiges boucles présentes dans l'ARN génomique pourraient servir à détourner la machinerie cellulaire de la synthèse des protéines cellulaires [189].

Les polyprotéines pp1a et pp1ab synthétisées possèdent deux domaines protéolytiques permettant le clivage des différentes nsp. Certains clivages ont lieu très tôt après la synthèse des polyprotéines [190]. La région correspondant à nsp5 contient un domaine 3C-like protéinase (3CLpro) qui clive pp1a et pp1ab sur onze sites, permettant la libération des polypeptides nsp5 à nsp16. Ce processus est initié par l'autoclivage de nsp5 [191]. La deuxième protéase est le domaine peptidase C16 contenu dans la région correspondant à nsp3. Le peptidase C16 clive pp1a et pp1ab en trois endroits, permettant la libération des protéines nsp1, nsp2, nsp3 et nsp4.

Nsp1 interagit avec les sous-unités 40S des ribosomes et inhibe la machinerie de traduction des ARNm cellulaires au profit des ARN viraux [192,193].

Les protéines nsp2-11 sont considérées comme des protéines apportant des fonctions de support au complexe de réplication/transcription viral (RTC), et nsp12-nsp16 contiennent les fonctions enzymatiques clés du RTC.

L'expression des formes clivées de nsp3 et nsp4 induit des modifications du réticulum endoplasmique (RE) [86]. Les déformations du RE conduisent à la formation de vésicules à double membrane (DMV) péri-nucléaires. Ces DMV sont reliées entre elles et au RE rugueux. Des pores constitués entre autres de nsp3 permettent le passage de molécules entre le cytosol et l'intérieur des DMV [194]. Les membranes des DMV

protègent les RTC des protéines cellulaires et de la détection par le système immunitaire inné en les isolant du reste de la cellule. L'ARN double brin, intermédiaire de réplication, est majoritairement retrouvé à l'intérieur des DMV au moins pendant les temps précoces de l'infection. Nsp2 est présente dans les DMV du côté cytoplasmique mais son rôle n'est pas encore bien défini.

Nsp7 et nsp8 servent de cofacteurs à la polymérase virale ARN-dépendante nsp12. Nsp7 et nsp8 forment un hexadecamère en forme d'anneau, avec des domaines de liaisons à l'ARN double brin au centre. Nsp8 servirait de primase [92,195]. Nsp13 possède un domaine hélicase et interagit avec nsp8 et nsp12 [196].

Nsp14 a une activité 3'-5' exonucléase qui permet la correction des ARNs synthétisés. Cette activité est propre aux Coronavirus et serait une des raisons permettant à un virus à ARN d'avoir un aussi grand génome [197]. Nsp14 joue aussi un rôle dans le coiffage des ARN via son domaine guanine-N7-methyltransferase [102]. Le coiffage des ARN des Coronavirus est assuré par le co-facteur nsp10, nsp14 ainsi que nsp16 et son domaine 2'-O-methyltransferase [97].

La polymérase virale permet l'initiation de la réplication en transcrivant un brin négatif à partir de l'ARN génomique. Ces ARNs négatifs servent eux-mêmes de matrice pour la transcription de l'ARN génomique, qui est aussi traduit et permet de générer plus de protéines nsp et donc de RTC.

Comme pour tous les autres membres des Nidovirales, un ensemble d'ARN sous génomique est également produit (Voir Figure 10). Ces ARNs possèdent tous la même séquence leader 5' et partagent la même extrémité 3'. Pendant la synthèse de l'ARN négatif, le RTC est capable d'arrêter la synthèse lorsqu'il atteint une séquence de régulation de la transcription (TRS). Ces TRS sont localisées en 3' des ORFs (à l'exception des ORF1a et b et des ORFs de certaines protéines accessoires). La synthèse reprend au niveau d'une séquence située entre 65 et 98 nucléotides de l'extrémité 5' du génome. Cette séquence est appelée séquence leader ou TRS-L et permettrait de

protéger les ARNm des clivages nucléotidiques induit par nsp1 [79]. Ces sauts de la polymérase impliqueraient des interactions ARN-ARN entre des éléments proximaux et distaux permettant de rapprocher physiquement les TRS et TRS-L [198].

Ces ARN négatifs sous génomiques servent ensuite de matrice pour la transcription d'ARN de polarité positive. Les ARNs sous génomiques positifs (ARNsg) servent d'ARNm pour la traduction des protéines de structures ainsi que les protéines accessoires. Les ARNsg ne sont pas synthétisés de manière équivalente. Plus un ORF est localisé en 3' du génome, plus son ARNsg correspondant sera produit en grande quantité. Ainsi, l'ARNsg le plus rare est celui de S et le plus abondant est celui de la nucléocapside N [79]. Bien que la plupart des ARNsg soit polycistronique, seul l'ORF situé en 5' est traduit. Les ARN viraux possèdent une queue polyA. Cette queue peut être de longueur variable à différents temps de l'infection et pourrait permettre une régulation supplémentaire de la production des protéines virales [199].

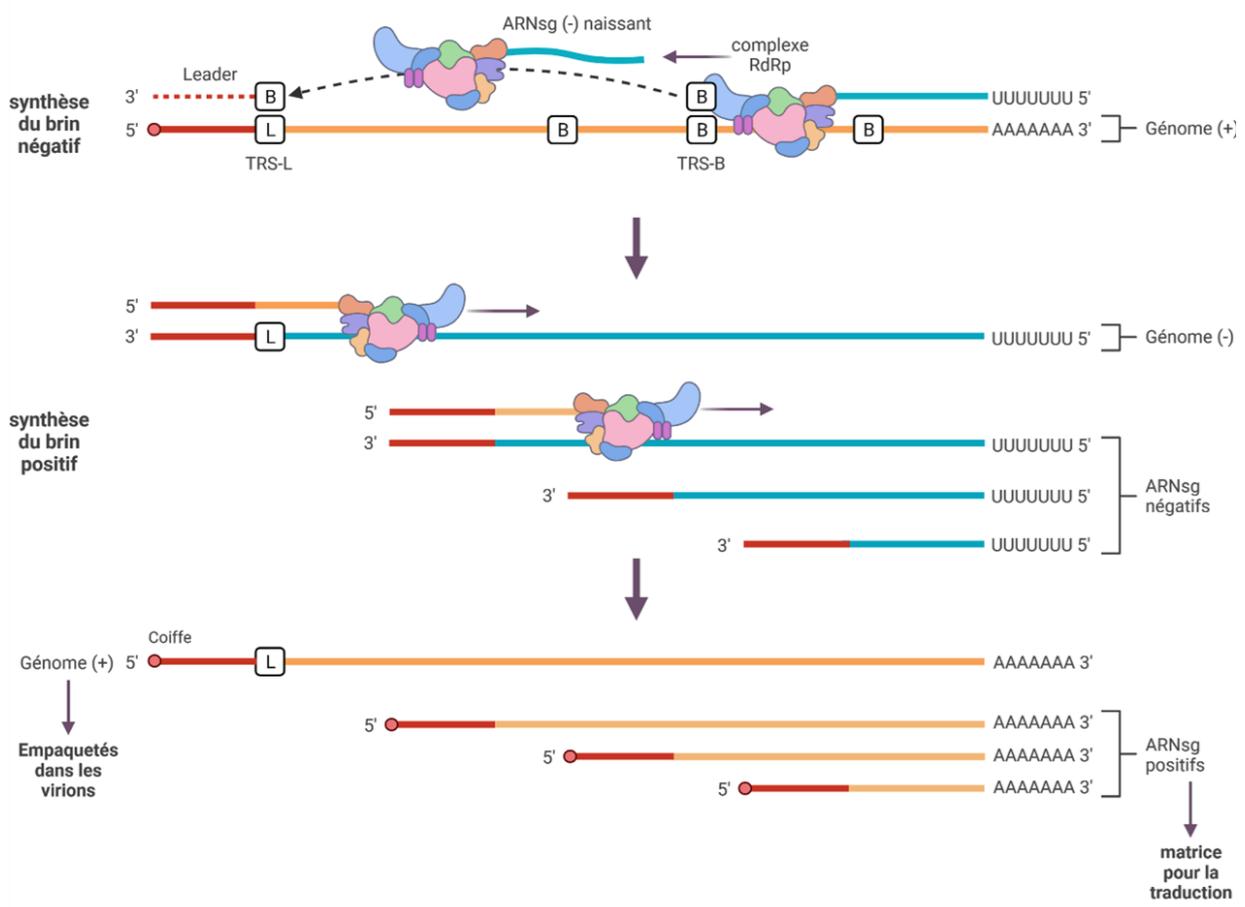


Figure 10 : Transcription des ARNs génomiques et sous génomiques des Coronavirus. Les carrés « B » et « L » représentent les TRS trouvés dans la séquence leader (L) ou dans le corps de la séquence (« body » B). La séquence leader est représentée en rouge, les ARN négatifs en bleu et les positifs en orange. Adaptée de la figure « Discontinuous Transcription » sur Biorender.

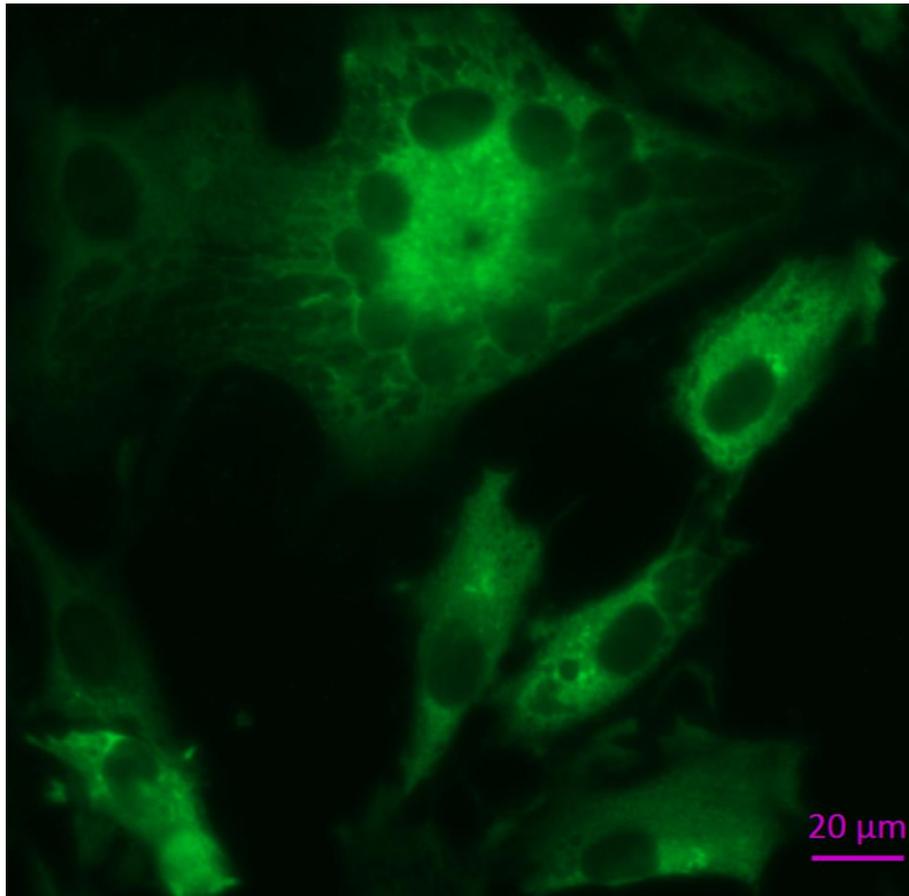
### 3. Traduction des protéines virales et assemblages des nouveaux virions

Les ARNsg sont traduits et permettent la synthèse des protéines structurales. La traduction des ARNm viraux est dépendante de la coiffe et utilise le facteur cellulaire EIF4F.

La traduction des protéines accessoires des Coronavirus est régie par différents mécanismes. Certaines ont un TRS en amont de l'ORF comme les protéines structurales mais pas toutes. L'ORF3b de TGEV serait traduit après dérivation ribosomique ("ribosomal shunt" en anglais) [199] et la protéine I de BCoV est traduite après balayage défaillant/leaky scanning et démarrage de la traduction au second codon AUG de l'ORF de la nucléocapside. D'autres protéines accessoires, comme la

protéine 3c d'IBV sont traduites grâce à la présence d'un site interne d'entrée ribosomale (IRES) [199].

Toutes les protéines structurales des Coronavirus subissent des modifications post-traductionnelles. Ces modifications permettent le bon repliement des protéines et jouent un rôle dans leur transport et association avec d'autres protéines (par exemple, la palmitoylation de S est requise pour son transport [117]). Ces modifications ont lieu dans le RE. Les protéines S, M et E sont insérées dans la membrane du RE et y transitent jusqu'au ERGIC. Des associations vont avoir lieu entre les différentes protéines structurales à ce moment. La protéine M est considérée comme l'organisateur central de l'assemblage et interagit avec S, M, E et HE lorsque cette dernière est présente. Les monomères de M interagissent entre elles sur plusieurs domaines formant des oligodimères et forment des réseaux M-M dans les membranes du RE. M sert également à retenir la protéine S au RE et/ou ERGIC. Elle suit autrement la voie de sécrétion cellulaire et se retrouve à la membrane plasmique si elle est exprimée seule. M a une fonction similaire sur la protéine HE [77]. La présence de S à la surface des cellules est responsable de la formation des syncytia observés pour certains CoV comme FCoV (Voir Figure 11).



*Figure 11 : Photo de cellules CRFK infectées par FIPV. La nucléocapside de FIPV est marquée en vert, indiquant les cellules infectées. Le syncytia présent en haut est le résultat de la fusion de plusieurs cellules. Quelques cellules infectées isolées sont présentes.*

La protéine E pourrait jouer un rôle dans la courbature des membranes. Elle est aussi capable de former des canaux ioniques en se polymérisant, qui pourrait agir comme une viroporine, et avoir une autre fonction, potentiellement dans la régulation du pH des virions [77].

N se lie de manière non-spécifique aux ARNg et ARNs en se fixant sur les séquences leader. D'autres protéines N sont recrutées et la ribonucléocapside s'agrandit, formant une structure hélicoïdale avec l'ARN au centre [124].

Les ARNg viraux sont encapsidés de manière sélective (au moins pour certains coronavirus). La sélection de l'ARNg pour l'encapsidation serait due à l'interaction entre M et l'ARNg. La séquence permettant la sélection des ARNg est située sur la

partie 5' du génome, qui est absente des ARNsg. Pour MHV, cette séquence est située dans la séquence codant pour nsp15 [77].

Le bourgeonnement des nouvelles particules virales a lieu au niveau du ERGIC et/ou de l'appareil de Golgi. Les virions sont ensuite exportés en dehors de la cellule par la voie d'exocytose.

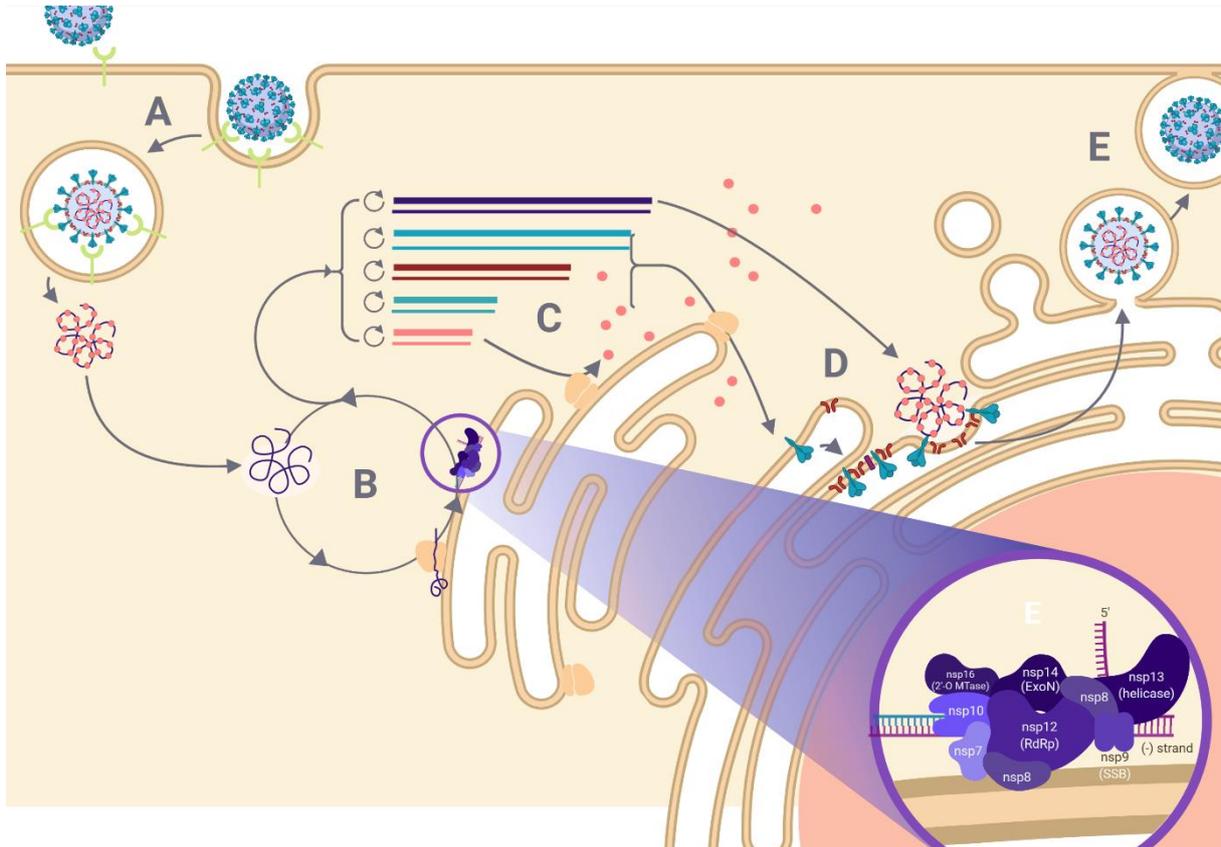


Figure 12 : Schéma du cycle de réplication des Coronavirus. A : Entrée du virus. B : traduction de l'ARNg, synthèse des protéines non structurales et assemblage du complexe de réplication. C : Transcription des ARN sous-génomiques de polarité négative puis positive et traduction des protéines structurales. D : Maturation post-traductionnelle des protéines structurales et assemblage dans le RE/ appareil de Golgi. E : Bourgeonnement et exocytose des virions. Figure créée sur Biorender.

## II. LE CORONAVIRUS FELIN

---

### A. BIOTYPES FeCV ET FIPV

Le coronavirus félin (FCoV) est connu depuis 1968 [7] mais beaucoup d'aspects de son cycle répliatif ne sont toujours pas caractérisés, comme son récepteur cellulaire lors des infections naturelles. Ce coronavirus, circulant chez les chats et autres grands félins existe sous forme de deux biotypes : Feline Enteric Coronavirus (FeCV), une forme bénigne avec un tropisme entérique, et Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV), une forme très virulente responsable de péritonite infectieuse (PIF), maladie systématiquement létale.

FeCV est très largement répandu à travers le monde, avec une séropositivité entre 20 et 60% chez les chats domestiques, qui approche les 90% dans les refuges et chatteries [200,201].

FeCV induit généralement des infections asymptomatiques chez le chat, avec des cas plus rares de diarrhée ou entérite sévère [202]. FeCV est principalement associé à la voie gastro-intestinale, et plus spécifiquement l'épithélium apical des villosités intestinales de l'intestin grêle et du colon [203]. L'infection par FeCV peut conduire à une infection chronique. Dans 2 à 5% des chats infectés par le virus FeCV, celui-ci peut muter et acquérir un tropisme pour les macrophages et monocytes et ainsi diffuser dans tout l'organisme. On parle alors d'infection par le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) qui va déclencher chez l'animal une maladie mortelle appelée péritonite infectieuse féline (PIF).

Récemment, les mutations génétiques responsables de l'apparition des souches FIPV ont été caractérisées. L'une des mutations génomiques caractéristique affecte le gène S avec une mutation ponctuelle à la position du nucléotide 23531 ou en position 23536

conduisant dans le premier cas à un changement de l'acide aminé Méthionine en Leucine et dans le deuxième cas à un changement d'une Sérine en Alanine [204]. Il a aussi été montré que les souches FIPV présentent très souvent des mutations au niveau du gène accessoire ORF3c (insertion d'un codon stop précoce ou délétion) conduisant à l'expression d'une protéine 3c non-fonctionnelle. Cette perte de fonction de la protéine 3c semble conférer au virus sa capacité à diffuser dans l'organisme, caractéristique des infections FIPV par opposition aux souches FeCV restreintes au tractus entérique. *In vitro*, les souches virales délétées de l'ORF3c se répliquent beaucoup mieux dans les monocytes, expliquant la capacité de ces souches virales à diffuser dans l'organisme [205]. Cette étude a été confirmée par une expérimentation *in vivo* de chats infectés par des souches virales délétées du gène ORF3c. Le virus perd effectivement son tropisme entérique et peut alors diffuser dans l'organisme. De manière intéressante, l'ORF7ab et ORF3abc n'étaient pas nécessaires à la réplication du virus sur cellules épithéliales (type CRFK) mais ORF7ab était nécessaire pour la réplication de FIPV dans les monocytes/macrophages, ainsi que l'ORF3abc dans une moindre mesure [206].

Lors des infections par le FIPV, les macrophages et monocytes infectés se retrouvent par diapédèse dans les différents organes du chat. Les cellules infectées secrètent des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , Il-1 $\alpha$ , GM-CSF et G-CSF [207,208] qui attirent des neutrophiles au site de l'infection. Les neutrophiles provoquent des lésions pyogranulomateuses qui induisent les signes cliniques observables. Les lymphopénies observées sont dues pour partie à la sécrétion de TNF $\alpha$  qui entraîne l'apoptose des lymphocytes T.

## **B. FORMES CLINIQUES**

La PIF est une maladie qui touche surtout les jeunes animaux entre 6 mois et 2 ans.

La PIF se présente sous deux formes cliniques [203]. La forme la plus classique, la PIF dite humide est caractérisée par des exsudats inflammatoires dans les cavités séreuses.

A la ponction, le liquide d'épanchement, présent soit dans la cavité abdominale soit la cavité pleurale, est fréquemment jaune citrin, visqueux et très riche en fibrine (Figure 13). L'épanchement caractéristique des PIF humides est due à l'augmentation de la perméabilité capillaire de l'endothélium vasculaire. Les macrophages infectés s'accumulant dans l'ascite provoquent ensuite des lésions pyogranulomateuses périvasculaires dans les organes abdominaux et thoraciques (Figure 13). Des thrombopénies et coagulations intravasculaires disséminées peuvent aussi être déclenchées par la consommation des facteurs de coagulation et des plaquettes [209].

Les PIF dites sèches sont caractérisées par des lésions granulomateuses vasculaires à la surface des séreuses et ce dans différents organes (foie, rein, rate, encéphale, etc.).

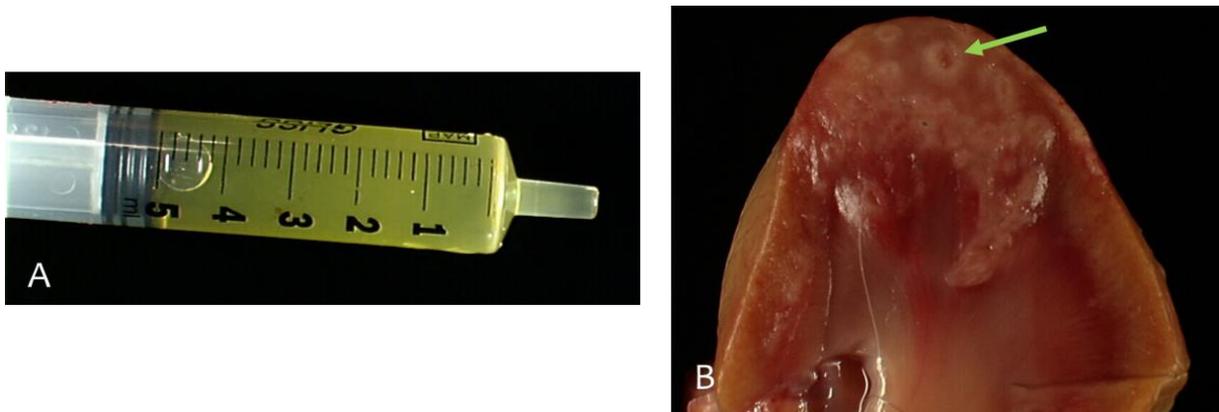


Figure 13 : Lésions associées à la forme humide et sèche de la PIF. A. Ponction de liquide d'épanchement jaune citrin B. Lésions pyogranulomateuses (indiquée par la flèche) sur le rein (Photos service d'Anatomie-pathologie de l'ENVA).

Environ 38 % des formes sèches présentent une atteinte du système nerveux central avec des symptômes neurologiques typiques (ataxie, crises d'épilepsie, etc...) [210]. On considère ces cas comme des formes neurologiques de PIF. Dans ces formes sèches l'évolution clinique est souvent plus longue que dans la forme humide mais dans tous les cas, la maladie est fatale.

## C. SEROTYPES DU CORONAVIRUS FELIN

Les Coronavirus félins existent sous forme de deux sérotypes appelés FCoV-I et FCoV-II, basés sur des différences antigéniques liées à la protéine de spicule. Ces sérotypes se retrouvent chez FeCV comme FIPV. Le sérotype I est beaucoup plus répandu que le sérotype II dans les infections naturelles avec une prévalence de 86 à 95 % [201,211–213]. Malheureusement, le sérotype I est aussi beaucoup plus difficile à cultiver en laboratoire, contrairement à FCoV-II qui est par conséquent le modèle de laboratoire de référence.

FCoV-II est issu d'une recombinaison entre FCoV-I et le coronavirus canin CCoV. Le génome des souches FCoV-II comprend donc une partie d'origine canine : l'extrémité 3' de l'ORF1ab, l'ORF S ainsi que l'ORF3abc. Le récepteur cellulaire reconnu par la protéine S de FCoV-II a été identifié : il s'agit de l'aminopeptidase N (APN) [108]. Le récepteur cellulaire de FCoV-I n'est toujours pas connu.

## D. MESURES DE LUTTE CONTRE LE VIRUS DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

Bien que FIPV soit un pathogène mortel, il n'existe malheureusement aucun traitement reconnu à l'heure actuelle mais seulement des soins palliatifs. Beaucoup d'efforts de recherches ont été menés afin de trouver des solutions, que ce soit un vaccin ou des composés antiviraux.

### 1. Vaccins

Un certain nombre d'essais vaccinaux ont été menés : des tests d'immunisation avec d'autres *alphacoronavirus* comme le CoV canin CCoV [214,215], le CoV porcin TGEV [216] ou le CoV humain HCoV-229E [217] n'ont pas permis d'obtenir de protection contre FIPV. D'autres essais utilisant une souche vivante atténuée de FCoV n'ont pas permis non plus de protéger les animaux contre l'infection. Certains animaux vaccinés ont même développé plus rapidement des symptômes que les non-vaccinés. Cet

évènement est dû à un effet délétère de certains anticorps qui n'empêchent pas l'infection mais au contraire facilitent l'infection des monocytes/macrophages, cellules cibles du FIPV. Ce phénomène est appelé facilitation de l'infection par les anticorps ou «Antibody dependent enhancement »(ADE) en anglais [218,219]. Des essais avec des vaccins recombinants exprimant la protéine S n'ont pas eu de succès non plus. Dans ces essais, les chats vaccinés développaient aussi la maladie plus rapidement, indiquant que les anticorps dirigés contre la protéine S sont responsables de l'ADE. Pour éviter les phénomènes d'ADE, une autre stratégie choisie a été de développer des vaccins utilisant d'autres protéines que S. Les protéines M [220] et N [221] ou les deux [222] ont été testées mais avec peu de succès.

Un seul vaccin est actuellement commercialisé aux Etats-Unis et certains pays d'Europe (n'incluant pas la France). Il s'agit d'une souche atténuée thermosensible. La souche est une souche de sérotype II, contrairement à la large majorité des souches FCoV circulant naturellement dans le monde et semble avoir une efficacité modérée [223].

## **2. Molécules immunostimulantes**

L'immunomodulation est une stratégie utilisée dans de nombreuses thérapies antivirales, y compris en médecine vétérinaire. Les interférons (IFN) sont couramment utilisés dans ce contexte. Un interféron félin oméga (fIFN- $\omega$ ) est même disponible dans le commerce. *In vitro*, fIFN- $\omega$  a réduit le nombre de virus de moins d'un log lorsque les cellules sont traitées continuellement pendant 48h p.i. avec 10000 U de molécule d'IFN. Aucun effet antiviral n'a été observé lorsque la molécule était utilisée en prétraitement [224]. *In vivo*, une étude contrôlée par un groupe placebo a été menée sur 37 chats PIF diagnostiqués et appartenant à des clients [225]. Les chats du groupe interféron (21 chats) ont reçu 106 U/kg (0,1 mL/kg) de fIFN $\omega$  par voie sous-cutanée toutes les 24 heures pendant une semaine, puis la même dose une fois par semaine jusqu'à l'euthanasie. Le groupe témoin a reçu une solution saline. Tous les chats ont été traités par des glucocorticoïdes. Aucun effet bénéfique du traitement n'a été

observé. De même, l'interféron-alpha humain (hIFN- $\alpha$ ) avait un effet inhibiteur de manière dose-dépendante *in vitro* [226] mais aucun effet inhibiteur n'a été observé dans un essai expérimental [227]. En conclusion, le principal intérêt de l'IFN peut être dans la combinaison avec d'autres molécules antivirales (voir ci-dessus) [225].

Le Polyprenyl Immunostimulant (PI) est un composé utilisé dans le traitement de l'herpèsvirus félin. Son effet antiviral pourrait être dû à la régulation positive des cytokines Th-1. Dans une étude de terrain, 60 chats diagnostiqués avec une forme sèche de PIF ont été traités par le PI à raison de 3 mg/kg par voie orale trois fois par semaine. Bien qu'aucun chat n'ait guéri, sept chats ont survécu pendant plus de 300 jours, avec un record de 1829 jours pour un chat. Il est important de noter que les chats traités simultanément avec le PI et des corticostéroïdes ont survécu en moyenne 47,5 jours, tandis que les chats traités avec le PI et sans corticostéroïdes ont survécu en moyenne 201 jours [228]. Le traitement simultané des chats avec des corticostéroïdes et des PI pourrait avoir un effet adverse.

### **3. Antiviraux**

L'intérêt pour un traitement de la PIF a permis à un grand nombre d'études d'être mené depuis la découverte de FIPV. Un certain nombre de molécules inhibant FIPV ont été caractérisées (Tableau 1), et le mécanisme, ou du moins l'étape de la réplication virale est connue pour certaines d'entre elles.

#### *a. Inhibiteurs de l'entrée du coronavirus félin dans les cellules*

Les molécules inhibant l'entrée du virus dans la cellule ciblent généralement l'interface entre le récepteur cellulaire et le site de liaison du récepteur viral, mais certaines d'entre elles inhibent les processus cellulaires d'entrée après l'étape d'attachement viral.

Différentes molécules inhibant l'attachement viral du FCoV ont été étudiées. Des peptides ciblant le domaine S1 de la protéine S, qui contient le RBD, ont été développés. A 160 $\mu$ M, trois peptides correspondant aux acides aminés 471-490

(peptide I-S1-9, comprenant le RBD de la spicule), 541-560 (peptide I-S1-16), et 601-620 (peptide I-S1-22) ont inhibé environ 80% de la réplication virale de la souche FIPV-I KU-2 dans des cellules foetales félines fcwf-4. Les peptides I-S1-9 et I-S1-16 ont également inhibé de manière significative les souches FIPV-I UCD-1 et Black. De manière plus surprenante, la souche FIPV-II 79-1146 est aussi inhibée, malgré l'hétérogénéité de séquence entre les protéines S des sérotypes I et II du FCoV. L'effet inhibiteur pourrait être dû à une compétition entre les peptides et les particules virales pour se lier au récepteur cellulaire de manière non spécifique au sérotype [229].

Des peptides correspondant à la région de répétition d'Heptades (HR) 2 de la sous-unité S2 de la protéine S de la souche FIPV-II NTU156 ont également été développés. Comme les régions HR sont essentielles pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'hôte, ces peptides pourraient bloquer l'entrée du virus. En préincubant le virus pendant 1h avec les peptides HR 2, les auteurs ont noté une inhibition de l'infection dépendante de la dose. Sur les cinq peptides testés, le plus efficace, nommé FP5, avait une IC<sub>50</sub> de 1,33µM et une CC<sub>50</sub> supérieure à 200µM [230]. Aucun de ces peptides n'a été testé *in vivo*.

Différentes molécules bloquant le processus d'endocytose des particules virales ont également été testées. Parmi eux, la diphyline est un composé naturel extrait de la plante *Cleistanthus collinus* et agit comme un bloqueur de l'ATPase vacuolaire. Il a déjà été démontré qu'elle inhibait le virus de la dengue et le virus de la grippe [231]. En inhibant la pompe à protons H<sup>+</sup> dans les compartiments endosomaux, la diphyline bloque l'acidification endosomale et donc l'activité de fusion de la protéine S, empêchant ainsi l'infection des cellules. Dans les cellules fcwf-4, la diphyline inhibe une souche FIPV-II, NTU156, à 0.6µM avec un CC<sub>50</sub> de 6µM. En délivrant la diphyline grâce à des nanoparticules polymériques, l'effet antiviral et la sécurité de la molécule ont augmenté (CI<sub>50</sub> de 9.8nM et CC<sub>50</sub> de 77µM) [232].

Les agents de liaison aux hydrates de carbone (CBA) se fixent sur les molécules N-glycosylées, comme les protéines S et M. Ils ont une activité antivirale qui est due à

leur capacité à se lier aux molécules N-glycosylées. Leur activité antivirale est due à l'inhibition du processus d'endocytose virale au stade de la post-fixation. Des composés CBA comme les lectines végétales *Galanthus nivalis* agglutininin (GNA), *Hippeastrum hybrid* agglutinin (HHA) et *Urtica dioica* agglutin (UDA) ont été testés contre FCoV-I et II. HHA et UDA ont inhibé respectivement le FCoV-I à une CI50 de 4 et 2nM et le FCoV-II à 60 et 170nM. Le CC50 a été estimée à 24h à 9.9µM pour l'UDA et >2µM pour le HHA. La CI50 de l'agglutinine de *Galanthus nivalis* (GNA) a été estimée à environ 0,012µM pour FCoV-I et 0,2µM pour FCoV-II avec une CC50 supérieure à 2µM [233].

La chloroquine (CQ) et son dérivé l'hydroxychloroquine (HCQ) ont été décrites comme ayant un effet inhibiteur sur les stades précoces de l'infection de différents virus *in vitro*, notamment le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de la grippe A/H5N1, le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 [234–238]. La CQ et la HCQ empêcheraient la réplication virale en bloquant l'entrée virale médiée par endocytose. Elles pourraient également entraver la modification post-traductionnelle des glycoprotéines virales, qui se produit dans les vésicules du réseau endoplasmique et du réseau trans-golgi. Pour le FCoV, la CQ atteignait une efficacité maximale lorsqu'elle était présente avant ou au moment de l'infection et commençait à perdre son effet inhibiteur lorsqu'elle était ajoutée 1h après l'infection (p.i) des cellules CRFK infectées par la souche FIPV-II 79-1146. La chloroquine avait une CI50 de 0,38µM 24 p.i. tandis que sa CC50 atteignait 82,31µM après 24h [239]. Une autre étude a confirmé l'effet antiviral de la Chloroquine sur l'infection de cellules fcwf-4 et de cellules monocytes avec la même souche virale. La Chloroquine à 10µM a réduit le titre du virus de 3logs dans les cellules fcwf-4 et de 1log dans les macrophages. L'Hydroxychloroquine, un dérivé de la chloroquine, est supposé être moins toxique chez certains animaux [240]. Dans les cellules fcwf-4, à 48h p.i., l'Hydroxychloroquine avait une CC50 de 515.7µM, et une CI50 de 48.7µM contre la souche KU-2 du FIPV-I

et de 30.3 $\mu$ M contre le FIPV-II. En comparaison avec le CQ, le HQ semble être moins cytotoxique [241].

Jusqu'à présent, les expériences *in vivo* n'ont été menées qu'avec la CQ. Trois groupes de trois chats SPF inoculés expérimentalement avec la souche FIPV-II 79-146 ont été traités avec 10mg/kg de chloroquine (ou une solution saline comme contrôle) administrée par voie sous-cutanée. Un groupe a été traité trois jours avant l'infection et tous les trois jours par la suite, tandis qu'un autre groupe a reçu de la chloroquine seulement 12 jours après l'infection et tous les trois jours par la suite. Par rapport au groupe témoin, les deux groupes traités à la chloroquine présentaient un niveau d'ARNm viral légèrement inférieur dans les PBMC 21 jours après l'infection, ainsi que des niveaux d'ARNm de cytokines inflammatoires légèrement inférieurs. Le nombre moyen de jours de survie des chats traités à la chloroquine était plus élevé (34,3 et 31,7 jours post-infection) que dans le groupe témoin (21 jours p.i.), bien que non significatif sur le plan statistique. Aucun chat traité n'a survécu à l'infection par le FIPV. En outre, malgré une amélioration du score clinique des chats traités à la CQ, une augmentation de l'alanine aminotransférase (ALT) due au traitement a été constatée. En conclusion, la chloroquine peut être une piste intéressante pour traiter le PIF, mais elle doit être utilisée en association avec d'autres médicaments anti-FIPV, car les doses élevées de CQ ont des effets secondaires graves [242].

### ***b. Inhibiteurs de la réplication et la transcription***

Les antiviraux ciblant la réplication virale suivent différentes stratégies. L'inhibition de la polymérase virale est un mécanisme d'action classique utilisé pour les thérapies antivirales contre le VIH ou le VHC. Une autre méthode consiste à éliminer les ARNm viraux avant leur traduction. Seule la seconde stratégie a été testée pour inhiber l'infection par le FCoV.

#### ***1. Analogues nucléosidiques***

Les analogues de nucléosides sont similaires aux nucléosides naturels mais les différences avec un nucléoside standard induisent un appariement ou un empilement

de bases différentes lorsqu'ils sont utilisés pour synthétiser l'ADN/ARN et inhibent la réplication virale. Ils sont souvent utilisés comme antiviraux (VIH, Herpesvirus...). Les cellules sont capables de supprimer et de corriger la présence de ces analogues, alors que les virus ne le peuvent pas.

i. GS-441524

Le GS-441524 est un analogue de l'adénosine et la forme active du Remsedevir (Gilead). Le GS-441524 a été testé *in vitro* et *in vivo* pour son effet contre le FIPV. *In vitro*, le GS-441524 a été capable d'inhiber complètement l'expression de l'ARN du FIPV-II 79-1146 dans les cellules CRFK à 10  $\mu$ M et partiellement à 1  $\mu$ M. Aucun effet cytotoxique du composé n'a été remarqué jusqu'à 100 $\mu$ M. Ce composé était efficace lorsqu'il était ajouté 1 heure après l'infection. Dans les macrophages obtenus à partir d'ascite de chats infectés naturellement, 10 $\mu$ M de GS-441524 ont réduit l'ARN viral de 1000 fois 72h après le traitement.

Chez 10 chats infectés expérimentalement et exprimant des symptômes cliniques de PIF, un traitement quotidien pendant 2 semaines de 2mg/kg ou 5mg/kg de GS-441524 deux à trois jours après l'apparition des symptômes a entraîné une rémission des symptômes de PIF. Une réapparition des signes cliniques est survenue chez deux chats, quatre ou six semaines après l'arrêt du traitement. Avec une nouvelle administration pendant deux semaines, ces chats ont également récupéré de leurs symptômes. Tous les chats sont restés exempts de symptômes 10 mois après le traitement [243].

Une étude clinique a été menée sur 31 chats souffrant naturellement de diverses formes de PIF (la forme neurologique étant exclue). Cinq chats sont morts ou ont été euthanasiés en raison de la gravité de leurs symptômes. Après un traitement de 12 semaines à 2,0mg/kg par 24h, 18 chats sont restés en bonne santé 44 semaines plus tard. Huit chats ont rechuté dans les 3 à 84 jours et ont été traités à nouveau pendant 2 semaines à 2mg/kg ou 4mg/kg. Deux d'entre eux ont rechuté une deuxième fois et ont été traités une troisième fois à 4mg/kg. Tous sauf un sont restés en bonne santé par la

suite [244]. Le suivi de l'ARN viral a montré une diminution rapide de la quantité virale après une semaine de traitement chez la plupart des chats. Le sérotype du FCoV infectant n'a pas été identifié mais étant donné que le sérotype I est le plus répandu dans les infections naturelles, les chats inclus dans cette étude ont probablement été infectés par des souches de FCoV-I. Une deuxième étude clinique a été menée un an plus tard sur quatre chats présentant une forme neurologique de PIF. Les chats ont été traités avec 5-10mg/kg de GS-441524 pendant au moins 12 semaines en injection quotidienne. Trois des quatre chats traités étaient encore en vie 254 à 528 jours après le traitement. Le dernier chat a dû être euthanasié suite à des rechutes après deux sessions de traitement, 216 jours après le début du traitement [245]. Le GS-441524 peut également être efficace pour traiter les formes nerveuses du PIF mais avec une dose plus élevée jusqu'à 10mg/kg par rapport aux formes non-neurologiques.

Même si le diagnostic de PIF n'a pas été confirmé dans tous les cas inclus dans les deux études de terrain réalisées, le GS-441524 apparaît comme l'inhibiteur du PIF le plus encourageant avec un traitement efficace sur différentes formes de PIF lors d'infections naturelles. Malgré ces résultats prometteurs, le GS-441524 n'a pas encore été autorisé pour le traitement vétérinaire.

Une autre étude rétrospective sur des chats présentant une forte suspicion de PIF a montré que 23 des 24 chats traités avec le GS-441524 ont guéri de la PIF. Le chat restant a rechuté après un traitement de 4 semaines et son propriétaire a décidé de ne pas poursuivre le traitement [246].

#### ii. Autres analogues de nucléosides

Un analogue de GS-441524, appelé Mutian X, a également été administré dans plusieurs foyers de chats, dans le but d'arrêter l'excrétion fécale du FCoV et de prévenir la transmission virale dans les chatteries. Une étude d'observation a suivi la sécrétion fécale du FCoV chez 29 chats traités par voie orale avec le Mutian X dans des chatteries [247]. Une dose de 4mg/kg par 24h, a réduit significativement l'excrétion du FCoV en quatre jours. Mutian X a également été utilisé pour traiter un chat avec succès. Un chat

mâle de 2 ans présentant une uvéite a été diagnostiqué comme souffrant d'une forme sèche de la PIF. Il a été traité avec de la prednisolone systémique et topique pendant 6 jours, et avec 8mg/kg de Mutian X par 24h par voie orale pendant 19 jours (jours 6 à 25), puis 6mg/kg pendant 21 jours supplémentaires. Cinquante jours après le début du traitement par Mutian X, le taux de diméthylarginine symétrique (SMDA), un indicateur précoce de souffrance rénale, s'est avéré être de 28µg/dL, soit le double de la fourchette de référence (<14µg/dL). L'uvéite du chat et les autres symptômes (perte de poids, anémie, taux élevé d'alpha-1 glycoprotéine acide) ayant disparu, les cliniciens ont décidé d'arrêter le traitement par Mutian X et l'ont remplacé par 100 000 unités d'interféron oméga félin (IFN- $\omega$ ), administrées par voie orale. Le taux de SMDA est tombé à 19µg/dL 35 jours après l'arrêt du traitement par Mutian X, ce qui pourrait indiquer que le taux élevé de SMDA est un effet secondaire du traitement par Mutian X. Le traitement par IFN- $\omega$  a été poursuivi pendant au moins 100 jours au moment de la rédaction de l'article. Trois des quatre chats vivant dans le même foyer que le chat PIF étaient excréteurs de FCoV et ont été traités de manière préventive avec 4mg/kg de Mutian X pendant cinq jours, ce qui a permis d'arrêter l'excrétion dans les fèces. Tous les chats étaient en vie et en bonne santé 6 mois après le diagnostic et le début du traitement [248].

La ribavirine, un analogue de la guanosine, est couramment utilisée dans les traitements antiviraux chez l'homme. Elle a permis de réduire efficacement l'infection par la souche 79-1146 du FIPV *in vitro* avec un effet maximal d'un facteur supérieur à 4 logs de réduction du titre du FIPV, lorsqu'elle a été ajoutée 1h après l'infection. La dose nécessaire, 50-100mg/mL, était cependant cytotoxique [249]. *In vivo*, 50 chatons ont été infectés expérimentalement par la souche FIPV 79-1146 et traités 18h après l'infection par 16,5 mg/kg administrés per os, par voie intramusculaire ou intraveineuse, une fois par jour pendant trois jours consécutifs, puis chaque semaine pendant trois semaines. Les chats traités par la ribavirine présentaient des symptômes exacerbés. La toxicité et les effets secondaires sévères induits par la ribavirine peuvent

être responsables de ces observations [250]. La ribavirine n'est pas recommandée pour le traitement du PIF.

D'autres analogues nucléosidiques ont également été testés *in vitro* sur la souche FIPV 79-1146 : l'adénine arabinoside, analogue de la purine, utilisée dans le traitement contre le HHV-1 et le HHV-3 [251] ainsi que la 6-azauridine, analogue de l'uridine et la 3-déazaguanosine, analogue de la guanosine. L'adénine arabinoside a inhibé de manière significative le FIPV *in vitro* avec une CI50 de 125µg/mL à 72h p.i. mais seulement lorsqu'elle est administrée avant ou en même temps que l'inoculum viral. Aucun effet cytotoxique n'a été observé jusqu'à 250µg/mL [252]. La 3-Deazaguanosine et la 6-Azauridine ont inhibé le FIPV *in vitro* avec des CI50 respectives de 10.37µg/mL et de 0,16g/mL. Leur cytotoxicité a varié de 323.32 pour la 3-Deazaguanoside à 19.4µg/mL pour la 6-Azauridine. L'effet antiviral de ces analogues nucléosidiques était perdu s'ils étaient ajoutés 1 heure après l'infection virale [253].

## 2. *SiRNA*

Le siARN est un concept thérapeutique antiviral basé sur l'ARN interférence. Cela consiste à dégrader l'ARNm par le biais d'un ARN court complémentaire spécifique à la séquence. De ce fait, le siARN peut être extrêmement sélectif et spécifique même envers les virus découverts récemment. Cependant, les virus à ARN, en raison de leur taux de mutation élevé et de leur faible fidélité de séquence, deviennent rapidement résistants au siARN. La combinaison de plusieurs siARN contre différentes cibles a donné de bons résultats contre les virus à ARN. Certains sont même testés dans des essais cliniques contre le VIH, le VHB ou le VHC [254] par exemple.

Une combinaison de 30nM d'un mélange de siARN contre la séquence leader 5', les séquences d'ARN de la nucléocapside et de la membrane a inhibé l'infection de plus de 100 fois avec un prétraitement de cellules CRFK infectées par le FIPV-II 79-1146. A 24h p.i, 5nM de siARN individuels contre la Nucléocapside ou la région 5' non traduite étaient suffisants pour inhiber plus de 80% de l'infection par le FIPV [255]. Aucun échappement viral n'a été constaté après cinq passages dans les cellules. Cependant, la

thérapie simple ou double par siARN était moins efficace et conduisait rapidement à l'émergence de mutants d'échappement viral [256]. Aucune expérience *in vivo* n'a été tentée.

Les oligonucléotides formant une triple hélice (TFO) sont des homopyrimidines qui se fixent dans le sillon majeur de brins nucléotidiques doubles. Cette fixation a lieu sur des cibles spécifiques, généralement d'une longueur de 10-30nt avec une purine sur un brin et une pyrimidine sur l'autre [257]. Bien que ces TFO se complexent habituellement avec l'ADN double brin, ils peuvent également se lier à l'ARN double brin ou aux hybrides ADN-ARN. Cinq TFO ciblant différentes régions du génome du FIPV (basé sur la souche FIPV 79-1146) ont été testés *in vitro*. Trois ciblaient l'ORF1a/b, un la séquence 3'UTR et l'autre la séquence 5'UTR du génome. Les cellules CRFK ont été transfectées avec 100nM de TFO 6h avant l'infection. Tous les TFO ont inhibé FIPV d'environ 5 logs, à l'exception de celui dirigé contre la séquence 3'UTR. Les auteurs ont testé le TFO1, ciblant la séquence 5'UTR, à différentes concentrations. 25nM de TFO1 n'ont pas réduit significativement l'infection par le FIPV alors que 50nM ont réduit l'infection de 5 logs [258]. L'effet antiviral des TFOs semble être plus prononcé que celui du traitement par siARN, mais des études supplémentaires sont nécessaires, notamment pour étudier la possibilité d'émergence d'un échappement viral.

### *c. Inhibiteurs de la synthèse des protéines*

Deux inhibiteurs de la synthèse des protéines ont été testés *in vitro* : l'acide fusidique et l'hygromycine B. Tous deux sont des antibiotiques. L'acide fusidique se lie au facteur d'élongation G (EF-G) et empêche son remplacement dans le ribosome, inhibant ainsi la synthèse des protéines. L'hygromycine B est un aminoglycoside qui inhibe la synthèse des protéines en stabilisant l'ARNt dans le site accepteur ribosomal. Les deux molécules ont réduit l'effet cytopathique induit par le FIPV de 3 à 6 fois *in vitro* lorsqu'elles ont été ajoutées à 2,6µg/mL pour l'Hygromycine B et à 50µg/mL pour l'acide fusidique. Les deux molécules ont eu un effet similaire lorsqu'elles ont été ajoutées 1h avant, pendant ou 1h après l'infection [253].

#### *d. Inhibiteurs de protéase*

Différents dérivés de composés peptidiques ciblant la 3CLpro peuvent inhiber le FIPV *in vitro*, lorsqu'ils sont ajoutés juste avant l'infection. La CI50 des composés variait de 0,02 $\mu$ M à 0,86  $\mu$ M avec une CC50 à 24h variant de 20 $\mu$ M à plus de 150 $\mu$ M [259]. Parmi ces composés, les plus prometteurs étaient GC376 et GC373. Avec une CI50 respective de 0.07 et 0.15 $\mu$ M contre le FIPV-II à 24h p.i et une CC50 supérieure à 500 $\mu$ M, leur index thérapeutique (calculé à partir du rapport CI50/CC50) était excellent. Leur activité antivirale augmente lorsque les molécules sont utilisées en prétraitement [260]. GC376 et NPI64 (un composé homologue à GC376 avec un résidu supplémentaire de 1-naththylalanine.) ont été étudiés *in vivo*. Le GC376 inhibe la 3CLPro en formant une liaison covalente avec un résidu de cystéine de la protéase, après conversion du GC376 en une forme aldéhyde [261].

Préalablement aux études *in vivo* du traitement du PIF, la pharmacocinétique du GC376 et du NPI64 a été étudiée chez deux chats SPF. Le pic plasmatique de GC376 a été observé deux heures après l'injection sous-cutanée de 10mg/kg et les concentrations de la molécule sont restées supérieures à la CI50 (8ng/mL) pendant 18 heures. Le NPI64 a été moins facilement absorbé dans le sang, et les doses de drogue dans le plasma ne sont restées au-dessus de la CI50 (12 ng/mL) que pendant 12 heures après l'injection de 5mg/kg. Les chats SPF auxquels on a injecté 10mg/kg deux fois par jour pendant quatre semaines avec le GC376 n'ont présenté aucun effet indésirable. Au vu de ces résultats, des études d'efficacité ont été menées avec le GC376. Au total, huit chats SPF ont été infectés expérimentalement par le FIPV-I. Dans le premier groupe de quatre chats, le traitement avec 5 à 10 mg/kg de GC376 deux fois par jour a été initié lorsque des symptômes modérés de PIF sont apparus (à partir du jour 15 p.i. pour le premier chat et du jour 20 p.i. pour le dernier). Dans le second groupe, le traitement a commencé lorsque des symptômes sévères de PIF sont apparus, notamment l'apparition de liquide d'ascite. Ces chats ont d'abord été traités avec des soins palliatifs (le composé anti-inflammatoire meloxicam ainsi que des fluides sous-cutanés) puis, à

partir du jour 18 pour le premier chat et du jour 21 pour le dernier, les traitements palliatifs ont été remplacés par une injection biquotidienne de GC376 à 5-10mg/kg. Tous les chats ont été traités jusqu'au jour 34 p.i., à l'exception de deux chats du second groupe qui ont dû être euthanasiés en raison de symptômes sévères. Chez les six chats restants, les symptômes ont disparu après le traitement, et aucune rechute n'a été observée jusqu'à 8 mois après la fin du traitement. Les deux chats euthanasiés présentaient des signes de pancréatite après autopsie, mais des lésions légères ou inexistantes en lien avec la PIF. La pancréatite observée pourrait être une complication due au traitement par le meloxicam [262].

Compte tenu de ces résultats encourageants, le GC376 a été évalué sur des chats de propriétaires souffrant de PIF. Le diagnostic de PIF était basé sur les symptômes cliniques, les anomalies hématologiques et biochimiques et la détection du virus par RT-qPCR. Les chats présentant des symptômes neurologiques ont été exclus. Les chats ont été traités avec 15 mg/kg de GC376 injecté par voie sous-cutanée deux fois par jour. Sur les 20 chats traités, les symptômes ont régressé pour 19 d'entre eux dans les deux semaines suivant le traitement. Néanmoins, une à sept semaines après les traitements, les symptômes ont réapparu et les chats ont été traités pendant un minimum de 12 semaines. Treize chats ont eu des rechutes et ne répondaient plus au traitement dans les 1 à 7 semaines suivant le traitement initial ou le traitement ultérieur. Huit de ces treize chats ont développé une PIF neurologique sévère et cinq ont présenté une récurrence des lésions abdominales. Le diagnostic de PIF a été confirmé à l'autopsie pour 12 d'entre eux. Cinq chats (âgés de 3,3 à 4,4 mois) atteints de PIF humide étaient toujours en rémission 5 à 14 mois après les 12 semaines de traitement. Un autre chaton a eu une rechute 10 semaines après le traitement initial mais répondait au retraitement au moment de la rédaction de cette étude. Un autre chat de 6 ans a rechuté trois fois et a nécessité plus de 10 mois de traitement avant rémission. Au total, 7 des 20 chats étudiés ont survécu après traitement avec GC376, principalement des chatons atteints de la forme humide du PIF [263]. Les analyses des séquences de la protéase virale chez

cinq chats traités n'ont pas mis en évidence de mutations, à l'exception d'une seule. Trois mutations ont été observées dans la séquence de la protéase virale après une longue durée de traitement, mais une seule semble diminuer légèrement l'efficacité du GC376 [264]. Malgré ces résultats rassurants concernant la faible émergence de variants de résistance, la surveillance de tels événements reste à faire lors de la mise en place de traitements antiviraux de longue durée.

Un autre inhibiteur de protéase, le Nelfinavir, un composé utilisé pour traiter les patients infectés par le VIH, s'est révélé efficace pour inhiber le SARS-CoV. *In vitro*, le Nelfinavir inhibait le FCoV-II NTU156 dans les cellules fcwf-4 avec une CI50 de 8,19 $\mu$ M. Cette valeur était plus élevée que pour l'inhibition du SARS-CoV (CI50 : 0,048 $\mu$ M) probablement en raison des différences de séquence entre la protéase 3CLPro du FCoV et du SARS-CoV. En effet, seuls sept des 18 sites de liaison du Nelfinavir identifiés sur la 3CLPro du SARS-CoV sont conservés dans le FCoV. Contrairement à ce qui a été observé avec le SARS-CoV [265], le Nelfinavir perdait son activité antivirale contre le FCoV s'il était ajouté après l'entrée du virus dans les cellules. De manière encourageante, le Nelfinavir a également été administré par voie orale à neuf chats sains excréteurs de FCoV à raison de 6,25 mg à 50 mg/kg/jour sans qu'aucun effet secondaire ne soit observé. Cependant, les auteurs n'ont pas précisé l'impact du Nelfinavir sur l'excrétion du FCoV [266].

#### *e. Inhibition des protéines de la cellule hôte*

La conception d'antiviraux ciblant directement les virus à ARN est un défi en raison de leur taux de mutation élevé et de leur potentiel d'échappement à l'inhibition. Une stratégie possible pour éviter ce problème consiste à concevoir des composés ciblant les protéines de l'hôte qui sont utilisées par le virus. Ainsi, l'échappement viral par mutation est moins probable.

L'U18666A est un composé amphiphile cationique qui inhibe le transport du cholestérol et empêche la libération du cholestérol des lysosomes. U18666A cible la protéine hôte Niemann-Pick C1 (NPC1), impliquée dans le trafic cellulaire du

cholestérol. La CC50 de U18666A était de 97,6 $\mu$ M. Il a été démontré que l'U18666A avait un effet inhibiteur sur quatre souches de FCoV-I en prétraitement à des doses comprises entre 0,2 et 20 $\mu$ M mais qu'il n'a aucun effet sur la réplication de FCoV-II *in vitro* [267]. L'U18666A a ensuite été testé *in vivo* chez des chats SPF. Après infection par la souche KU-2 du FIPV-I, l'U18666A a été injecté par voie sous-cutanée à raison de 2,5 mg/kg au jour 0, et de 1,25 mg/kg aux jours 2 et 4. Du PBS a été injecté au groupe témoin. Deux chats sur cinq du groupe témoin ont développé un PIF ainsi qu'un chat sur cinq dans le groupe traité. Tous les chats, quel que soit le traitement, ont excrété de l'ARN du FIPV dans leurs excréments. Cette expérience *in vivo* a été déclarée non concluante en raison du faible nombre de chats symptomatiques dans le groupe témoin [268].

L'itraconazole (ICZ), comme l'U18666A, interagit avec la NCP1 cellulaire et induit une accumulation de cholestérol dans les lysosomes, inhibant ainsi le transport du cholestérol dans la cellule hôte. Par ailleurs, l'itraconazole inhibe la biosynthèse de l'ergostérol, en agissant sur la protéine de liaison à l'oxysterol (OSBP) [269]. L'itraconazole est un composé antifongique utilisé en médecine vétérinaire pour traiter les infections fongiques chez les chats et les chiens. L'ICZ inhibe efficacement la réplication du FCoV-I (avec un indice de sélectivité compris entre 349 et 1426 pour trois souches de FCoV-I) à la fois en prétraitement des cellules et lorsqu'il est ajouté 1 ou 3h après l'infection. La réplication du FCoV-II n'a été cependant que légèrement diminuée en présence de l'ICZ [270]. En tant que traitement vétérinaire approuvé, la pharmacocinétique de l'ICZ chez le chat a été décrite précédemment : une dose de 10mg/kg per os est associée à une concentration sanguine maximale de 1,6 $\mu$ M d'ICZ, qui atteint 4,8 $\mu$ M lorsque les chats sont traités deux fois dans un intervalle de 12h [271]. Comme la CI50 nécessaire pour inhiber le FCoV-I était inférieure à 1 $\mu$ M, l'ICZ pourrait être un agent thérapeutique intéressant. Une étude a évalué l'effet antiviral de l'itraconazole en combinaison avec l'ADA, un anti-TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) humain. Dans cette étude, trois des dix chats SPF infectés par la souche FCoV-I KU-2

ont développé des symptômes de PIF. Le traitement par ADA et ICZ a débuté dès l'apparition des symptômes, correspondant aux jours 21, 32 et 34 post-infection pour les trois chats. Chaque chat a été traité deux fois au cours des quatre premiers jours avec 10 mg d'ADA et quotidiennement avec 50 mg d'ICZ pendant chacun des 30 jours du traitement. Pendant cette période, les symptômes cliniques se sont améliorés pour deux chats tandis que le troisième chat, le seul à avoir développé une ascite, n'a pas répondu au traitement et a dû être euthanasié [268]. Dans une étude de cas, un chaton appartenant à un client et présentant une PIF effusive a été traité avec 10mg/kg d'ICZ deux fois par jour et 1mg/kg de prednisolone une fois par jour. L'ARN du FCoV dans les selles et l'accumulation de liquide pleural ont initialement diminué mais le chat a commencé à présenter des symptômes neurologiques et a dû être euthanasié après 38 jours de traitement [272]. L'examen post-mortem a confirmé le diagnostic de PIF. Malgré une certaine amélioration des symptômes, le traitement avec l'itraconazole n'a pas réussi à guérir la PIF.

La cyclosporine A (CsA) est une macromolécule immunosuppressive qui se lie aux cyclophilines, des protéines chaperonnes capables de catalyser le changement de conformation cis/trans de la proline. Cette interaction bloque la calcineurine, qui à son tour inhibe la translocation du facteur nucléaire des cellules T activées du cytosol vers le noyau. L'effet antiviral de la CsA est probablement dû à son interaction avec les cyclophilines cellulaires, car de nombreuses études ont démontré qu'elles sont des facteurs essentiels du cycle de vie des coronavirus. Dans les cellules fwcf-4, la CsA était cytotoxique à haute dose (CC50 de 14,1 $\mu$ M) et inhibait le FIPV de manière dose dépendante à des concentrations de CsA comprises entre 0,16 et 10  $\mu$ M en traitement post-infection [273]. Un traitement par CsA a été tenté chez un chat appartenant à un client, souffrant d'une forme humide de PIF. L'administration de la CsA s'est faite à des doses allant de 25mg/kg à 75mg/kg. Les symptômes et l'épanchement ont régressé mais une rechute est survenue au 251ème jour après le traitement et le chat est mort

d'insuffisance respiratoire après 264 jours de traitement [274]. Cependant, sans examen post-mortem, le diagnostic de PIF n'a pas été confirmé.

Tableau 4 : Molécules ayant un effet antiviral sur FCoV (repris de Delaplace et al. 2021 [275]).

Composé	Souche	CI50 <sup>1</sup> ( $\mu$ M)	CC50 <sup>1</sup> ( $\mu$ M)	IS	Test <i>in vivo</i>	
peptides HR (FP5)	FIPV-II NTU156	1,33	>200	>150		[230]
Dyphillin	FIPV-II NTU156	0.59	5.99	10.15		[276]
Dyphillin nanoparticule	FIPV-II NTU156	0.098	77.26	7884		
GNA	FIPV-II 79-1146	0.2 <sup>oo</sup>	>2 <sup>**</sup>			
	FIPV-I Black	0.012 <sup>oo</sup>				
HHA	FIPV-II 79-1146	0.06 <sup>oo</sup>	>2 <sup>**</sup>			[277]
	FIPV-I Black	0.004 <sup>oo</sup>				
UDA	FIPV-II 79-1146	0.17 <sup>oo</sup>	2.2 <sup>**</sup>			
	FIPV-I Black	0.02 <sup>oo</sup>				
Chloroquine	FIPV-II 79-1146	21.2*	325,3 $\alpha$	15.34		[241]
Chloroquine (diphosphate)	FIPV-II NTU156	27.92*	37.50*	1.34	Chats SPF	[278]
Chloroquine	FIPV-II 79-1146	0,38	82,31 <sup>***</sup>	216		[239]

Hydroxychloroquine	FIPV-I	48.7*	515.7 $\alpha$	10.59		[241]
	KU-2					
	FIPV-II	30.3*	515.7 $\alpha$	17.02		[241]
	79-1146					
GS-441524	FIPV-II	3.5*	>100*	>28.6	Essai	[278]
	NTU156					
	FIPV-II	0.78*	>100-		clinique	[243]
Mefloquine	FIPV-II	0.74-			Cinétique	
	79-1146	5.71* - 7.89**	15.13***		pharmaceutique	[239]
Ribavirin	FIPV-II	41.7**	ND	ND	Chats SPF	[279]
Adenosine arabinoside	FIPV-II	125	ND	ND		[279]
	79-1146					
3-Deazaguanosine	FIPV-II	10.37**	323.32**	31.18		[253]
6-azauridine	FIPV-II	0.16**	19.4**	121.2		[253]
	79-1146					
siRNA L2 (leader 2)	FIPV-II	$\alpha$ 0.0012	ND	ND		[255]
	79-1146					
siRNA N1 (nucleocapsid 1)	FIPV-II	$\alpha$ 0.0018	ND	ND		[255]
	79-1146					
Fusidic acid	FIPV-II	75**	232.56**	3,1		[253]
Hygromycin B	FIPV-II	2.25**	29.94**	13,31		[253]
	79-1146					

GC376	FIPV-II 79-1146	0,04	>150	>3750	Essai clinique	[260]
	FIPV-II NTU156	0.4–2*	>50*	>25		[280]
NPI64	FIPV-II 79-1146	0.04	61.91	1548	Cinétique pharmaceu tique	[260]
Nelfinavir	FIPV-II NTU156	8.19°	11.45**			[266]
U18666A	FIPV-II 79-1146	>50**	97.6**	488	Chats SPF	[268]
	FIPV-I KU-2	0.2**				
Itraconazol	FIPV-I KU-2	0.219**	208**	950.6		
	FIPV-I UCD1	0.597**	208**	348.7		[270]
	FIPV-I UCD4	0.146**	208**	1426	Chats SPF	
	FIPV-II 79-1146	>160**	208**	<1.3		
	FIPV-I KU-2	0.7	121**	172.9		[281]

<sup>1</sup> \* indique le temps post infection : \* 48h, \*\* 72h, \*\*\* 96h, x 36h, ° 15h, °° pour 6h, et pas de symbole pour 24h. L'Index de sélectivité (SI) est calculé par le ratio CC50 /CI50. GNA : *Galanthus nivalis* agglutinin. UDA : *Urtica dioica* agglutinin. HHA : *Hippeastrum hybrid* agglutinin. ND : Non disponible, SPF : Specific Pathogens Free. x temps non spécifié

#### *f. Thérapie combinée*

Une autre solution pour éviter l'éventuel échappement des virus aux antiviraux thérapeutiques est la thérapie combinée. Des traitements efficaces des infections chroniques par le VHC [282,283] et le VIH [284] reposent sur cette stratégie. Les combinaisons de composés, ciblant différentes étapes du cycle de réplication virale, peuvent avoir des effets synergiques, et permettent d'utiliser des doses plus faibles qu'en monothérapie, avec une cytotoxicité ou des effets secondaires potentiellement plus faibles.

C'est le cas de la thérapie combinée entre le Nelfinavir et le GNA par exemple. Lorsqu'ils ont été ajoutés à des cellules pré-infectées avec une MOI de 0,1, le Nelfinavir et le GNA n'ont pas eu d'activité antivirale significative en dessous des doses cytotoxiques. Cependant, l'addition de Nelfinavir à 9,41  $\mu\text{M}$  avec des doses de GNA comprises entre 0,12 et 0,48 nM, ou l'addition de 0,48nM de GNA avec des doses de Nelfinavir comprises entre 6,27 et 9,41 $\mu\text{M}$  ont complètement inhibé l'infection par le FCoV, sans cytotoxicité [266].

Une étude (qui n'a pas encore été évaluée par des pairs) [285] décrit le crible de 89 composés contre le FIPV-II, puis a évalué l'activité antivirale avec différentes combinaisons de composés. La molécule GC376 à 20 $\mu\text{M}$  a été utilisée en combinaison avec 9 autres composés à 10 $\mu\text{M}$ . La combinaison présentant l'activité antivirale la plus efficace était le GC376 à 20 $\mu\text{M}$  avec 10 $\mu\text{M}$  d'Amodiaquine, une molécule utilisée dans le traitement de la malaria. Cette combinaison a réduit l'ARN du FIPV de  $10^7$  fois et a montré un effet synergique important comparé à la monothérapie.

Takano *et al.* ont évalué l'effet antiviral d'une combinaison de HCQ et d'Interféron oméga (IFN- $\omega$ ) sur les cellules fcwf-4. Après une exposition de 24h à 100 $\mu\text{M}$  d'hydroxychloroquine et 10 000 U/mL d'IFN- $\omega$ , la viabilité des cellules était de 95%. L'effet antiviral de cette combinaison a ensuite été évalué sur trois souches du FIPV-I, UCD1, UCD4 et KU2 ainsi que sur le FIPV-II 79-1146. HCQ à 100 $\mu\text{M}$  et IFN- $\omega$  à 10 000U/mL incubés indépendamment pendant 1h ont réduit les titres viraux d'environ

10 fois dans chaque cas, mais pour les trois souches FIPV-I et FIPV-II testées, la combinaison de HCQ et IFN- $\omega$  a fortement réduit la réplication virale de plus de 1000 fois, au moins [241].

Lee *et al.* ont également observé un effet inhibiteur synergique lorsque des cellules infectées par le FIPV-II étaient traitées par une combinaison du peptide FFP5 ciblant le domaine HR2 de la protéine de spicule et de l'Interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ). Un effet inhibiteur complet a été observé lorsque 10 $\mu$ M de FFP5 a été associé à 1000 UI d'IFN- $\alpha$ , le titre viral étant réduit jusqu'à un facteur 10<sup>4</sup> [230].

Malgré ces résultats prometteurs, les thérapies combinées n'ont pas été tentées *in vivo* chez les chats infectés par le PIF à ce jour. Etant donné que les derniers grands succès en matière de thérapies antivirales (HIV, HCV, etc) ciblent plusieurs étapes de la réplication virale, il est donc important de développer des antiviraux contre diverses étapes de la réplication de FIPV.

Dans ce cadre, nous nous sommes penchés sur la caractérisation d'inhibiteurs de protéines de l'hôte, similaire à la cyclosporine A, un inhibiteur prometteur, mais comprenant des défauts, dont son effet immunosuppresseur. Certains inhibiteurs de cyclophilines ont été explorés dans le cadre de cette thèse.

### III. CYCLOPHILINES

---

#### A. GENERALITES SUR LES CYCLOPHILINES

Les cyclophilines sont des protéines cellulaires appartenant à la super famille des immunophilines. Les immunophilines ont initialement été caractérisées pour leur capacité à se lier à des molécules immunosuppressives, la cyclosporine A pour les cyclophilines (et notamment son interaction avec la cyclophiline A) et FK506 pour les FKBP, un autre groupe d'immunophilines.

Les cyclophilines partagent un domaine commun d'approximativement 109 acides aminés, entourés par d'autres domaines spécifiques à chaque cyclophiline, qui permettent une spécialisation fonctionnelle ou sont associés à une localisation subcellulaire.

Ces protéines se retrouvent dans tout le domaine du vivant, aussi bien chez les métazoaires, les plantes, les champignons que les bactéries. Leur structure est très conservée, et elles ont toutes une fonction peptidyl-prolyl isomérase (PPI). Le domaine PPI des cyclophilines permet de stabiliser l'état de transition des conformations *cis* et *trans* des prolines, accélérant ainsi leur isomérisation. Fonctionnellement, cette activité joue un rôle important pendant le repliement des protéines et leur assemblage [286].

La structure 3D des cyclophilines forme deux poches, une contenant le domaine PPI catalytique, et une poche « gardienne » contiguë au domaine catalytique qui permettrait la spécificité de la liaison avec les substrats [287] (Figure 14).

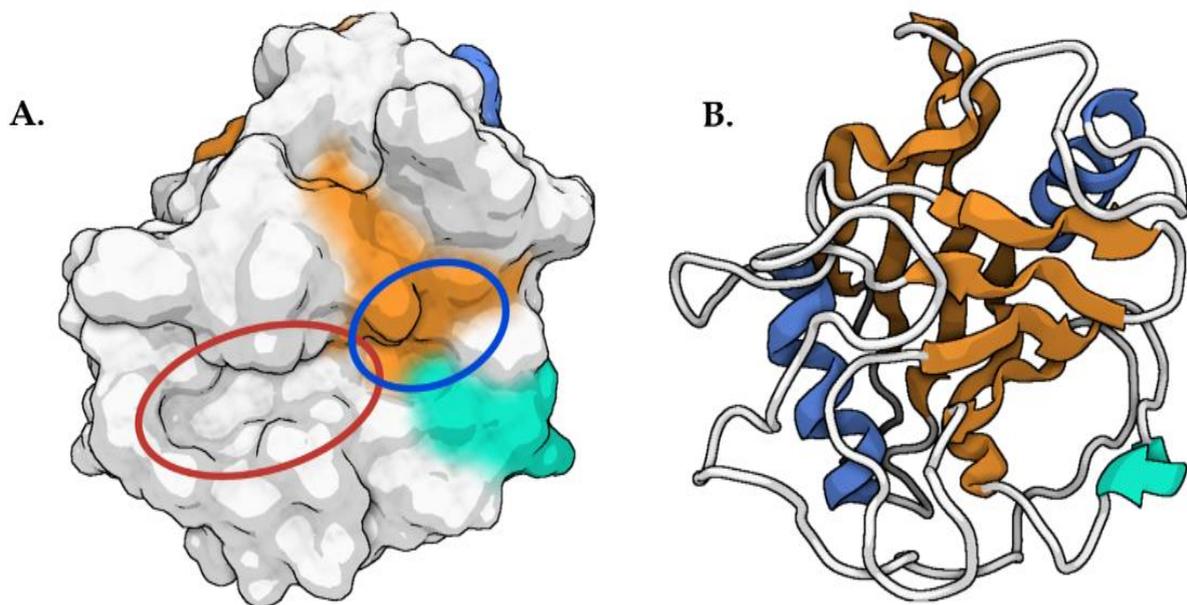


Figure 14 : Structure de CypA basée sur la structure PDB 10CA. (A) : surface représentée. Le cercle rouge représente la localisation approximative de la poche gardienne [288]. Le cercle bleu représente la localisation approximative du site actif. (b) Structure stylisée. Les couleurs indiquent différents types de structures secondaires avec les feuillets bêtas en orange, les hélices alpha en bleu. Créée sur Biorender

Il existe 18 cyclophilines [289] chez l'Homme, dont sept considérées comme majeures : CypA à E, Cyp40 et CypNK [286].

CypA, une protéine de 18kDa chez le chat, est la cyclophiline la plus abondante chez les eucaryotes comme les procaryotes. CypA constitue 0.1 à 0.4% du total protéique d'une cellule humaine [290] et est normalement localisée dans le cytosol. En cas de stress oxydatif, elle est acétylée et excrétée hors de la cellule et participerait dans des voies de signalisations autocrine [291] et paracrine [292].

La Cyclophiline B, une protéine de 24kDa chez le chat, est normalement localisée dans le RE où elle régule le repliement de protéines. Elle peut également contribuer à la prolyl 3-hydroxylation (P3H) et lysine (Lys) hydroxylation des protéines du collagène [293]. La CypB peut être clivée et se retrouver dans le milieu extracellulaire [294].

Les cyclophilines A et B sécrétées pourraient jouer un rôle dans l'immunité. En effet, les CypA et CypB sécrétées se fixent sur le récepteur transmembranaire CD147 qui est présent à la surface des granulocytes, monocytes et lymphocytes T CD4+. Par ce mécanisme, les formes sécrétées de CypA et CypB ont une action chimioattractive pour les leucocytes, et joue aussi un rôle plus direct dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire [295,296]. Il a été montré que l'interaction CypA/CD147 induit la production de la métalloprotéinase MMP-9, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  [297].

La Cyclophiline D est une cyclophiline mitochondriale, de 22kDa chez le chat. Elle est connue comme régulateur des fonctions mitochondriales, en contrôlant la perméabilité du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP). Certaines études suggèrent aussi qu'elle joue un rôle dans la chaîne de transport des électrons [298].

Les cyclophilines peuvent avoir d'autres fonctions variées en dehors de leur rôle de protéine chaperonnes. Certaines cyclophilines comme PPIG, PPIE, PPIL1 et PPIH font partie du splicéosome, un complexe cellulaire de protéines et ARN permettant l'épissage des ARNm cellulaires. D'autres sont capables de se lier à la polymérase ARN II. Une association entre les splicéosomes et/ou machinerie de

transcription et les cyclophilines semble exister chez de très nombreuses espèces, bien que les cyclophilines impliquées ne soient pas les mêmes d'une espèce à l'autre. Une hypothèse est que les cyclophilines pourraient participer à l'assemblage/désassemblage du spliceosome et/ou son association à la machinerie de transcription, grâce à leur activité de chaperonne et de transport de protéines [299].

Etant donné leur implication dans de nombreuses voies cellulaires, les cyclophilines sont également suspectées d'avoir un rôle dans un certain nombre de pathologies impliquant des protéines mal repliées. Par exemple, la CypA extracellulaire est impliquée dans certaines maladies vasculaires notamment à cause la dégradation de matrice extracellulaire due à l'abondance de MMP-9 ou à une expression de molécules de l'inflammation. La CypA pourrait jouer un rôle dans le dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique qui contribuerait à la progression de maladies neurodégénératives comme Alzheimer [289]. Des études suggèrent que des Cyp pourraient contribuer à la prolifération de certains cancers [300] comme la CypA et le cancer du sein [301], des ovaires [302] ou des poumons [303] ou encore la CypB et le cancer gastrique [304] ou le cancer endométrial [305].

Des inhibiteurs de cyclophilines ont été développés et sont étudiés comme traitements pour ces pathologies, ainsi que dans le cas d'infections virales (voir page 83).

## **B. LES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES**

La cyclosporine A (CsA) a été isolée du champignon *Tolyplocladium inflatum* en 1970. La CsA est un peptide cyclique composé de 11 acides aminés. Dans les cellules, la CsA forme un complexe ternaire avec la CypA et la calcineurine. En plus d'inhiber CypA, ce complexe inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine, nécessaire à la translocation du facteur NFAT (Nuclear Factor Activation T-Cell), ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activation des lymphocytes T [306] (Figure 15). Ainsi, en plus de son activité inhibitrice de cyclophilines, CsA a donc une activité immunosuppressive qui a permis de révolutionner le monde de la greffe [307].

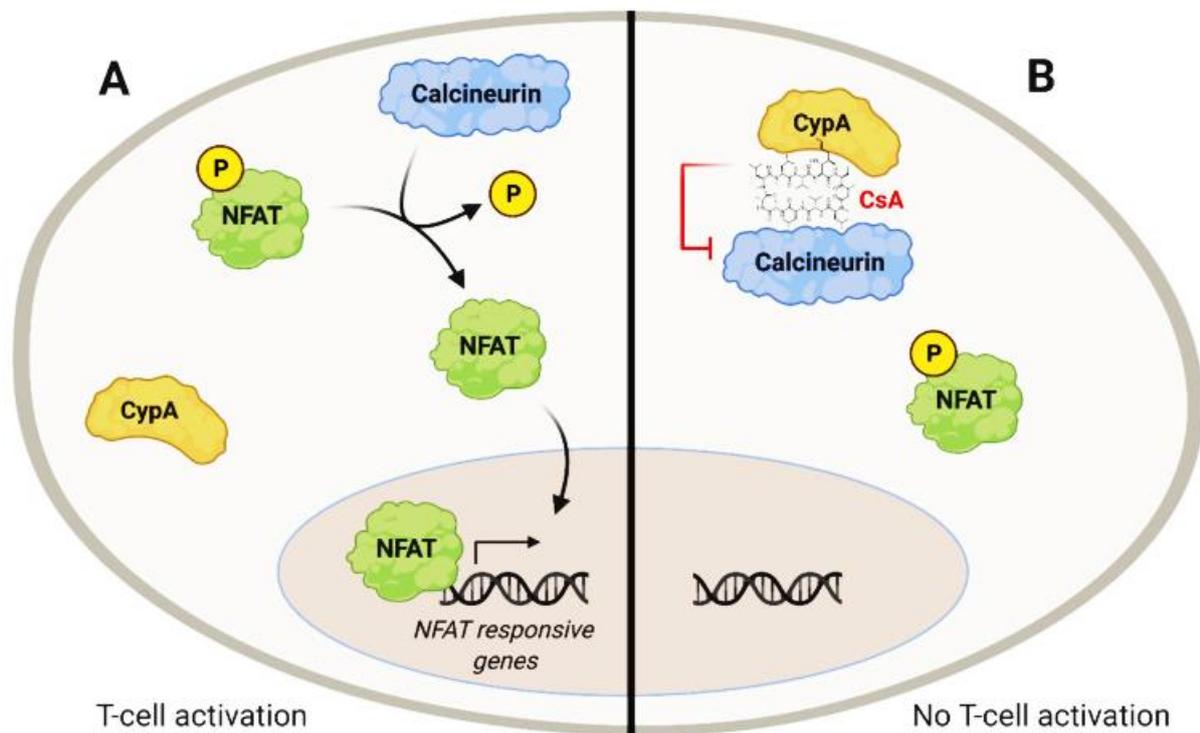


Figure 15 : Mécanisme d'inhibition de NFAT par CsA. A. La calcineurine catalyse la déphosphorylation du facteur nucléaire d'activation des lymphocytes T (NFAT), permettant sa translocation nucléaire et l'activation des lymphocytes T. B. CsA se lie à CypA, permettant au complexe CypA-CsA de se lier à la calcineurine et de l'inhiber, ce qui empêche la déphosphorylation et la translocation nucléaire de NFAT. Schéma de C.E. Gallardo-Flores et Colpitts. 2021 [308].

Des inhibiteurs de Cyp (CypI) non-immunosuppresseurs ont été obtenus en modifiant chimiquement la CsA. Parmi ces CypI, les plus connus sont l'Alisporivir, NIM811 et SCY-635. L'Alisporivir et la CypA forment des complexes similaires à ceux de CsA/CypA, mais l'Alisporivir n'est pas capable de se lier de manière stable à la calcineurine et n'est donc pas immunosuppresseur.

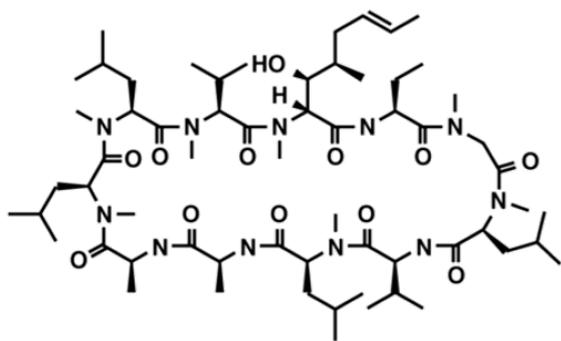
Des CypI non dérivés de la CsA ont été développés plus récemment. Il s'agit de la famille des sanglifehrin, comprenant les sanglifehrin A, B et C. Ces molécules sont produites par une bactérie *Streptomyces*. Les sanglifehrin ont une action immunosuppressive indépendante de la calcineurine. Des dérivés de sanglifehrin non-immunosuppresseurs ont été créés [306].

Tous les dérivés de sanglifehrin et CsA ont pour inconvénient d'être des molécules macrocycliques de grande taille (Figure 16), leur conférant une perméabilité cellulaire

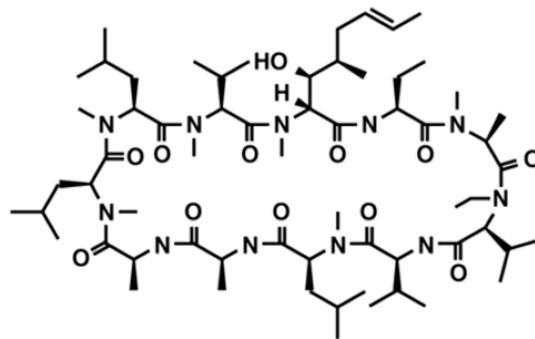
médiocre. Il existe aussi un doute sur de potentielles interactions avec d'autres drogues, ainsi que d'effets secondaires non liés à l'inhibition des Cyp. L'Alisporivir, en combinaison avec de l'Interféron- $\alpha$  pegylé a par exemple été associé à des cas de pancréatites aiguës lors d'un essai clinique de phase III pour un traitement du virus de l'Hépatite C [309].

Une nouvelle famille de CypI, non dérivée de CsA ou de la sangliféhrin a été développée par l'équipe 18 de l'UMR955 INSERM à l'Hôpital Henri Mondor, pour parer à ces défauts. Cette famille d'inhibiteurs a été développée en utilisant une approche FBDD (pour conception de médicaments par la méthode des fragments ou « fragment-based drug design » en anglais). Des fragments de molécules de très petite taille ( $<300 \text{ g mol}^{-1}$ ) ont été sélectionnés pour leur capacité à se lier au domaine catalytique et à la poche gardienne ainsi que leur pouvoir d'inhibition de l'activité PPIase [287].

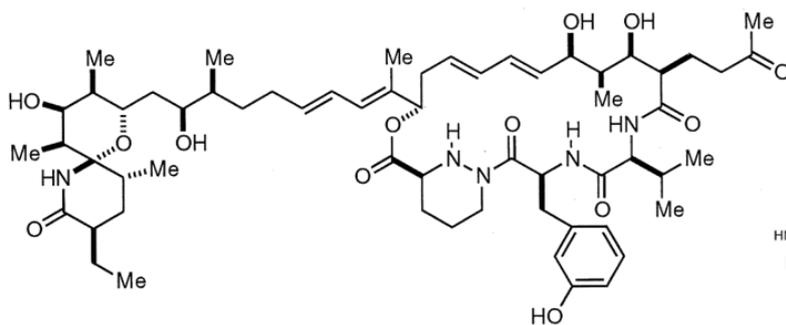
Cette nouvelle famille de molécules de petites tailles, ou Small-molecule Cyclophilin Inhibitor (SM-CypI) a été utilisée et caractérisée au cours de cette thèse pour son effet antiviral sur le coronavirus félin.



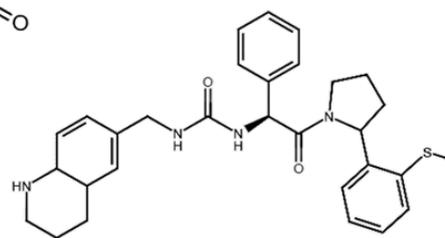
Cyclosporine A



Alisporivir



Sanglifehrin A



SM-CypI 832

Figure 16 : Structure des principaux inhibiteurs de cyclophilines.

## C. CYCLOPHILINES ET VIRUS

L'effet de la cyclosporine A sur les virus est connu depuis 1983 [310] mais ce n'est qu'en 1993 qu'un rôle direct des cyclophilines dans la réplication de virus est décrit pour la première fois [311]. Depuis, les cyclophilines ont été impliquées dans le cycle viral de nombreux virus, des virus à ADNdb aux virus à ARNsb, positifs comme négatifs, et du virus de champignons [312] aux virus humains.

### 1. Virus de l'immunodéficience humaine

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est un virus à ARN simple brin positif. Il appartient à la famille des *Retroviridae*. Sa polyprotéine Gag est clivée par une protéase virale après relargage du virion et donne les protéines de capsid (CA), de

matrice (MA) et la nucléocapside (NC) qui s'assemblent pour former la capsidie au sein du virion.

Les Cyp A et B interagissent avec la protéine Gag du VIH et peuvent être détectées à l'intérieur des virions [313]. La CypA stabilise la capsidie du VIH en se liant à trois monomères de protéines de capsidie CA simultanément [314]. De manière intéressante, l'interaction CypA/CA a un rôle très variable selon l'espèce hôte infectée.

Ainsi, déstabiliser l'interaction entre CypA et CA augmente l'infectiosité du VIH dans les cellules de primates non humains, mais la diminue dans les cellules humaines. Cette différence serait due à TRIM5 $\alpha$ , un facteur de restriction humain spécifique aux protéines de CA. L'association de CypA et CA empêcherait l'association de TRIM5 $\alpha$  humain aux protéines CA dans les virions, les rendant résistants à ce facteur de restriction [315].

La protéine virale Tat du VIH est palmytolée par un complexe impliquant entre autre la cyclophiline A. La palmytoylation de Tat empêche sa sécrétion, et permet son accumulation dans les cellules, où elle influe sur de nombreuses machineries cellulaires (en inhibant par exemple la phagocytose ou la neurosécrétion). De manière intéressante, dans les cellules infectées, les CypA interagissent avec Gag et CA, entraînant une déplétion de ces cellules en CypA disponibles. Tat interagit avec la membrane plasmique et est sécrétée en dehors de ces cellules. Tat extracellulaire est ensuite endocytée par la plupart des types cellulaires. Par conséquent, la palmytoylation et accumulation de Tat a lieu spécifiquement dans les cellules non-infectées [316].

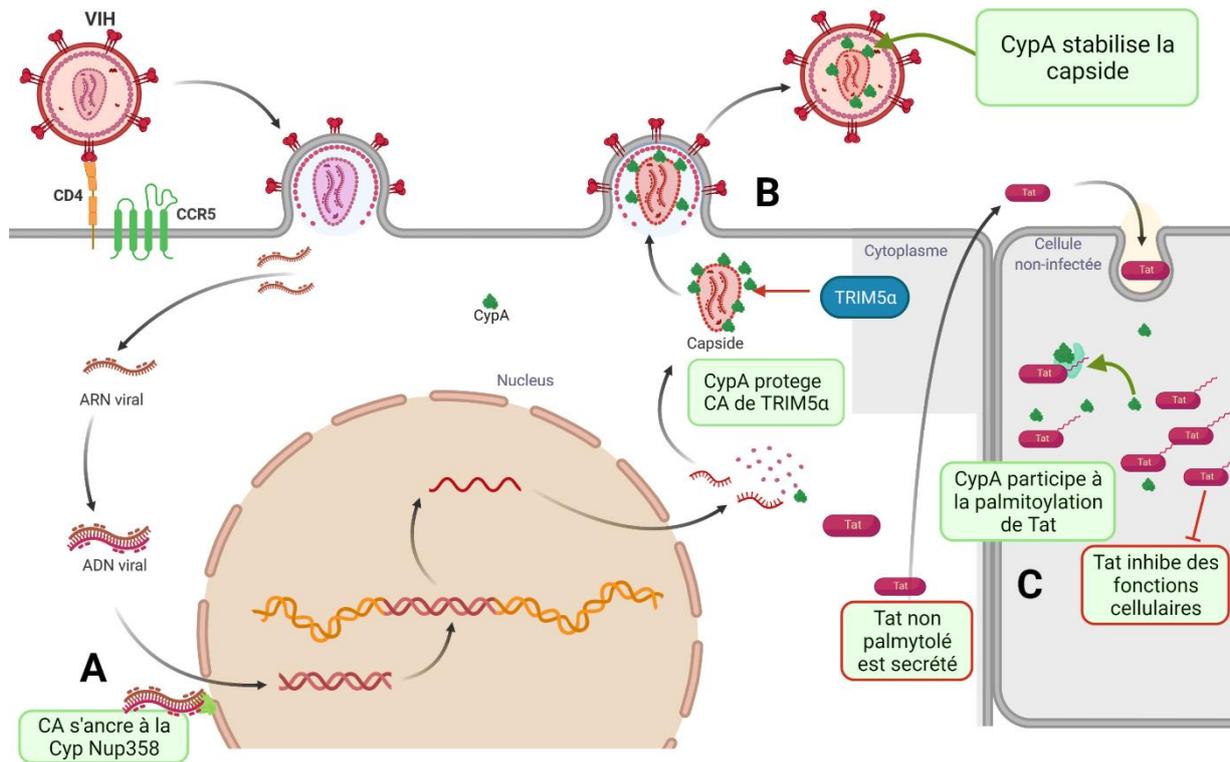


Figure 17 : Fonctions des cyclophilines dans le cycle du VIH. A : Ancrage de la capside à la cyclophiline Nup358. B : L'interaction CypA/CA protège CA de la dégradation par TRIM5α. C : En absence des interactions CA/CypA, la palmitoylation de Tat par CypA induit l'inhibition de fonctions cellulaires. Créée sur Biorender.

Les cyclophilines réguleraient également l'engagement des virions dans les machineries d'import nucléaire, ce qui aurait aussi pour conséquence de modifier les zones d'intégration du VIH dans le génome cellulaire de la Cyp Nup358 [317]. La CypB intracellulaire régit l'import nucléaire du VIH via son domaine N-ter, indépendamment de l'activité PPI. Elle est aussi surexprimée dans les macrophages infectés par le VIH [318]. La Figure 17 résume les différentes fonctions des cyclophilines au cours du cycle du VIH.

## 2. Flavivirus

Les Flavivirus sont des virus enveloppés à ARN positif. Leur génome code une polyprotéine qui est clivée en une douzaine de polypeptides par des protéases cellulaires et virales comprenant plusieurs protéines structurales et non-structurales (nommées NS1-5) remplissant divers rôles dans la réplication des Flavivirus. NS5b est

par exemple la polymérase virale RdRp. Comme pour les Coronavirus, leur réplication a lieu dans des structures cellulaires composées de membranes issues du RE détourné par le virus, appelés organelles de réplication (RO). Les protéines NS4b et NS5a sont responsables de ces modifications du RE, avec un rôle supplémentaire de NS5a dans l'assemblage des particules virales.

#### *a. Virus de l'hépatite C*

Le virus de l'hépatite C (HCV) peut provoquer des infections chroniques, responsable d'hépatite pouvant mener à des cirrhoses et cancers du foie chez l'Homme. Près de 58 Millions de personnes souffrent d'infection chronique à HCV dans le monde. Depuis qu'il a été démontré que la CsA inhibe la réplication de HCV en 2003 [319], les interactions de Cyp et HCV sont beaucoup étudiées. Des CypI ont même été utilisées pour le traitement de HCV dans des essais cliniques avec un certain succès [320].

La présence de CypA est essentielle à la réplication de HCV [308] et une étude a démontré que la résistance de HCV à la CsA peut être obtenue par l'apparition de mutations dans NS5a et, de manière beaucoup plus mineure sur NS5b [321]. Il a été démontré que NS5b, la polymérase virale, interagit avec CypB et que cette liaison permettrait d'améliorer sa liaison avec l'ARN viral, et ainsi d'augmenter la synthèse d'ARN viral [322].

Des interactions entre NS5a et CypA ont également été montrées. NS5a possède un domaine désordonné riche en proline, NS5a-D2 qui permet à NS5a de se lier à l'ARN. L'interaction de ce domaine avec la CypA est essentielle pour la réplication du virus [323]. La dimérisation de NS5a régule son interaction avec CypA [324] et l'ubiquitinylation du résidu K308 de NS5a par ISG15 accroît les interactions NS5a/CypA [325]. L'apparence du RE des cellules infectées par HCV est modifiée en présence de CypI [326] avec une inhibition de la formation de nouvelles organelles de réplication.

La CypA serait donc impliquée dans plusieurs étapes du cycle de réplication de HCV, au niveau de la formation des complexes de réplication NS5a/NS5b/ARN<sub>v</sub> [327,328] ainsi que la mise en place des RO.

Il a aussi été montré que les interactions NS5a/CypA joueraient un rôle dans l'inhibition de l'immunité innée, en inhibant la PKR, inhibant ainsi l'activation de IRF1 [329].

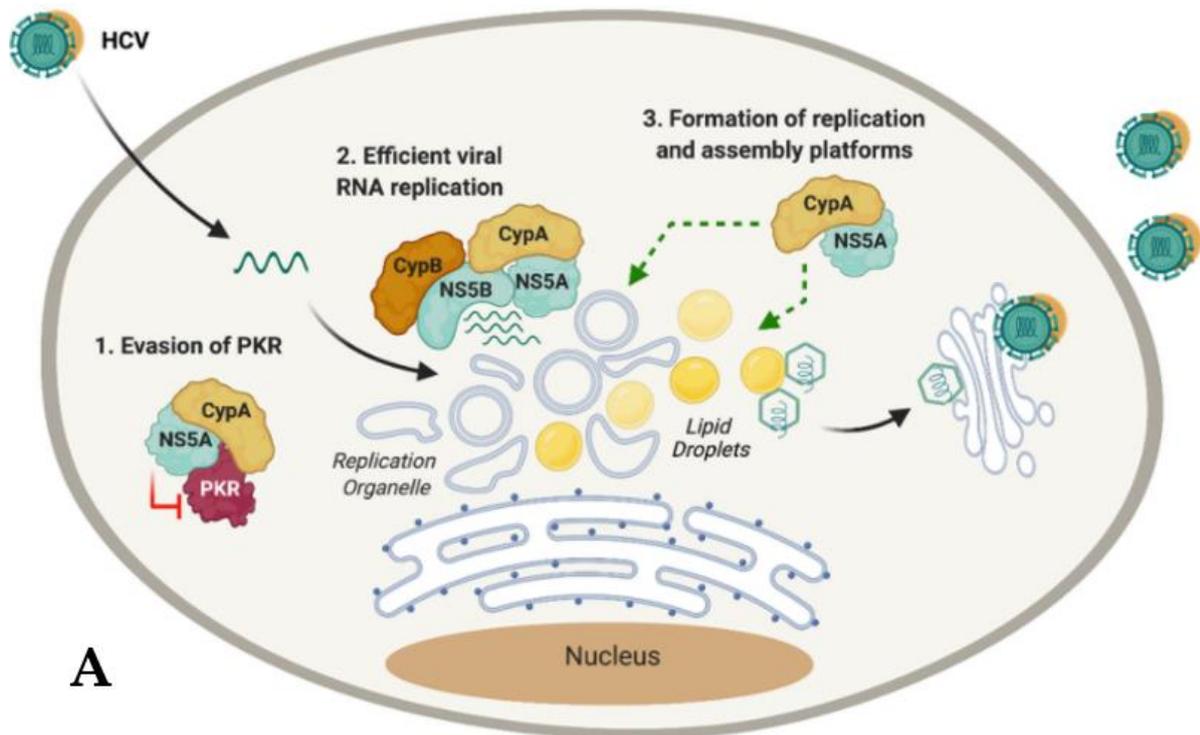
#### *b. Autres flavivirus*

De manière intéressante, des rôles similaires des cyclophilines ont été décrits pour d'autres Flavivirus (Figure 18).

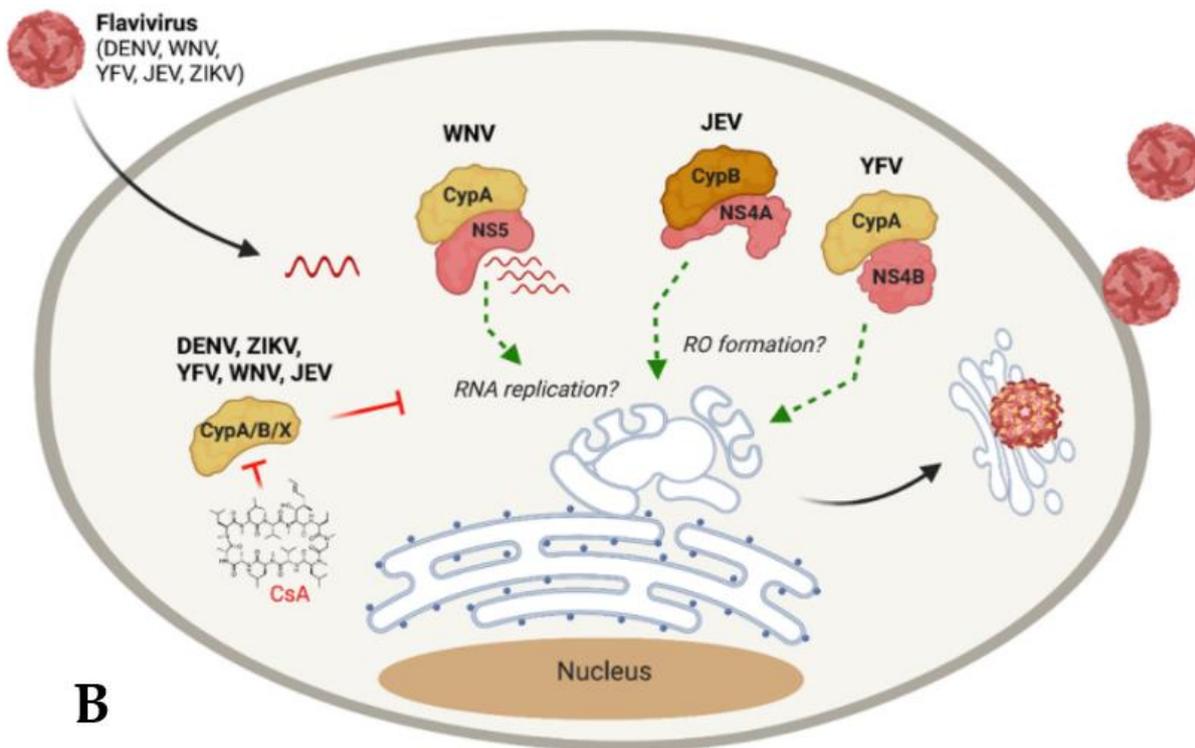
Le West Nile Virus (WNV) est un arbovirus responsable d'atteintes neurologiques chez l'Homme et le cheval, avec pour réservoir animal des oiseaux. Comme pour HCV, CypA interagit avec la polymérase RdRp NS5 de WNV et l'ARN<sub>v</sub>, à l'intérieur des complexes de réplication. Cette interaction a un effet pro-viral. La CsA inhibe la réplication de WNV à une étape correspondant à la synthèse des ARN<sub>v</sub> [330].

Des études de protéomiques ont aussi montré des interactions avec des cyclophilines chez deux autres Flavivirus responsables d'arboviroses, le Virus de la fièvre jaune (YFV) et le virus de l'encéphalite japonaise (JEV). NS4a de JEV [331] et NS4b [331] de YFV interagissent respectivement avec CypB et CypA. Ces deux protéines virales jouent un rôle dans la formation des organelles de réplication, à l'instar de NS5a de HCV.

La CsA atténue aussi l'inhibition de la voie Interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) qui est induite par la protéine virale NS5B [332] de JEV.



**A**



**B**

Figure 18 : Rôle des cyclophilines dans la réplication des Flaviviridae dans les cellules mammifères. A. Hepacivirus. B. Flavivirus. HCV : virus de l'hépatite C, JEV, virus de l'encéphalite japonaise, YFJ : virus de la fièvre jaune, DENV, virus de la Dengue, ZIKV virus Zika, RO : organelle de réplication, CsA : Cyclosporine A, CypA : Cyclophiline A. Figures de C.E. Gallardo-Flores et Colpitts. 2021 [308].

De manière intéressante, un rôle des cyclophilines a aussi été démontré en dehors des hôtes mammifères pour deux autres Flavivirus. Les protéines NS1 du virus de la dengue (DENV) et du virus Zika (ZIKV) sont secrétées en dehors des cellules de moustique par une voie de sécrétion non-conventionnelle grâce à un complexe cavéoline chaperon. Ce complexe comprend entre autres les cyclophilines CypA et Cyp40/CypD et l'immunophiline FKBP52 [333]. ZIKV et DENV sont des arbovirus donnant des infections parfois bénignes chez l'Homme mais pouvant se compliquer respectivement en microcéphalie chez le fœtus de la femme enceinte infectée ou en fièvre hémorragique pour DENV.

### **3. Virus Influenza**

Le virus de la grippe (Influenza virus) est un virus à ARN segmenté négatif. Son génome est composé de 8 segments codant les 14 protéines du virus Influenza dont : les polyprotéines PB1, PB2, PA, la protéine de Nucléocapside NP, l'hémagglutinine HA, la neuraminidase NA et les protéines de matrice M1 et M2 [334].

CypA se lie à M1, et empêche son entrée dans le noyau cellulaire, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle viral du virus de la grippe. Cette inhibition est indépendante de l'activité PPI de la CypA. CypA accélère la dégradation de M1 via le système d'Ubiquitine Protéasome. CypA empêcherait la liaison de M1 à AIP4, une ligase ubiquitine E3. AIP4 ubiquitine M1 aux résidus K102 et K104. Cette ubiquitinylation est essentielle à la réplication du virus de la grippe et jouerait aussi un rôle dans l'importation de M1 dans les noyaux [335]. Des souris transgéniques surexprimant la Cyclophiline A étaient plus résistantes à l'infection par Influenza que les souris contrôles [336].

De manière intéressante, la CsA inhibe tout de même la réplication des virus de la grippe par plusieurs voies dont au moins certaines sont indépendantes de la calcineurine, CypA, CypB et la Glycoprotéine P, les ligands majoritaires de CsA. Un mécanisme serait que la CsA consolide la liaison entre CypA et M1. La CsA pourrait aussi empêcher l'export de l'ARNm viral en dehors du noyau cellulaire [337].

La CsA inhiberait aussi une étape tardive de l'infection post-synthèse des protéines virales. Ce mécanisme serait indépendant des CypA, CypB et la Glycoprotéine P [338].

#### **4. Autres virus**

##### ***a. Tombusvirus***

Les tombusvirus sont des petits virus à ARNs de polarité positive qui infectent des plantes. La CypA mammifère et ses analogues Roc1 et Roc2 chez la plante sont capables de se lier à l'ARN viral ainsi qu'aux protéines virales p33 et p92. Ces interactions inhibent le recrutement de l'ARNv et sa synthèse ainsi que l'assemblage du complexe de réplication viral. Cette inhibition est indépendante de l'activité PPI de CypA [339]

##### ***b. Rotavirus***

Les Rotavirus sont des virus non enveloppés à ARN double brin qui provoquent des diarrhées. La CypA peut inhiber la réplication des Rotavirus en facilitant la production d'IFN- $\beta$  via la voie de signalisation c-Jun N-terminal kinase (JNK). Cette activation est indépendante de l'activité PPI [340]. La CypA est aussi recrutée et interagit avec VP2, une des protéines de structure des rotavirus, dans le viroplasma, structure au sein de laquelle a lieu la réplication virale et l'assemblage des particules virales. La CypA réprimerait l'expression des protéines virales. Sa surexpression dans les entérocytes de souris corrèle avec leur résistance aux diarrhées induites par les Rotavirus [341].

##### ***c. Cytomegalovirus (CMV)***

Le CMV, ou HHV-5 (pour human herpes virus -5) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Les infections sont généralement bénignes mais peuvent provoquer des pathologies graves chez les personnes immunodéficientes et chez les femmes enceintes non-immunisées. L'expression et la sécrétion de CypA augmentent lors de l'infection par CMV. CypA extracellulaire est un ligand de CD147 qui permet l'activation de NF $\kappa$ B et de IFN- $\beta$ . Cette réponse antivirale cellulaire inhibe la réplication de CMV [343]. Cependant, la CypA aurait aussi un effet pro-viral. Elle joue

un rôle de régulation positive dans l'expression des protéines « immediate early » (IE) de CMV, qui permettent la réplication de l'ADN viral et pourrait être nécessaire à la sortie de la latence de CMV dans certains types cellulaires [345]. Lors d'une infection par CMV, la CypC se lie avec la glycoprotéine virale US2 et les molécules de Classe I HLA-A2 et participe à leur dégradation, participant à l'immunoévasion de CMV [347].

#### *d. Virus de la stomatite vésiculaire*

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est un virus à ARN négatif [348] de la famille des *Rhabdoviridae*. Ce virus cause des lésions des muqueuses chez le bétail. La CypA interagit avec la protéine de Nucléocapside de VSV et est incorporé dans les virions. La CsA ou la surexpression de CypA avec un domaine PPI non fonctionnel peuvent inhiber certaines souches de VSV en entrant en compétition avec les cyclophilines fonctionnelles endogènes, indiquant que l'activité PPI serait importante lors de cette interaction. La CypA serait utilisée par VSV lors de la transcription virale intracellulaire [348].

#### *e. Virus de la vaccine*

Le virus de la vaccine est un *Poxviridae* infectant les bovins et a servi de vaccin vivant contre un autre *Poxviridae* humain, le virus de la variole, permettant son éradication. L'infection de cellules par le virus de la Vaccine (VV) entraîne une surexpression de CypA qui se retrouve ensuite séquestrée aux viroplasmes au stade tardif de l'infection. Cette relocalisation est nécessaire à la synthèse des protéines virales tardives. CypA est aussi incorporée dans les virions, plus précisément dans le core [350].

#### *f. Virus de la rougeole*

Le virus de la rougeole (Measles virus en anglais) est un virus à ARN négatif appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et est responsable de la rougeole.

CD147, le récepteur des formes sécrétées de CypA et CypB, est un récepteur d'entrée pour le virus de la rougeole dans les cellules épithéliales. CypB est incorporée dans les virions et l'entrée du virus dans les cellules pourrait être due à l'interaction de CypB

associée aux virions et CD147 [351]. La Cyclophiline A est aussi intégrée dans les virions du virus de la rougeole, ainsi que dans celle d'un autre *paramyxoviridae*, le virus ourlien, responsable des oreillons, mais l'intérêt de cette intégration n'a pas encore été déterminée.

#### ***g. Papillomavirus humain (HPV)***

Les papillomavirus sont des virus à ADN double brin non enveloppés. Ils peuvent causer un certain nombre de pathologies chez l'Homme, allant de la verrue au cancer cervical. Ils comportent deux types de protéines, traduites par épissages alternatifs : les protéines non structurales précoces (ou « early ») E1-E7 et les protéines de structures tardives (ou « late ») L1 et L2.

Suite à l'attachement d'HPV sur les héparan-sulfates protéoglycanes (HSPG), les protéines de la capsid L1 et L2 subissent un changement de conformation qui est nécessaire pour leur transfert sur un deuxième récepteur et l'internalisation de HPV. Ce changement de conformation serait facilité par la CypB, qui permettrait l'exposition de la partie N-terminale de L2 [352]. De manière intéressante, une étude a montré qu'une souche HPV mutante, qui ne requiert pas la présence de CypB pour son internalisation reste sensible à la CsA. Cette étude a montré que *in vitro*, CypA et CypB permettaient la dissociation des protéines L1 de la capsid et que cette dissociation a lieu en présence d'un pH correspondant à celui des endosomes précoces [353].

#### ***h. Hépatite B***

Le virus de l'Hépatite B (HBV), un virus enveloppé à ADN partiellement double brin, peut mener à des infections chroniques chez l'Homme, qui peut avoir pour conséquence des cirrhoses ou cancers du foie.

De manière intéressante, une des trois protéines d'enveloppe de HBV, la protéine S ou SHB, interagit avec CypA et induit sa sécrétion [355]. Ce phénomène est aussi constaté *in vivo*, puisque le foie de souris infecté ainsi que les cellules infectées par HBV expriment moins de CypA intracellulaire et plus de CypA extracellulaire [358].

Comme décrit plus haut, la forme secrétée de CypA peut mener à une inflammation, et pourrait donc participer à la pathologie induite par HBV. De manière encourageante, HBV est aussi inhibé par plusieurs CypI, y compris *in vivo* chez des souris transgéniques infectées [354].

*i. Orf virus*

L'Orf virus appartient à la famille des *Poxviridae* causant des maladies de peau chez les chèvres et moutons. La CypB est surexprimée dans les cellules infectées par Orf virus. Il a été démontré qu'elle était nécessaire à la réplication d'Orf virus [359] et que la protéine virale ORF058, une protéine impliquée dans l'entrée virale interagit avec CypB [360].

*j. Mimivirus*

Les Mimivirus sont actuellement les plus gros virus connus. Ces virus d'amibes codent leurs propres cyclophilines capables de former des trimères. Ces mimiCyp sont localisées à la surface des virions et sont dépourvues d'activité PPI [288]. Ces Cyp sont uniquement retrouvées chez les Mimivirus, tandis que d'autres *Megavirales* codent des Cyp canoniques, similaires à leurs homologues mammifères et pourvues d'une activité PPI [361]. La fonction de ces cyclophilines n'a pas été décrites chez les Mimivirus.

*k. Rubella/ Virus de la rubéole*

Le virus de la rubéole (RV) est un virus enveloppé à ARN simple brin positif. Il cause la rubéole chez l'homme, maladie souvent bénigne mais qui peut se compliquer, notamment chez les femmes enceintes. Lors de l'infection de cellule hôte, le RV régule l'apoptose des cellules. Il peut par exemple inhiber cette apoptose par l'activation de la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) /AKT, ou via sa protéine de capsid C qui a une activité anti-apoptotique en interagissant avec des facteurs mitochondriaux de l'apoptose comme p32. Le RV est aussi capable d'induire l'apoptose, et ce en utilisant la voie de signalisation mitochondriale. La CypD/Cyp40 mitochondriale serait impliquée dans l'apoptose induite par le RV [362]

### *l. Picornaviridae*

Les *Picornaviridae* sont des virus non enveloppés de petites tailles (20-30nm) comportant un génome à ARN simple brin positif. Ces virus de vertébrés sont associés à un certain nombre de pathologies, allant du simple rhume à la méningite.

Chez les *Picornaviridae*, le coxsackievirus B3 [363] génère des myocardites chez son hôte murin. La CypA joue un rôle dans l'activation des défenses immunitaires en participant au recrutement des macrophages et lymphocytes T. L'enterovirus-71 (EV-71) utilise aussi la CypA lors de sa réplication [364]. EV-71 est sensible aux inhibiteurs de Cyp et sa multiplication diminue si la CypA endogène est déplétée. Il a été montré que CypA interagit et modifie la boucle H-I de la protéine VP1 de EV-71, la protéine de capsid virale majoritaire.

### *m. Virus de l'hépatite E (HEV)*

Le HEV est un virus non enveloppé à ARN positif. Il fait partie des facteurs majeurs d'hépatites aiguës dans le monde, après consommation de viande infectée. Une étude montrait que la présence de CsA et/ou une inhibition de l'expression de CypA et CypB permettait d'augmenter la réplication virale d'HEV [365], avec pour conséquence un effet inhibiteur de CypA et CypB sur HEV. Une étude postérieure a cependant montré que cet effet n'était observable que sur des souches de laboratoires [366].

Tableau 5 : Résumé des interactions cyclophilines/virus.

Génome	Virus	Effet des Cyp sur la réplication virale	Interactions Cyp/protéine virale	
ARN+	Virus de l'hépatite C	proviral	CypA /NS5a CypB/NS5b	[322,324]
	JEV	proviral	CypB/SN4a	[331]
	YFV	proviral	CypA/NS4b	[367]
	WNV	proviral	CypA/NS5	[368]
	ZIKV, DENV	?		[368]
	Virus de l'hépatite E	proviral pour certaines souches		[366]
	Tombusvirus	antiviral	Roc1-2/ARNv et p33 et p92	[339]
	Entérovirus 71	proviral	CypA/VP1	[364]
	CVB3	antiviral		[363]
	Virus de la Rubéole	?		
Retrovirus ARN+	Virus de l'immunodéficience humaine	proviral	CypA/Tat CypA/CA	[315,316]
ARN-	Virus de la Stomatite Vésiculaire	proviral	CypA/N	[348]
	Virus de la rougeole	proviral		[351]
ARN - segmenté	Virus de la grippe	antiviral	M1/CypA	[338]
ARNdb	Rotavirus	antiviral	CypA/VP2	[341]
ADNdb	Orf virus	proviral	CypB/ORF058	[359]

	Virus de la vaccine	proviral		
	Cytomégalo virus	eCypA antiviral iCypA et CypC proviral	CypC/US2	[342]
	Mimivirus	?		[361]
	Papillomavirus humain	proviral	CypB/L2 CypA et CypB/L1	[353,369]
ADNdb partielle ment circulaire	Virus de l'hépatite B	proviral	CypA/SHB	[355]

Les interactions des virus avec les cyclophilines sont très nombreuses et variées (Tableau 4). De manière intéressante, ces virus détournent les cyclophilines pour de très diverses fonctions. Que ce soit pour son activité PPI ou de chaperonne (comme le HIV et sa protéine CA), une régulation des voies de signalisation cellulaire (comme HBV et SHBV) ou même des fonctions inédites (comme le virus de la rougeole), virus et cyclophilines ont une relation complexe et qui restent assez peu caractérisées dans la plupart des cas.

## D. CYCLOPHILINES ET NIDOVIRUS

Un certain nombre d'études a déjà été mené sur le rôle des cyclophilines dans le cycle des Coronavirus et Artérovirus [370].

### 1. Apports des études par des traitements inhibiteurs de cyclophilines

Comme mentionné précédemment, la CsA peut inhiber FCoV, mais également un grand nombre d'autres *Nidovirus* (voir tableau 5)

Tableau 6 : Effet de la cyclosporine A sur les Coronavirus et Artérovirus.

Virus		CI50	Référence
<i>Alphacoronavirus</i>	FCoV	2.7µM (48h p.i)	[371]
	SADS-CoV	<10µM (36h p.i)	[372]
	TGEV	<15µM	[371]
	PEDV	<2µM	[373]
	HCoV-229E	2.3µM	[371]
	HCoV-NL63	2.3µM (48 or 96h p.i)	[371]
<i>Betacoronavirus</i>	SARS-CoV-2	3.3µM (48h p.i)	[374]
	SARS-CoV	3.3µM (24 or 48h p.i)	[371]
	MHV	<16µM (8h p.i)	[375]
	MERS-CoV	ND*	[376]
<i>Gammacoronavirus</i>	IBV	<10µM (24h p.i)	[371]
<i>Arterivirus</i>	EAV	0.95 µM (18h p.i)	[377]
	PRRSV	5.2 µM (18h p.i)	

\*9µM de CsA permet de réduire significativement la réplication de MERS CoV sur des poumons *ex vivo*.

Dans un modèle de souris, une étude a montré que le MERS-CoV était inhibé par la CsA. Des souris C75BL/6 ont été inoculées avec un adénovirus portant le DDP4 humain au niveau de la trachée. Trois jours après la transduction, et tous les jours suivants, les souris ont été nourries avec 50mg/kg/jour de CsA, ou un contrôle DMSO, mixé dans une crème chocolat/noisette. Cinq jours après la transduction, les souris ont été infectées par voie intranasale avec MERS-CoV. Les souris étaient sacrifiées 4 ou 7 jours après l'infection. Les auteurs ont trouvé que le traitement CsA induisait le relargage d'IFN-λ dans le fluide de lavage bronchoalvéolaire. Le traitement à la CsA réduisait aussi le titre viral par rapport au contrôle DMSO et les œdèmes présents dans les souris infectées contrôles étaient absents des souris traitées à la CsA. Cette étude démontrait aussi *in vitro* que l'inhibition de MERS-CoV par CsA était due à l'inhibition de l'activité PPI de CypA ainsi qu'à l'inhibition de la voie MAPK via JNK. L'inhibition

de l'activité PPI de CypA réduisait fortement les quantités d'ARN de MERS, et correspondrait à un rôle de CypA à une étape précoce de l'infection. Les auteurs ont aussi déterminé que la présence de CsA ou ALV dans des cellules infectées par MERS-CoV menait à une surexpression de IFN- $\lambda$  par rapport à un contrôle DMSO. Ils ont aussi confirmé la surexpression d'un certain nombre d'ISG tels que MxA, PKR, OAS1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, Bst2/tetherin, RSAD2/viperin et XAF1, confirmant qu'une réponse IFN est mise en place en présence de CsA.

Les auteurs ont ensuite déterminé que IRF1, et non IRF3, IRF7 et IRF9 était surexprimé dans les cellules traitées à la CsA. Dans des cellules infectées par MERS-CoV, la sous-expression de IRF1 ou la neutralisation d'IFN- $\lambda$  par des anticorps menait à une augmentation du titre viral [378].

Chez les Artérovirus, des souches de l'artérovirus équin (EAV) ayant acquis une résistance à la CsA après passage en série ont été séquencées. Les mutations observées étaient principalement localisées au niveau de nsp5 et nsp2 [379], qui sont chez les Artérovirus des protéines contenant plusieurs domaines transmembranaires qui seraient impliqués avec nsp7 dans la formation des structures à double membrane où a lieu la réplication virale, à l'instar des nsp3, nsp4 et nsp6 des Coronavirus. Ces observations permettent d'inférer que, comme pour certains flavivirus, les cyclophilines sont impliquées dans la formation des organelles de réplication des artérovirus. De Wilde et al. concluent néanmoins que l'inhibition de la synthèse d'ARN de EAV lors des traitements par la CsA indiquerait un rôle direct de la CypA dans cette synthèse, plutôt que la simple mise en place des DMV [370].

## **2. Apports des études par déplétion cellulaires des cyclophilines**

Afin de vérifier l'importance des cyclophilines pour la réplication des Nidovirus, et de mieux comprendre le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus ou artérovirus, des expériences de déplétion cellulaire de Cyps par Knock Out (KO), shRNA ou siRNA ont été menées. Les déplétions des cellules hôtes en CypA inhibent la réplication d'EAV [377], de HCoV-NL63 [380], et FCoV [381]. Les cellules KO en

CypB résistaient aussi à la réplication de FCoV [381]. Inversement, des lignées transfectées avec CypA ou CypB exprimée de manière stable augmentaient l'infection par FCoV [381]. En revanche, ces déplétions n'ont pas ou peu d'effet sur MERS-CoV [382] et SARS-CoV [375] (voir Tableau 6). Une hypothèse avancée est qu'il pourrait y avoir une complémentation fonctionnelle par d'autres cyclophilines lorsque CypA est déplétée, et/ou qu'une faible quantité de CypA serait suffisante à la réplication virale, lorsque la déplétion n'est pas totale. Il a été montré que les particules infectieuses de coronavirus comme le SARS-CoV [383] embarqueraient des CypA dans leur capsid, et celles-ci pourraient remplacer les CypA endogènes dans les modèles de cellules KO lorsque l'infection se ferait avec une MOI suffisamment importante.

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet de déplétion en cyclophilines sur la réplication des Nidovirus. \*Une expression des Cyp était toujours détectable (>3% d'expression ARN).

	CypA	CypB	Autres Cyps	
HCoV-229E	*Effet mitigé	Pas d'effet	CypD* et CypC* : Pas d'effet	[382,384]
EAV	Inhibition	Pas d'effet	CypD* et CypC* : Pas d'effet	[382]
HCoV-NL63	Inhibition complète	Pas d'effet		[380]
MERS-CoV	Pas d'effet	Pas d'effet	CypD* et CypC* : Pas d'effet	[382]
SARS-CoV	*pas d'effet	*pas d'effet		[375]
HCoV-OC43			CypD* : inhibition de l'apoptose	[385]
FCoV	*Inhibition	*Inhibition		[381]

Pour le virus HCoV-229E, la déplétion en CypA inhibe la réplication virale dans certains types cellulaires, comme les cellules hépatocytaires Huh7 mais pas les Huh7.5

[382]. Des expériences menées sur des cellules Huh7.5 K.O. en CypA et complétées avec des CypA mutées sur différents acides aminés ont démontré l'importance du polymorphisme génétique des cyclophilines pour la réplication de HCoV-229E. Les CypA avec les mutations en position D66E, N106I ou G96D ne permettaient pas la réplication de HCoV-229E. Le virus HCoV-229E se répliquait légèrement moins en présence des CypA mutantes E134K, E84D et I89T qu'en présence de la CypA non-mutée [384]. Les mutations N106I et G96D et dans une moindre mesure D66E induisent une déstabilisation de CypA qui est dégradée plus rapidement que la CypA non-mutée [386].

Lors d'infection par HCoV-229E, des déformations du RE sont observées, avec notamment la formation de « blebs » ou bulle de RE. Ces structures contiennent plusieurs protéines du RE comme la protéine Disulfide-Isomerase (PDI) ou la cyclophiline B [387] qui sont relocalisées depuis le RE et séquestrées dans les blebs. La raison de cette relocalisation, qu'il s'agisse d'un blocage d'une voie de sécrétion, ou un autre mécanisme fonctionnel n'est pas connu.

Pour les virus PDCoV [388], PEDV, HCoV-OC43 et SADS-CoV [372] la déplétion en CypD protège les cellules hôtes de l'apoptose lors de l'infection, suggérant que ces virus utilisent la CypD pour activer l'apoptose des cellules hôtes. L'ajout de la CsA a le même effet anti-apoptotique.

### **3. Apports des études des interactions des protéines virales et des cyclophilines**

Des interactions entre les protéines virales et les cyclophilines ont aussi été montrées. SARS-CoV N et la CypA interagissent. Cette interaction a été montrée par plusieurs études indépendantes utilisant une technique de résonance plasmonique de surface [389] ou de la co-immunoprécipitation [390].

La protéine N du SARS -CoV possède au moins trois résidus prolines sur lesquels la CypA vient se fixer (P199, P13 et P42). Ces résidus prolines sont situés dans les régions désordonnées des extrémités de N. Ces régions réguleraient les interactions N/N. Par

conséquent, il est possible que la Cyclophiline A régule les interactions N/N [391]. Il a aussi été montré une interaction entre la protéine N du virus HCoV-229E et CypA et cette interaction est supprimée par les analogues non immunosuppresseurs de CsA, tel que NIM81. Les protéines N du HCoV-229E et CypB, en revanche, n'interagissent pas [387].

CD147 a récemment été montré comme facilitant l'infection des cellules par certains CoVs. Comme décrit précédemment, CypA et CypB sont des ligands de CD147. Il est donc soupçonné qu'il pourrait y avoir un rôle des cyclophilines dans l'utilisation de CD147 par les CoVs, comme ce qui a été observé pour le virus de la rougeole par exemple [392]. La protéine N du SARS-CoV interagissant avec CypA pourrait se lier à CD147 et ainsi faciliter l'infection par cette voie d'entrée.

En plus des interactions CypA/N, des interactions entre SARS-CoV nsp1 et CypA, CypB, CypH et CypG ont été montrées par crible double hybride [371].

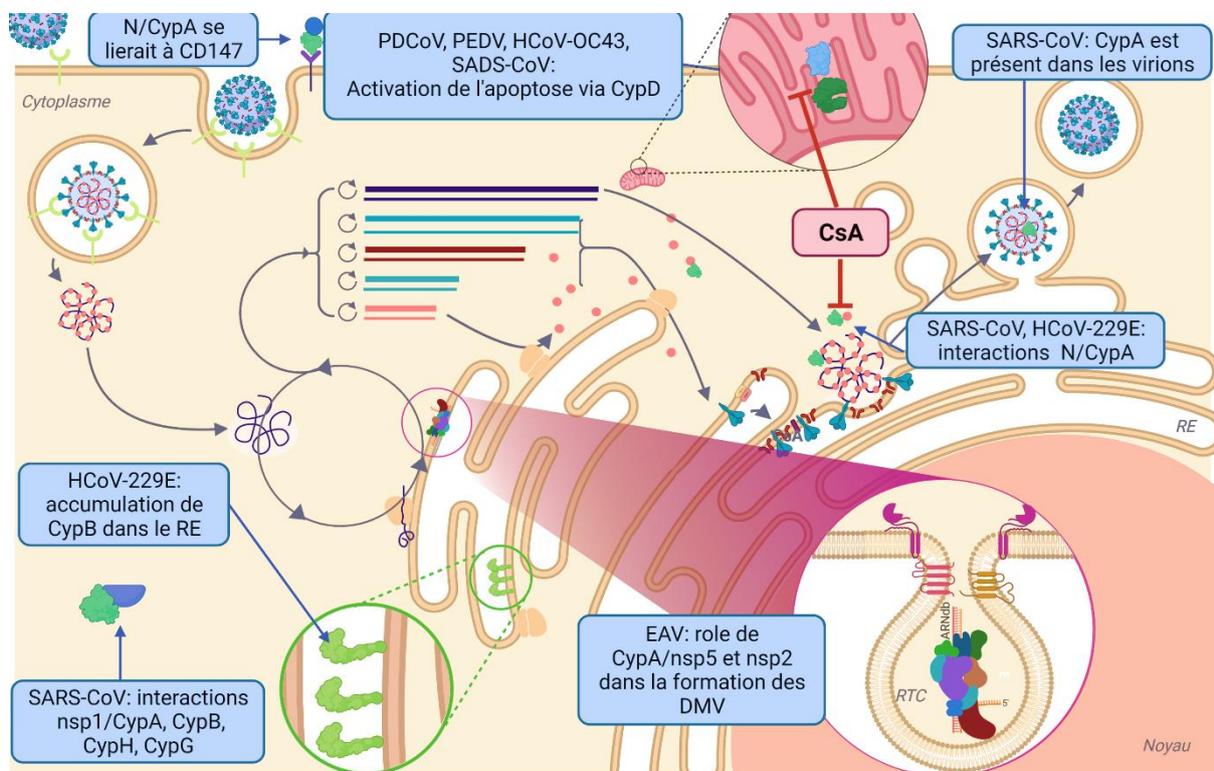


Figure 19 : Schéma récapitulatif des interactions Cyp/CoV DMV : vésicule à double membrane, EAV : artérovirus équin, RE : réticulum endoplasmique, CsA : Cyclosporine A, RTC : Complexe de réplication/transcription, ARNdb : ARN double brin.

Les cyclophilines jouent définitivement un rôle dans la réplication des coronavirus (Figure 19), mais celui-ci reste encore à caractériser. Les cyclophilines A, B et D seraient les plus impliquées mais l'étape du cycle de réplication et le mécanisme d'action sont encore inconnus.



# Objectifs de la thèse

Les cyclophilines sont des protéines cellulaires très conservées parmi les êtres vivants et détournées par de nombreux virus. Plusieurs études ont démontré qu'elles étaient essentielles pour la réplication des coronavirus. Comme pour beaucoup d'autres virus, leurs fonctions dans le cycle de réplication des coronavirus ne sont, cependant, pas encore connues.

Afin d'évaluer le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus, mon projet de thèse a consisté à caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels les coronavirus détournent les cyclophilines cellulaires au profit de leur réplication. Pour cela, nous avons défini trois sous-projets :

Premièrement, nous avons souhaité déterminer à quelle étape du cycle viral les cyclophilines sont nécessaires à la réplication des coronavirus. Pour répondre à cette problématique, nous avons utilisé une nouvelle classe d'inhibiteurs de cyclophiline, appelés SM-CypI. Ces inhibiteurs font partie d'une famille de petites molécules non immunosuppressives ayant une affinité importante pour les cyclophilines. Ils ont été développés par notre laboratoire partenaire (Equipe 18, UMR 955 Inserm). Nous avons d'abord caractérisé une banque de ces molécules sur le coronavirus félin, FIPV et avons retenu trois molécules, dont une ayant un effet antiviral particulièrement important. Nous avons ensuite réalisé des tests avec ces inhibiteurs à différents moments du cycle de réplication du coronavirus félin et avons pu déterminer que les cyclophilines sont nécessaires à une étape précoce du cycle viral.

Deuxièmement, nous avons cherché à identifier les interactions entre les protéines de coronavirus et les cyclophilines par différentes techniques. Nous avons recherché en particulier à montrer si l'interaction entre la protéine N et la cyclophiline A, montrée pour le SARS-CoV et le HCoV-229E existait aussi entre la protéine N du FIPV et la cyclophiline A féline. Nous avons aussi réalisé un crible d'interaction par

complémentation fonctionnelle avec différentes protéines du SARS-CoV-2 et la cyclophiline A humaine et avons de nouveau confirmé la même interaction entre la protéine N du SARS-CoV-2 et la cyclophiline A. Enfin, afin de définir si le rôle des cyclophilines était conservé chez les coronavirus, nous avons caractérisé l'action antivirale des SM-CypI sur l'infection par un *gammacoronavirus* aviaire IBV dans un modèle de cellules primaires aviaires. Ces expériences ont eu lieu dans le cadre d'un séjour de recherche dans l'unité VIPAC sur le site ANSES Ploufragan. Nous avons notamment pu tester l'inhibition de trois SM-CypI. Enfin, dans le cadre d'un partenariat avec l'équipe 18 de l'UMR955, nous avons initié une expérience *in vivo* de test d'un SM-CypI sur SARS-CoV-2, dans le modèle d'infection des hamsters dorés. Nous présentons ici les résultats préliminaires de cette expérience.

Ces résultats nous ont permis de définir une cible thérapeutique contre des coronavirus d'intérêts majeurs, et permettent d'approfondir les connaissances sur le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus.

# Matériel et méthodes

## I. ETUDE DE L'EFFET ANTIVIRAL DES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES SUR LE CORONAVIRUS FELIN

---

### A. MATERIEL ET ANALYSES DES RESULTATS

#### 1. Cellules et virus

##### *a. Cellules*

Les cellules utilisées lors de ce projet sont les cellules de cortex de rein de chat Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK). Elles sont maintenues à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> en DMEM 10%SVF 1% Penistreptomycine 1% Sodium pyruvate 1% Acide aminé non essentiel.

##### *b. Virus*

Le virus utilisé est la souche FIPV WSU 79-1146. Le virus est amplifié sur CRFK en flasque 75cm<sup>2</sup> en milieu de culture décrit précédemment pendant 48h. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 5000 rpm et le culot de débris cellulaire est éliminé. Les surnageants sont ultracentrifugés à 28000 rpm. Les culots sont récupérés et titrés par test de la dilution limite (décrit ci-dessous).

#### 2. Titrage des particules infectieuses dans les surnageants de culture

Les CRFK ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond plat dans 200µL de milieu de culture, à raison de 20 000 cellules par puits. Les plaques sont incubées pendant 24h. Des dilutions en série du surnageant à titrer ont été effectuées avec le milieu de culture. Six dilutions allant de 1/10 à 1/1000000 ont été faites par échantillon. Huit répliquats par dilution ont ensuite été distribués à raison de 50µl par puit, dans les plaquesensemencées la veille. Les plaques ont été incubées pendant 2h à 37°C. 150µl

de milieu de culture frais ont ensuite été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 22h supplémentaires. Le milieu a été retiré, et les puits ont été rincés avec de l'éthanol absolu. De l'éthanol absolu frais a ensuite été distribué et les plaques ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante. L'éthanol absolu a été retiré et remplacé par de l'éthanol 70%. Les plaques ont été marquées par immunofluorescence et les puits contenant des cellules fluorescentes ont été comptés. La dose infectieuse à 50 % (ID50) a été calculée à l'aide de la méthode Spearman-Kärber dans une feuille Excel préremplie (librement accessible à l'adresse <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de>) (Marco Binder, Heidelberg). Le titre en FFU/ml a été estimé en multipliant le titre en ID50/ml par un facteur de 0,56.

### 3. RT-qPCR des ARN viraux

L'ARN total des cellules est extrait avec le kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification (*ThermoFischer*). La RTqPCR est ensuite réalisée avec le kit qScript XLT one Step RTqPCR ToughMix (*Quantabio*). La  $\beta$ -actine est utilisée comme gène de ménage. Les sondes et amorces sont décrits dans le tableau 7. Un thermocycler Lightcycler 96 a été utilisé avec le programme suivant : une étape de transcription inverse à 50°C (1200s), une étape de dénaturation initiale à 95°C (600s), 40 cycles de dénaturation à 95°C (15s), d'hybridation et extension à 60°C (30s) puis 95°C (10s).

Tableau 8 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour les qPCR

Nom	Séquence
CoV F	5'-GCAATAGGGTTGCTTGACCTCC-3'
CoV R	5'-CGAGGATTGGTCATCGC-3'
CoV sonde	5'-HEX-TTCTACAGAATGGTAAGCAC-MGBEQ-3'
$\beta$ -actine F	5'- CCAGCACGATGAAGATCAAGATC -3'
$\beta$ -actine R	5'- CGGACTCGTCGTACTCCTGC -3
$\beta$ -actine sonde	5'-FAM-TGTCCACCTTCCAGCAGATG-MGBEQ-3'.

#### **4. Marquage par immunofluorescence des antigènes viraux FCoV**

Les cellules CRFK fixées ont été rincées trois fois avec du PBS. Le liquide d'ascite d'un chat infecté par le FIPV dilué au 1/500 dans un diluant d'anticorps (Zytomed) a été réparti dans les puits (50µl pour une plaque de 96 puits ou 100µl pour une plaque de 48 puits). Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes. Les puits ont été rincés trois fois avec du PBS. Un anticorps de chèvre anti-Anticorps de Chat, couplé avec Alexa 488 (Jackson Immunoresearch) dilué à 1/250 dans le diluant d'anticorps (Zytomed) a été ajouté aux puits et les plaques ont été incubées 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS. 50µl de DAPI à 1µg/ml a été ajouté aux puits pour marquer les noyaux cellulaires et les puits ont été examinés à un grossissement de 100x avec un microscope à fluorescence (Zeiss) et analysés avec le logiciel Zen.

### **B. INFECTION DE FIPV EN PRESENCE DE SM-CypI**

#### **1. Crible des SM-CypI**

Une plaque 48 puits estensemencée avec 30 000 CRFK/puit et incubée 24h. Les plaques sont ensuite infectées à une MOI 1 de FIPV en présence de 25µM de SM-CypI ou de DMSO ou de 10µM de Cyclosporine A en triplicat pour chaque condition. Un contrôle de cellules non-infectées et non-traitées est également réalisé. Les plaques sont incubées 1h à 37°C puis le milieu est retiré et remplacé par du milieu frais contenant les inhibiteurs ou du DMSO. Les plaques sont incubées pendant 24h puis les surnageants cellulaires sont récupérés et titrés.

#### **2. Ajout des inhibiteurs SM-CypI à différents temps post-infection des inhibiteurs**

Une plaque 48 puits estensemencée avec 30 000 CRFK/puit et incubée pendant 24h. Les plaques sont ensuite infectées à une MOI 1 de FIPV. Trois puits sont infectés en présence de 5µM de 83233, 25µM de 832 ou 833, ou de DMSO. Les plaques sont incubées à 37°C. A différents temps de l'infection, le milieu est retiré et remplacé par

du milieu contenant les SM-CypI ou du DMSO. Chaque condition est réalisé en triplicat. Après 24h d'infection, les surnageants de culture cellulaire sont récupérés et titrés. Le tapis cellulaires de deux surnageants sur trois est lysé avec 200 $\mu$ L du bufffer de lyse du kit MagMax CORE (Thermofischer) et les ARNs sont extraits et mesurés en RTqPCR. Le troisième réplikat est fixé à l'éthanol et est observé après marquage en immunofluorescence. Le protocole est résumé dans la Figure 20.

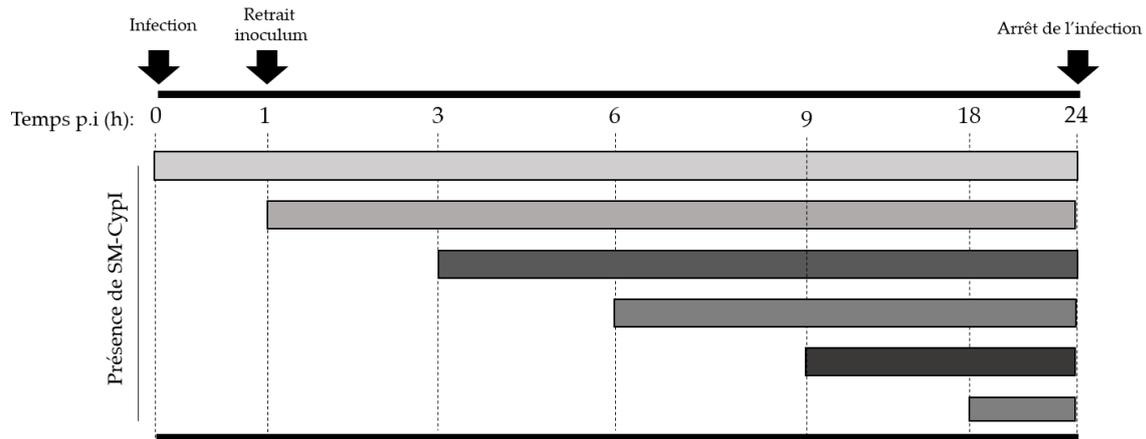


Figure 20 : Résumé de l'expérience d'addition des SM-CypI à différents temps post-infection

### 3. Test de l'effet des SM-CypI sur l'étape d'attachement du virus FIPV à son récepteur

Une plaque 48 puits estensemencée avec 30 000 CRFK/puit et incubée 24h. Les plaques sont placées 1h à 4°C. Les plaques sont ensuite infectées à une MOI 1 de FIPV en présence de 5 $\mu$ M de 83233, 25 $\mu$ M de 832 ou 833, ou de DMSO et sont incubées 1h à 4°C. Les puits sont rincés au PBS puis du milieu de culture avec molécules inhibitrices ou DMSO est ajouté. Les plaques sont incubées 24h à 37°C. Les surnageants sont ensuite récupérés et titrés. Le tapis cellulaire de deux surnageants sur trois est lysé avec 200 $\mu$ L du bufffer de lyse du kit MagMax CORE (Thermofischer) et les ARNs sont extraits et mesurés en RTqPCR. Le troisième réplikat est fixé à l'éthanol et est observé après marquage par immunofluorescence. Le protocole est résumé dans la Figure 21

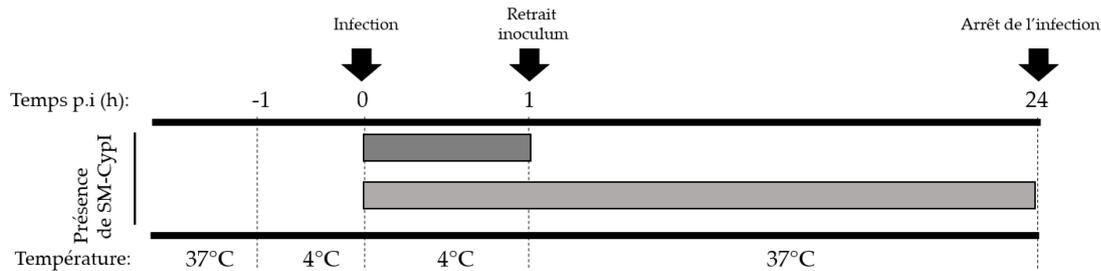


Figure 21 : Résumé de l'expérience de l'effet antiviral des SM-CypI sur l'étape d'attachement

#### 4. Test de l'effet des SM-CypI en préincubation de l'infection FIPV

Une plaque 48 puits estensemencée avec 30 000 CRFK/puit et incubée 24h. Le milieu des plaques est remplacé par du milieu contenant 5 $\mu$ M de 83233, 25 $\mu$ M de 832 ou 833, ou du DMSO puis elles sont placées 1h à 37°C. Les plaques sont ensuite infectées à une MOI 1 de FIPV en présence de milieu frais seul ou contenant 5 $\mu$ M de 83233, 25 $\mu$ M de 832 ou 833, ou de DMSO et sont incubés 1h à 37°C. Les puits sont rincés au PBS puis du milieu de culture avec ou sans SM-CypI ou du DMSO est ajouté. Les plaques sont incubées 24h à 37°C. Les surnageants sont ensuite récupérés et titrés. Le tapis cellulaires de deux surnageants sur trois est lysé avec 200 $\mu$ L du bufffer de lyse du kit MagMax CORE (Thermofischer) et les ARNs sont extraits et mesurés en RTqPCR. Le troisieme réplikat est fixé et est observé en immunofluorescence. Le protocole est résumé dans la Figure 22.

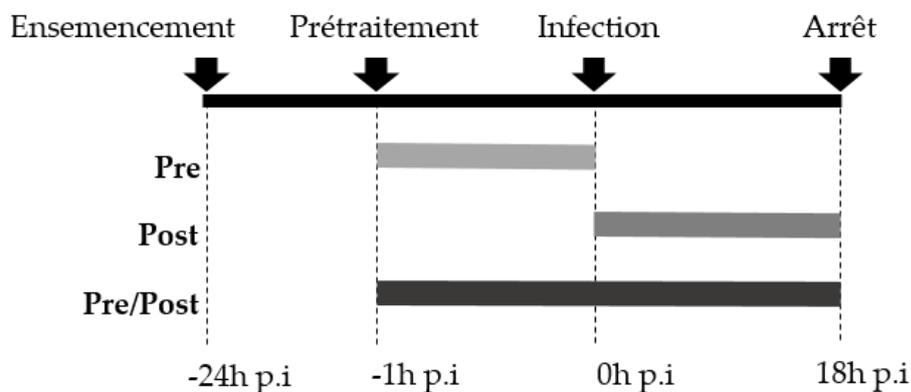


Figure 22 : Protocole de l'expérience de préincubation des SM-CypI sur l'infection FIPV

### 5. Test de la réversibilité de l'action antivirale des SM-CypI

Une plaque 48 puits estensemencée avec 30 000 CRFK/puit et incubée 24h. Les plaques sont infectées à une MOI 1 de FIPV en présence de milieu frais seul ou contenant 5µM de 83233, 25µM de 832 ou 833, ou de DMSO et sont incubées 1h à 37°C. Au bout de 3h d'infection, les puits sont rincés au PBS et du milieu de culture avec ou sans SM-CypI ou du DMSO est ajouté. Les plaques sont incubées 24h à 37°C. Les surnageants cellulaires sont ensuite récupérés et titrés. Le tapis cellulaire de deux surnageants sur trois est lysé avec 200µL du bufffer de lyse du kit MagMax CORE (Thermofischer) et les ARNs sont extraits et mesurés en RTqPCR. Le troisième répliat est fixé à l'éthanol et est observé après marquage des antigènes du FCoV en immunofluorescence.

## II. ETUDES DES INTERACTIONS DES PROTEINES VIRALES ET CYCLOPHILINES

---

### A. CELLULES

Des cellules HEK-293T d'épithélium de reins humains et des cellules HeLa (adénocarcinomes épithélium) ont été utilisées pour ce projet. Ces lignées sont cultivées dans du DMEM 10% SVF 1% Penistreptomycine 1% Sodium pyruvate à 37°C.

### B. CONSTRUCTION DES BANQUES DE PLASMIDES EXPRIMANT LES PROTEINES D'INTERET

#### 1. Obtention des gènes d'intérêt

L'ARN a été extrait avec le kit Qiagen RNA Easy plus Mini à partir de cellules CRFK infectées avec FIPV ou de sang de chat complet. La complémentation des ARN est faite grâce au kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (*Invitrogen*) à partir de 5µg d'ARN et en utilisant 50ng de "random hexamère". Un thermocycleur Biorad T100 a

été utilisé avec une hybridation de 10 minutes à 25°C puis une élongation de 50 minutes à 50°C et la dégradation des ARN de 5 minutes à 85°C.

Les ADNc sont ensuite utilisés comme matrice avec des amorces des séquences spécifiques flanquées de séquences attb1 (pour les amorces F) et attb2 (pour les amorces R) décrits dans le tableau 8 afin de pouvoir cloner les gènes d'intérêt dans des plasmides par le système "Gateway". Pour les protéines obtenues après clivage (comme les nsp), un codon stop a été ajouté sur l'amorce. Les PCR sont réalisées avec le kit Mastermix Phusion II Hot Start (*ThermoFischer*). 250ng d'ADNc servent de matrice et un thermocycleur Biorad T100 est utilisé avec le programme suivant : Initiation de la polymérase à 98°C (30s) une fois puis dénaturation à 98°C (10s), hybridation à 56°C (30s) et élongation à 72°C (30s/kb selon les amplicons) pendant 35 cycles, suivi d'une élongation finale à 72°C (10min).

Les produits des PCR sont déposés sur gel pour électrophorèse et la taille des amplicons est vérifiée.

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la construction des banques de plasmides

Nom	Taille (nt)	Séquence spécifique (5'→3')
CyPA R	18	ATGGTCAACCCCATCGTG
CyPA F	21	TTAGATTTGTCCACAGTCAGC
nsp1 F	21	ATGAGTTCCAAACAATTTAAG
nsp1 R	18	GCCGTTTCCAGTACGGGC
nsp4 F	19	TCAGGTTTCTTTGATGTAC
nsp4 R	20	CTGCAGTGTTGAATTGACAC
nsp6 F	21	AATCTTCAGAGTGGTAAAGTG
nsp6 R	19	CTGCACAGTGGATATTTTG
nsp13 F	23	GCTGCAGGTATGTGTGTTGTGTG
nsp13 R	21	CTGTAAACCAATCTTTGAGTC
nsp15 F	24	AGTCTAGAAAATGTGGCTTTTAAC
nsp15 R	20	TTGGAGTTGTGGATAGAAGG
S1 F	18	TTGGCTGGCAATGAAAAC
S1 R	18	CGTTGTCCAATGTGTTAG
RBD F	24	GTAATATATGAAGAAGGAGACAAC
RBD R	18	GACAGGTTCAATCAAC
S2 S	24	TCTATATATAATTACACAAGTGAG
S2 R	20	AGGCCATTTTACATAAGTTT
Cytodomaine F	20	TGCTGTTTTAGCACAGGTTG
Cytodomaine R	25	CTATTCAATTGGTTCATAATTTTCA
N R	22	TTAGTTCGTAACCTCATCAATC
N F	19	ATGGCCACACAGGGACAAC
<b>Flanc des amorces</b>		
F attb1	29	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
R attb2	30	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
R attb2 (stop)	33	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTA

## 2. Construction des plasmides donneurs par le système Gateway

Les amplicons sont ensuite insérés dans des plasmides pDONR207 à l'aide du kit Clonase™ Gateway™ BP Clonase II Enzyme Mix (*Invitrogen*) à raison de 5µl d'amplicons et de 300ng de plasmides. Les plasmides sont ensuite transformés dans des bactéries (protocole ci-dessous).

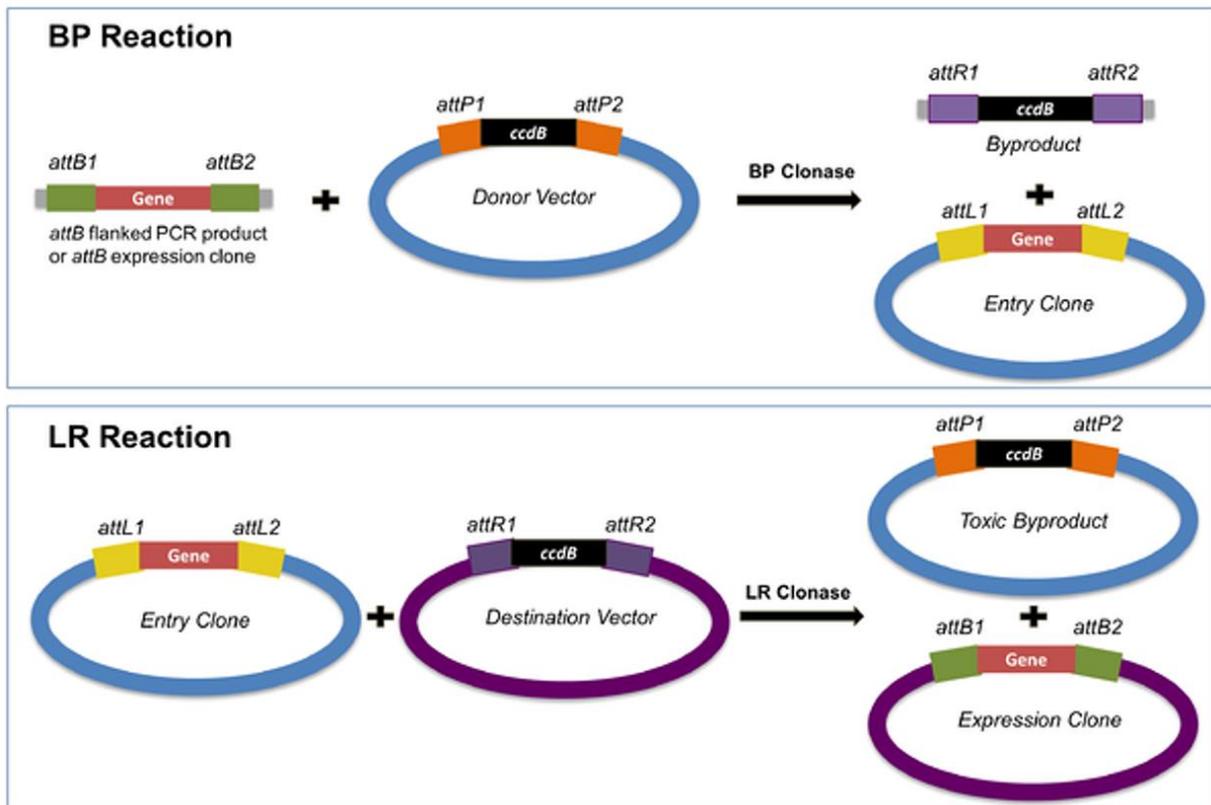


Figure 23 : Principe du système de clonage Gateway. Repris de Maria Sorano, *Plasmids 101 : Gateway Cloning*.

## 3. Plasmides d'expression

Les plasmides d'entrée sont ensuite recombinaisonnés avec les plasmides de destination (pDEST) avec le kit Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (*Invitrogen*) (Voir Figure 23) 150ng de plasmide d'entrée sont mis à incuber avec 150ng de pDEST contenant soit le domaine 3XFLAG, soit le domaine GST, soit l'un des deux sous-domaines Luc1 ou Luc 2 de la Nanoluc (voir Figure 24) sur la nuit.



Figure 24 : Banques de plasmides d'expression construites par clonage Gateway. Deux banques contenant les fragments Luc1 ou Luc2 de la Nanoluciférase ont été réalisées correspondant l'une aux différents ORFs du SARS-CoV-2, et l'autre à la cyclophiline A. Une banque contenant certains ORFs du SARS-CoV-2 et de FIPV et la cyclophiline A humaine ou féline fusionnés avec la séquence codant soit pour la protéine GST soit pour l'étiquette 3XFLAG a aussi été construite. Repris de A. Gambino.

#### 4. Transformation bactérienne

Après une incubation sur la nuit, 3µl des plasmides d'entrée (voir Figure 23) ou 2µl des plasmides d'expression sont transformés dans 40µl de bactéries Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells (*ThermoFischer Scientific*) pour les réactions BP et 15 µl de bactéries compétentes E.Coli. DH5alpha pour les réactions LR. Le mélange est laissé à incuber sur glace pendant 30min et un choc thermique est fait à 42°C pendant 45 sec puis le mélange est à nouveau placé sur glace pendant 2min avant l'ajout de 150µl de milieu SOCS (Super Optimal broth with catabolite repression). Les bactéries transformées sont cultivées pendant 24h en milieu solide LB (Lysogeny Broth)-agar avec 100µg/ml d'Ampicilline à 37°C pour les plasmides d'expression ou 50µg/ml de Gentamycine pour les plasmides donneurs, puis une colonie a été récupérée et cultivée dans du milieu liquide LB avec l'antibiotique approprié pendant 24h à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin plasmid Kit de Macherey-Nagel à partir de 4mL de culture liquide. Pour cela, les bactéries ont été lysées via un tampon alcalin/SDS (sodium dodecyl sulfate) puis le lysat est purifié par liaison de l'ADN plasmidique sur une membrane de silice, les déchets cellulaires sont

alors éliminés et l'ADN est élué dans de l'eau milliQ. Les concentrations d'ADN ont ensuite été mesurées au Nanodrop.

## C. TRANSFECTION

Les transfections sont réalisées en plaques 96 puits ou 6 puits ou en lamelles 8 puits (Labtek). Les plasmides d'expression de cyclophiline et protéine virale (ou contrôles) (voir Figure 23b) sont mélangés à quantité égale dans du tampon JetPrime. Du "reagent" JetPrime dilué dans du tampon est ensuite ajouté à chaque plasmide. Les mélanges sont laissés à incuber 10 minutes à température ambiante puis du milieu frais est ajouté et les plasmides sont distribués au goutte à goutte dans les puits. Les cellules sont incubées 36 à 48h à 37°C.

## D. TESTS DES INTERACTIONS

### 1. Test par complémentation fonctionnelle de la nanoluciférase

Le principe de l'expérience est résumé dans la figure 24

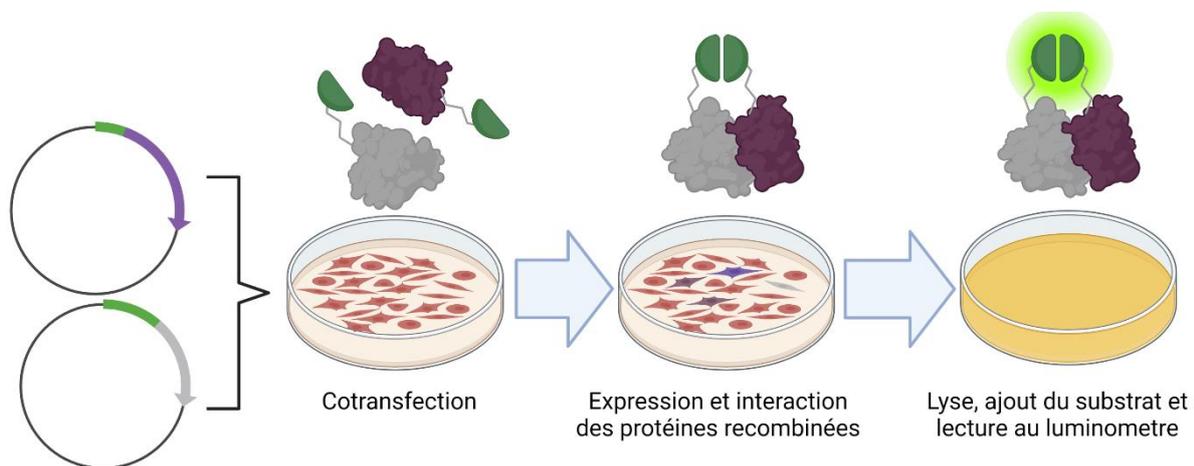


Figure 25 : Principe des tests d'interactions de complémentation fonctionnelle de Nanoluciférase. Chaque protéine d'intérêt virale et cyclophilines est exprimée avec le fragment 1 (Luc1) ou 2 (Luc2) de la Nanoluciférase au niveau de l'extrémité N-terminale (Configuration N) ou C-terminale (Configuration C). Huit combinaisons peuvent alors être testées après transfection des plasmides d'expression en cellules HEK-293T.

Les cellules HEK-293T en plaque 96 puits sont transfectées avec deux plasmides d'expression contenant le domaine N-ter de la luciférase (Luc1) de *Oplophorus gracilirostris* pour l'un, et son domaine C-ter pour l'autre (Luc2), positionnés en C-ter ou N-ter de la protéine taguée. Les plaques sont incubées pendant 48h à 37°C. Les cellules sont lysées avec le tampon de lyse Passive Lysis Buffer (*Proméga*). La luminescence est révélée avec le kit Nano-Glo® Luciferase Assay System (*Proméga*) et est mesurée avec un luminomètre. Des plasmides pDEST non recombinés (plasmides pDEST « vides » avec les sous domaines Luc1 ou Luc2 seulement) sont transfectés comme contrôles.

## 2. Test de ligation par proximité (PLA)

Le principe de l'expérience est résumé dans la Figure 26.

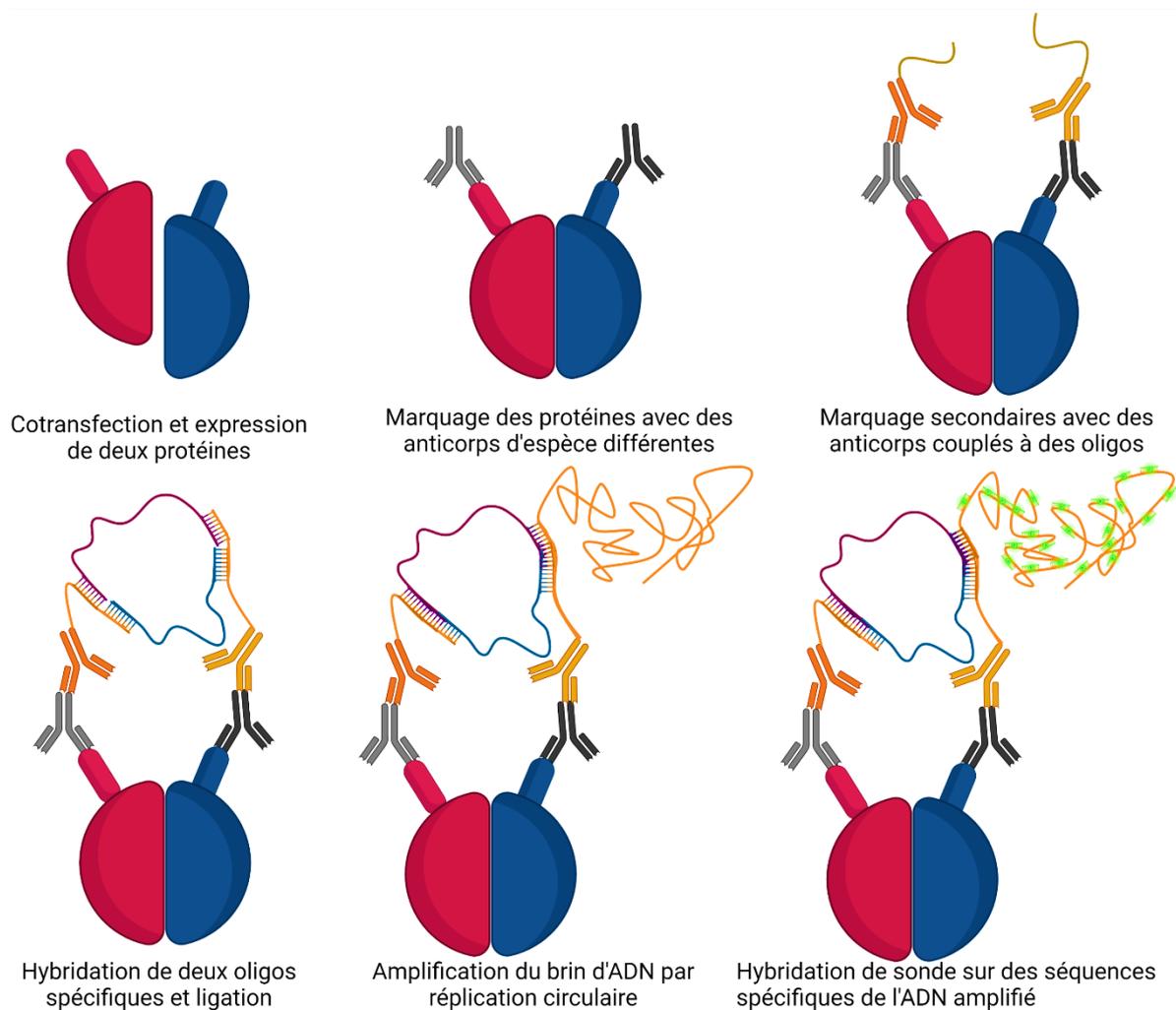


Figure 26 : Principe du test de ligation de proximité.

Les cellules HeLa sontensemencées en lamelles 8 puits (Labtek) et sont transfectées avec les plasmides Cyclophiline A féline marquée avec l'étiquette 3X FLAG et Nucléocapside du FIPV marquée avec l'étiquette GST. Des contrôles non transfectés ou transfectés avec les plasmides pDEST GST et 3X FLAG, n'exprimant pas de protéines recombinantes sont aussi réalisés. Les cellules sont incubées 48h à 37°C. Les puits sont rincés au PBS puis fixés au Paraformaldéhyde (PFA) pendant 10 minutes).

Après deux rinçages des puits au PBS, les lamelles sont perméabilisées dans du méthanol 100% pendant 10 minutes à -20°C. Une étape de saturation est réalisée avec une solution PBS 0.3% Triton X-114 3%BSA fraction V pendant 1h à 37°C. Les puits sont rincés en PBS puis des anticorps anti 3X FLAG et anti GST dilués dans une solution de PBS 0.3% BSA sont utilisés et les plaques sont incubées 1h à 37°C. Les lames sont rincées et les anticorps secondaires lapin MINUS et souris PLUS du kit Duolink® PLA Probes (*Sigma-Aldrich*) dilués au 1/5 dans du PBS 0.3% BSA sont incubés pendant 1h à 37°C.

Ensuite, les puits sont rincés en Tampon A du kit Duolink® In Situ Detection Reagents Orange (*Sigma-Aldrich*) puis 100µl de tampon de ligation et la ligase sont ajoutés et les lamelles sont incubées pendant 30 minutes à 37°C. Les lamelles sont rincées avec le tampon A puis 100µl de la solution d'amplification et la polymérase du kit sont déposées pendant 1h40 à 37°C. Après rinçage dans le tampon B du kit, les puits sont marqués pendant 5 minutes avec 100µl de DAPI (1µg/ml) puis sont montés sur lamelles. Les lamelles sont observées au microscope à fluorescence avec filtre Cyanine 3.

### III. ETUDES DE L'EFFET ANTIVIRAL DES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES SUR D'AUTRES CORONAVIRUS

---

#### A. VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE (IBV)

##### 1. Cellules et virus

Les cellules utilisées ont des cellules de rein d'embryons de 19 jours de poulet Longhorn. Les reins sont prélevés sur les embryons, puis sont rincés au PBS pendant 3 minutes trois fois et une fois avec du trypsine-versène, sous agitation à 37°C. Le surnageant est éliminé et de la trypsine-versène est ajoutée. Les cellules sont incubées 3 minutes à 37°C sous agitation puis sont laissées à incuber pendant 1 minute. De la

trypsine et du SVF décomplémenté (10% final) sont ajoutés. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500rpm. Après centrifugation, le culot est repris en milieu BHK21 et est filtré sur 6 couches de gaze stérile. Pour les cultures de virus, les cellules sont ensemencées en flasques 75cm<sup>2</sup> à raison de 1\*10<sup>7</sup> cellules/ml en milieu BHK21 5% SVF. Pour les expériences et titrages, les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits à raison de 5\*10<sup>6</sup> cellules/ml en milieu BHK21 1.5% SVF. Les cellules sont incubées 24h à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Une souche CR88 et une souche Massachusettes 41 ont été utilisées pendant ce projet. Les souches ont été titrées sur cellules primaires par titrage en dilution limite.

## 2. Infection

24h après ensemencement avec cellules primaires de poulet, le milieu d'une plaque 96 puits est retiré par renversement. 50µL de milieu BHK 2% SVF 0.2% Penistreptomycine 0.04% Fungizone seul (contrôle) ou contenant du DMSO ou du 83233 à 200µM ou 66µM ou 20µM sont déposés simultanément avec 50µL de la souche Massachusettes 41 ou CR88 en milieu BHK. Les plaques sont incubées 1h à 37°C. Le milieu des plaques est retiré et remplacé par 200µL de milieu de culture seul ou contenant du DMSO ou du 83233 à 100µM ou 33µM ou 10µM. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 48h.

Dans la deuxième expérience, le même protocole a été utilisé avec 100µM (puis 50µM) de 83233, 832 ou 833.

## 3. RTqPCR

Les ARNs sont extraits avec le kit Nucléomag VET (*Macherey-Nagel*) sur automate Kingfisher. Les puits sont grattés pour décoller les cellules et 100µl de surnageant/cellules sont utilisés comme matrice d'extraction.

Pour les ARN viraux, le kit QuantiTect Probe RT-PCR kit (*Quiagen*) est utilisé avec 5µl d'ARN totaux extraits, avec des sondes et amorces dirigées contre l'extrémité 5' du génome IBV. Les séquences des amorces sont 5'-GCT TTT GAG CCT AGC GTT-3' et 5'-GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G -3' et la séquence de la sonde est FAM 5'-CAC

CAC CAG AAC CTG TCA CCT -3' BHQ1. Pour la GADPH, 5µl d'ARN totaux sont utilisés avec le kit SYBR Green et des amorces GAPDH.

#### **4. Titrages des particules**

Des dilutions en cascade de 10 en 10 des surnageants sont réalisés de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup>. 100µL sont distribué par puits d'une plaque 96 puitsensemencée la veille avec des cellules primaires. Chaque dilution est déposée en dix réplicats. Les plaques sont incubées 30 minutes à 37°C puis 150µL de milieu BHK est ajouté et les plaques sont incubées 50h à 37°C. Les surnageants sont retirés par renversement puis les puits sont rincés au PBS. 50µl d'éthanol-acétone froid est déposé par puit et les plaques sont incubées 20 minutes à -20°C. Les puits sont vidés et les plaques sont laissées à sécher à température ambiante pendant 30 minutes. Les plaques sont rincées 1 minute au PBS puis 50µL de sérum polyclonal anti-IBV dilué au 1/30 en PBS sont déposés et les plaques sont incubées 30 minutes à 37°C en chambre humide. Le sérum est retiré des puits par renversement et trois lavages de 5 minutes au PBS sont effectués. 50µL d'une dilution en bleu d'Evans au 1/50 d'anticorps de lapin anti anticorps de poulet, conjugué à la fluorescéine (*Rockland*) sont déposés dans les puits. Les plaques sont incubées 30 minutes à 37°C. Trois lavages de 5 minutes au PBS sont effectués. Les plaques sont ensuite observées au microscope sous FITC.

## **B. ETUDE *IN VIVO* DE L'EFFICACITE DE LA MOLECULE 83233 DANS LE MODELE D'INFECTION DU HAMSTER DORE PAR LE SARS-CoV-2**

### **1. Infection des hamsters et traitements réalisés**

Les hamsters sont des mâles âgés de 6 à 8 semaines hébergés à deux par cage. 24 h avant l'infection (J-1), les hamsters sont pesés une première fois. 80 µL de solution de 83233 à 500 µM dilué en PBS (59.9 %) PEG-400 (40 %) DMSO (0.1 %) sont injectés en intranasal aux huit hamsters dits « traités » tandis que les hamsters dits « contrôles » reçoivent 80 µl de PBS (59.9 %) PEG-400 (40 %) DMSO (0.1%). Une heure après ce premier traitement, les hamsters sont infectés de manière intranasale avec une dose de

5000 TCID<sub>50</sub> de souche D614G de SARS-CoV-2 (Don JC Manuguerra, Institut Pasteur, Paris) diluée en DMEM. Deux croquettes imbibées de sucrose et d'un colorant alimentaire sont pesées puis déposées dans chaque cage. Le lendemain, les hamsters sont retraités avec la même solution contenant soit le 83233, soit du PEG uniquement. Ils sont également pesés et les croquettes marquées sont récupérées, pesées, puis remplacées par de nouvelles croquettes marquées. Quatre sur huit hamsters des deux groupes sont sacrifiés. Les poumons et la cavité nasale sont prélevés. Des écouvillons nasaux sont également réalisés en passant des cotons-tiges stériles sur le nez des hamsters. Les cotons-tiges sont ensuite placés dans 400µL de milieu de culture DMEM. Le lendemain matin, les hamsters restants sont re-traités et pesés. Les croquettes marquées sont récupérées, pesées et remplacées. De nouveaux écouvillons nasaux sont réalisés puis les hamsters sont sacrifiés. Les poumons et cavités nasales sont prélevés.

## **2. Titrages des particules infectieuses dans les écouvillons nasaux**

Des plaques 96 puits sontensemencées avec des 5000 cellules Vero E6/puit dans un milieu DMEM 5%SVF 1 % Penistreptomycine 1 % Sodium pyruvate pendant 24h à 37 °C. Les écouvillons nasaux sont dilués en cascade dans du milieu de culture sans SVF. Des dilutions en série de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup> sont réalisées. Le milieu des puits est enlevé et remplacé par 50 µl d'une dilution. Pour chaque dilution, six réplicats sont déposés. Les plaques sont incubées pendant 2h à 37 °C puis 150 µl de milieu de culture avec 5% de SVF sont ajoutés. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant quatre jours. Les plaques sont observées au microscope sous lumière blanche et les puits contenant des tapis avec des effets cytopathiques sont comptés. Les TCID<sub>50</sub> sont estimés par la méthode décrite précédemment.

## **3. Mesure des ARNs viraux**

Les ARNs sont extraits de 30mg de poumons broyés grâce au kit RNAeasy (Qiagen). La RT-qPCR ciblant le gène E du SARS-CoV-2 est ensuite réalisée et le gène cellulaire 18S est utilisé comme gène de ménage. Ces mesures ont été réalisées par D. Lopez Molina (Inserm, U955).



# Résultats

## I. ETUDE DE L'EFFET ANTIVIRAL DES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES SUR LE CORONAVIRUS FELIN

---

### A. INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES

Le premier objectif de cette thèse était d'identifier parmi les inhibiteurs de cyclophilines de petites tailles (SM-CypI) développés par le laboratoire partenaire (Eq 18, UMR 955, Ahmed-Belkacem et coll.) des molécules qui auraient une activité antivirale contre le coronavirus félin, éventuellement supérieure à celle de la cyclosporine A. Le second objectif était de caractériser le mode d'action antivirale de ces molécules, notamment en recherchant à quelles étapes du cycle de réplication des coronavirus les cyclophilines jouaient un rôle. Les SM-CypI sont des inhibiteurs de cyclophilines de très petites tailles. Ils possèdent un squelette commun et trois groupement radicaux variables appelés R1, R2 et R3 R1, R2 et R3. Lorsque la molécule interagit avec les cyclophilines, le groupement R1 se retrouve dans la poche catalytique et le groupement R3 dans la poche gardienne (voir Figure 14 pour la structure des cyclophilines). Ces inhibiteurs de cyclophilines ont été testés [287] par le laboratoire partenaire et inhibent l'*alphacoronavirus* humain HCoV-229E. Des résultats préliminaires indiquent que ces inhibiteurs auraient également un effet antiviral sur MERS-CoV et SARS-CoV-2 (communication personnelle H. Ahmed-Belkacem).

Afin de vérifier l'intérêt des SM-CypI dans un modèle félin, 21 molécules ont été testées dans un crible sur l'effet antiviral contre FCoV. Une molécule en particulier baptisée 83233, utilisée à une concentration de 25µM inhibait l'infection de plus de 99.9%. Cette molécule ainsi que les molécules parentes (molécules "832" et "833") qui

possèdent les groupements chimiques à l'origine de 83233 (voir Figure 27) ont été sélectionnées pour cette étude.

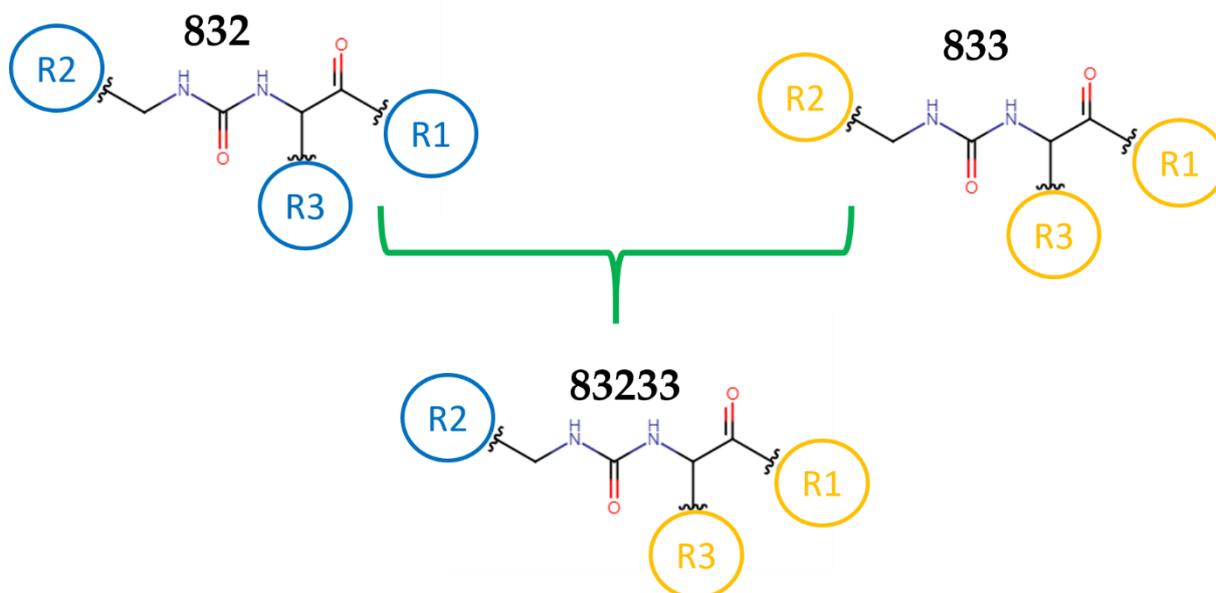


Figure 27 : Représentation schématique des inhibiteurs de cyclophilines utilisés. Les SM-CypI possèdent un squelette commun et trois groupements radicaux R1-3 qui varient selon les molécules. La molécule 83233 partage le groupement R2 de 832 et les groupements R1 et R3 de 833.

L'effet des inhibiteurs ont été caractérisés par le calcul de leur CC50 et CI50. 832 et 833 ont un index de sélectivité (ou index thérapeutique) respectif de 20 et 16. L'index de 83233 en revanche est de 1979, ce qui signifie qu'il est efficace à une dose très inférieure aux concentrations cytotoxiques. Les index thérapeutiques sont calculés par le ratio de la dose moyenne cytotoxique sur la dose inhibitrice moyenne :

$$\frac{CC50}{CI50} = \text{Index de sélectivité}$$

L'inhibiteur 83233 est donc une molécule très intéressante pour d'éventuels essais *in vivo*.

D'après les expériences réalisées, les SM-CypI inhibent le coronavirus félin à une étape précoce de l'infection avec un effet maximal dans les premières heures de l'infection. Des expériences complémentaires sur ces étapes ont été menées : l'inhibition de

l'infection n'a pas lieu au niveau de l'attachement, et les molécules n'ont pas d'effet antiviral lorsqu'elles sont utilisées en prétraitement des cellules. Ces molécules inhiberaient l'infection par le coronavirus félin à une étape post-entrée mais avant les étapes de réplication-transcription du virus.

L'ensemble de ces travaux a été rassemblé sous forme de manuscrit en vue d'une publication dans un journal à comité de lecture.

# **A new class of cyclophilin inhibitors inhibited Feline Infectious Peritonitis Virus at an early step of infection.**

Manon Delaplace <sup>1,\*</sup>, Helene Huet<sup>1</sup>, Abdelhakim Ahmed-Belkacem <sup>2</sup> and Sophie Le Poder <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 1161 Virologie INRA-ENVA-ANSES, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup>Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955 Team 18, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France ; e-mail@e-mail.com

## **Abstract**

Coronaviruses are infamous for their emerging tendencies and jumping across the species barrier. They are the agent responsible for major epidemics, both human (SARS-CoV2/CoVID19) and veterinary (IBV, PEDV, etc). Among them, Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) causes a systematic fatal disease, the feline infectious peritonitis virus (FIP), in cats. There is no treatment approved for the treatment of FIP as of yet. In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, broad-spectrum treatment should be investigated with urgency. We present here the characterization of a host-target antiviral compound. This family of novel cyclophilin inhibitors has a strong antiviral effect on FIPV multiplication, a feline coronavirus. One inhibitor, 83233, reduced CoV infection by over a 100 fold factor at a nanomolar scale, while having a CC50 superior to 100µM. These inhibitors act at an early stage of the replication cycle after attachment of the virus to its receptor. These inhibitors are very interesting therapeutic candidates, both for a current lethal disease and potentially against future emerging coronaviruses.

25 **Keywords:** coronavirus; FIPV; antiviral; cyclophilin; viral cycle

26

## 27 **Introduction**

28 Coronavirus (CoV) are positive single strand RNA virus. The *Coronaviridae* family is  
29 composed of four genera of CoV: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* and *Deltacoronavirus*.  
30 *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* infect mammals while *Deltacoronavirus* and  
31 *Gammacoronavirus* infect mostly birds with a few exceptions of mammals.

32 Coronaviruses have a huge impact on public health both veterinary and human. SARS-  
33 CoV-2 is infamously the agent responsible for the COVID19 pandemic that started in  
34 December 2019 with over 217 million infected people and over 4.5 million deaths at  
35 the time of writing. In veterinary medicine, Infectious Bronchitis Virus (IBV) is  
36 responsible for significant economic loss every year for the poultry industry [1] and  
37 the re-emergence of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in the USA in 2013  
38 caused severe illness and deaths in piglets [2]. Considering the impressive capacity of  
39 CoV to jump across the species barrier [3] and the regular and severe resulting  
40 epidemics, it is of utmost importance to find, not only treatment for a pathogenic CoV  
41 but also treatments that could be applied to a broad spectrum of CoV, therefore  
42 preventing future emerging viruses.

43 In this study, we investigated the antiviral effect of new class of cyclophilin inhibitors  
44 on Coronavirus, as potential host targeted antiviral compounds. Host targeting  
45 antivirals (HTA) target conserved host proteins and have the potential for broad  
46 spectrum antiviral action and high barrier resistance to viral-escape mutants [4].

47 FIPV, a CoV causing a feline infectious peritonitis (FIP) in cats is considered one of the  
48 leading causes of death in communal cat groups with a 100% lethality rate [5].  
49 Antiviral treatment and vaccines are still being researched. A vaccine is available in

50 some countries, but its efficacy is limited [6,7]. As of now, there is no treatment  
51 approved for FIP.

52 Coronaviruses possess a large RNA genome, ranging from 26 to 32kb, that is capped  
53 on the 5'end and carry a polyA tail on the 3'end. All coronavirus genomes are  
54 structured similarly: the first two-third corresponds to the ORF1a/b, which encodes  
55 the 16 non-structural proteins (nsp1-nsp16), followed by the structural genes always  
56 present in the same order: S (spike), E (envelope), M (membrane), N (nucleocapsid).  
57 Additional ORFs encodings for accessory proteins are found interspaced between the  
58 structural genes. Those accessory proteins are unique of each coronavirus species and  
59 play various roles in pathogenesis, and tropism. After binding to their specific  
60 receptor, Coronaviruses enter the cell host either via direct fusion at the plasma  
61 membrane or endocytosis [11]. After entry, the Nucleocapsid is disassembled and viral  
62 RNA is translated. The ORF1a/1b gene is directly translated the 16 non-structural  
63 proteins. These nsp proteins then form the replicase-transcriptase complex (RTC). The  
64 RTC is responsible for the transcription of full-length negative RNA and negative  
65 subgenomic (sg)RNAs through the unique discontinuous transcription of  
66 coronaviruses [8]. The negative viral RNA (vRNA) is then used as a template for  
67 positive full-length RNA and positive sgRNAs. The positive sgRNAs are translated  
68 into structural and accessory proteins. The viral proteins undergo eventual post-  
69 translation modification in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Endoplasmic  
70 Reticulum-Golgi apparatus Intermediary Compartment (ERGIC). Viral assembly of  
71 novel viral particles also takes place in these compartments. During their transit in the  
72 Golgi apparatus, the virions are matured and end up secreted out of the cell through  
73 the exocytosis pathway.

74 Feline coronaviruses (FCoV) are classified into two biotypes: Feline enteric  
75 coronaviruses (FeCV) are avirulent strains and induce mild or subclinical digestive  
76 symptoms. FeCV is endemic in cats. Studies found seropositivity of 20 to 60%, reaching  
77 up to 90% of positive cats who lived in multiple cats' households [9]. The feline

78 infectious peritonitis (FIP) disease is caused by virulent strains called FIP viruses  
79 (FIPV) [10]. FeCV has a strict intestinal tropism. FIPV is able to infect monocytes and  
80 macrophages [11], allowing the virus to spread in various organs leading to a systemic  
81 infection. This tropism changes are due to mutation in the spike protein and the Orf3c  
82 accessory protein [12].

83 FCoV is also subdivided, based on serological responses, into two serotypes: FCoV-I,  
84 the source of most natural infection amongst cats [9], and FCoV-II resulting from  
85 recombination between FCoV-I and the canine coronavirus CCoV-II [13]. FCoV-II is  
86 usually the laboratory model used due to its ease of replication in cell lines like CRFK  
87 (Crandell-Reed Feline Kidney).

88 Cyclophilins (Cyp) are conserved cellular proteins present in both prokaryotes and  
89 eukaryotes. Cyclophilins share a common peptidyl-prolyl-isomerase domain (PPiase).  
90 This domain catalyzes the interconversion of proline configuration [14]. Cyclophilins  
91 are known to play critical roles in the replication of different viruses, including DNA  
92 viruses [15], negative and positive RNA viruses [16] [17]. Cyclophilins also play a role  
93 in Coronavirus replication [18]. Cyclosporin A [19] a macrocyclic inhibitor of  
94 cyclophilins, as well as its non-immunosuppressive derivatives (Alisporivir, etc)  
95 inhibit CoV replication of every genus [20,21]. Gene Knock-Out or siRNA of  
96 cyclophilins render cells resistant to several CoV infection [19,22]. Cyclophilins have  
97 also been identified as an interactor of several viral proteins of SARS-CoV [23], SARS-  
98 CoV-2 [24], and HCoV-229E [25].

99 We present here the characterization of the antiviral effect a new class of small-  
100 molecule cyclophilin inhibitors (SM-CypI) [26] on a feline coronavirus of major  
101 veterinary interest. This new class of molecules, with a small molecular weight are  
102 non-immunosuppressive and less cytotoxic than CsA. Their antiviral effect has  
103 previously been described for HCoV-229E, and showed promising results for SARS-  
104 CoV-2 (Ahmed-Belkacem personal communication). 21 SM-CypI were screened for  
105 their antiviral effect on feline coronavirus. Among them, the 83233 was highly potent

106 and exhibited a high selective index. Time-addition experiments were performed and  
107 showed, that SM-CypI targeted an early stage of the virus cycle, after the attachment  
108 step.

## 109 **Materials and Methods**

### 110 **Cells and virus strains**

111 The FCoV strain used for this study is the serotype II, FIPV 79-1146 strain. The virus  
112 was amplified on CRFK Cells and supernatant was harvested and ultracentrifugated.  
113 Titers were determined using an endpoint dilution assay described below.

114 CRFK Cells were cultivated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's  
115 medium (DMEM) supplemented with 10% Foetal bovine serum 1% penicillin-  
116 streptomycin 1% sodium pyruvate and 1% non-essential amino acids.

### 117 **SM-CypI Screening**

118  
119 CRFK cells were plated in 48 wells flat bottom plate in 300µL of culture medium at 30  
120 000 cells per well and incubated for 24h. Culture medium was removed and replaced  
121 by 50µL of 30 000 FFU of FIPV in culture medium and 50µl of culture medium  
122 containing inhibitors at either 100µM for SM-CypI or at 20µM for CsA. Plates were  
123 then incubated for 1h at 37°C. Media was removed and 300µL of culture medium  
124 were used to rinse wells. 300µl of culture medium containing inhibitors at either 50µM  
125 for SM-CypI or at 10µM for CsA were added. Plates were incubated for 24h at 37°C.  
126 The supernatants were collected and kept at -80°C. For each condition, one well was  
127 fixed using 300µL of Absolute ethanol. After 10 minutes at room temperature, absolute  
128 ethanol was removed and replaced by 300µL of ethanol 70% before immunostaining  
129 of FCoV antigens by immunofluorescence. Result were the means of one to three  
130 experiments performed in triplicate.  
131

### 132 **Cytotoxicity assays**

133  
134

135 CRFK were plated in 96 wells flat bottom plate in 200 $\mu$ L of culture medium at 10 000  
136 cells per well and incubated for 24h. Well media were replaced by serial dilutions of  
137 culture media containing different concentrations of 83233, 832 and 833  
138 molecules, DMSO or media alone as control. Three-fold dilutions were made from  
139 667 $\mu$ M to 1 $\mu$ M. Each dilution was deposited in three replicates. Plates were incubated  
140 24h at 37°C. Cytotoxicity was evaluated with the Celltiter-Glo Cell viability Assay kit  
141 (Promega) by measuring ATP in the supernatant.

142

### 143 **Dose dependent inhibition of SM CypI**

144

145 CRFK cells were plated in 48 wells flat bottom plate in 300 $\mu$ L of culture medium at 30  
146 000 cells per well and incubated for 24h. Culture medium was removed and replaced  
147 by 50 $\mu$ L of 30 000 FFU of FIPV in culture medium and 50 $\mu$ L of culture medium  
148 containing inhibitors at different doses of 833, 832 and 83233, ranging from 0.1 (or  
149 0.05 $\mu$ M for 83233) to 100 $\mu$ M. Equivalent concentrations of DMSO were used as  
150 control. Each condition was tested in triplicate. Plates were then incubated for 1h at  
151 37°C. Media were removed and 300 $\mu$ L of culture medium were used to rinse wells.  
152 300 $\mu$ L of culture medium containing inhibitors or DMSO were added. Plates were  
153 incubated for 24h at 37°C. The supernatants were collected in tubes and kept at -80°C.  
154 Two out of three wells per condition were lysed with 300 $\mu$ L of Magmax Core duo  
155 Lysis Buffer for 1 minute. Lysates were placed in microtubes and placed at -80°C  
156 until RNA extraction. The remaining well was fixed using 300 $\mu$ L of Absolute ethanol.  
157 After 10 minutes at room temperature, absolute ethanol was removed and replaced by  
158 300 $\mu$ L of ethanol 70% before FCoV antigens immunostaining. The experiment was  
159 repeated twice.

160

### 161 **Determination of the CC50, IC50 and Selectivity Index**

162 The viral titers were determined by the end point dilution method described below of  
163 each supernatant were calculated for the IC50. For IC50 and CC50 determination,  
164 viral titers or mean luminescence were plotted against compound concentration,

165 respectively and fitted with a four parameters variable slope with Graphpad Prism  
166 8.2.1 software. The selectivity Index was then calculated by the ratio of the obtained  
167 CC50 divided by the IC50.

### 168 **Time of addition assays**

169 CRFK were plated in 48 wells flat bottom plate in 300 $\mu$ L of culture medium at 30 000  
170 cells per well and incubated for 24h. Culture medium was removed and replaced by  
171 50 $\mu$ L of 30 000 FFU of FIPV in culture medium and 50 $\mu$ l of culture medium containing  
172 inhibitors at either 50 $\mu$ M for 833 and 832 or at 10 $\mu$ M for 83233, for the 0h p.i condition  
173 and 50 $\mu$ L of culture medium for other conditions. For positive control, 50 $\mu$ L of DMSO  
174 diluted at 1/200 in culture medium was used. Each condition was tested in triplicate.  
175 Plates were then incubated for 1h at 37°C. Media was removed and 300 $\mu$ L of culture  
176 medium was used to rinse wells. 300 $\mu$ l of culture medium containing inhibitors at  
177 either 25 $\mu$ M for 836, 833 and 832 or at 5 $\mu$ M for 83233 was added at different times of  
178 the infection. For positive control, 300 $\mu$ L of DMSO diluted at 1/400 with culture  
179 medium were used. Plates were incubated for 24h at 37°C. The supernatant was  
180 collected in tubes and kept at -80°C. Two out of three wells per condition were lysed  
181 with 300 $\mu$ L of Magmax Core duo Lysis Buffer for 1 minute. Lysates were placed in  
182 microtubes and placed at -80°C until extraction. The remaining well was fixed using  
183 300 $\mu$ L of Absolute ethanol. After 10 minutes at room temperature, absolute ethanol  
184 was removed and replaced by 300 $\mu$ L of ethanol 70%. The experiment was repeated  
185 three times.

### 186 **Attachment assays**

187 CRFK were plated in 48 wells flat bottom plate in 300 $\mu$ L of culture medium at 30 000  
188 cells per well and incubated for 24h. Plates were incubated at 4°C for 1h, allowing virus  
189 attachment but not entry, then culture medium was removed and replaced by 50 $\mu$ L of  
190 30 000 FFU of FIPV in culture medium and 50 $\mu$ l of culture medium containing  
191 inhibitors at either 50 $\mu$ M for 833 and 832 or at 10 $\mu$ M for 83233. As positive control,

192 50 $\mu$ L of DMSO diluted at 1/200 with culture medium were used. Plates were then  
193 incubated for 1h at 4°C. The medium was removed and wells were rinsed with 300 $\mu$ L  
194 of fresh culture medium. For wells, named “attachment”, 300 $\mu$ L of medium only were  
195 added. For wells, named “infection”, the media were removed and after rinsing, 300 $\mu$ L  
196 of culture medium containing inhibitors at either 25 $\mu$ M for 833 and 832 or at 5 $\mu$ M for  
197 83233 were added. As positive control, 50 $\mu$ L of DMSO diluted at 1/400 with culture  
198 medium were used. Plates were incubated for 24h at 37°C. The supernatant was  
199 collected in tubes and kept at -80°C. Two out of three wells per condition were lysed  
200 for further RNA extraction. The remaining triplicate was fixed with Ethanol. This  
201 experiment was repeated twice.

## 202 **Preincubation assays**

203 CRFK were plated in 48 wells flat bottom plate in 300 $\mu$ L of culture medium at 30 000  
204 cells per well and incubated for 24h. The media were removed and 300 $\mu$ L of culture  
205 medium containing inhibitors at either 25 $\mu$ M for molecules 833 and 832 or at 5 $\mu$ M for  
206 83233 were added. As positive control, 300 $\mu$ L of DMSO diluted at 1/400 with culture  
207 medium were used instead. Plates were incubated for 1h at 37°C, then culture medium  
208 was removed and replaced by 50 $\mu$ L of 30 000 FFU of FIPV in culture medium and 50 $\mu$ L  
209 of culture medium containing inhibitors at either 50 $\mu$ M for molecules 833 and 832 or  
210 at 10 $\mu$ M for the 83233 molecules. As positive control, 50 $\mu$ L of DMSO diluted at 1/200  
211 with culture medium were used. Plates were. For wells, named “preincubation”, only  
212 300 $\mu$ L of fresh medium were added without antiviral molecules. For wells, named  
213 “infection” 300 $\mu$ L of culture medium containing inhibitors at either 25 $\mu$ M for 836, 833  
214 and 832 or at 5 $\mu$ M for 83233 were added. As positive control, 300 $\mu$ L of DMSO diluted  
215 at 1/400 with culture medium were used. Plates were incubated for 24h at 37°C. The  
216 supernatant was collected in tubes and kept at -80°C. Two out of three wells per  
217 condition were lysed for further RNA extraction. The remaining triplicate was fixed  
218 with absolute ethanol, for immunofluorescence. This experiment was repeated twice.

219

## 220 **Detection of FCoV antigens by immunofluorescence**

221 Fixed CRFK cells were rinsed three times with PBS. Ascites liquid from an FIPV  
222 infected cat diluted at 1/500 in antibody diluent (Zytomed) was distributed in wells  
223 (50µl for 96 wells plate or 100µl for 48 wells plate). Plates were incubated at 37°C for  
224 30 minutes. Wells were rinsed three times with PBS. Anti-Cat antibody coupled with  
225 Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch) diluted at 1/250 in antibody diluent (Zytomed)  
226 was added to wells and plates were incubated 30 minutes at 37°C. Cells were washed  
227 three times with PBS. 50µl of DAPI at 1µg/mL in PBS was added to wells and wells  
228 were examined at 100x magnification with a fluorescent microscope (Zeiss)  
229 and analyzed with Zen software.

## 230 **Virus titration by end point dilution assay**

231 CRFK were plated in 96 wells flat bottom plate in 200µL of culture medium at 10  
232 000 cells per well and incubated for 24h. Serial dilutions of supernatant of interest were  
233 done within 50µL of culture medium. Six dilutions ranging from 1/10 to 1/1000000  
234 were done per sample. Eight replicates per dilution were then distributed in CRFK  
235 plate. Plates were incubated for 2h at 37°C. 150µl of fresh culture medium were then  
236 added and the plates were incubated for an additional 22h. Afterwards, the medium  
237 was removed, and wells were rinsed with absolute ethanol. 100µL of fresh absolute  
238 ethanol were then distributed in each well and plates were incubated for 10 minutes  
239 at room temperature. Absolute ethanol was removed and replaced by 100µL ethanol  
240 70%. FCoV antigens were stained by immunofluorescence and wells containing  
241 fluorescent cells were counted. The 50% infectious dose (ID50) was calculated using  
242 the Spearman-Kärber method in a pre-filled Excel sheet (freely accessible at <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de>) (courtesy of Marco Binder, Heidelberg). When  
243 necessary, the titer in FFU/mL was estimated by multiplying the ID50/mL titer by a  
244 0.56 factor.  
245

246

247

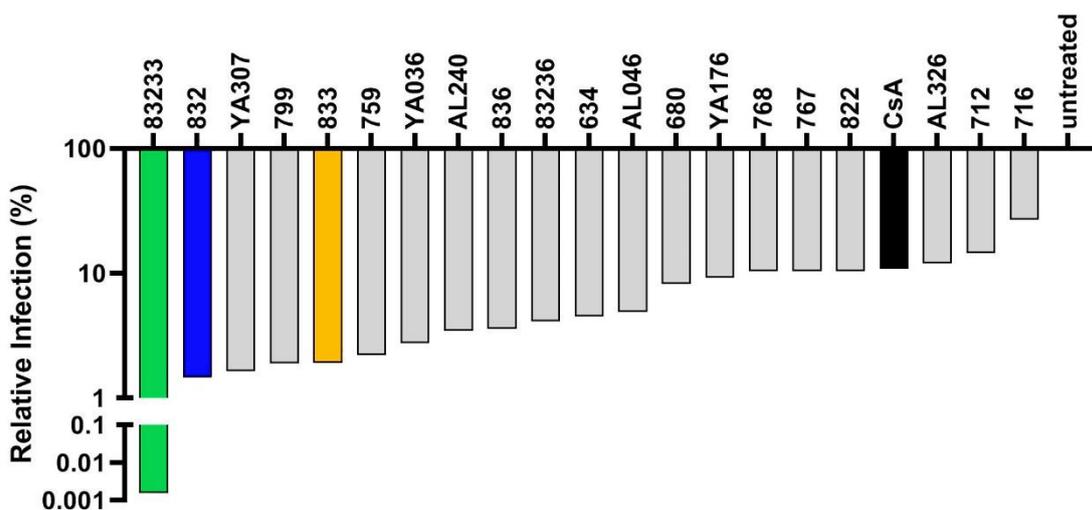
## 248 **Viral RNA extraction and RTqPCR**

249  
250 Cells were lysed with 300µL of Lysis buffer from the MagMAX CORE Nucleic  
251 Acid Purificaton Kit (Thermofischer). Total intracellular RNA was then extracted  
252 using MagMAX CORE Nucleic Acid Purificaton Kit (Thermofischer) from 200µl of  
253 lysates following manufacturer protocol. RNA was recovered in 90µl of Nuclease free  
254 water (Qiagen). RTqPCR was realized using qScript XLT 1-Step RT-  
255 qPCR ToughMix (Quantabio), using a system of probes and primers targeting either  
256 the 3' untranslated region of FCoV genome or the feline beta actine gene. Primer and  
257 probe sequences were as followed: CoV F 5'-GCAATAGGGTTGCTTGTACCTCC-  
258 3'; CoV R 5'-CGAGGATTGGTCATCGC-3'; CoV probe 5'-HEX-  
259 TTCTACAGAATGGTAAGCAC-MGBEQ-3'; feline beta-actine F 5'-  
260 CCAGCACGATGAAGATCAAGATC -3'; feline beta-actine R 5'-  
261 CGGACTCGTCGTACTCCTGC -3'; feline beta-actine probe 5'-FAM-  
262 TGTCACCTTCCAGCAGATG-MGBEQ-3'. A Lightcycler 96 thermocycler was set  
263 as follow: one step of RT at 50°C (1200s), one step of initial denaturation at 95°C (600s),  
264 40 cycles of denaturation at 95°C (15s), of annealing and extension at 60°C  
265 (30s) then 95°C (10s).

## 266 **Results**

### 267 **SM-CypI screening**

268 To confirm that the novel class of cyclophilin inhibitors (SM-CypI) had an effect  
269 on FCoV, 21 molecules were screened for their FIPV antiviral activity (Figure 1). CRFK  
270 Cells were infected for 24h with FIPV at MOI 1 in presence of SM-CypI at 25µM or  
271 Cyclosporin A (CsA) at 10µM (maximal dose to limit cytotoxicity). Viral titers were  
272 then measured by endpoint dilution assay. Varying degrees of FIPV replication  
273 inhibition were observed. Seventeen out of the 21 SM-CypI inhibited FIPV infection  
274 better than CsA. The 83233 molecule in particular inhibited over 99.9% the FIPV  
275 replication.



276

277 **Figure 1. Infection of FIPV in presence of SM-Cyp inhibitors and CsA.** Titers were  
 278 normalized with untreated titers and are presented in  
 279 percentage. The 83233 molecule (in green) as well as its parental compounds 832 (in  
 280 blue) and 833 (in yellow) were selected and studied further. Results with CsA appears  
 281 in black.

282 The 83233 molecule structure was built by combining moieties of two other  
 283 compounds, 832 and 833. Interestingly, the 832 and 833 molecules themselves  
 284 inhibited over 80% of the FIPV infection. Further characterization was pursued using  
 285 the 83233 molecules and the parental compounds, 832 and 833.

### 286 SM-CypI inhibit FIPV in a dose-dependent manner at non-cytotoxic dose

287

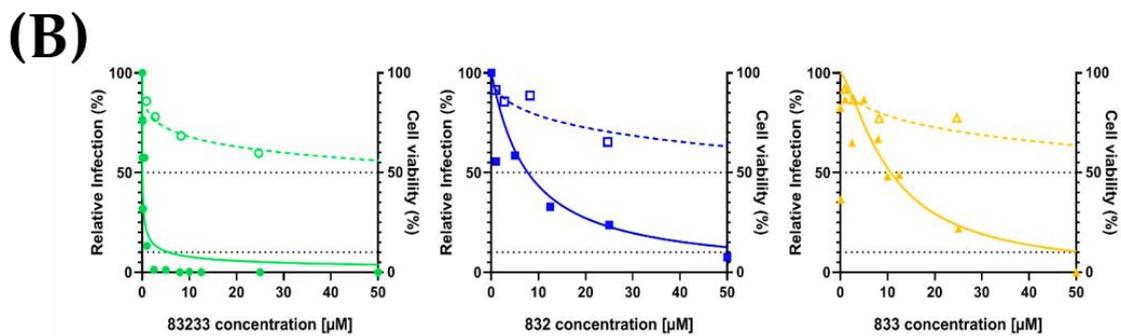
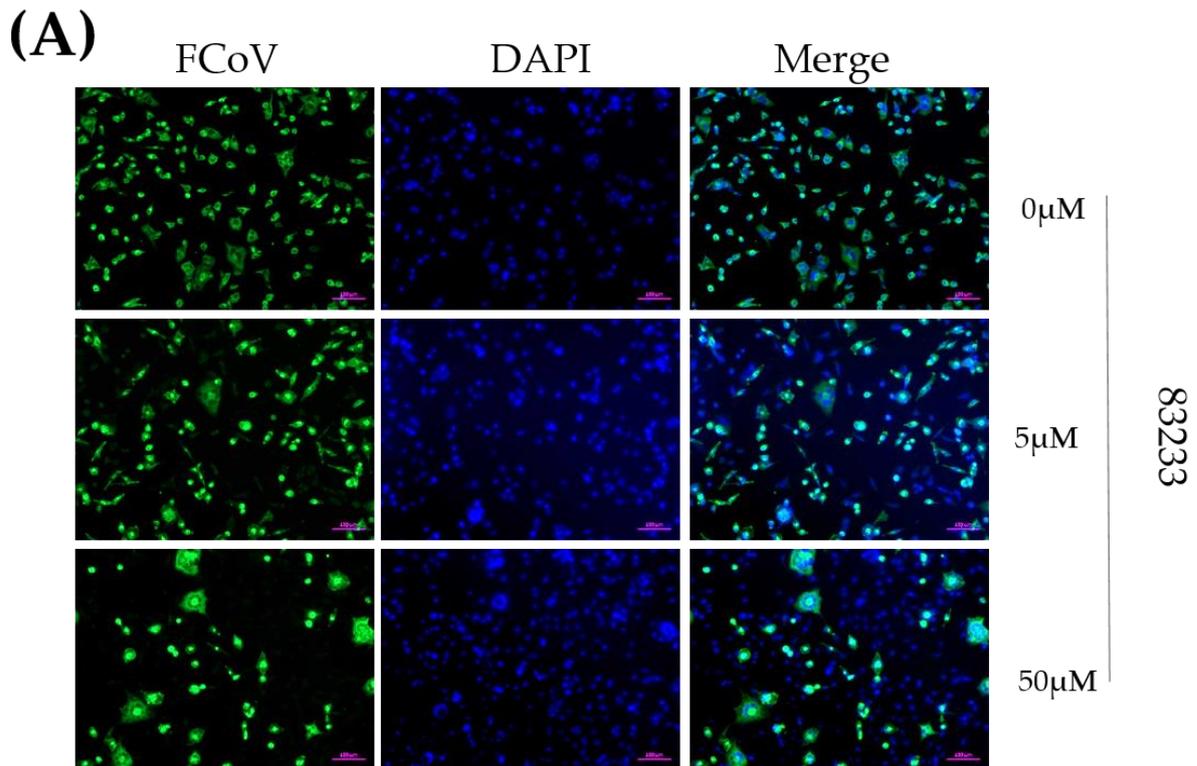
288 To determine the cytotoxicity of the inhibitors, CRFK cells were exposed  
 289 to various concentrations (from 667 $\mu$ M to 0.1 $\mu$ M) of selected SM-CypI for 24h (Figure  
 290 2A). Since all SM-CypI stocks are maintained in DMSO, DMSO cytotoxicity was also  
 291 measured (results not shown) but did not reach 50% of cytotoxicity even at the highest  
 292 concentration (0.33%). Viable cells (with an active metabolism) produce ATP.  
 293 The luminescence readout with the CellTiter-Glo kit is proportional to the quantity of  
 294 ATP in the wells, and therefore proportional to the number of viable cells. CC50 was  
 295 determined using GraphPad Prism software (8.2.1) with a nonlinear fit analysis  
 296 variable slope (see figure 2B). The CC50 values of the different molecules were  
 297 169.2 $\mu$ M for the 833 molecule, 153.0 $\mu$ M for the 832 molecule and 107.8 $\mu$ M for

298 83233. (See Table 1). All SM-CypI tested had a CC50 superior to that of CsA, which  
299 was 10 $\mu$ M at 48h post-infection (unpublished results).

300  
301 **Table 10 : EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> and selectivity index (SI) values for the individual inhibitors**  
302 **determined at 24h p.i.**

	EC50 ( $\mu$ M)	CC50 ( $\mu$ M)	SI
83233	0.05447	107.8	1979.07
833	10.67	169.2	15.86
832	7.731	153.0	19.79

303  
304 Half maximal inhibition concentration (IC50) of selected SM-CypI were then measured  
305 by infecting CRFK cells in presence of increasing concentration doses of inhibitors for  
306 24h, then viral titers were measured (Figure 2B). Unsurprisingly, 83233 was the most  
307 potent compounds with an EC50 of 0.05 $\mu$ M. 832 and 833 had EC50 of 7.7 $\mu$ M and  
308 10.7 $\mu$ M respectively (see Table 1). As a comparison, Cyclosporin A, the most well  
309 known CypI has an IC50 superior to 12.5 $\mu$ M on FCoV [27]. The therapeutic index of  
310 83233 is 1979.



311

312

313

314 **Figure 2. Effect of SM-CypI on FIPV.** (A) Immunostaining of FCoV antigens in  
 315 infected cells treated with different doses of 83233. Cells were infected at MOI 1 with  
 316 different doses of 83233. After infection, the medium was replaced with fresh medium  
 317 containing 83233 for 24h. Infected cells were stained with polyclonal anti-  
 318 FCoV antibody by immunofluorescence. Nuclei were visualized with DAPI. (B)  
 319 Relative infection (left axis), represented in plain lines and symbols, was calculated  
 320 with endpoint dilution titrating assay of supernatants after a 24h infection with FIPV at  
 321 MOI 1. Titers were normalized with DMSO treated cells used as control. Cell viability  
 322 at 24h of CRFK cells treated with SM-CypI (right axis), represented in dashed line and  
 323 empty symbol. ATP presence in supernatants was normalized to the culture medium

324 supernatant used as control. The dotted lines correspond to the 50% and 10%  
325 thresholds.

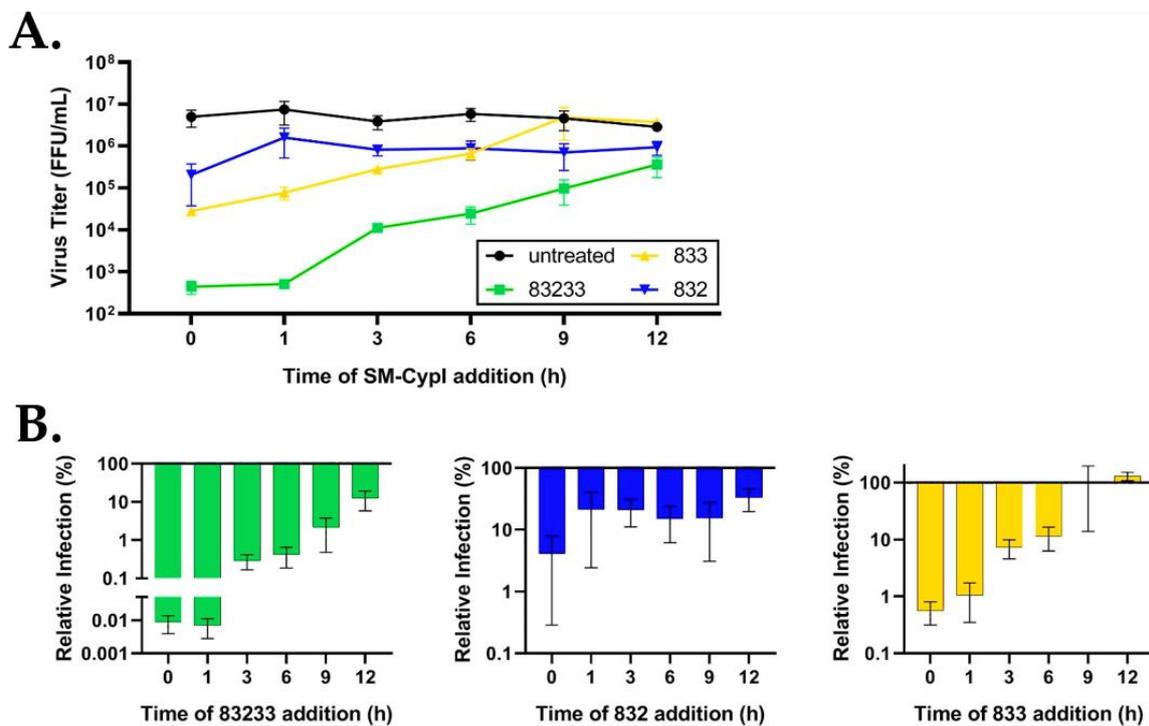
326

### 327 SM-CypI inhibit FIPV at an early stage of viral infection

328

329 To understand the mechanisms of SM-CypI inhibition on FCoV infection, we used  
330 these three cyclophilin inhibitors in time of addition assays.

331 CRFK cells were infected for 24h with FIPV at MOI 1 and SM-CypI were added at  
332 different times post-infection (1h, 3h, 6h, 9h and 18h) in three replicates. Three  
333 independent kinetics were realized. Figures 3 and 4 show representative results of  
334 the three assays.

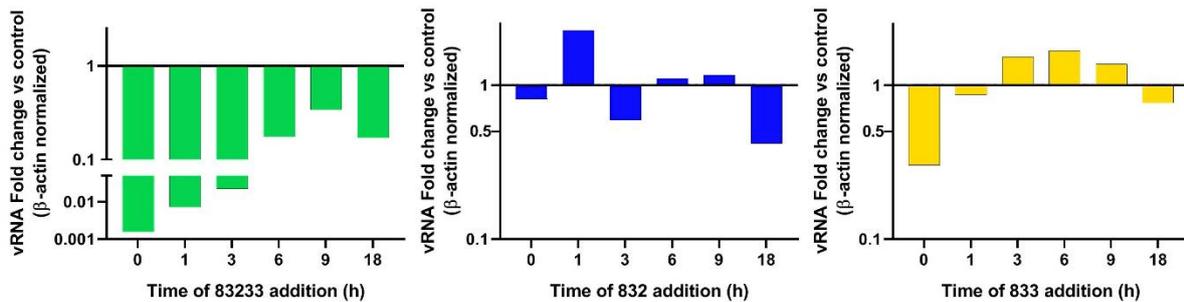


335

336 **Figure 3. Effect of time of addition of SM-CypI on supernatants viral titers.**  
337 Molecules were added to the cells at various times during the infection with FIPV. 832  
338 and 833 molecules were used at 25 $\mu$ M and 83233 at 5 $\mu$ M). A: Mean viral titers of the  
339 replicates and SEM. B: Titers were normalized with the untreated condition and are  
340 presented as mean percentage of infection with SEM.

341

342 For each SM-CypI, the lowest viral titer (Figure 3A) and highest relative inhibition  
343 (Figure 3B) was observed when the molecules were added simultaneously with the  
344 virus. The antiviral effect is still marked when the molecules were added 1h post-  
345 infection, suggesting that the inhibitory effect could take place at a very early stage of  
346 the viral replication cycle.



347

348 **Figure 4. Effect of time of addition of SM-CypI on intracellular viral RNA.** Molecules  
349 were added to the cells at various times during the infection with FIPV. 832 and 833  
350 were used at 25μM and 83233 at 5μM. Total RNA was extracted from cells and viral  
351 RNA was measured by RTqPCR. Mean Ct values were normalized to feline β-actine  
352 gene using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and presented as fold expression over untreated

353

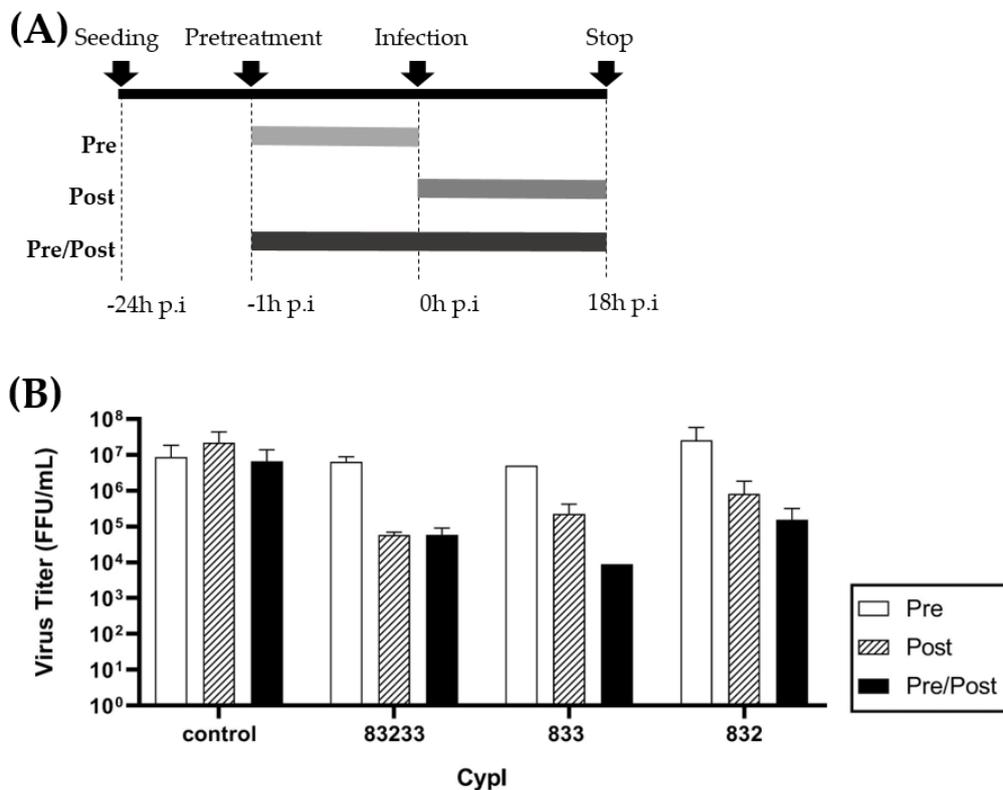
354 The same trends were observed with viral titers for all SM-CypI tested, with much  
355 better efficiency for the 83233 compound. Quantification of intracellular  
356 viral RNA (Figure 4) also demonstrated a diminution of viral RNA when the  
357 molecules were added concomitantly with the virus but the vRNA reduction is much  
358 lower than for the infectious titers of the supernatants. For example, while the  
359 addition of the 833 compound concomitantly with the virus (at 0h p.i) reduced the  
360 viral titer by over 100-fold, it only reduced vRNA by a third. The treatment with the  
361 832 molecule decreases about 10-fold the virus titer in supernatant when added at the  
362 time of infection but no decrease of the intracellular viral RNA is observed. FCoV  
363 antigen staining by immunofluorescence of each condition is available in  
364 the appendix 1 and followed the same trends as vRNA and supernatant viral titers.

365

366 **SM-CypI inhibit FIPV replication after the attachment step**

367

368 Cells were treated either with 5 $\mu$ M of 83233, 25 $\mu$ M of 832 or 833, or DMSO (untreated  
369 cells) 1h before infection and/or with virus addition (Figure  
370 5A). 18h post- infection, supernatants were collected and viral titers were determined  
371 SM-CypI pretreatment had no impact on viral replication (figure 5B). The pre-  
372 treatment did not potentiate the antiviral effect of the molecules, as there was no  
373 significant decrease of the viral charge between cells treated from -1h p.i or from 0h  
374 p.i, to the end of the experiment.



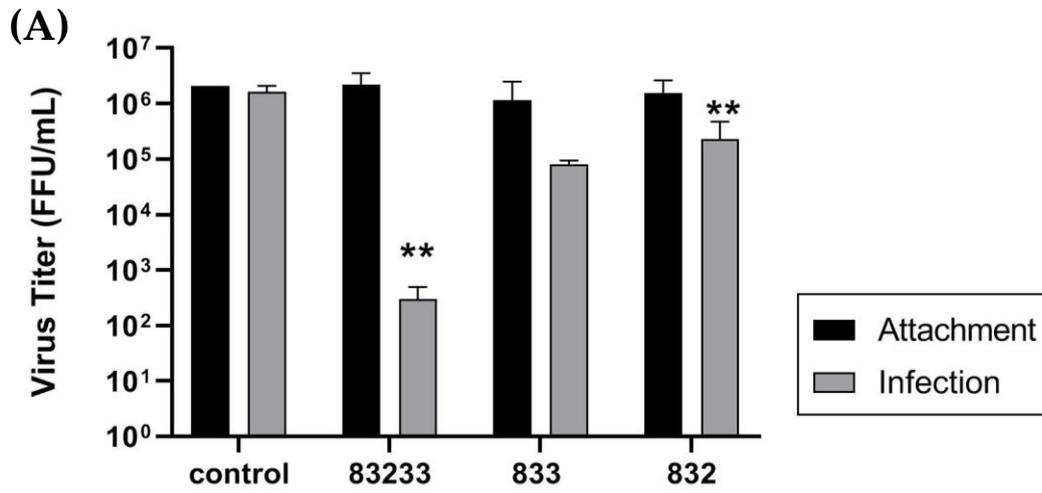
375

376 **Figure 5. Effect of pretreatment of cells with SM-CypI on FIPV infection.**  
377 (A) Design of the protocol. (B) Cells were either treated with SM-CypI 1 hour before  
378 infection (Pre) or during infection (Post) or both (Pre/Post).  
379 Supernatants were collected 18h post-infection and tittered by TCID50 assay. With  
380 the 832 and 833 molecules, 25 $\mu$ M were added. For the 83233 molecule, 5 $\mu$ M were used  
381 and an equivalent dose of DMSO as control.

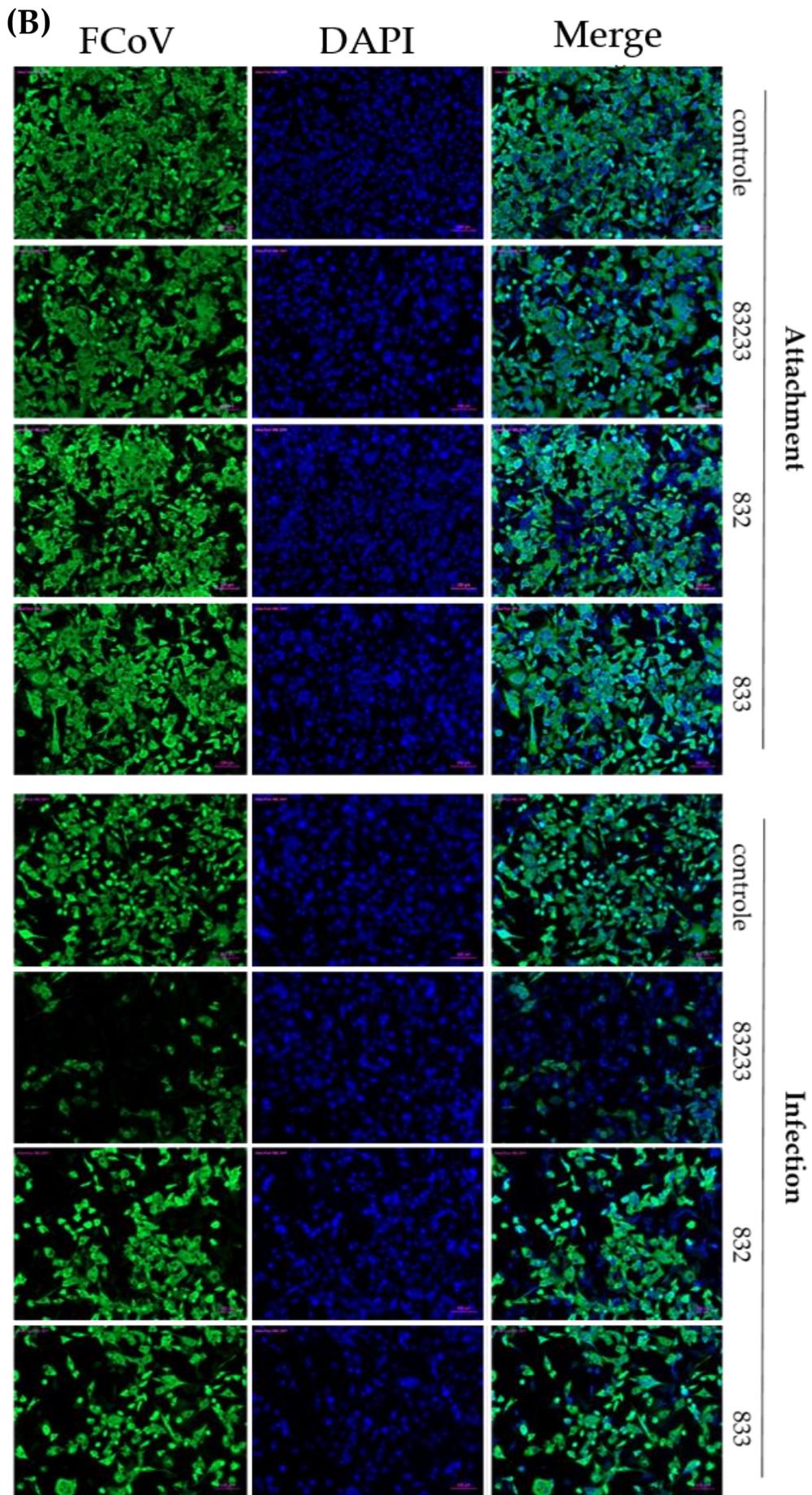
382 We also tested whether SM-CypI had an effect on viral attachment. To this purpose,  
383 we infected cells at 4°C for 1 hour in presence of SM-CypI to allow attachment but not

384 the virus entry. Plates were washed, then incubated at 37°C with or without SM-CypI  
385 (Figure 6)

386



387



389 **Figure 6. Effect of SM-CypI on virus attachment step.** Cells were infected (MOI1) for  
390 1h at 4°C to allow attachment, then rinsed and placed at 37°C for 24h with SM-  
391 CypI (Infection) or without (Attachment). For 832 and 833 molecules, 25µM were used  
392 and 5µM for 83233. (A) Viral supernatant titers. Means of three replicates +/- SD values  
393 were compared with the control titers using unpaired t-tests and analyzed  
394 with Graphpad software. \*\* = p<0.01 vs control (B) Immunofluorescence staining  
395 of FCoV antigens in the different conditions.

396

397 We measured a decrease of the viral titer in supernatant, only when SM-CypI were  
398 added during the infection. We could not observe any effect of SM-CypI on the viral  
399 attachment step. By immunofluorescence, we observed the same results, with an  
400 observation of less viral infected cells only when the molecules were added at the time  
401 of infection. We concluded that SM-CypI are effective on a post-attachment step of the  
402 infection but at an early event of the virus life cycle.

#### 403 **4. Discussion**

404 We described here the antiviral action against FIPV of a new class of cyclophilin  
405 inhibitors. Cyclophilin inhibitors have previously been described for their antiviral  
406 effect on feline coronaviruses [27] as well as many other viruses [16,19,28]. These  
407 inhibitors reduced FIPV infection in a very efficient manner. In order to understand  
408 the role of cyclophilins during the viral cycle of FIPV, we performed time addition  
409 experiments by adding SM-CypI (molecules 83233, 832 and 833) at different times of  
410 infection with FIPV. These experiments allowed us to show that the antiviral action of  
411 SM-CypI took place at an early stage of the replication cycle within the first hour of  
412 infection, after the attachment step. Despite SM-CypI targeting a host protein,  
413 pretreating cells with the inhibitors did not have an impact on viral replication.

414 The outbreaks of SARS-CoV, then MERS-CoV, then SARS-CoV-2, highlighted the high  
415 risk for the emergence of novel coronaviruses. Therefore, there is a need to develop  
416 inhibitors that could be used against potential novel coronaviruses, and even more so,  
417 that can be used to treat current coronavirus pathology, including the deadly FIP.

418 Feline infectious peritonitis virus is one of the deadliest diseases in cats. With a  
419 mortality rate of 100% [29] FIPV is an important challenge in veterinary medicine.  
420 Despite many research efforts to find a cure [30], no treatment has been accepted for  
421 FIP to date. Many compounds with antiviral activity have been studied. Some of them  
422 showed a very low therapeutic index, with a cytotoxic effect dose close to the  
423 inhibitory dose (fusidic acid for example [30]). We described here an inhibitor with a  
424 high therapeutic index (The SI of the molecule 83233 is estimated around 1979),  
425 making this compound a very interesting compound. The most efficient compounds,  
426 notably GS-441524 and GC376 are classical antivirals, targeting directly the virus  
427 replication (for GS-441524 [31]) or the protease (for GC376 [32]). As the SM-CypI have  
428 a host target instead, they should be, like other host-directed antivirals (HDA), less  
429 susceptible to emergence of resistant strains [33]. CsA treatment was attempted in a  
430 client-owned cat, suffering from an effusive form of FIP. Administration of CsA  
431 ranged at doses from 25mg/kg to 75mg/kg. The symptoms and the effusion regressed  
432 but relapse occurred at day 251 post-treatment and the cat died of respiratory failure  
433 after 264 days of treatment [70] CsA has immunosuppressive effect but this  
434 preliminary assay is quite encouraging to the development of cyclophilin inhibitors  
435 against FIPV, especially if they do not have an immunosuppressive effect.  
436 Combination of compounds, targeting different steps of the viral replication cycle can  
437 have synergistic effects. This means that a combination of canonical Direct Acting  
438 Antiviral (DAA) compounds, like GS-441524 and of HDA compounds, like the  
439 molecule 83233 could be a very efficient treatment against FIP.

440 We are currently working on FIPV proteins interactions with feline cyclophilins. The  
441 SARS-CoV N protein interacts with CypA [23] and this interaction is inhibited by the  
442 cyclophilin inhibitor Cyclosporin A. A recent study showed the same interaction for  
443 SARS-CoV-2 N protein [24].

444 The N protein is a multifunctional protein. Its main function is as the major constituent  
445 of the nucleocapsid, but it has also been shown that its recruitment at the replication

446 transcription complex is essential to coronavirus replication [29]. Another study also  
447 showed that the RNA binding domain of N overlaps its CypA binding domain [24]. It  
448 is, therefore, possible that Cyclophilin binding plays an early role potentially linked to  
449 the RTC formation. Another hypothesis is that CypA may play a role in the  
450 disassembly of Coronavirus nucleocapsid. A similar role has been observed in Human  
451 papillomavirus, where CypA bound to the envelope protein L2 and permitted the  
452 disassembly of the capsid [30]. In these cases, the SM-CypI may have an impact on the  
453 interaction between CypA and N, and affect the functionality of the N protein. Since  
454 cyclophilins are highly conserved proteins amongst living beings [31], we are hopeful  
455 that these inhibitors could have a broad spectrum of coronavirus inhibition.

456  
457 **Author Contributions:** Conceptualization, S.LP., A.A-B and M.D.;  
458 methodology, A.A-B, S.LP and M.D.; validation, M.D, A.G and H.H.; formal  
459 analysis, M.D and S.LP.; writing—original draft preparation, M.D.; writing—review  
460 and editing, M.D and S.LP. ; funding acquisition, S.LP. All authors have read and  
461 agreed to the published version of the manuscript.

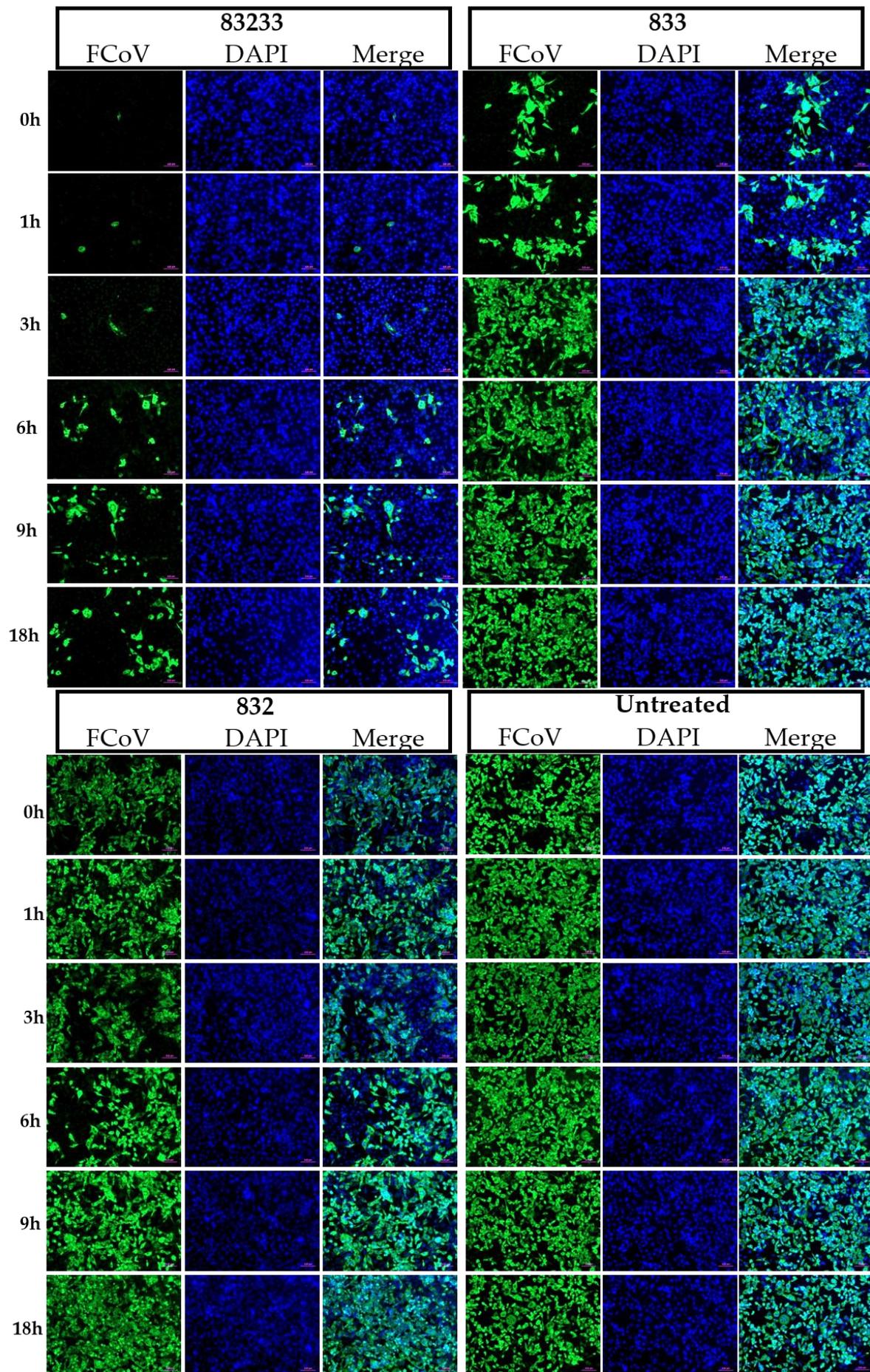
462 **Funding:** This research was funded by a DGER and DIM1Health grant

463 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

464 **Funding:** This research was funded by a DGER and DIM1Health grant

465 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

466 Appendix 1: Detection of FCoV antigens by immunofluorescence after time addition  
467 assays of molecules 832 and 833.



469 **Figure 7. Immunostaining of FCoV antigens in untreated and SM-CypI treated**  
470 **infected cells.** Molecules were added to the cells at various times during the infection  
471 with FIPV. 832 and 833 were used at 25µM and 83233 at 5µM. FCoV antigens were  
472 stained with ascite from a FIPV infected cat (green). Nuclei were stained with DAPI.

## 473 Bibliography

- 474 1. Bande, F.; Arshad, S.S.; Omar, A.R.; Hair-Bejo, M.; Mahmuda, A.; Nair, V. Global  
475 Distributions and Strain Diversity of Avian Infectious Bronchitis Virus: A  
476 Review. *Animal Health Research Reviews* **2017**, *18*, 70–83, doi  
477 :10.1017/S1466252317000044.
- 478 2. Marthaler, D.; Bruner, L.; Collins, J.; Rossow, K. Third Strain of Porcine Epidemic  
479 Diarrhea Virus, United States. *Emerg Infect Dis* **2014**, *20*, 2162–2163, doi  
480 :10.3201/eid2014.140908.
- 481 3. Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Huang, Y.; Yuen, K.-Y. Coronavirus Diversity,  
482 Phylogeny and Interspecies Jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* **2009**, *234*, 1117–  
483 1127, doi :10.3181/0903-MR-94.
- 484 4. Pawlotsky, J.-M. What Are the Pros and Cons of the Use of Host-Targeted  
485 Agents against Hepatitis C? *Antiviral Res* **2014**, *105*, 22–25, doi :  
486 10.1016/j.antiviral.2014.02.008.
- 487 5. Le Poder, S. Péritonite infectieuse féline. *EMC - Vétérinaire* **2005**, *2*, 169–178, doi :  
488 10.1016/j.emcvet.2005.10.001.
- 489 6. Glansbeek, H.L.; Haagmans, B.L.; Te Lintelo, E.G.; Egberink, H.F.; Duquesne, V.;  
490 Aubert, A.; Horzinek, M.C.; Rottier, P.J.M. Adverse Effects of Feline IL-12 during  
491 DNA Vaccination against Feline Infectious Peritonitis Virus. *J Gen Virol* **2002**, *83*,  
492 1–10, doi :10.1099/0022-1317-83-1-1.
- 493 7. Vennema, H.; de Groot, R.J.; Harbour, D.A.; Dalderup, M.; Gruffydd-Jones, T.;  
494 Horzinek, M.C.; Spaan, W.J. Early Death after Feline Infectious Peritonitis Virus  
495 Challenge Due to Recombinant Vaccinia Virus Immunization. *J Virol* **1990**, *64*,  
496 1407–1409.
- 497 8. Sola, I.; Almazán, F.; Zúñiga, S.; Enjuanes, L. Continuous and Discontinuous  
498 RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol* **2015**, *2*, 265–288, doi  
499 :10.1146/annurev-virology-100114-055218.
- 500 9. Kummrow, M.; Meli, M.L.; Haessig, M.; Goenczi, E.; Poland, A.; Pedersen, N.C.;  
501 Hofmann-Lehmann, R.; Lutz, H. Feline Coronavirus Serotypes 1 and 2:  
502 Seroprevalence and Association with Disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab*  
503 *Immunol* **2005**, *12*, 1209–1215, doi :10.1128/CDLI.12.10.1209-1215.2005.
- 504 10. Le Poder, S. Feline and Canine Coronaviruses: Common Genetic and  
505 Pathobiological Features. *Adv Virol* **2011**, *2011*, 609465, doi :10.1155/2011/609465.
- 506 11. Rottier, P.J.M.; Nakamura, K.; Schellen, P.; Volders, H.; Haijema, B.J. Acquisition  
507 of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis

- 508 Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *J Virol* **2005**,  
509 79, 14122–14130, doi :10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005.
- 510 12. Bank-Wolf, B.R.; Stallkamp, I.; Wiese, S.; Moritz, A.; Tekes, G.; Thiel, H.-J.  
511 Mutations of 3c and Spike Protein Genes Correlate with the Occurrence of Feline  
512 Infectious Peritonitis. *Vet. Microbiol.* **2014**, 173, 177–188, doi:  
513 10.1016/j.vetmic.2014.07.020.
- 514 13. Herrewegh, A.A.; Smeenk, I.; Horzinek, M.C.; Rottier, P.J.; de Groot, R.J. Feline  
515 Coronavirus Type II Strains 79-1683 and 79-1146 Originate from a Double  
516 Recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus. *J*  
517 *Virol* **1998**, 72, 4508–4514, doi :10.1128/JVI.72.5.4508-4514.1998.
- 518 14. Göthel, S.F.; Marahiel, M.A. Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerases, a Superfamily  
519 of Ubiquitous Folding Catalysts. *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, 423–436, doi  
520 :10.1007/s000180050299.
- 521 15. Castro, A.P.V.; Carvalho, T.M.U.; Moussatché, N.; Damaso, C.R.A.  
522 Redistribution of Cyclophilin A to Viral Factories during Vaccinia Virus  
523 Infection and Its Incorporation into Mature Particles. *J Virol* **2003**, 77, 9052–9068,  
524 doi :10.1128/jvi.77.16.9052-9068.2003.
- 525 16. Hamamoto, I.; Harazaki, K.; Inase, N.; Takaku, H.; Tashiro, M.; Yamamoto, N.  
526 Cyclosporin A Inhibits the Propagation of Influenza Virus by Interfering with a  
527 Late Event in the Virus Life Cycle. *Jpn J Infect Dis* **2013**, 66, 276–283, doi  
528 :10.7883/yoken.66.276.
- 529 17. Qing, J. ; Wang, Y. ; Sun, Y. ; Huang, J. ; Yan, W.; Wang, J.; Su, D.; Ni, C.; Li, J.;  
530 Rao, Z.; et al. Cyclophilin A Associates with Enterovirus-71 Virus Capsid and  
531 Plays an Essential Role in Viral Infection as an Uncoating Regulator. *PLoS Pathog*  
532 **2014**, 10, e1004422, doi: 10.1371/journal.ppat.1004422.
- 533 18. de Wilde, A.H.; Pham, U.; Posthuma, C.C.; Snijder, E.J. Cyclophilins and  
534 Cyclophilin Inhibitors in Nidovirus Replication. *Virology* **2018**, 522, 46–55, doi  
535 :10.1016/j.virol.2018.06.011.
- 536 19. de Wilde, A.H.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; van der Meer, Y.; Thiel, V.; Narayanan,  
537 K.; Makino, S.; Snijder, E.J.; van Hemert, M.J. Cyclosporin A Inhibits the  
538 Replication of Diverse Coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **2011**, 92, 2542–2548, doi  
539 :10.1099/vir.0.034983-0.
- 540 20. Pfefferle, S.; Schöpf, J.; Kögl, M.; Friedel, C.C.; Müller, M.A.; Carbajo-Lozoya, J.;  
541 Stellberger, T.; von Dall’Armi, E.; Herzog, P.; Kallies, S.; et al. The SARS-  
542 Coronavirus-Host Interactome: Identification of Cyclophilins as Target for Pan-  
543 Coronavirus Inhibitors. *PLoS Pathog* **2011**, 7, e1002331, doi  
544 :10.1371/journal.ppat.1002331.
- 545 21. Lee, Y.J.; Lee, C. Porcine Deltacoronavirus Induces Caspase-Dependent  
546 Apoptosis through Activation of the Cytochrome c-Mediated Intrinsic  
547 Mitochondrial Pathway. *Virus Res* **2018**, 253, 112–123, doi  
548 :10.1016/j.virusres.2018.06.008.

- 549 22. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Sasaki, T. Feline Coronavirus Replication Is Affected by Both  
550 Cyclophilin A and Cyclophilin B. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 190–200, doi  
551 :10.1099/jgv.0.000663.
- 552 23. Luo, C.; Luo, H.; Zheng, S.; Gui, C.; Yue, L.; Yu, C.; Sun, T.; He, P.; Chen, J.; Shen,  
553 J.; et al. Nucleocapsid Protein of SARS Coronavirus Tightly Binds to Human  
554 Cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *321*, 557–565, doi  
555 :10.1016/j.bbrc.2004.07.003.
- 556 24. Lutomski, C.A.; El-Baba, T.J.; Bolla, J.R.; Robinson, C.V. Proteoforms of the  
557 SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Are Primed to Proliferate the Virus and  
558 Attenuate the Antibody Response. *bioRxiv* **2020**, 2020.10.06.328112, doi  
559 :10.1101/2020.10.06.328112.
- 560 25. Ma-Lauer, Y.; Zheng, Y.; Malešević, M.; von Brunn, B.; Fischer, G.; von Brunn,  
561 A. Influences of Cyclosporin A and Non-Immunosuppressive Derivatives on  
562 Cellular Cyclophilins and Viral Nucleocapsid Protein during Human  
563 Coronavirus 229E Replication. *Antiviral Res* **2020**, *173*, 104620, doi  
564 :10.1016/j.antiviral.2019.104620.
- 565 26. Ahmed-Belkacem, A.; Colliandre, L.; Ahnou, N.; Nevers, Q.; Gelin, M.; Bessin,  
566 Y.; Brillet, R.; Cala, O.; Douguet, D.; Bourguet, W.; et al. Fragment-Based  
567 Discovery of a New Family of Non-Peptidic Small-Molecule Cyclophilin  
568 Inhibitors with Potent Antiviral Activities. *Nature Communications* **2016**, *7*, 12777.
- 569 27. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Osawa, S.; Inoue, M.; Tanaka, S.; Sasaki, T. Suppression of  
570 Feline Coronavirus Replication in Vitro by Cyclosporin A. *Veterinary Research*  
571 **2012**, *43*, 41, doi :10.1186/1297-9716-43-41.
- 572 28. Damaso, C.R.; Moussatché, N. Inhibition of Vaccinia Virus Replication by  
573 Cyclosporin A Analogues Correlates with Their Affinity for Cellular  
574 Cyclophilins. *J Gen Virol* **1998**, *79* ( Pt 2), 339–346, doi :10.1099/0022-1317-79-2-  
575 339.
- 576 29. Hök, K. Morbidity, Mortality and Coronavirus Antigen in Previously  
577 Coronavirus Free Kittens Placed in Two Catteries with Feline Infectious  
578 Peritonitis. *Acta Vet Scand* **1993**, *34*, 203–210.
- 579 30. Delaplace, M.; Huet, H.; Gambino, A.; Le Poder, S. Feline Coronavirus Antivirals  
580 : A Review. *Pathogens* **2021**, *10*, 1150, doi :10.3390/pathogens10091150.
- 581 31. Pedersen, N.C.; Perron, M.; Bannasch, M.; Montgomery, E.; Murakami, E.;  
582 Liepnieks, M.; Liu, H. Efficacy and Safety of the Nucleoside Analog GS-441524  
583 for Treatment of Cats with Naturally Occurring Feline Infectious Peritonitis. *J*  
584 *Feline Med Surg* **2019**, *21*, 271–281, doi :10.1177/1098612X19825701.
- 585 32. Kim, Y.; Shivanna, V.; Narayanan, S.; Prior, A.M.; Weerasekara, S.; Hua, D.H.;  
586 Kankanamalage, A.C.G.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Broad-Spectrum  
587 Inhibitors against 3C-Like Proteases of Feline Coronaviruses and Feline  
588 Caliciviruses. *Journal of Virology* **2015**, *89*, 4942–4950, doi :10.1128/JVI.03688-14.
- 589 33. Kaufmann, S.H.E.; Dorhoi, A.; Hotchkiss, R.S.; Bartenschlager, R. Host-Directed  
590 Therapies for Bacterial and Viral Infections. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 35–56,  
591 doi :10.1038/nrd.2017.162.

## B. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

En plus des résultats décrits précédemment, d'autres expériences ont été réalisées.

### 1. Test de réversibilité de l'inhibition

L'action antivirale des SM-CypI a lieu à un temps précoce. Afin de savoir si cette inhibition était réversible, une infection de CRFK en présence de SM-CypI à 25 $\mu$ M pour 832 et 833 ou 5 $\mu$ M pour 83233 a été réalisée. Les SM-CypI ont été retirées 3h après le début de l'infection ou ont été laissées jusqu'à la fin de l'expérience (18h p.i)

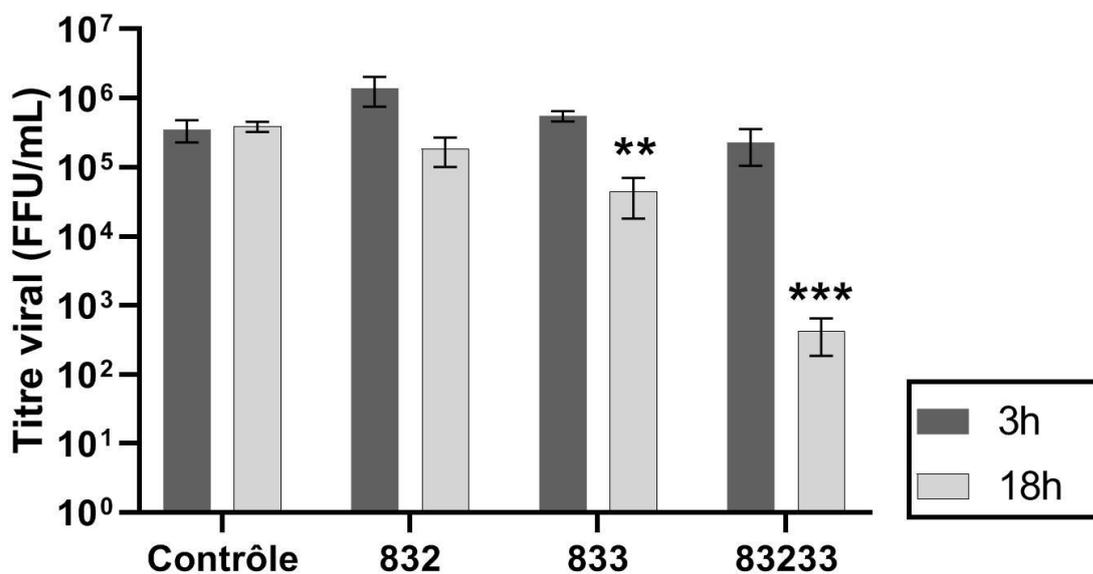


Figure 28 : Etude de la réversibilité de l'action antivirale des SM-CypI sur les particules infectieuses. Les molécules SM-CypI ont été ôtées du milieu de culture soit 3h post-infection soit maintenues pendant 18h. Les surnageants de chaque condition ont été titrés 18 h p.i et les moyennes +/- écart-types standards de trois réplicats sont représentés. \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport au contrôle.

La Figure 28 montre que le titre viral dans les surnageants de culture où les molécules SM-CypI ont été mises en contact avec les cellules infectées seulement pendant les trois premières heures de l'infection, est équivalent à celui des surnageants de culture non-traitées. L'effet antiviral des molécules SM-CypI bien que survenant de manière

précoce, semble donc réversible. Il est possible que les molécules SM-CypI bloquent l'infection à une étape particulière du cycle et que lorsqu'elles sont ôtées, le cycle viral reprend sur les 15 h restantes.

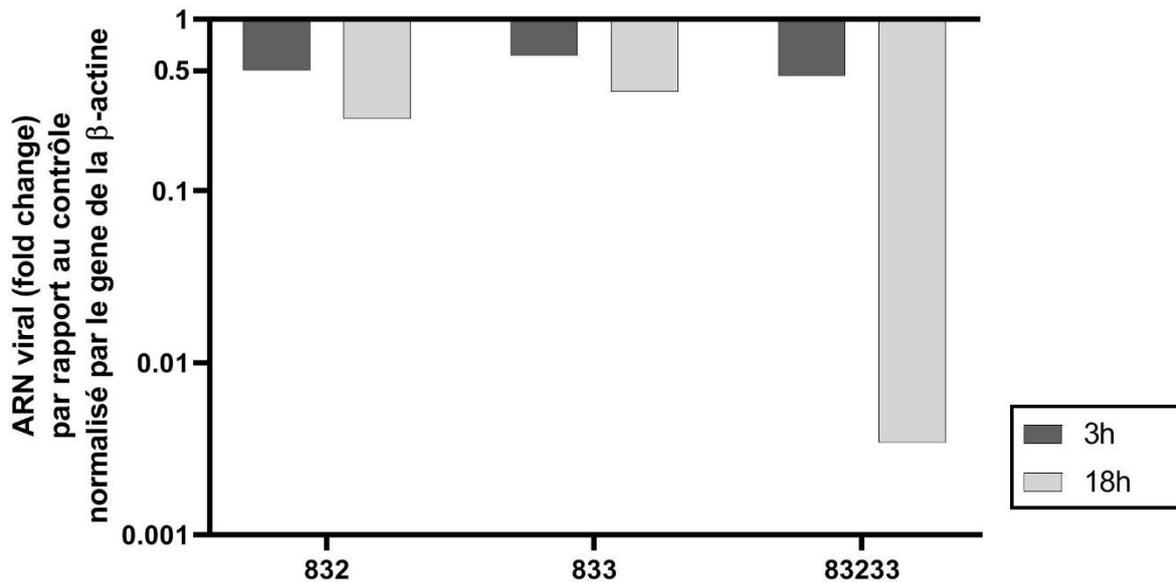


Figure 29 : Etude de la réversibilité de l'action antivirale des SM-CypI sur les ARN viraux intracellulaires. Les molécules SM-CypI ont été ôtées du milieu de culture soit 3h post-infection soit maintenues pendant 18h. Les cellules ont été lysées 18 h p.i. Les ARNs totaux ont été extraits et les ARN viraux ont été mesuré par RTqPCR. La moyenne des Ct (n=2) a été normalisée avec le gène de la  $\beta$ -actine féline. Les  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sont rapportés au contrôle non traité et présentés ici en fold change.

On peut voir sur la Figure 29 que les tendances des titres des particules infectieuses ne sont pas suivies par les ARN viraux intracellulaires.

Etant donné le système de répllication particulier des coronavirus et l'existence de leurs ARN sous génomiques, il était possible qu'une des étapes affectées par les cyclophilines joue sur la quantité d'ARN génomique par rapport aux ARN sous génomiques. Afin d'explorer plus précisément cette hypothèse, nous avons développé un système de sonde/amorces spécifique d'une séquence correspondant à nsp6. Ces amorces ont donc la particularité de n'amplifier que les ARNv génomiques. Nous avons ainsi pu comparer la quantité d'ARN génomiques et la quantité d'ARN sous-

génomiques intracellulaires au cours d'une expérience où les SM-CypI ont été ajoutées à différents temps post-infection (1h, 3h, 6, 9, 18h).

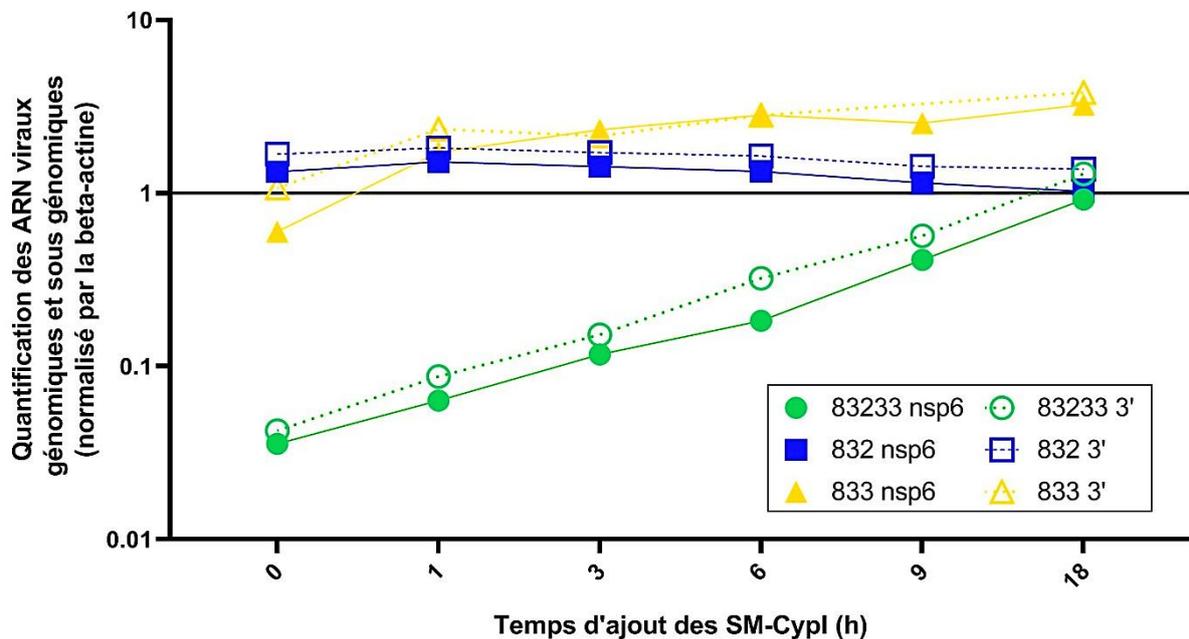


Figure 30 : Quantification des ARN génomiques et sous génomiques lors d'une expérience d'ajout des SM-cypI à différents temps post-infection. Les ARN génomiques seuls quantifiés par une RT-qPCR ciblant nsp6 sont représentés par les symboles et traits pleins et les ARN sous-génomiques, quantifiés par une RT-qPCR ciblant l'extrémité 3' du génome sont représentés par les traits en pointillés/symboles vides. Les quantités d'ARN ont été normalisées avec la  $\beta$ -actine puis avec les contrôles non traités par SM-CypI par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

On observe une quantité moindre d'ARN génomique par rapport aux ARN sous-génomiques ce qui était attendu compte tenu du mode de transcription des Coronavirus. La diminution de la quantité des ARN sous-génomiques paraît directement en lien avec la diminution des ARN génomiques. (Figure 30). Cette observation laisse penser que l'inhibition de FCoV par les SM-CypI aurait lieu avant la synthèse des ARNsg. L'utilisation d'un réplicon permettrait de confirmer cette hypothèse.

## C. CONCLUSION

L'objectif de ce projet était premièrement de vérifier l'implication des cyclophilines dans le cycle viral du coronavirus félin, et de caractériser l'étape du cycle à laquelle ces cyclophilines interagissaient.

Nous avons pu déterminer que, comme mis en avant par d'autres études [273,381], la réplication du coronavirus félin est inhibée par des inhibiteurs de cyclophilines, démontrant bien l'importance de ces protéines dans le cycle viral de ce virus. Nous avons aussi pu déterminer que les cyclophilines jouent potentiellement différents rôles à différentes étapes du cycle viral, puisqu'une action antivirale était observée lors de l'ajout de la molécule 83233 jusqu'à 6h post infection.

Cependant, nous avons établi que le rôle majeur des cyclophilines dans la réplication des coronavirus se jouait à des temps précoces, avec une activité antivirale maximale lorsque les molécules inhibitrices sont mises en même temps que le virus ou dans la première heure suivant l'infection. Nous avons aussi pu préciser que cette inhibition ne portait pas sur l'étape l'attachement du virus sur son récepteur et que la préincubation des cellules avec ces inhibiteurs n'influençait n'avait aucun effet antiviral. Il semblerait aussi que l'action antivirale des SM-CypI soit réversible, puisque leurs retraits à 3h p.i a permis d'obtenir un titre viral dans le surnageant de culture infectée similaire au surnageant des cellules contrôles, infectées mais sans présence d'inhibiteur.

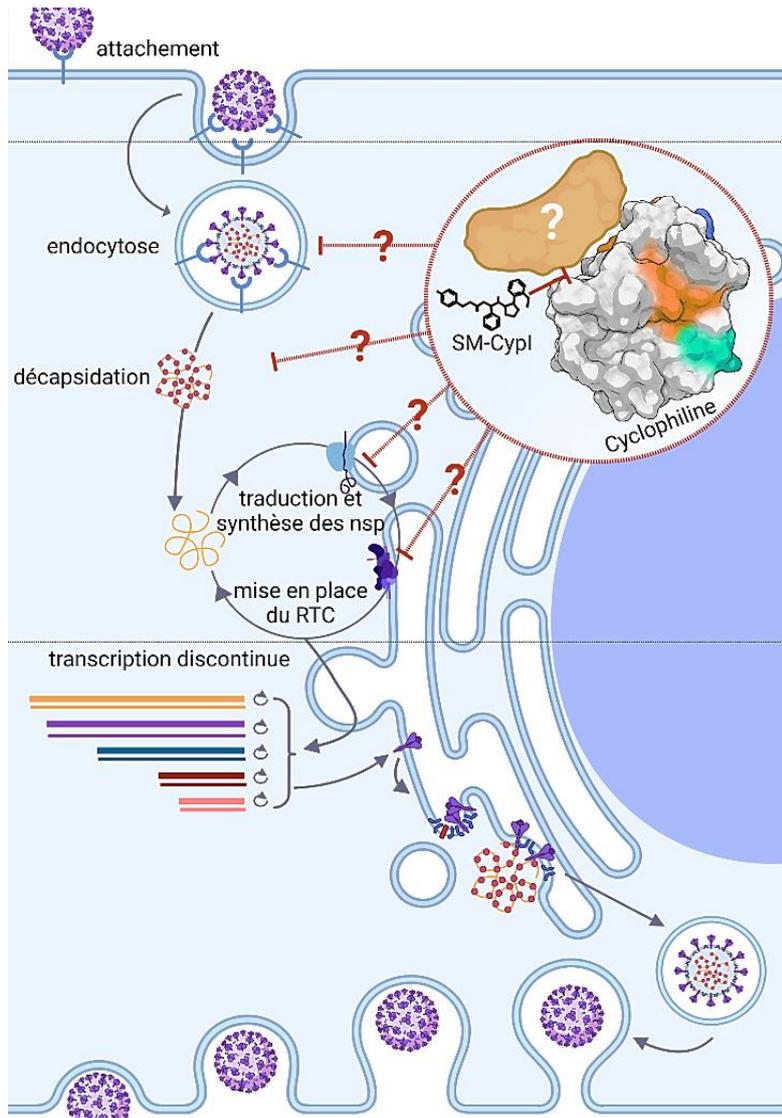


Figure 31 : Etapes du cycle viral du coronavirus félin potentiellement ciblées par les SM-CypI.

Ainsi les inhibiteurs de cyclophilines auraient un impact soit sur les étapes d'endocytose, de décapsidation ou de mise en place du complexe de réplication/transcription ( Figure 31) , cela signifie que les cyclophilines sont utilisées par le coronavirus félin à l'une de cette/ces étapes. Afin de mieux préciser le rôle des cyclophilines dans le cycle viral, mécanisme, nous avons souhaité investiguer les éventuelles interactions entre les cyclophilines et les protéines virales.

## II. ETUDES DES INTERACTIONS DES PROTEINES VIRALES ET CYCLOPHILINES

---

Le deuxième objectif de cette thèse a été de rechercher d'éventuelles interactions entre les cyclophilines cellulaires et les protéines des coronavirus.

### A. ETAT DE L'ART

Le génome des coronavirus est constitué de 5 protéines structurales, 16 protéines non-structurales ainsi que des protéines accessoires. Du côté des cyclophilines, une quarantaine de cyclophilines est présente chez les mammifères. Une sélection des candidats a été réalisée sur la base des études préalablement existantes. Premièrement, la Cyclophiline A a été sélectionnée car étant celle la plus impliquée dans la réplication de divers Coronavirus (voir Tableau 5). Pour les protéines virales, la protéine N a été sélectionnée car des interactions entre N et CypA ont été identifiées chez plusieurs coronavirus humains [389,393]. Nsp1, dont l'interaction avec des cyclophilines avait aussi été montrée [371] a également été sélectionnée.

Une étude [387] démontrait aussi que l'infection par le coronavirus HCoV-229E a pour conséquence la relocalisation de CypB dans des structures particulières de RE. Nsp4 et nsp6 induisent des repliements des membranes du RE. Nous avons donc sélectionné ces protéines pour le crible.

Une expérience du laboratoire partenaire de ce projet (Ahmed-Belkacem et al. Résultats non publiés) avait déterminé que des souches du virus HCoV-229E résistantes à certains SM-CypI présentaient des mutations dans les ORFs des protéines Nsp13 et Nsp15 et de la protéine S. Ces protéines virales ont donc également été sélectionnées.

## **B. TESTS D'INTERACTION ENTRE LES PROTEINES VIRALES DU FIPV ET LA CYCLOPHILINE A FELINE**

Afin d'identifier les interactions entre les protéines virales et les cyclophilines cellulaires, plusieurs méthodes ont été testées : la coprécipitation par GST pull-down, la complémentation fonctionnelle de luciférase et le test de ligation de proximité. Pour réaliser ces expériences, les gènes des protéines choisies ont été insérés dans des plasmides afin d'obtenir l'expression des protéines recombinantes marquées avec les différentes étiquettes nécessaires.

### **1. Construction d'une banque de plasmides codants pour les protéines recombinantes du virus FIPV**

L'ARN total de cellules CRFK infectées par FIPV 79-1146 a été extrait et a servi de matrice pour les cloner les ORF des protéines virales souhaitées. Afin d'éviter d'obtenir des ORF de cyclophilines portant des mutations potentiellement dues à la dérive génétique des lignées cellulaires, les ARN extraits de sang de chat ont été utilisés comme matrice. Les ORFs des protéines candidates ont été amplifiés par PCR et insérés dans des plasmides d'entrée du système « Gateway », afin d'obtenir des plasmides donneurs (pDONR). Ce système permet de recombiner facilement les plasmides donneurs avec des plasmides de destination portant différentes étiquettes grâce à des sites homologues présents sur les deux types de plasmides (Figure 23). Les plasmides résultants codent les protéines recombinantes portant diverses étiquettes. Dans le cadre de ce projet, des plasmides codant des protéines recombinantes nsp1, nsp4, nsp13 et nsp15 ainsi que les protéines N et S et la cyclophiline A (Figure 24) avec des étiquettes FLAG, GST, et des sous-domaines d'une luciférase (système Nanoluc) ont été obtenus.

## 2. Test de ligation de proximité

Nous n'avons observé aucune interaction avec les techniques de coprécipitation par GST pull-down et de complémentation fonctionnelle de la luciférase. Cependant, les différentes données de la littérature pointent vers une interaction possible entre la protéine N de différents coronavirus (SARS-CoV, SARS-CoV-2 et HCoV-229E) et la cyclophiline A. Nous avons donc choisi de spécifiquement nous focaliser sur l'interaction potentielle entre la protéine N du virus FIPV et la CypA féline, en réalisant un test d'interaction par ligation de proximité (Proximity Ligation Assay ou PLA en anglais). Des plasmides codant la CypA féline avec étiquette 3X FLAG ou la protéine de nucléocapside de FIPV exprimée avec l'étiquette GST ont été cotransfectés dans des cellules humaines HeLa et les étiquettes ont été utilisées pour détecter la proximité des protéines par la technique de PLA. Le principe de cette technique est décrit dans la Figure 26.

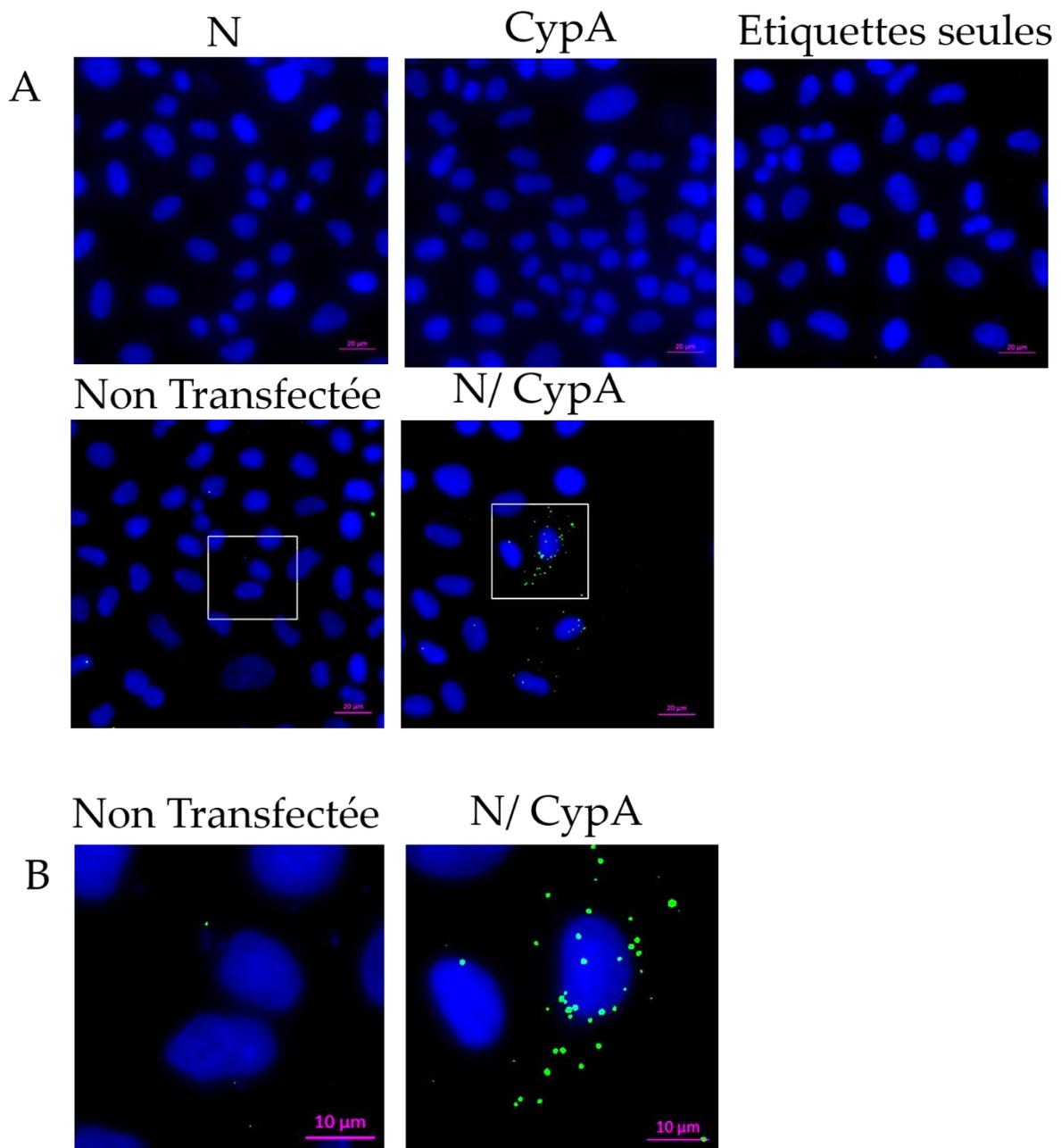


Figure 32 : Visualisation de l'interaction de la protéine N du coronavirus félin et la CypA féline par PLA. Des cellules HeLa ont été transfectées par des plasmides permettant l'expression des protéines CypA-3XFlag, de la protéine N-GST ou co-transfectées avec ces deux plasmides simultanément (N/CypA). Des contrôles avec des cellules non transfectées ou co-transfectées avec des plasmides pDEST exprimant seulement les domaines GST ou 3XFLAG sont réalisés. Les noyaux sont colorés au DAPI. La PLA est effectuée à partir des étiquettes 3X FLAG (CypA féline) et GST (Nucléocapside de FIPV). Les barres d'échelles correspondent à 20 $\mu$ m (A) ou 10 $\mu$ m (B). Les photos en (B) sont un agrandissement des zones représentées par les carrés blancs en (A).

On observe très peu de cellules exprimant à la fois les protéines N et cyclophiline A. Une fluorescence est bien détectée dans les cellules co-exprimant les deux protéines, ce qui témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Aucune fluorescence n'est observée dans les cellules témoins (exprimant seulement l'une des deux protéines, ou exprimant que les étiquettes "FLAG" et "GST", ou les cellules non- transfectées). Ainsi, l'interaction entre la protéine N et la cyclophiline A est montrée ici pour un modèle félin de coronavirus et pour la première fois dans un autre modèle que pour un coronavirus infectant l'Homme.

### **3. Etude des interactions potentielles entre les protéines virales du SARS-CoV-2 et la cyclophiline A**

En décembre 2019, le SARS-CoV-2 a émergé dans la population humaine, devenant rapidement un problème critique de santé publique. Il a été rapidement montré que les inhibiteurs de cyclophilines comme l'Alisporivir inhibait la réplication du SARS-CoV-2 [394]. De plus la molécule 83233 a un effet inhibiteur de la réplication du SARS-CoV-2 (H. Ahmed-Belkacem, communication personnelle). Les cyclophilines sont donc très probablement nécessaires à la réplication du SARS-CoV-2 et nous avons souhaité investiguer les interactions potentielles entre les cyclophilines et les protéines virales de SARS-CoV-2. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les interactions avec la cyclophiline A, qui est la plus abondante dans les cellules. Nous avons choisi de tester différentes protéines du SARS-CoV-2 vis à vis de la cyclophiline A. Notre choix des protéines virales à tester s'est basé sur les différentes données de la littérature concernant les interactions potentielles entre les coronavirus et les cyclophilines. Nous avons donc sélectionné les mêmes protéines du SARS-CoV-2, comme nous l'avions envisagé pour le virus FIPV : nsp1, nsp4, nsp6, nsp7, nsp13, nsp15 et les protéines de structure S et N ainsi que les protéines nsp3 et nsp14. Nous avons choisi de tester ces potentielles interactions par le test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluciférase (Nanoluc), qui permet de tester rapidement un grand nombre d'interaction. Cette technique innovante repose sur la détection d'une

petite luciférase de 19 KDa isolée chez la crevette *Oplophorus gracilirostris*. Le principe, décrit dans la Figure 25, est de séparer la Nanoluc en deux fragments (Luc1 et Luc2) et de fusionner le fragment 1 (Luc1) avec la protéine X et le fragment 2 (Luc2) avec la protéine Y ou inversement. Chaque fragment peut être fusionné à l'extrémité N-terminale ou à l'extrémité C-terminale des protéines à tester. Les protéines fusionnées s'expriment à partir de plasmides d'expression construits. S'il y a une interaction entre les protéines X et Y alors la Nanoluc sera reconstituée et pourra, en présence de substrat, émettre de la luminescence (Figure 25). Cette activité lumineuse est mesurable. Pour chaque interaction testée on calcule le ratio luminescence normalisé (NLR) de l'interaction testée par rapport à la somme de la luminescence des deux contrôles négatifs.

$$NLR = \frac{\text{Luminescence}(X\text{Luc1} + Y\text{Luc2})}{\text{Luminescence}(X\text{Luc1} + \text{Luc2}) + \text{Luminescence}(\text{Luc1} + Y\text{Luc2})}$$

On estime qu'il y a une interaction si le NLR est égal ou supérieur à 3, soit trois fois supérieur au bruit de fond.

Une banque de plasmides de l'ORFéome du SARS-CoV-2 nous a été fournie par le Dr Yves Jacob (Institut Pasteur). Afin de pouvoir réaliser des tests d'interaction entre protéines par reconstitution de la nanoluciférase, il a fallu insérer des étiquettes Luc1 ou Luc2 pour chaque ORF. Les étiquettes Luc1 et Luc2 ont été positionnées à l'extrémité 5' des ORFs des protéines SARS-CoV-2 et aux extrémités 5' ou 3' des cyclophilines testées. Deux cribles ont été réalisés avec 6 interactions testées dans 4 configurations différentes, 4 dans configuration différentes, et l'interaction nsp13 n'a pu être testée que dans 2 configurations, en raison d'un problème d'amplification du plasmide. Les NLRs ont été calculés et sont rassemblés sur la Figure 33. On y observe que seule l'interaction N/CypA présente une majorité de configuration avec un NLR, ainsi que leur médiane supérieure à trois fois le bruit de fond.

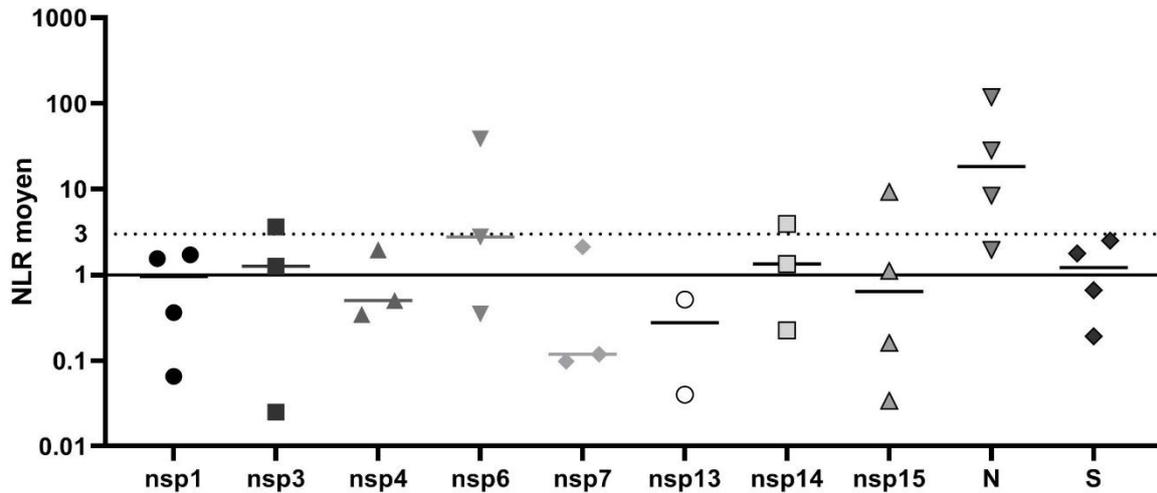


Figure 33 : Test d'interaction par complémentation fonctionnelle des protéines recombinantes de SARS-CoV-2 et de la cyclophiline A. Les différents points représentent des configurations différentes de la cyclophiline A et leurs médianes (trait). La ligne pointillée représente un niveau de luminescence trois fois supérieure au bruit de fond, considéré comme le seuil de positivité.

Certaines configurations d'autres interactions sont également supérieures à 3 (nsp6 par exemple) mais la majorité des confirmations reste en dessous du seuil. L'interaction entre la protéine N de SARS-CoV-2 et la cyclophiline A humaine, a déjà été décrite par une autre étude [393], ce qui conforte nos résultats présentés ici.

## C. CONCLUSION

Nous avons décrit ici pour la première fois l'interaction de la protéine N du virus FIPV avec la cyclophiline A féline. Nous retrouvons aussi une interaction entre la protéine N du SARS-CoV-2 et la cyclophiline A, qui a été décrite précédemment y compris pour le SARS-CoV [389] et HCoV-229E [387].

Aucune étude n'a encore démontré si le rôle des cyclophilines dans le cycle viral des coronavirus était identique ou au contraire différent selon l'hôte et/ou le virus, mais il semble que l'interaction entre la protéine N et la cyclophiline A soit une interaction conservée pour différents coronavirus.

Nous avons poursuivi nos études en nous intéressant au rôle des cyclophilines et à l'effet antiviral de leurs inhibiteurs pour d'autres coronavirus.

### III. ETUDES DE L'EFFET ANTIVIRAL DES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES SUR D'AUTRES CORONAVIRUS

---

#### A. ETUDE DES INHIBITEURS DE CYCLOPHILINES DANS LE CYCLE VIRAL DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE (IBV)

Puisque des interactions entre les cyclophilines et protéines de coronavirus ont été montrées chez des *alpha*- et *betacoronavirus* de deux espèces hôtes différentes (le chat et l'homme), nous nous sommes intéressés à un coronavirus plus éloigné.

IBV est un *gammacoronavirus* infectant des poulets. Les cyclophilines sont des protéines très conservées et sont très proches d'un mammifère à l'autre, mais plus distantes chez les oiseaux comme le poulet. Comme visible sur la Figure 34, les acides aminés des poches catalytiques et poches gardiennes sont complètement conservés. En revanche, on observe une variabilité entre les cyclophilines des différentes espèces. Par exemple, les cyclophilines de mammifères partagent ici plus de 95% d'identité, mais la cyclophiline de poulet n'en partage que 90% (89% avec celle du chat).

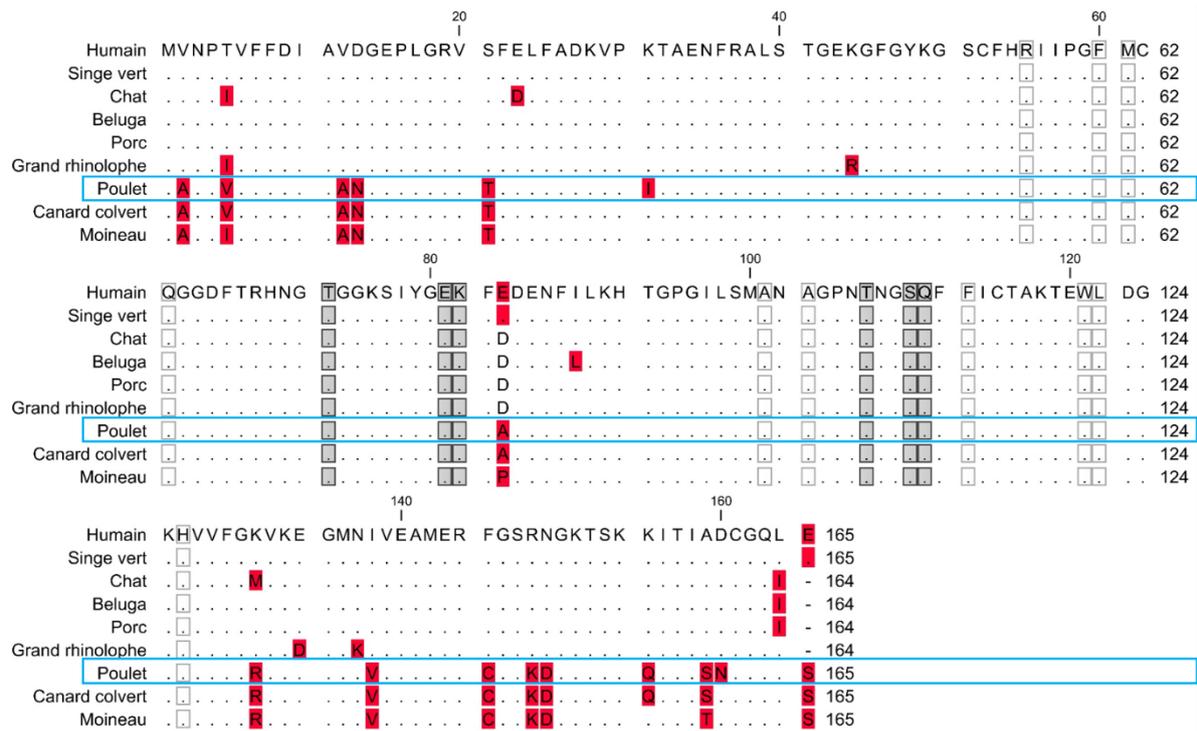


Figure 34 : Comparaison des séquences protéiques de cyclophiline A de différentes espèces. Les séquences des cyclophilines de six mammifères (humain, singe vert, chat, beluga, porc et chauves-souris grand rhinolophe) et de trois oiseaux (poulet, canard colvert et moineau) ont été alignées. Les différences sont indiquées en rouge, les carrés indiquent les acides aminés de la poche catalytique (blanc) ou de la poche gardienne (gris). Les alignements ont été réalisés sur CLC mainworkbench à partir des séquences trouvées sur Uniprot. La séquence de la cyclophiline de poulet est indiquée en bleu.

Afin de vérifier si les cyclophilines sont nécessaires au cycle de réplication des *gammacoronavirus*, nous avons de nouveau utilisé les mêmes inhibiteurs SM-CypI. Des expériences pour évaluer l'effet antiviral des molécules 832, 833 et 83233 sur IBV ont été réalisées sur des cellules primaires de poulet. Ces expériences ont été réalisées dans le cas d'un partenariat avec l'ANSES de Ploufragan, avec le Dr. Paul Brown et Chantal Allée.

IBV est un *gammacoronavirus* représentant un véritable défi pour l'industrie agroalimentaire. Ce virus est présent dans les élevages de tous les pays exportant des poulets et affecte les poules adultes comme les embryons. Afin de se rapprocher un maximum d'un modèle relevant, nous avons utilisé deux souches prototypes d'IBV : La souche Massachussets 41 (M41 ou Mass 41), qui est (avec ces variants Mass-like) la

souche la plus prévalente en Amérique. Les souches de génotype CR 88 (aussi connu comme 4/91 ou 793B) sont les souches les plus prévalentes en Europe. Ce sont les souches les plus utilisées pour la vaccination. Les deux souches ont un tropisme respiratoire, classique des souches pathogènes d'IBV.

Nous avons eu l'opportunité d'utiliser un modèle de cellules primaires d'embryon de poulet utilisé par le laboratoire d'accueil. Nous avons prélevé les cellules rénales d'embryon de poulet et les avons ensemencées en plaque 24h avant l'expérience, évitant d'éventuelle dérive génétique liée aux passages répétés des lignées de cellules. Toutes les expériences ont été menées avec une multiplicité d'infection (MOI) de 1. Pour chaque expérience, les surnageants de culture ont été récoltés et les titres des particules infectieuses ont été estimés par calcul de la dilution limite. Les tapis cellulaires ont été lysés, les ARN totaux extraits puis la quantité de génome viral a été mesurée en utilisant un système de sonde/amorce amplifiant une séquence dans la partie 5'UTR du génome entre la séquence leader et l'ORF1a/b. Le gène de la GAPDH cellulaire a aussi été amplifié et sert de gène de ménage.

Nous avons d'abord testé l'éventuel effet antiviral de la molécule 833233 en la mettant en présence des virus IBV au moment de l'infection et pendant toute la durée de l'expérimentation, avec une incubation des cellules pendant 48h. Nous avons testé des quantités croissantes de la molécule de 10 à 100 $\mu$ M.

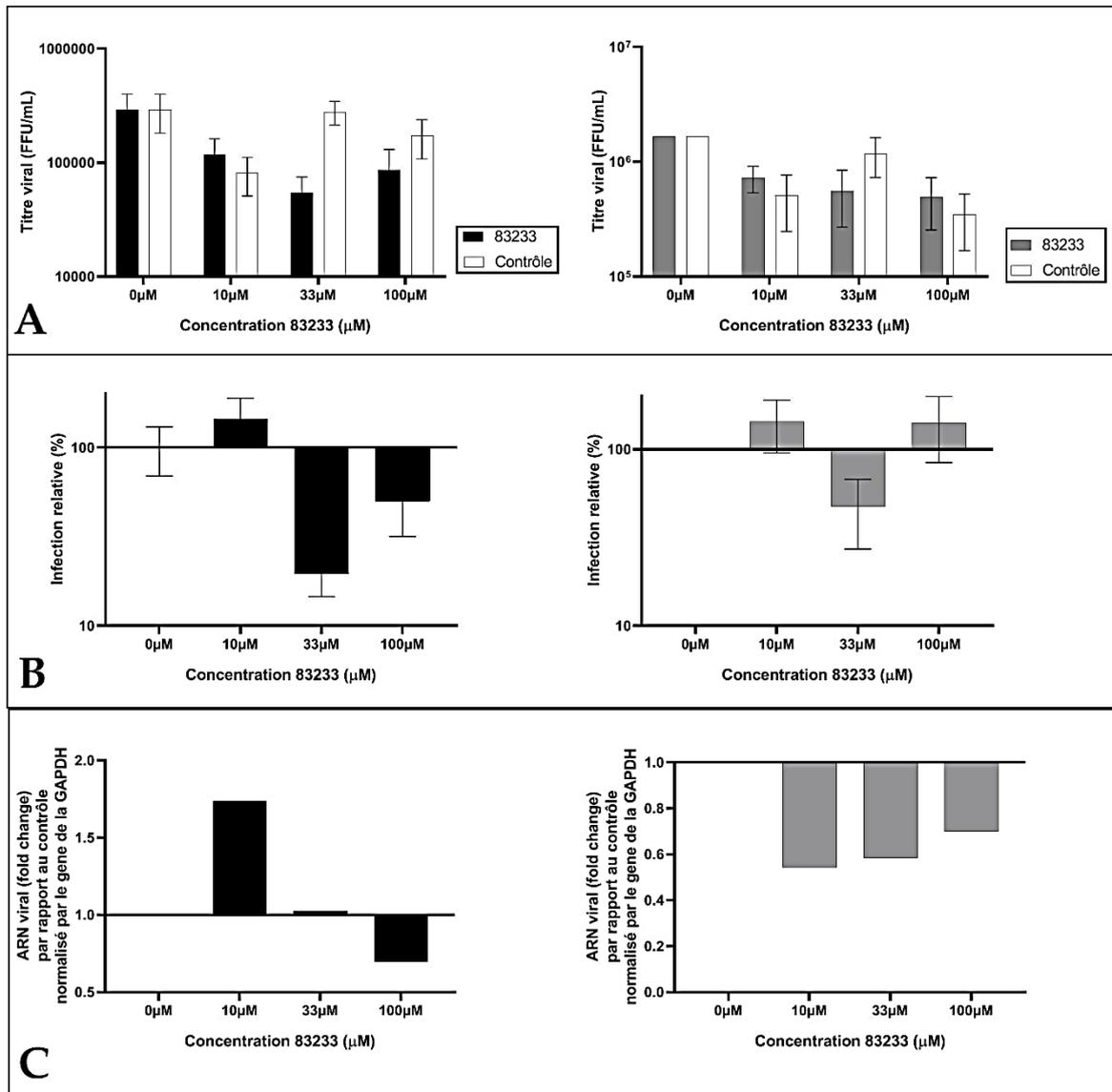


Figure 35 : Test de l'effet antiviral de différentes concentrations de la molécule 83233 sur IBV. Les cellules ont été infectées à MOI 1 avec deux souches d'IBV Massachusets 41 (en noir à gauche) et CR88 (en gris à droite) en présence de 83233 ou du diluant DMSO (Contrôle) à différentes concentrations. (A) Moyenne des titres infectieux mesurés dans les surnageants +/- écart-type standard (B) Les titres infectieux ont été normalisés par rapport au contrôle DMSO et sont présentés en pourcentage (C) Quantification des ARN viraux intracellulaires. Le gène GAPDH a été utilisé comme gène de ménage et les ARN ont été normalisés avec les contrôles par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Alors que la molécule 83233 inhibe souvent l'infection d'un facteur supérieur à 1000 pour FIPV (voir Projet 1), il y a ici au maximum moins d'un log d'inhibition pour les titrages des particules infectieuses dans le surnageant d'infection, lorsque la molécule est mise à incuber à une concentration de 33 $\mu$ M. Une augmentation de la quantité de molécule ne permet pas une inhibition plus importante de la production de particules infectieuses IBV. L'effet antiviral semble plus marqué sur la souche IBV M41. Aucune diminution significative de la quantité d'ARN viraux intracellulaires n'a été observée quelle que soit la concentration de molécule utilisée ou la souche IBV testée. Nous avons donc une différence majeure de l'action antivirale de la molécule 83233 entre son efficacité en cellules de mammifères sur le virus FIPV et son action en cellules de poulet sur le virus IBV.

Nous avons réitéré l'expérience en comparant l'effet des trois inhibiteurs 832, 833 et 83233 à 50 $\mu$ M, dans les mêmes conditions expérimentales.

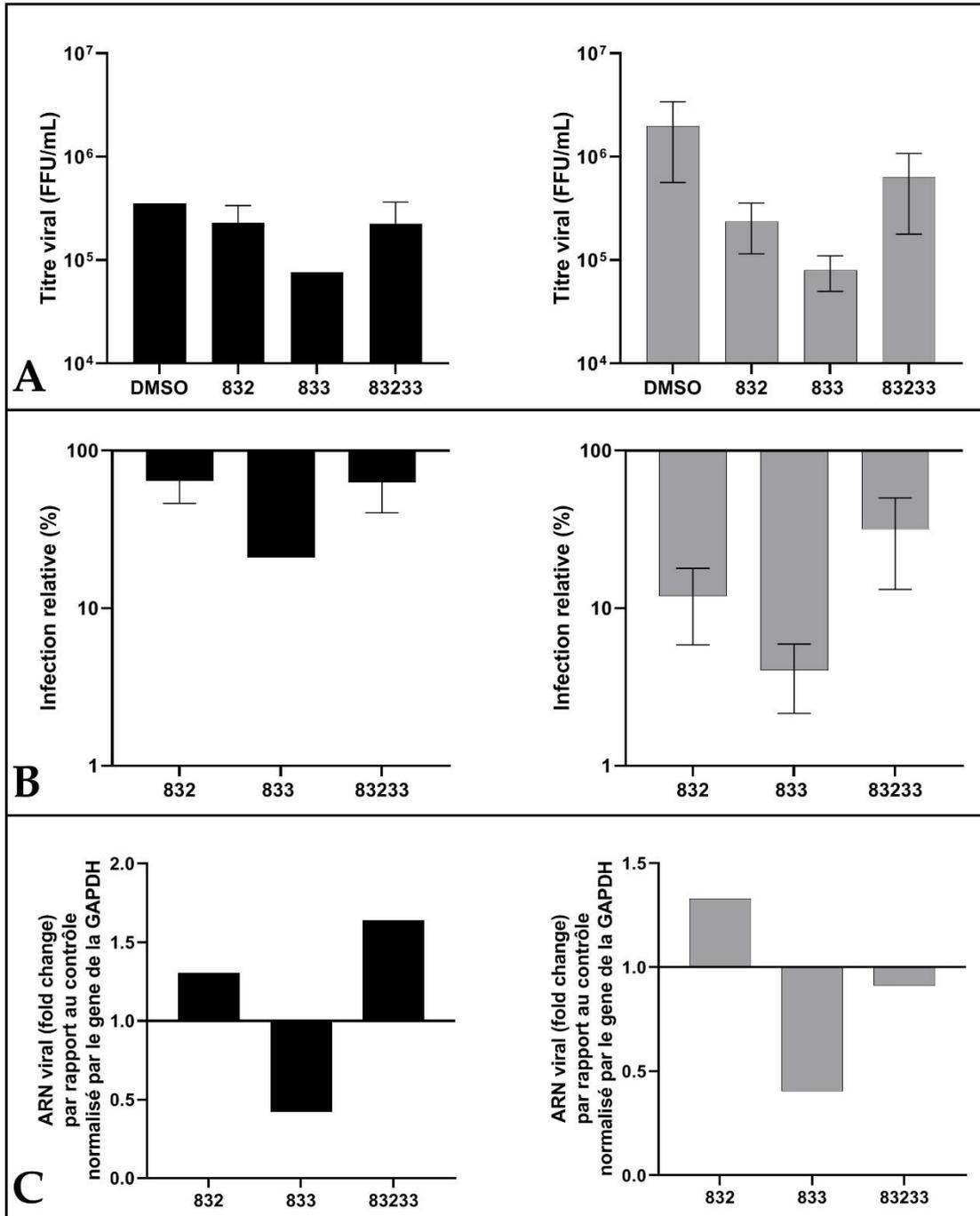


Figure 36 : Test des molécules SM-CypI sur le virus IBV. Les inhibiteurs ont été testés à une concentration de 50  $\mu$ M. Deux souches de virus IBV, M41 (en noir à gauche) et CR88 (en gris à droite) ont été testées. (A) Moyenne des titres infectieux mesurés dans les surnageants +/- écart-type standard (B) Les titres infectieux ont été normalisés par rapport au contrôle DMSO et sont présentés en pourcentage (C) Quantification des ARN viraux intracellulaires. Le gène GAPDH a été utilisé comme gène de ménage et les ARN ont été normalisés par les contrôles par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

On observe ici un effet antiviral de la molécule 833 qui inhibe plus de 90 % des particules infectieuses dans le surnageant d'infection de la souche CR88 et près de 80% de la souche Massachusetts 41. On observe également deux fois moins d'ARN viral présent dans les cellules traitées avec 833, contrairement à celles traitées avec 832 ou 83233 ou aucune diminution n'est observée. Comme précédemment la molécule 83233 n'inhibe pas le virus IBV dans les conditions expérimentales utilisées Figure 27, et on peut voir que la molécule 832 ne semblent pas non plus avoir d'effet sur le titre de particules infectieuses de la souche Massachusetts 41, et très peu sur la souche CR88.

Les expériences présentées ici n'ont pu être menées qu'une seule fois et doivent être répétées afin de confirmer ces résultats.

## **B. SARS-CoV-2 : TEST *IN VIVO* DE L'ACTION ANTIVIRALE DE LA MOLECULE 83233 DANS UN MODELE DE HAMSTERS DORES**

Les expériences précédentes nous ont permis de montrer que 83233 était une molécule très intéressante de par sa faible cytotoxicité et grande efficacité antivirale sur plusieurs Coronavirus. La molécule 83233 pourrait être utile comme traitement contre les infections dues aux coronavirus. Dans cette optique, nous avons réalisé une expérience afin de tester *in vivo* l'efficacité de 83233 contre l'infection par le SARS-CoV-2 dans un modèle de hamster doré (*Mesocricetus auratus*). Nous présentons ici les résultats préliminaires de cette expérience. Nous avons infecté 16 hamsters par voie intra-nasale avec une dose 5000 TCID<sub>50</sub> de virus par hamster. Nous avons utilisé une souche de type "D614G" fournie par l'Institut Pasteur (Dr Manuguerra, CIBU). Les hamsters ont été répartis en deux groupes de 8 animaux. Un groupe est traité avec la molécule 83233 par voie intranasale avec 80µl d'une solution de molécule mises à une concentration de 500µM. Le traitement a été réalisé 1h avant l'infection puis répété le lendemain matin (J1) pour tous les animaux, le lendemain soir pour les animaux sacrifiés à J2 post-infection. Les animaux sacrifiés à J2 ont aussi été traités de nouveau à J2 post-infection le matin, le sacrifice ayant lieu dans l'après-midi. Le groupe de

hamsters contrôles a été inoculé de la même manière mais avec le diluant ayant servi à dissoudre la molécule 83233 (PEG 400). Huit hamsters sont sacrifiés 24h post-infection et les huit autres 48h post-infection. Ces informations sont résumées dans la Figure 37.

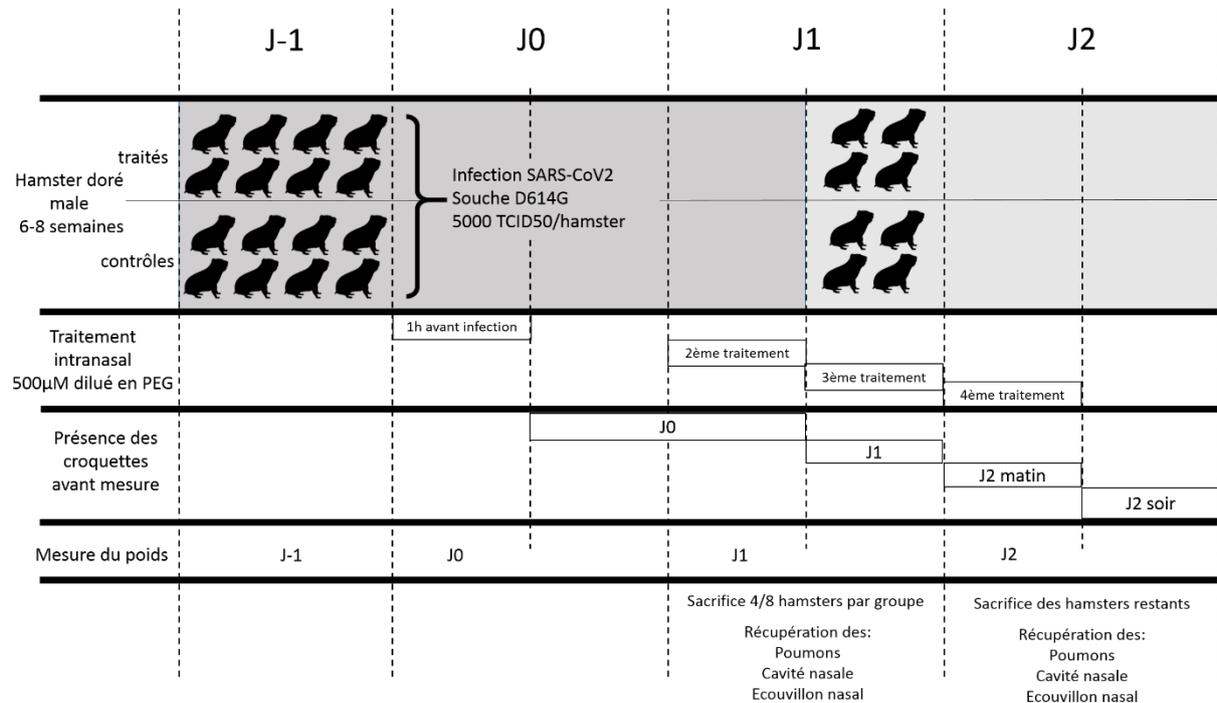


Figure 37 : Principe de l'expérience in vivo. Les hamsters dorés ont été infectés par la souche SARS-CoV-2 par voie intranasale. Un groupe est traité par voie intra-nasale avec la molécule 83233 1h avant l'infection puis le traitement est renouvelé toutes les 12 heures. Le groupe contrôle reçoit le diluant de la molécule. Pour chaque groupe, 4 animaux sont sacrifiés 24h post-infection, et 4 animaux 48h post-infection.

Le poids des hamsters a été mesuré à chaque jour de l'expérience. La perte de poids est un des signes cliniques de l'infection du hamster doré par SARS-CoV2. Lors de notre expérience, les hamsters traités perdaient légèrement moins (0.3%) de poids que les hamsters contrôles à J1 et J2 p.i. (Figure 38). Cette différence n'est cependant pas statistiquement significative.

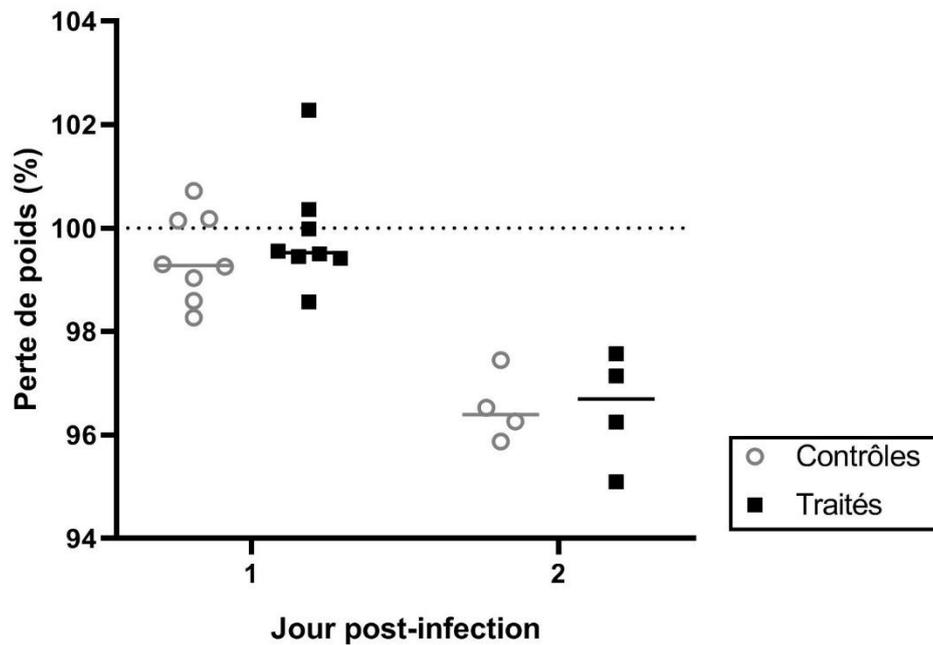


Figure 38 : Poids perdus par les hamsters infectés par SARS-CoV-2 traités ou non avec la molécule 83233. Les ratios des poids initiaux des hamsters (J0 avant infection) divisés par leur poids à J1 ou J2 p.i sont représentés en pourcentage.

La perte d'appétit est un autre signe clinique de l'infection par SARS-CoV-2 chez le hamster. Afin de mesurer celle-ci, nous avons utilisé des croquettes imbibées de glucose et marquées avec un colorant alimentaire. Ces croquettes ont été proposées aux hamsters deux fois par jour et pesées pour un suivi de la quantité mangée par les hamsters entre chaque traitement. Pour les deux groupes, on observe bien une baisse de la quantité de croquettes mangées, ce qui montre la perte d'appétit des hamsters, mais il n'y a pas de différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe traité avec la molécule 83233 (Figure 39).

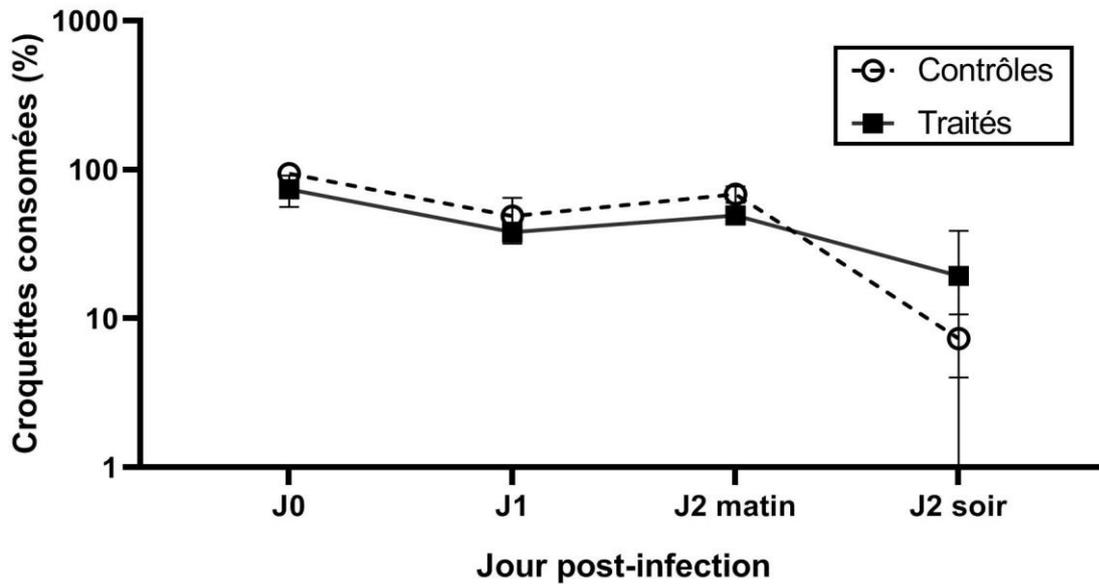


Figure 39 : Mesure de l'appétit des hamsters. Des croquettes marquées par un colorant alimentaire rouge et imbibées de glucose ont été laissées dans les cages des hamsters pendant différents temps. Les croquettes ont été pesées et les moyennes des ratios du poids final sur le poids initial des croquettes sont présentées ici en pourcentage +/-Ecart-types.

Chaque jour nous avons aussi réalisé des écouvillons nasaux de tous les hamsters. Ces écouvillons ont été dilués dans du milieu DMEM et utilisés ensuite pour un titrage par TCID50 sur cellules VERO E6 de la quantité de particules virales infectieuses présentes. Les résultats sont présentés sur la Figure 40.

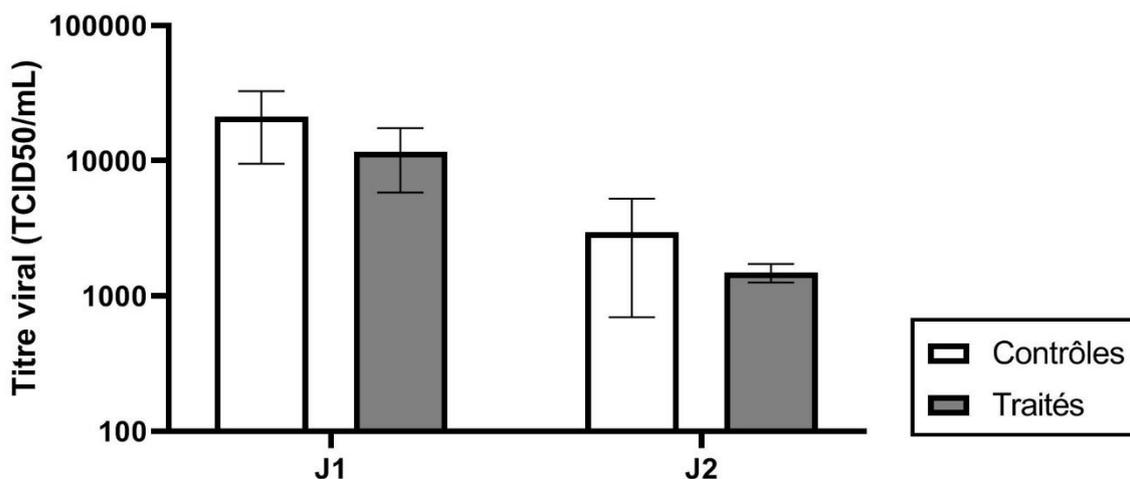


Figure 40 : Titrage des particules infectieuses présentes dans les écouvillons nasaux à J1 et J2 post infection. Les histogrammes correspondent soit aux écouvillons des hamsters non-traités ou des hamsters traités avec la molécule 83233. Les titres viraux moyens et les écarts-types entre les différents hamsters sont représentés (n=8 pour J1 et n=4 pour J2 pour chaque groupe traité et non-traité).

La quantité de particules virales mesurées dans les écouvillons (Figure 40) diminuent entre J1 et J2 pour tous les animaux. La quantité de virus mesurée dans les écouvillons des hamsters contrôles est en moyenne légèrement plus faible (environ moitié moins, passant de 21175 TCID50/ml pour les animaux contrôles à 11647 TCID50/ml pour les hamsters traités à J1 par exemple) que celle mesurée chez les hamsters traités avec la molécule 83233, mais cette différence est faible et n'est pas statistiquement significative.

Au moment du sacrifice, nous avons prélevé les poumons en vue d'un titrage des particules infectieuses et de la quantification du génome viral (Figure 41). Les ARNs ont été extraits des poumons et ont été mesurés en RTqPCR (Collaboration D. Lopez Molina, INSERM, U955). Des sondes et amorces dirigés contre l'ARN de l'ORF E ont été utilisées pour amplifier SARS-CoV-2 et le gène 18S a été utilisé gène de ménage. Comme observable sur la Figure 41, les hamsters contrôles semblent avoir moins d'ARN viral dans leurs poumons au premier jour de l'infection par rapport aux hamsters traités.

Cette différence n'est en revanche plus observable au deuxième jour p.i. Ces différences ne sont pas significatives mais sont en opposition avec les tendances observées pour les signes cliniques des hamsters (Figure 38 et Figure 39) ainsi que les titrages notamment à J1 des écouvillons nasaux (Figure 40). Il est intéressant de noter que des différences entre les tendances des titres des particules et des ARN viraux intracellulaires étaient aussi observées pour FCoV.

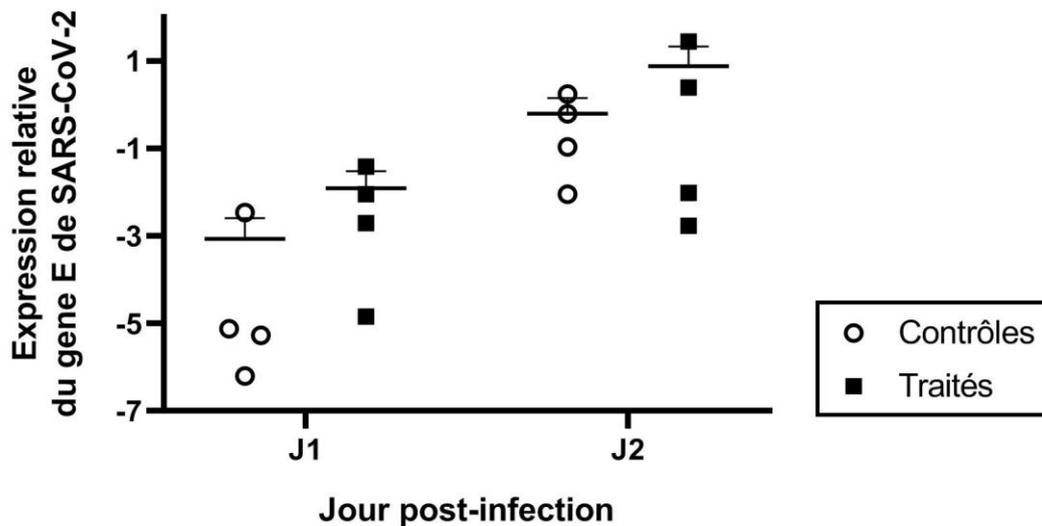


Figure 41 : Quantité d'ARN viral normalisée par rapport au gène cellulaire 18S. L'ARN total a été extrait depuis des échantillons de poumon de hamsters infectés. Les histogrammes correspondent soit aux poumons des hamsters non-traités (blanc) ou des hamsters traités avec la molécule 83233 (noir). Les moyennes des quantités d'ARN viraux normalisées par le gène de ménage 18S pour les hamsters des différents groupes (n=4) sont données avec les écart-types moyens.

Nous avons aussi prélevé spécifiquement la muqueuse olfactive (collaboration Dr N. Meunier, INRAE, unité VIM) qui est le site principal précoce de réplication virale du SARS-CoV-2 dans la cavité nasale chez le hamster. Ces échantillons doivent aussi être analysés pour évaluer la quantité de génome viral mais le laboratoire de confinement 3 ayant dû fermer, nous n'avons pas encore pu réaliser ces analyses ainsi que les titrages des particules infectieuses dans le poumon.

## C. CONCLUSION

Les résultats de ce projet sont préliminaires, mais soulèvent quelques questions.

Premièrement, nous avons pu montrer qu'il semble exister des différences dans le mode d'action de la molécule 83233 sur l'infection des cellules CRFK par le virus FIPV par rapport à l'infection des cellules CEK par IBV. En effet la molécule 83233 n'inhibait pas ou peu le virus IBV, alors que c'est un inhibiteur avec une action antivirale très importante sur FIPV.

Nous avons aussi entrepris de tester l'efficacité antivirale de la molécule 83233 *in vivo*. Le laboratoire a développé le modèle d'infection du hamster doré par le virus SARS-CoV-2 et il a ainsi été possible de faire une première expérience *in vivo* dans ce modèle. Nous n'avons pas encore pu analyser l'ensemble des échantillons de cette expérience. Les premiers résultats ne montrent pas de différences statistiquement différentes entre les hamsters traités ou non par la molécule mais des analyses complémentaires sont en cours.

Des expériences sur la pharmacocinétique de 83233 chez des souris Balb/C ont été réalisées via un prestataire par l'équipe 18 de l'IMRB. En intraveineuse, le temps de demi vie de la molécule n'était que d'une heure environ, avec une clairance très haute (résultats non publiés). Il est donc possible que l'absence d'effet antiviral sur les hamsters traités soit due à la faible disponibilité de la molécule.



# Discussion

Ces dernières années ont vu l'apparition d'un grand nombre de virus émergents à des échelles sans précédents, comme la pandémie due au virus SARS-CoV-2.

Les Coronavirus sont des virus d'intérêt vétérinaire et humain. Ils sont responsables de nombreuses épizooties et leur émergence dans la population humaine est un phénomène récurrent, et malheureusement responsable d'épidémies de gravité parfois sévère (épidémie due au SARS-CoV en 2002-2003, émergence du MERS-CoV en 2012, puis du SARS-CoV-2).

Les traitements contre les Coronavirus sont assez limités, la plupart du temps palliatifs aux signes cliniques. Quelques vaccins efficaces existent (BCoV et SARS-CoV-2). La variabilité génétique des Coronavirus, notamment au niveau de la protéine S, qui est un antigène majeur pour les vaccins, peut conduire cependant à l'apparition des variants échappant à l'immunité acquise après vaccination. L'exemple le plus marquant de ce phénomène est observable pour IBV [31]. La plupart des pathologies vétérinaires restent sans vaccin et sans traitement alors qu'elles induisent de lourdes pertes économiques, comme certains CoV porcins tels que le PEDV ou le SADS-CoV.

La PIF est une autre pathologie vétérinaire avec un besoin crucial de traitement antiviral. Le FIPV est l'un des coronavirus les plus mortels avec un taux de létalité de 100% [395]. Plusieurs essais de vaccins ont été réalisés mais se sont avérés inefficaces en raison d'un phénomène d'ADE. Il existe de nombreuses études sur d'éventuelles molécules antivirales [275] mais à ce jour, aucun traitement n'a encore été approuvé.

La recherche sur le développement de traitements antiviraux a permis le développement de traitements extrêmement efficaces pour des pathologies qui faisaient jusqu'alors de nombreuses victimes dans les populations. Les traitements antiviraux dirigés contre le VIH et HCV sont des succès thérapeutiques majeurs. Ces

traitements sont cependant très spécifiques et nécessitent d'être adaptés à chaque virus.

Devant la menace continue de l'émergence de nouveaux virus, et le grand nombre de coronavirus sévissant déjà dans les populations humaine et animale, la nécessité de traitements antiviraux à spectre large se fait ressentir. Il existe deux grandes catégories d'antiviraux :

- les antiviraux à action directe (DAA) ciblent directement les protéines ou le génome du virus. Ces molécules forment la majorité des traitements utilisés actuellement et sont parfois extrêmement efficaces. Les analogues de nucléosides et des molécules ciblant les protéases virales sont un exemple de DAA utilisés dans le cadre des thérapies antivirales contre le VIH [396] et HCV [397] par exemple. En revanche, ce type de molécule antivirale tend à être spécifique à certaines souches/cibles, et peut être sujet à l'émergence de souches résistantes. C'est une des raisons pour laquelle une combinaison de plusieurs inhibiteurs ciblant différentes étapes de la réplication est souvent utilisée lors des traitements appelés polythérapies.
- les molécules ciblant l'hôte sont un autre concept de développement de thérapie antivirale. Les antiviraux dirigés contre l'hôte (HDA), sont des molécules ciblant une protéine de l'hôte détournée par le virus au cours de son cycle de réplication. Le génome des hôtes évolue bien plus lentement que ceux des virus, ce qui implique que les protéines cellulaires sont souvent mieux conservées que celles des virus. Le spectre d'action de ces molécules peut donc potentiellement être élargi à différents virus d'une même famille et notamment des futurs coronavirus émergents.

L'objectif de ce projet de thèse était d'évaluer le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus. Les cyclophilines appartiennent à une famille de protéines cellulaires très conservées au sein des êtres vivants, partageant un domaine peptidyl-prolyl isomérase, qui permet le changement de conformation des prolines des

conformations cis vers trans (et inversement). Des études précédentes avaient montré que les cyclophilines étaient essentielles pour la réplication des coronavirus avec une action antivirale des inhibiteurs de cyclophilines [375] sur les coronavirus et une baisse de la sensibilité à l'infection des cellules déplétées en cyclophiline [381].

Il était dès lors pertinent de s'intéresser à ce mécanisme ainsi qu'à sa conservation dans les différents systèmes de coronavirus/hôtes. Identifier le mécanisme d'interaction entre les cyclophilines et les coronavirus permet également de définir une cible thérapeutique.

Dans ce cadre, la caractérisation de molécules inhibitrices de cyclophilines, de faible poids moléculaire et non-immunosuppressives était très utile pour répondre à ces objectifs. Au cours de ce projet, nous avons réalisé un crible de 20 inhibiteurs de cyclophiline interagissant spécifiquement avec les cyclophilines (contrairement à d'autres CypI comme la CsA). Ces inhibiteurs non immunosuppresseurs, et qui ne sont pas des macromolécules ou basés sur la structure d'autres CypI, ont été développés par notre partenaire [287]. Nous avons montré qu'ils inhibaient effectivement l'infection du coronavirus félin responsable de la péritonite infectieuse féline, le FIPV. Neuf d'entre eux ont une action antivirale supérieure à la CsA. Nous avons aussi caractérisé l'efficacité antivirale et la cytotoxicité de trois SM-CypI en particulier : l'inhibiteur le plus efficace 83233, ainsi que les molécules à partir desquelles il a été dérivé, 832 et 833. 83233 a une  $CI_{50}$  de  $0.05\mu\text{M}$  et une  $CC_{50}$  de  $111\mu\text{M}$  ce qui signifie que la dose antivirale efficace est plus de mille fois inférieure à la dose cytotoxique. Pour cette raison, nous avons déterminé que 83233 était une molécule prometteuse.

Pour FIPV en particulier, cette découverte est extrêmement intéressante. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement antiviral approuvé contre l'infection de FIPV. Beaucoup d'efforts de recherche ont été menés afin de trouver des traitements efficaces (Tableau 4) mais peu de molécules ont atteint le stade de l'essai clinique, et un certain nombre ayant atteint ce stade se sont révélées inadaptées sous leur forme actuelle. Le risque d'apparition de souches FIPV résistantes aux inhibiteurs les plus prometteurs

inquiète certains scientifiques, et des études sur d'éventuelles polythérapies sont menées [255]. Les SM-CypI comme 83233 ciblent une protéine de l'hôte, contrairement à la très large majorité des antiviraux développés contre FIPV. Ceci les rend d'autant plus intéressant pour la polythérapie car ils sont moins sensibles à l'apparition de mutation de résistance et l'échappement viral. Avec son index thérapeutique extrêmement élevé (1979), la molécule 83233 fait partie des inhibiteurs avec le meilleur score in vitro (voir Tableau 4). Sa  $CI_{50}$  est même inférieure à celle de certains des inhibiteurs les plus prometteurs comme GS-441524 ( $0.05\mu\text{M}$  contre  $0.78\mu\text{M}$ ), permettant d'envisager leur utilité clinique.

Notre modèle repose sur l'infection de lignées cellulaires félines par un virus de sérotype-II du FIPV, souche de laboratoire communément utilisée. Néanmoins, il est connu que la majorité des infections naturelles chez le chat sont dues à des virus FIPV de sérotype-I, plus difficiles à cultiver en laboratoire, notamment en raison de leur récepteur toujours inconnu, contrairement à celui du sérotype I [398]. Il était initialement prévu de tester les SM-CypI sur FIPV-I, un modèle d'infection plus proche des infections naturelles lors d'un partenariat avec le Pr H. Nauwynck (Ghent University, Belgium). Malheureusement, ce projet a dû être abandonné en raison de la pandémie de SARS-CoV-2 et des fermetures des frontières.

Afin de comprendre le rôle des cyclophilines au cours du cycle viral du virus FIPV, nous avons réalisé des expériences en ajoutant les SM-CypI (les molécules 83233, 832 et 833) à différents temps de l'infection par le virus FIPV. Ces expériences nous ont permis de montrer que l'action antivirale des SM-CypI avait lieu à un temps précoce du cycle de réplication dans la première heure de l'infection. On peut par exemple observer dans la figure 3 de l'article une inhibition d'un facteur 10 000 lorsque la molécule 83233 est ajoutée au moment de l'infection (soit une inhibition de 99.991% de l'infection) tandis que cette inhibition n'est plus que d'un facteur 10 (ou 97.876% d'inhibition) lorsqu'il est ajouté à 9h p.i.

D'autres expériences d'infection avec ajout des SM-CypI nous ont permis de définir que leur action antivirale n'était pas liée à l'étape d'attachement du virus sur son récepteur cellulaire, et que la préincubation des cellules avec les SM-CypI n'avait pas d'impact sur la réplication de FIPV. D'après les expériences menées, l'action antivirale contre FIPV des SM-CypI aurait donc lieu à une étape du cycle de réplication virale probablement avant la transcription du génome viral, sur les premières heures de l'infection. Les antiviraux ayant actuellement le plus de succès sont souvent dirigés contre les protéases virales et les analogues de nucléosides, que ce soit pour le traitement des PIF, avec les molécules GC376 et GS-441524 ou pour le traitement d'autres virus (HCV [295] et HIV [399]). Les polythérapies utilisent des antiviraux qui ciblent différentes étapes de la réplication des virus. Les SM-CypI sont donc compatibles avec les molécules antivirales les plus prometteuses, en proposant de cibler une autre étape du cycle viral très précoce.

Les SM-CypI se sont également révélées être très utiles pour la caractérisation du rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus. Leur spécificité et leur faible toxicité en font un outil précieux pour des études sur ce sujet, que ce soit dans des modèles d'infection de coronavirus, ou pour d'autres virus. Ces inhibiteurs ont déjà été utilisés pour caractériser le rôle des cyclophilines dans la réplication de HCV [401]. Comme décrit précédemment (Tableau 5), beaucoup de virus utilisent les cyclophilines au cours de leur cycle viral, mais très peu de mécanismes ont pu être définis pour l'instant. Pour ce qui est du rôle des cyclophilines chez les coronavirus, les étapes de la réplication virale concernées par l'action antivirale des inhibiteurs de cyclophilines correspondraient à une ou des étapes après l'attachement et avant la transcription discontinue. A ce stade du cycle de réplication, et notamment pendant la décapsidation et la mise en place du complexe de réplication/transcription, la protéine N joue un rôle important. Cette protéine est l'élément principal de la nucléocapside, mais a également été impliquée dans d'autres fonctions. Il a notamment été démontré que la protéine N jouerait aussi un rôle dans la transcription en recrutant des protéines

cellulaires au RTC [126]. Il est possible que les interactions Cyp/N se déroulent à ce moment ou bien pendant la décapsidation, comme ce qui est observé avec le papillomavirus où la cyclophiline A joue un rôle dans la décapsidation du virus en interagissant avec la capsid [368].

Nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de cette thèse aux interactions entre les protéines virales des coronavirus et les cyclophilines cellulaires. Dans ce but, nous avons utilisé trois techniques différentes: une technique de coprécipitation par GST pull-down, une technique de complémentation fonctionnelle d'une luciférase appelée "Nanoluc", et une technique de ligation par proximité. Dans un premier temps, nous avons souhaité tester des interactions potentielles entre la cyclophiline A et différentes protéines du coronavirus félin. Sur la base des données de la littérature ayant déjà suggérées des interactions entre protéines de coronavirus et cyclophilines, nous avons sélectionné les protéines virales nsp1, nsp4, nsp6, nsp13 et nsp15 ainsi que les protéines S et N.

Parallèlement, nous avons eu l'opportunité d'obtenir une banque de plasmide contenant l'ORFéome du SARS-CoV-2 (Collaboration Dr Y. Jacob, Institut Pasteur). Nous avons donc entrepris de tester aussi les interactions potentielles avec la même sélection de protéines virales du SARS-CoV-2 et la cyclophiline A humaine. Afin de tester de manière rapide un plus grand nombre de combinaison d'interactions potentielles, nous avons choisi dans un premier temps une technique basée sur la complémentation fonctionnelle d'une nanoluciférase. Dans cette approche, des cellules sont transfectées avec deux plasmides codant respectivement pour une protéine de SARS-CoV-2 ou du virus FIPV marquée avec une moitié de la nanoluciférase et l'autre plasmide codant pour une cyclophiline A humaine ou féline avec l'autre moitié de la nanoluciférase. Si les deux protéines interagissent, la reconstitution de la nanoluciférase conduit à une émission de luminescence qui est quantifiée. Ces expériences, et la création de la banque de plasmide de protéines recombinantes du SARS-CoV-2 ont été réalisées dans le cadre d'un projet de stage de

M1 (A. Gambino, Sorbonne-Université) que j'ai pu encadrer. Pour les protéines du virus FIPV qui ont fait l'objet du criblage, nous avons notamment dû construire les plasmides contenant les ORF nous mêmes, à partir de cellules infectées par le FIPV ou de sang de chat pour les cyclophilines. Nous n'avons observé aucune interaction lors du criblage des protéines du virus FIPV et de la cyclophiline A féline.

Cependant, ce premier crible (*Figure 36*) nous a permis de retrouver l'interaction entre la protéine N et la CypA du SARS-CoV-2. Cette interaction avait été montrée précédemment pour SARS-CoV-2 [399], montrant que ce système de mesure des interactions fonctionne. Cette interaction a également été montrée chez SARS-CoV [389] et HCoV-229E [387].

Nous avons aussi voulu confirmer cette interaction par une technique de co-précipitation par GST pull-down, entre la CypA et les protéines de SARS-CoV-2.

Malheureusement, les expériences de GST pull-down se sont retrouvées infructueuses, que ce soit pour les expériences menées avec les protéines du SARS-CoV-2 ou protéines du FCoV. Nous avons émis l'hypothèse que les transfections ou expressions des protéines transfectées étaient peu efficaces, résultant en peu de cellules co-transfectées. La faible expression des protéines de coronavirus (en particulier animale) avait été observée précédemment par notre laboratoire. Il serait intéressant de transférer ces plasmides dans des cellules félines afin d'observer si une meilleure expression des protéines transfectées se produit.

Nous nous sommes donc orientés vers la technique de ligation par proximité. Cette technique est plus sensible que celles utilisées précédemment, et permet une observation directe des cellules. Ainsi, même si peu de cellules expriment les protéines d'intérêt, celles-ci sont observables. Dans ces conditions, nous avons testé spécifiquement l'interaction entre la protéine N du virus FIPV et la cyclophiline A féline et avons pu confirmer cette interaction.

De manière intéressante, nous avons défini que les SM-CypI avaient une action antivirale dès la première heure de l'infection virale, et que les cyclophilines jouaient donc un rôle à une étape précoce du cycle de réplication (Figure 3 de l'article).

Lors de ces étapes, et particulièrement celle de la décapsidation, la protéine N joue un rôle extrêmement important, en tant que composant majeur de la nucléocapside. Une étude a aussi démontré que la protéine N était recrutée via nsp3 au complexe de réplication/transcription du virus et que cette interaction était nécessaire à la bonne transcription des ARN viraux [126].

Cela signifie donc que l'inhibition par les SM-CypI pourrait avoir un impact sur des interactions N/CypA se déroulant durant ces étapes. Afin de mieux décrire ces interactions, il serait intéressant de mesurer les interactions entre les protéines N et CypA en présence de SM-CypI. Un des avantages de la technique de complémentation fonctionnelle de Nanoluc (par laquelle nous avons déjà observé l'interaction N/CypA) est que la luminescence mesurée est semi-quantitative [400,401]. Ainsi, nous pourrions étudier l'interaction entre les protéines N et CypA en présence de dose croissante de SM-CypI et, en mesurant les variations de luminescence, obtenir une estimation de la force de ces interactions.

Il serait aussi intéressant d'étudier les interactions des sous-domaines de la protéine N avec la CypA. Pour SARS-CoV-2, les domaines d'interaction entre la CypA et N ont été identifiés par une étude et correspondent aux mêmes régions qui permettent les interactions N/N (régions désordonnées 1-43aa et 176-209) [391]. La protéine N est considérée comme une protéine avec une structure dynamique et des interactions qui évoluent en fonctions de différents paramètres. Il n'est donc pas impossible que les interactions N/N (et donc par exemple la décapsidation) dépendent d'interaction avec CypA, et de leur activité catalytique (observée sur les prolines P13, P42, et P199) [391]. Il serait donc très intéressant d'observer si on peut retrouver, par les mêmes méthodes précédemment utilisées, une interaction entre la région 1-43aa ou 176-209 de la protéine N et la Cyclophiline A ou au contraire, si des interactions sont

toujours observées dans des protéines délétées de ces régions. Il serait aussi intéressant de voir si la modification des prolines 1, 42 ou 199 ou des acides aminés voisins influe sur ces interactions. Si une abolition de l'interaction N/CypA est observée, il serait intéressant d'observer l'impact de ces mutations dans un cadre infectieux, en utilisant par exemple un réplicon, afin d'évaluer l'impact direct de l'interaction entre la protéine N et la cyclophiline A sur la réplication de coronavirus. Cette interaction entre la protéine N et la cyclophiline A avait été montrée avec quelques coronavirus humains (SARS-CoV, HCoV-229E et SARS-CoV-2 [387,389,393]) mais seulement dans des cellules humaines avec une cyclophiline humaine. Avec la démonstration, dans notre étude, que la protéine N du FCoV interagit avec la cyclophiline A féline, nous suggérons que les interactions cyclophilines/coronavirus pourraient être conservées chez plusieurs coronavirus et à leurs différents hôtes.

Bien que les cyclophilines soient des protéines très conservées chez les mammifères, il existe tout de même des différences de séquences (Figure 30). Un même coronavirus peut parfois infecter des hôtes très divers, comme PDCoV HKU15 qui peut infecter des porcs et expérimentalement des poulets [403]. Bien que beaucoup de coronavirus de différentes espèces aient été montrées comme sensibles aux inhibiteurs de cyclophilines (Tableau 6), aucune étude n'a encore démontré que le rôle des cyclophilines dans le cycle des coronavirus était identique ou, au contraire, différent selon l'hôte et/ou le virus. Toutes les études sur la sensibilité des coronavirus aux inhibiteurs de cyclophilines ont de plus été menées dans des cellules de mammifères.

Le projet 3 a été mené afin de d'étudier plus précisément la conservation du mécanisme Cyp/CoV, et par conséquent, le spectre d'action des SM-CypI. Nous avons mené les premières expériences sur le rôle des cyclophilines dans la réplication d'un coronavirus dans un système non mammifère. Le *gammacoronavirus* IBV est un virus d'intérêt vétérinaire important et pour lequel les vaccins utilisés ne parviennent malheureusement pas à endiguer les épizooties. Identifier une cible thérapeutique conservée est donc d'autant plus intéressant dans ce cadre.

Nous avons d'abord réalisé une gamme de concentration pour tester l'effet antiviral de la molécule 83233 sur IBV (Collaboration C. Allée et Dr P. Brown, Unité VIPAC, ANSES Ploufragan). 83233 n'inhibait pas ou peu IBV, alors que c'est un inhibiteur avec une action antivirale très importante sur FIPV et plusieurs *alpha*- et *betacoronavirus* humains (Ahmed-Belkacem *et al.* Communications personnelles). Nous avons ainsi montré qu'il existe des différences importantes entre les infections dans les systèmes aviaire et mammifère. Cette différence d'activité antivirale pourrait être due à plusieurs phénomènes :

- Il est possible que la molécule 83233 soit plus efficace sur des cyclophilines de mammifères que des cyclophilines aviaires. Il existe effectivement plus de variabilité entre les cyclophilines aviaires et mammifères qu'entre les cyclophilines mammifères elles-mêmes (voir figure 30). Étant données ces différences, la structure tertiaire des cyclophilines, et notamment les régions d'ancrage des SM-CypI, voire des protéines virales comme N, sur les cyclophilines pourraient être légèrement différentes, expliquant la différence d'activité antivirale.
- Il est aussi possible que la réplication des coronavirus dans ces différents hôtes soient légèrement différentes. D'après Pfefferle et al. [371], la souche Beaudette d'IBV est inhibée par la CsA dans les cellules mammifères Vero avec une EC50 comprise entre 5 et 10 $\mu$ M, il serait donc très intéressant de tester sur ce type de modèle d'IBV l'activité antivirale des SM-CypI. Il faudrait pour cela adapter les souches IBV à des cellules de mammifère (Vero) Malheureusement, l'adaptation de la souche sur des cellules de mammifères s'est révélée plus compliquée que prévu, et le décalage de ce projet dans le temps, du fait de la pandémie de SARS-CoV-2 n'a pas permis de mener ces projets à bien.
- Il est également possible que les *alpha*- et *betacoronavirus* soient sensibles à la molécule 83233 via des interactions avec des domaines des protéines N qui sont

conservés entre ces deux genres, mais que pour les *gammacoronavirus* comme IBV, ces domaines soient plus divergents.

Au sein même des coronavirus de mammifères, il existe des disparités de l'action antivirale des SM-CypI. Par exemple, la molécule 836, un inhibiteur très efficace sur HCoV-229E [401], s'est avérée très peu efficace sur FIPV dans nos conditions expérimentales. Nous avons donc testé d'autres SM-CypI dans le modèle IBV. Nous avons réalisé des expériences en utilisant les molécules « parentes » de 83233, les SM-CypI 832 et 833. Ceux-ci ont une activité antivirale sur FIPV (Figure 2 de l'article) bien moindre par rapport à la molécule 83233. Etonnement, et contrairement à ce qui avait été observé pour les coronavirus félin et humains testés jusqu'à présent, l'inhibiteur 833 présentait une action antivirale contre IBV supérieure à celle de la molécule 83233. Ces derniers résultats sont cependant préliminaires et devraient être confirmés. En l'état actuel, nous avons pu déterminer que certains SM-CypI étaient potentiellement efficaces sur des *gammacoronavirus*. Pour les deux souches testées, l'une circulant sur le continent européen (CR88), l'autre sur le continent américain (M41), en présence de la molécule 833, nous avons pu observer deux fois moins d'ARN viraux présents dans les cellules, et plus de dix fois moins de particules virales dans les surnageants pour la souche CR88. Il serait intéressant de réaliser un nouveau crible de l'activité antivirale de divers SM-CypI avec des groupes radicaux plus éloignés de 83233. Il se pourrait que les interactions des SM-CypI varient soit avec les cyclophilines de différentes espèces, soit avec les différentes protéines de coronavirus. La molécule 83233 pourraient être très efficace seulement dans un système mammifère.

Ces disparités de l'action antivirale des SM-CypI entre les différents modèles, et donc potentiellement du rôle des cyclophilines, pourraient aussi indiquer que les cyclophilines influent sur l'émergence des coronavirus dans de nouveaux hôtes. Si les protéines de coronavirus et les cyclophilines de différentes espèces interagissent différemment, il est possible que le franchissement de barrière d'espèces et l'émergence d'un coronavirus dans une nouvelle espèce soient conditionnés au fait

que ce coronavirus puisse utiliser les cyclophilines du nouvel hôte. Il a par exemple été démontré que la protéine cellulaire ANP32A (un facteur proviral de l'infection par le virus de la grippe) était un des déterminants intracellulaires important dans le franchissement de la barrière d'espèces (voir Figure 42). Remplacer l'ANP32A mammifère par une ANP32A aviaire permettait aux polymérase des souches de grippe aviaires de se répliquer dans un système mammifère [404].

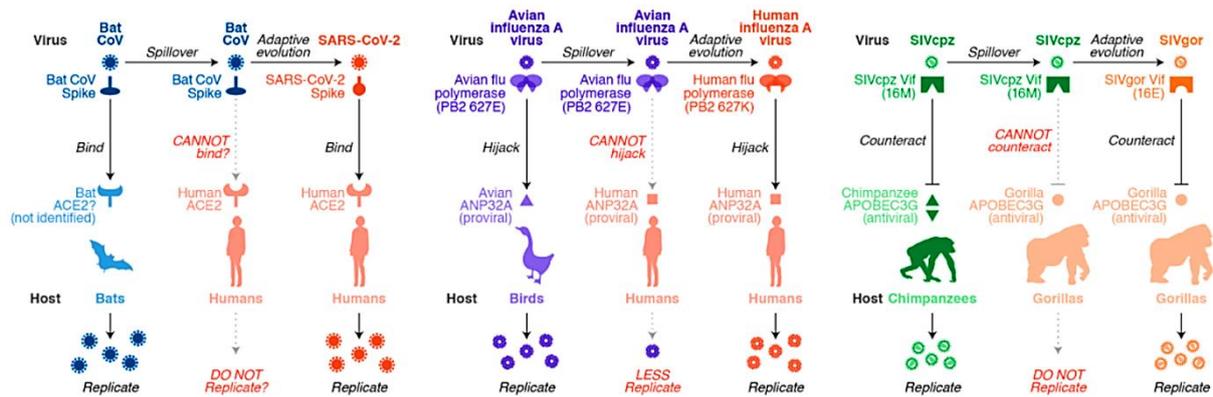


Figure 42 : Différents exemples de facteurs d'hôtes associés au franchissement de barrière d'espèce. Repris de Sato et al. 2021 [405].

Il a aussi été démontré que la mutation d'un seul acide aminé de la cyclophiline A induisait une résistance de cellules à l'infection par l'*alphacoronavirus* HCoV-229E [383] donc les divergences entre les cyclophilines de différentes espèces pourraient avoir un impact sur la répllication des coronavirus.

Si les cyclophilines agissent comme des facteurs de restriction intracellulaire au franchissement de la barrière d'espèces, alors une surveillance des coronavirus dans la faune sauvage permettrait d'évaluer un risque d'émergence des coronavirus, en estimant quels virus ont entre autres acquis la capacité d'interagir avec les cyclophilines humaines, ou les cyclophilines des animaux d'élevage comme le porc.

Une expérience à mener et qui permettrait d'exploiter les modèles que nous avons développés pendant cette thèse serait de tester les interactions des protéines de différents coronavirus contre les cyclophilines de différentes espèces. Nous avons déjà

obtenu des banques de plasmides des ORF de SARS-CoV-2, une banque partielle des protéines de FCoV ainsi que des cyclophilines humaines et félines. Pouvoir croiser ces interactions, notamment avec les coronavirus infectant plusieurs espèces (comme SARS-CoV-2 qui peut infecter les chats et l'Homme) ou, au contraire, avec les cyclophilines d'espèces non sensibles à certains coronavirus permettrait d'approfondir nos connaissances sur la restriction potentielle du spectre d'hôte par les cyclophilines, mais aussi d'estimer si les cyclophilines sont une cible thérapeutique conservée dans les infections à coronavirus.

Les cyclophilines sont une cible thérapeutique qui pourrait être commune aux coronavirus humains et au moins certains coronavirus vétérinaires, ce qui signifie que les SM-CypI pourraient aussi être utilisés dans le cas de traitements de pathologies vétérinaires dues à des coronavirus.

Nous avons eu l'opportunité de tester l'activité antivirale de la molécule 83233 sur un modèle *in vivo* de hamster mise en place au laboratoire, en partenariat avec D. Lopez Molina et H. Ahmed-Belkacem (U955, Inserm) et le Dr N. Meunier (unité VIM Inrae). Etant donné que nous avons déterminé que 83233 avait une action précoce sur FCoV, phénomène qui a aussi été observé sur le SARS-CoV-2 (Dr H. Ahmed-Belkacem, communication personnelle), nous avons choisi de traiter les hamsters de manière intranasale, une heure avant l'infection pour le traitement initial. Les hamsters ont ensuite été infectés avec une souche D614G de SARS-CoV-2. Chaque jour, les hamsters étaient traités de nouveau avec 500 $\mu$ M de la molécule 83233, et leur poids et appétit ont été suivis. Des écouvillons nasaux ont également été prélevés chaque jour pour un suivi de l'excrétion virale. Les hamsters ont été sacrifiés à J1 ou J2, et leur poumons et cavité nasale ont été prélevés.

Cette expérience est toujours en cours d'analyses, mais nous présentons ici les résultats préliminaires. Dans les conditions de l'expérience, aucune différence significative n'était observable entre les hamsters traités avec la molécule 83233 et les hamsters non-traités. On observe cependant une légère moindre perte de poids (Figure

38) et d'appétit (Figure 39) des hamsters traités par rapport aux hamsters contrôles. Cette tendance est aussi observable dans les titres des particules infectieuses des écouvillons nasaux (Figure 40). La tendance inverse est cependant observée pour les ARNs viraux dans les poumons (Figure 41). On observe à J1 davantage d'ARN viraux dans les hamsters traités que les hamsters contrôles. Cette dichotomie entre les ARNs viraux intracellulaires et les particules infectieuses avait déjà été observée lors de nos expériences avec le virus FIPV (Figure 29).

Nous souhaitons poursuivre nos analyses de cette expérience *in vivo*, en titrant les particules infectieuses présentes dans les poumons. Ces analyses seront prochainement réalisées. Les poumons sont une région secondaire de l'infection *in vivo* de SARS-CoV-2. La cavité nasale, et son épithélium olfactif est le site primaire de l'infection [402]. Il sera donc aussi très intéressant de comparer l'action des SM-CypI sur le site primaire par rapport au site secondaire de l'infection.

La sévérité des pathologies liées à SARS-CoV-2 est en grande partie due à la réponse inflammatoire très importante. De manière intéressante, les cyclophilines, notamment la cyclophiline A peuvent jouer un rôle pro-inflammatoire (comme décrit page 55). Sans affecter la répllication de SARS-CoV-2 chez les hamsters, il est possible que les inhibiteurs de cyclophilines comme 83233 aient un impact bénéfique pour les hamsters en inhibant les Cyps et leur action pro-inflammatoire pendant l'infection. Il est prévu de réaliser une histologie sur les poumons et la cavité nasale des hamsters prélevées pendant l'expérience *in vivo*. Ces coupes permettraient d'observer les lésions causées par l'inflammation dans ces tissus, et donc de potentielles différences entre les hamsters traités par la molécule 83233 et les hamsters contrôles. De manière plus spécifique, il serait intéressant d'estimer la réponse inflammatoire dans ces tissus. Il est aussi possible de mesurer les cytokines connues comme faisant à la fois partie de la réponse inflammatoire des infections à SARS-CoV-2, et dont la production est aussi induite par la cyclophiline A, tels qu'IL-1 $\beta$  et IL-6 [288,408].

Une étude récente suggère effectivement que la CypA extracellulaire joue un rôle dans la tempête cytokinique associée aux infections par SARS-CoV-2. En revanche, ils associent cette fonction des cytokines à des voies de signalisation activées par la fixation de la protéine S sur les récepteurs cellulaires CD147 [403] (qui servent aussi de récepteur à la CypA extracellulaire). De manière intéressante, leur étude montre que l'addition d'anticorps antiCypA n'affectait pas la charge virale mais que l'expression d'IL-6 et CCL-2 était réduite lors d'infection de Vero E6 par SARS-CoV-2.

Une possibilité que nous n'avons pas abordée serait que les cyclophilines jouent plusieurs rôles dans la réplication des coronavirus, et que ces rôles pourraient être plus ou moins identiques selon les espèces et les coronavirus.



# Conclusion générale

Durant ce projet de thèse, nous avons caractérisé l'action d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de cyclophilines cellulaires, les SM-CypI, sur la réplication d'un coronavirus félin hautement pathogène. Ces inhibiteurs sont très efficaces et s'avèrent être une piste intéressante pour le traitement des pathologies dues aux infections à coronavirus, dont la pathologie grave des péritonites infectieuses félines.

En utilisant des tests d'interactions par complémentation fonctionnelle et ligation de proximité, nous avons aussi confirmé des interactions entre la nucléocapside de SARS-CoV-2 et la cyclophiline A humaine, et mis en évidence pour la première fois une interaction entre la protéine N d'un coronavirus et une cyclophiline non humaine. Ces résultats montrent que les cyclophilines sont une cible thérapeutique conservée qui pourrait être utile pour le développement de traitement antiviraux à spectre large.

Nous avons aussi testé pour la première fois l'impact d'inhibiteurs de cyclophilines sur la réplication d'un coronavirus dans un système aviaire/non mammifère. En utilisant des cellules primaires d'embryons de poulet et deux souches (européenne CR88 et américaine Massachusetts 41) du *gammacoronavirus* IBV, ces travaux ont permis de déterminer qu'il existait des différences dans le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus mammifères et aviaires.

Nos travaux nous ont aussi permis de caractériser le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus. En mesurant l'infection d'un coronavirus félin en présence de SM-CypI à différents moments du cycle de réplication, nous avons déterminé que les cyclophilines seraient essentielles à une étape du cycle de réplication correspondant à la décapsidation ou au début de la mise en place du complexe de réplication/transcription (figure 40). Durant ces étapes, la protéine N a un rôle central. En tant que composant majeur de la nucléocapside, elle est un élément clé de la décapsidation, mais elle jouerait aussi un rôle dans la mise en place du complexe de

réplication/transcription. L'interaction CypA/N que nous avons pu observer pour SARS-CoV-2 et pour FCoV semble donc être d'autant plus logique, si les SM-CypI impactent cette interaction.

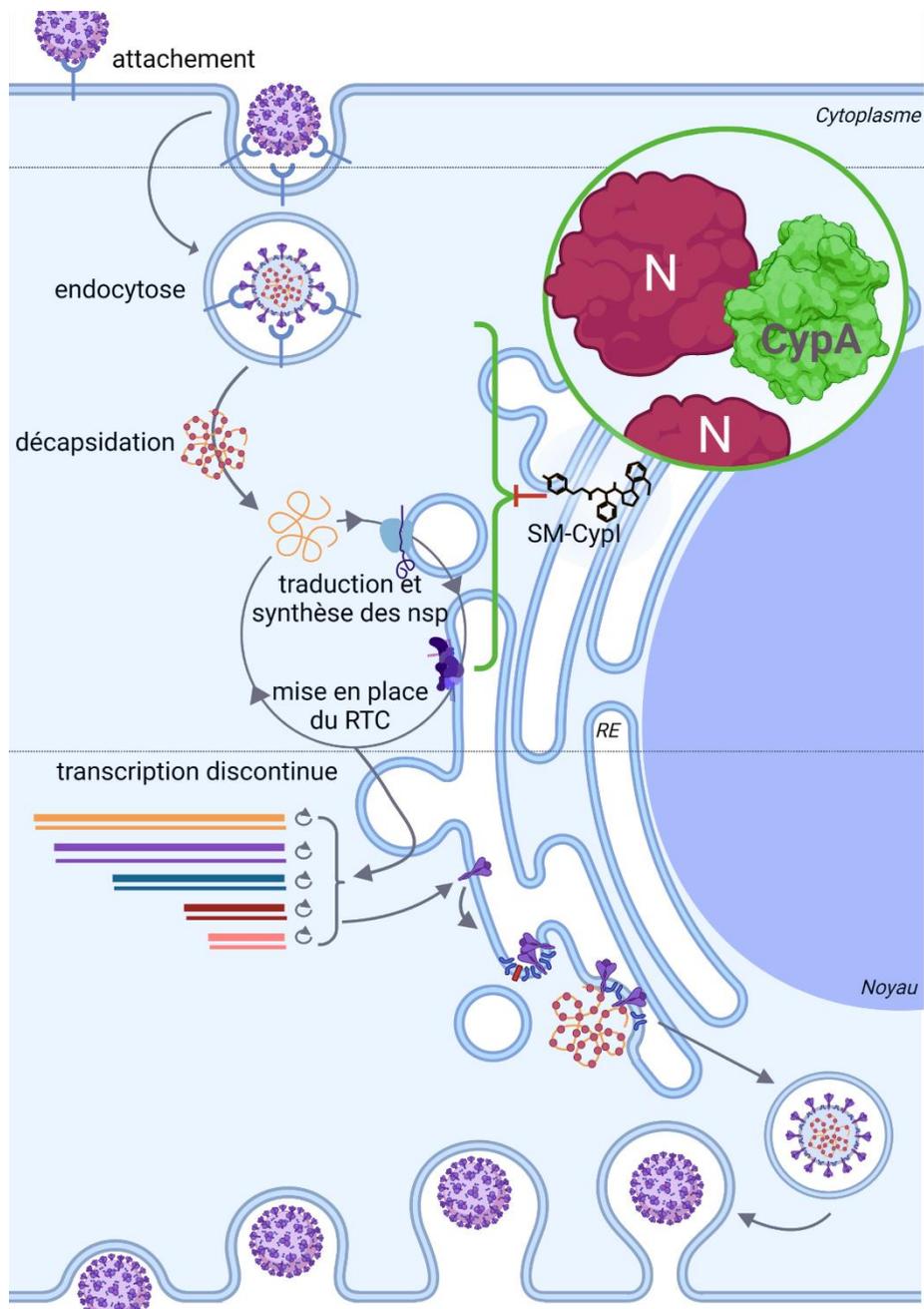


Figure 43 : Résumé du rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus. Figure créée sur Biorender. La réplication des coronavirus est affectée lorsque les cyclophilines sont inhibées à des temps correspondant à des étapes du cycle après l'attachement mais avant la transcription discontinue. Au vu des interactions N/CypA, les cyclophilines pourraient jouer un rôle dans la décapsidation et/ou la mise en place et l'initiation du complexe de réplication/transcription. RTC : Complexe de réplication transcription, RE : Réticulum endoplasmique, nsp : protéines non structurales.

Nous avons également pu initier le premier test *in vivo* de l'action antivirale des SM-CypI sur SARS-CoV-2 dans un modèle de hamster doré développé par le laboratoire. Même si les premiers résultats ne semblent pas montrer d'effet antiviral majeur, il faudra finaliser l'analyse de cette expérience avant de pouvoir conclure à l'efficacité *in vivo* de la molécule 83233 dans les conditions d'expérimentation.

En conséquence, nous décrivons ici une cible thérapeutique intéressante pour des molécules antivirales à spectre large, ainsi que les premiers essais *in vivo* d'une de ces molécules antivirales.



# Bibliographie

1. Schalk, A.F. An Apparently New Respiratory Disease Of Baby Chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1931**, *78*, 413–423.
2. Beaudette, F.R. Cultivation Of The Virus Of Infectious Bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1937**, *90*, 51–60.
3. Boursnell, M.E.; Brown, T.D.; Foulds, I.J.; Green, P.F.; Tomley, F.M.; Binns, M.M. Completion Of The Sequence Of The Genome Of The Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *J Gen Virol* **1987**, *68* ( Pt 1), 57–77, Doi:10.1099/0022-1317-68-1-57.
4. Bailey, O.T.; Pappenheimer, A.M.; Cheever, F.S.; Daniels, J.B. A Murine Virus (Jhm) Causing Disseminated Encephalomyelitis With Extensive Destruction Of Myelin : Ii. Pathology. *J Exp Med* **1949**, *90*, 195–212, Doi:10.1084/Jem.90.3.195.
5. Doyle, L.P.; Hutchings, L.M. A Transmissible Gastroenteritis In Pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1946**, *108*, 257–259.
6. Wood, E.N. An Apparently New Syndrome Of Porcine Epidemic Diarrhoea. *Vet. Rec.* **1977**, *100*, 243–244, Doi:10.1136/Vr.100.12.243.
7. Ward, J.M.; Munn, R.J.; Gribble, D.H.; Dungworth, D.L. An Observation Of Feline Infectious Peritonitis. *Veterinary Record* **1968**, *83*, 416–417, Doi:10.1136/Vr.83.16.416.
8. Holzworth, J. Some Important Disorders Of Cats. *Cornell Vet* **1963**, *53*, 157–160.
9. Hamre, D.; Procknow, J.J. A New Virus Isolated From The Human Respiratory Tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1966**, *121*, 190–193, Doi:10.3181/00379727-121-30734.
10. Mcintosh, K.; Becker, W.B.; Chanock, R.M. Growth In Suckling-Mouse Brain Of “IBV-Like” Viruses From Patients With Upper Respiratory Tract Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**, *58*, 2268–2273.
11. Bande, F.; Arshad, S.S.; Omar, A.R.; Hair-Bejo, M.; Mahmuda, A.; Nair, V. Global Distributions And Strain Diversity Of Avian Infectious Bronchitis Virus: A Review. *Animal Health Research Reviews* **2017**, *18*, 70–83, Doi:10.1017/S1466252317000044.
12. Gebhardt, J.T.; Tokach, M.D.; Dritz, S.S.; Derouchey, J.M.; Woodworth, J.C.; Goodband, R.D.; Henry, S.C. Postweaning Mortality In Commercial Swine Production II: Review Of Infectious Contributing Factors. *Transl Anim Sci* **2020**, *4*, Txaa052, Doi:10.1093/Tas/Txaa052.
13. Channappanavar, R.; Perlman, S. Pathogenic Human Coronavirus Infections: Causes And Consequences Of Cytokine Storm And Immunopathology. *Semin Immunopathol* **2017**, *39*, 529–539, Doi:10.1007/S00281-017-0629-X.
14. Ksiazek, T.G.; Erdman, D.; Goldsmith, C.S.; Zaki, S.R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J.A.; Lim, W.; Et Al. A Novel Coronavirus Associated With

- Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953–1966, Doi:10.1056/Nejmoa030781.
15. WHO | China's Latest SARS Outbreak Has Been Contained, But Biosafety Concerns Remain – Update 7 Available Online: [Http://Archive.Wikiwix.Com/Cache/Index2.Php?url=Https%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fcsr%2Fdon%2F2004\\_05\\_18a%2Fen%2F](http://archive.wikiwix.com/cache/index2.php?url=https%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fcsr%2Fdon%2F2004_05_18a%2Fen%2F) (Accessed On 26 July 2021).
  16. WHO | SARS Outbreak Contained Worldwide Available Online: [Https://Apps.Who.Int/Mediacentre/News/Releases/2003/Pr56/En/Index.Html](https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr56/en/index.html) (Accessed On 22 July 2021).
  17. Fouchier, R.A.M.; Hartwig, N.G.; Bestebroer, T.M.; Niemeyer, B.; De Jong, J.C.; Simon, J.H.; Osterhaus, A.D.M.E. A Previously Undescribed Coronavirus Associated With Respiratory Disease In Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 6212–6216, Doi:10.1073/Pnas.0400762101.
  18. Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Chu, C.; Chan, K.; Tsoi, H.; Huang, Y.; Wong, B.H.L.; Poon, R.W.S.; Cai, J.J.; Luk, W.; Et Al. Characterization And Complete Genome Sequence Of A Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, From Patients With Pneumonia. *J. Virol.* **2005**, *79*, 884–895, Doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
  19. Vabret, A.; Dina, J.; Brison, E.; Brouard, J.; Freymuth, F. Coronavirus Humains (Hcov). *Pathologie Biologie* **2009**, *57*, 149–160, Doi:10.1016/J.Patbio.2008.02.018.
  20. Monchatre-Leroy, E.; Boué, F.; Boucher, J.-M.; Renault, C.; Moutou, F.; Ar Gouilh, M.; Umhang, G. Identification Of Alpha And Beta Coronavirus In Wildlife Species In France: Bats, Rodents, Rabbits, And Hedgehogs. *Viruses* **2017**, *9*, Doi:10.3390/V9120364.
  21. Lau, S.K.P.; Wong, E.Y.M.; Tsang, C.-C.; Ahmed, S.S.; Au-Yeung, R.K.H.; Yuen, K.-Y.; Wernery, U.; Woo, P.C.Y. Discovery And Sequence Analysis Of Four Deltacoronaviruses From Birds In The Middle East Reveal Interspecies Jumping With Recombination As A Potential Mechanism For Avian-To-Avian And Avian-To-Mammalian Transmission. *J. Virol.* **2018**, *92*, Doi:10.1128/JVI.00265-18.
  22. Letko, M.; Seifert, S.N.; Olival, K.J.; Plowright, R.K.; Munster, V.J. Bat-Borne Virus Diversity, Spillover And Emergence. *Nat Rev Microbiol* **2020**, 1–11, Doi:10.1038/S41579-020-0394-Z.
  23. Mizutani, T. [A Novel Coronavirus, MERS-Cov]. *Uirusu* **2013**, *63*, 1–6, Doi:10.2222/Jsv.63.1.
  24. WHO EMRO | MERS Outbreaks | MERS-Cov | Health Topics Available Online: [Http://Www.Emro.Who.Int/Health-Topics/Mers-Cov/Mers-Outbreaks.Html](http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html) (Accessed On 22 July 2021).
  25. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Et Al. A Novel Coronavirus From Patients With Pneumonia In China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733, Doi:10.1056/Nejmoa2001017.
  26. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Available Online: [Https://Covid19.Who.Int](https://covid19.who.int) (Accessed On 11 October 2021).

27. Wang, M.-Y.; Zhao, R.; Gao, L.-J.; Gao, X.-F.; Wang, D.-P.; Cao, J.-M. SARS-Cov-2: Structure, Biology, And Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 587269, Doi:10.3389/Fcimb.2020.587269.
28. Pubmed By Year Available Online: [Https://Esperr.Github.Io/Pubmed-By-Year/?Q1=Coronavirus](https://Esperr.Github.Io/Pubmed-By-Year/?Q1=Coronavirus) (Accessed On 26 July 2021).
29. Novel Canine Coronavirus Isolated From A Hospitalized Pneumonia Patient, East Malaysia | Clinical Infectious Diseases | Oxford Academic Available Online: [Https://Academic.Oup.Com/Cid/Advance-Article/Doi/10.1093/Cid/Ciab456/6278597](https://Academic.Oup.Com/Cid/Advance-Article/Doi/10.1093/Cid/Ciab456/6278597) (Accessed On 26 May 2021).
30. Brugere-Picoux, J.; Bouzouaia, M. Les Coronaviruses Aviaires. *Bavf*.
31. Jordan, B. Vaccination Against Infectious Bronchitis Virus: A Continuous Challenge. *Vet Microbiol* **2017**, *206*, 137–143, Doi:10.1016/J.Vetmic.2017.01.002.
32. Brown, P.A.; Touzain, F.; Briand, F.X.; Gouilh, A.M.; Courtillon, C.; Allée, C.; Lemaitre, E.; De Boissésou, C.; Blanchard, Y.; Eterradossi, N. First Complete Genome Sequence Of European Turkey Coronavirus Suggests Complex Recombination History Related With US Turkey And Guinea Fowl Coronaviruses. *J Gen Virol* **2016**, *97*, 110–120, Doi:10.1099/Jgv.0.000338.
33. Liais, E.; Croville, G.; Mariette, J.; Delverdier, M.; Lucas, M.-N.; Klopp, C.; Lluch, J.; Donnadieu, C.; Guy, J.S.; Corrand, L.; Et Al. Novel Avian Coronavirus And Fulminating Disease In Guinea Fowl, France. *Emerg Infect Dis* **2014**, *20*, 105–108, Doi:10.3201/Eid2001.130774.
34. Wang, Q.; Vlasova, A.N.; Kenney, S.P.; Saif, L.J. Emerging And Re-Emerging Coronaviruses In Pigs. *Curr Opin Virol* **2019**, *34*, 39–49, Doi:10.1016/J.Coviro.2018.12.001.
35. Le Poder, S.; Delaplace, M.; Huet, H.; Zientara, S. Les Coronavirus Animaux : Ce Qu'ils Nous Apprennent. *BAVF* **2020**, *173*, Doi:10.3406/Bavf.2020.70916.
36. Ridremont, B. Les Coronaviruses Des Petits Ruminants. *Bavf* **2020**, *173*, 66–70, Doi:10.4267/2042/70848.
37. Körner, R.W.; Majjouti, M.; Alcazar, M.A.A.; Mahabir, E. Of Mice And Men: The Coronavirus MHV And Mouse Models As A Translational Approach To Understand SARS-Cov-2. *Viruses* **2020**, *12*, 880, Doi:10.3390/V12080880.
38. Le Poder, S. Feline And Canine Coronaviruses: Common Genetic And Pathobiological Features. *Adv Virol* **2011**, *2011*, 609465, Doi:10.1155/2011/609465.
39. Hendley, J.O.; Fishburne, H.B.; Gwaltney, J.M. Coronavirus Infections In Working Adults. Eight-Year Study With 229 E And OC 43. *Am Rev Respir Dis* **1972**, *105*, 805–811, Doi:10.1164/Arrd.1972.105.5.805.
40. Li, Z.; Tomlinson, A.C.; Wong, A.H.; Zhou, D.; Desforges, M.; Talbot, P.J.; Benlekbir, S.; Rubinstein, J.L.; Rini, J.M. The Human Coronavirus Hcov-229E S-Protein Structure And Receptor Binding. *Elife* **8**, E51230, Doi:10.7554/Elife.51230.
41. Corman, V.M.; Baldwin, H.J.; Tateno, A.F.; Zerbinati, R.M.; Annan, A.; Owusu, M.; Nkrumah, E.E.; Maganga, G.D.; Oppong, S.; Adu-Sarkodie, Y.; Et Al. Evidence For An Ancestral Association Of Human Coronavirus 229E With Bats. *J Virol* **2015**, *89*, 11858–11870, Doi:10.1128/JVI.01755-15.

42. Tao, Y.; Shi, M.; Chommanard, C.; Queen, K.; Zhang, J.; Markotter, W.; Kuzmin, I.V.; Holmes, E.C.; Tong, S. Surveillance Of Bat Coronaviruses In Kenya Identifies Relatives Of Human Coronaviruses NL63 And 229E And Their Recombination History. *J. Virol.* **2017**, *91*, Doi:10.1128/JVI.01953-16.
43. Huang, Y.-W.; Dickerman, A.W.; Piñeyro, P.; Li, L.; Fang, L.; Kiehne, R.; Opriessnig, T.; Meng, X.-J. Origin, Evolution, And Genotyping Of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains In The United States. *Mbio* **2013**, *4*, E00737-13, Doi:10.1128/Mbio.00737-13.
44. Zhou, P.; Fan, H.; Lan, T.; Yang, X.-L.; Shi, W.-F.; Zhang, W.; Zhu, Y.; Zhang, Y.-W.; Xie, Q.-M.; Mani, S.; Et Al. Fatal Swine Acute Diarrhoea Syndrome Caused By An HKU2-Related Coronavirus Of Bat Origin. *Nature* **2018**, *556*, 255–258, Doi:10.1038/S41586-018-0010-9.
45. Lau, S.K.P.; Li, K.S.M.; Tsang, A.K.L.; Shek, C.-T.; Wang, M.; Choi, G.K.Y.; Guo, R.; Wong, B.H.L.; Poon, R.W.S.; Lam, C.S.F.; Et Al. Recent Transmission Of A Novel Alphacoronavirus, Bat Coronavirus HKU10, From Leschenault's Rousettes To Pomona Leaf-Nosed Bats: First Evidence Of Interspecies Transmission Of Coronavirus Between Bats Of Different Suborders. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11906–11918, Doi:10.1128/JVI.01305-12.
46. Vlasova, A.N.; Saif, L.J. Bovine Coronavirus And The Associated Diseases. *Front Vet Sci* **2021**, *8*, 643220, Doi:10.3389/Fvets.2021.643220.
47. Ridremont, B. Les Coronavirus Des Bovins : Virologie, Diversité D'hôtes Et Transmission Interspécifiques. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France* **2020**, *173*, 49–54, Doi:10.3406/Bavf.2020.70923.
48. Nuttall, P.A.; Harrap, K.A. Isolation Of A Coronavirus During Studies On Puffinosis, A Disease Of The Manx Shearwater(Puffinus Puffinus). *Arch Virol* **1982**, *73*, 1–13, Doi:10.1007/BF01341722.
49. Guan, Y.; Zheng, B.J.; He, Y.Q.; Liu, X.L.; Zhuang, Z.X.; Cheung, C.L.; Luo, S.W.; Li, P.H.; Zhang, L.J.; Guan, Y.J.; Et Al. Isolation And Characterization Of Viruses Related To The SARS Coronavirus From Animals In Southern China. *Science* **2003**, *302*, 276–278, Doi:10.1126/Science.1087139.
50. Li, W.; Zhang, C.; Sui, J.; Kuhn, J.H.; Moore, M.J.; Luo, S.; Wong, S.-K.; Huang, I.-C.; Xu, K.; Vasilieva, N.; Et Al. Receptor And Viral Determinants Of SARS-Coronavirus Adaptation To Human ACE2. *EMBO J* **2005**, *24*, 1634–1643, Doi:10.1038/Sj.Emboj.7600640.
51. Lau, S.K.P.; Feng, Y.; Chen, H.; Luk, H.K.H.; Yang, W.-H.; Li, K.S.M.; Zhang, Y.-Z.; Huang, Y.; Song, Z.-Z.; Chow, W.-N.; Et Al. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus ORF8 Protein Is Acquired From SARS-Related Coronavirus From Greater Horseshoe Bats Through Recombination. *J Virol* **2015**, *89*, 10532–10547, Doi:10.1128/JVI.01048-15.
52. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Et Al. A Pneumonia Outbreak Associated With A New Coronavirus Of Probable Bat Origin. *Nature* **2020**, *579*, 270–273, Doi:10.1038/S41586-020-2012-7.

53. Identifying SARS-Cov-2-Related Coronaviruses In Malayan Pangolins - Pubmed Available Online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32218527/> (Accessed On 17 August 2021).
54. Sailleau, C.; Dumarest, M.; Vanhomwegen, J.; Delaplace, M.; Caro, V.; Kwasiborski, A.; Hourdel, V.; Chevaillier, P.; Barbarino, A.; Comtet, L.; Et Al. First Detection And Genome Sequencing Of SARS-Cov-2 In An Infected Cat In France. *Transbound Emerg Dis* **2020**, Doi:10.1111/Tbed.13659.
55. Sharun, K.; Dhama, K.; Pawde, A.M.; Gortázar, C.; Tiwari, R.; Bonilla-Aldana, D.K.; Rodriguez-Morales, A.J.; De La Fuente, J.; Michalak, I.; Attia, Y.A. SARS-Cov-2 In Animals: Potential For Unknown Reservoir Hosts And Public Health Implications. *Vet Q* **2021**, *41*, 181–201, Doi:10.1080/01652176.2021.1921311.
56. Molenaar, R.J.; Vreman, S.; Hakze-Van Der Honing, R.W.; Zwart, R.; De Rond, J.; Weesendorp, E.; Smit, L.A.M.; Koopmans, M.; Bouwstra, R.; Stegeman, A.; Et Al. Clinical And Pathological Findings In SARS-Cov-2 Disease Outbreaks In Farmed Mink (Neovison Vison). *Vet Pathol* **2020**, *57*, 653–657, Doi:10.1177/0300985820943535.
57. Montagutelli, X.; Prot, M.; Levillayer, L.; Salazar, E.B.; Jouvion, G.; Conquet, L.; Donati, F.; Albert, M.; Gambaro, F.; Behillil, S.; Et Al. The B1.351 And P.1 Variants Extend SARS-Cov-2 Host Range To Mice. *Biorxiv* **2021**, 2021.03.18.436013, Doi:10.1101/2021.03.18.436013.
58. Hemida, M.G.; Elmoslemay, A.; Al-Hizab, F.; Alnaeem, A.; Almathen, F.; Faye, B.; Chu, D.K.W.; Perera, R. A. P.M.; Peiris, M. Dromedary Camels And The Transmission Of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-Cov). *Transbound Emerg Dis* **2017**, *64*, 344–353, Doi:10.1111/Tbed.12401.
59. 2015 MERS Outbreak In Republic Of Korea Available Online: <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/2015-mers-outbreak> (Accessed On 16 August 2021).
60. Li, F.; Du, L. MERS Coronavirus: An Emerging Zoonotic Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 663, Doi:10.3390/V11070663.
61. Zhou, Z.; Qiu, Y.; Ge, X. The Taxonomy, Host Range And Pathogenicity Of Coronaviruses And Other Viruses In The Nidovirales Order. *Animal Diseases* **2021**, *1*, 5, Doi:10.1186/S44149-021-00005-9.
62. Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Lam, C.S.F.; Tsang, A.K.L.; Hui, S.-W.; Fan, R.Y.Y.; Martelli, P.; Yuen, K.-Y. Discovery Of A Novel Bottlenose Dolphin Coronavirus Reveals A Distinct Species Of Marine Mammal Coronavirus In Gammacoronavirus. *Journal Of Virology* **2014**, *88*, 1318–1331, Doi:10.1128/JVI.02351-13.
63. Wang, L.; Maddox, C.; Terio, K.; Lanka, S.; Fredrickson, R.; Novick, B.; Parry, C.; McClain, A.; Ross, K. Detection And Characterization Of New Coronavirus In Bottlenose Dolphin, United States, 2019. *Emerg Infect Dis* **2020**, *26*, 1610–1612, Doi:10.3201/Eid2607.200093.
64. De Wit, J.J.S.; Cook, J.K.A. Spotlight On Avian Coronaviruses. *Avian Pathol* **2020**, *49*, 313–316, Doi:10.1080/03079457.2020.1761010.

65. Discovery Of Seven Novel Mammalian And Avian Coronaviruses In The Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses As The Gene Source Of Alphacoronavirus And Betacoronavirus And Avian Coronaviruses As The Gene Source Of Gammacoronavirus And Deltacoronavirus Available Online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302495/> (Accessed On 24 October 2019).
66. Chung, H.-C.; Park, B.-K. Porcine Deltacoronavirus Outbreaks In The World. *Journal Of Animal Sciences And Livestock Production* **2017**, *1*, Doi:10.21767/2577-0594.100010.
67. Jung, K.; Hu, H.; Saif, L.J. Porcine Deltacoronavirus Infection: Etiology, Cell Culture For Virus Isolation And Propagation, Molecular Epidemiology And Pathogenesis. *Virus Res* **2016**, *226*, 50–59, Doi:10.1016/j.virusres.2016.04.009.
68. Wille, M.; Holmes, E.C. Wild Birds As Reservoirs For Diverse And Abundant Gamma- And Deltacoronaviruses. *FEMS Microbiol Rev* **2020**, *44*, 631–644, Doi:10.1093/femsre/fuaa026.
69. Vlasova, A.N.; Kenney, S.P.; Jung, K.; Wang, Q.; Saif, L.J. Deltacoronavirus Evolution And Transmission: Current Scenario And Evolutionary Perspectives. *Front Vet Sci* **2020**, *7*, 626785, Doi:10.3389/fvets.2020.626785.
70. Patiño-Galindo, J.Á.; Filip, I.; Rabadan, R. Global Patterns Of Recombination Across Human Viruses. *Mol Biol Evol* **2021**, *38*, 2520–2531, Doi:10.1093/molbev/msab046.
71. Lin, S.-Y.; Chen, H.-W. Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis And Pathogenicity Investigation. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, Doi:10.3390/ijms18102030.
72. Forni, D.; Cagliani, R.; Sironi, M. Recombination And Positive Selection Differentially Shaped The Diversity Of Betacoronavirus Subgenera. *Viruses* **2020**, *12*, E1313, Doi:10.3390/v12111313.
73. Lorusso, A.; Decaro, N.; Schellen, P.; Rottier, P.J.M.; Buonavoglia, C.; Haijema, B.-J.; Groot, R.J. De Gain, Preservation, And Loss Of A Group 1a Coronavirus Accessory Glycoprotein. *Journal Of Virology* **2008**, *82*, 10312–10317, Doi:10.1128/JVI.01031-08.
74. Woo, P.C.Y.; Huang, Y.; Lau, S.K.P.; Yuen, K.-Y. Coronavirus Genomics And Bioinformatics Analysis. *Viruses* **2010**, *2*, 1804–1820, Doi:10.3390/v2081803.
75. Lai, M.M.; Baric, R.S.; Makino, S.; Keck, J.G.; Egbert, J.; Leibowitz, J.L.; Stohlman, S.A. Recombination Between Nonsegmented RNA Genomes Of Murine Coronaviruses. *J Virol* **1985**, *56*, 449–456, Doi:10.1128/JVI.56.2.449-456.1985.
76. Yang, Y.; Yan, W.; Hall, B.; Jiang, X. Characterizing Transcriptional Regulatory Sequences In Coronaviruses And Their Role In Recombination. *Biorxiv* **2020**, 2020.06.21.163410, Doi:10.1101/2020.06.21.163410.
77. Masters, P.S. The Molecular Biology Of Coronaviruses. *Adv Virus Res* **2006**, *66*, 193–292, Doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
78. Lang, Y.; Li, W.; Li, Z.; Koerhuis, D.; Burg, A.C.S. Van Den; Rozemuller, E.; Bosch, B.-J.; Kuppeveld, F.J.M. Van; Boons, G.-J.; Huizinga, E.G.; Et Al.

- Coronavirus Hemagglutinin-Esterase And Spike Proteins Coevolve For Functional Balance And Optimal Virion Avidity. *PNAS* **2020**, *117*, 25759–25770, Doi:10.1073/Pnas.2006299117.
79. Sola, I.; Almazán, F.; Zúñiga, S.; Enjuanes, L. Continuous And Discontinuous RNA Synthesis In Coronaviruses. *Annu Rev Virol* **2015**, *2*, 265–288, Doi:10.1146/Annurev-Virology-100114-055218.
  80. Dye, C.; Siddell, S.G. Genomic RNA Sequence Of Feline Coronavirus Strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol* **2005**, *86*, 2249–2253, Doi:10.1099/Vir.0.80985-0.
  81. Schaecher, S.R.; Mackenzie, J.M.; Pekosz, A. The ORF7b Protein Of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-Cov) Is Expressed In Virus-Infected Cells And Incorporated Into SARS-Cov Particles. *J Virol* **2007**, *81*, 718–731, Doi:10.1128/JVI.01691-06.
  82. Van Hemert, M.J.; Van Den Worm, S.H.E.; Knoops, K.; Mommaas, A.M.; Gorbalenya, A.E.; Snijder, E.J. SARS-Coronavirus Replication/Transcription Complexes Are Membrane-Protected And Need A Host Factor For Activity In Vitro. *Plos Pathog* **2008**, *4*, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1000054.
  83. Nakagawa, K.; Makino, S. Mechanisms Of Coronavirus Nsp1-Mediated Control Of Host And Viral Gene Expression. *Cells* **2021**, *10*, 300, Doi:10.3390/Cells10020300.
  84. Thoms, M.; Buschauer, R.; Ameisemeier, M.; Koepke, L.; Denk, T.; Hirschenberger, M.; Kratzat, H.; Hayn, M.; Mackens-Kiani, T.; Cheng, J.; Et Al. Structural Basis For Translational Shutdown And Immune Evasion By The Nsp1 Protein Of SARS-Cov-2. *Science* **2020**, *369*, 1249–1255, Doi:10.1126/Science.Abc8665.
  85. Angeletti, S.; Benvenuto, D.; Bianchi, M.; Giovanetti, M.; Pascarella, S.; Ciccozzi, M. COVID-2019: The Role Of The Nsp2 And Nsp3 In Its Pathogenesis. *J Med Virol* **2020**, *92*, 584–588, Doi:10.1002/Jmv.25719.
  86. Oudshoorn, D.; Rijs, K.; Limpens, R.W.A.L.; Groen, K.; Koster, A.J.; Snijder, E.J.; Kikkert, M.; Bárcena, M. Expression And Cleavage Of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Nsp3-4 Polyprotein Induce The Formation Of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated With Coronaviral RNA Replication. *Mbio* **2017**, *8*, E01658-17, Doi:10.1128/Mbio.01658-17.
  87. Angelini, M.M.; Akhlaghpour, M.; Neuman, B.W.; Buchmeier, M.J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, And 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *Mbio* **2013**, *4*, E00524-13, Doi:10.1128/Mbio.00524-13.
  88. Lei, J.; Kusov, Y.; Hilgenfeld, R. Nsp3 Of Coronaviruses: Structures And Functions Of A Large Multi-Domain Protein. *Antiviral Res* **2018**, *149*, 58–74, Doi:10.1016/J.Antiviral.2017.11.001.
  89. Zhu, X.; Wang, D.; Zhou, J.; Pan, T.; Chen, J.; Yang, Y.; Lv, M.; Ye, X.; Peng, G.; Fang, L.; Et Al. Porcine Deltacoronavirus Nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling By Cleaving STAT2. *J. Virol.* **2017**, *91*, Doi:10.1128/JVI.00003-17.

90. Roe, M.K.; Junod, N.A.; Young, A.R.; Beachboard, D.C.; Stobart, C.C. Targeting Novel Structural And Functional Features Of Coronavirus Protease Nsp5 (3clpro, Mpro) In The Age Of COVID-19. *J Gen Virol* **2021**, *102*, Doi:10.1099/Jgv.0.001558.
91. Cottam, E.M.; Maier, H.J.; Manifava, M.; Vaux, L.C.; Chandra-Schoenfelder, P.; Gerner, W.; Britton, P.; Ktistakis, N.T.; Wileman, T. Coronavirus Nsp6 Proteins Generate Autophagosomes From The Endoplasmic Reticulum Via An Omegasome Intermediate. *Autophagy* **2011**, *7*, 1335–1347, Doi:10.4161/Auto.7.11.16642.
92. Zhai, Y.; Sun, F.; Li, X.; Pang, H.; Xu, X.; Bartlam, M.; Rao, Z. Insights Into SARS-Cov Transcription And Replication From The Structure Of The Nsp7–Nsp8 Hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, *12*, 980–986, Doi:10.1038/Nsmb999.
93. Te Velthuis, A.J.W.; Van Den Worm, S.H.E.; Snijder, E.J. The SARS-Coronavirus Nsp7+Nsp8 Complex Is A Unique Multimeric RNA Polymerase Capable Of Both De Novo Initiation And Primer Extension. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1737–1747, Doi:10.1093/Nar/Gkr893.
94. Peng, Q.; Peng, R.; Yuan, B.; Zhao, J.; Wang, M.; Wang, X.; Wang, Q.; Sun, Y.; Fan, Z.; Qi, J.; Et Al. Structural And Biochemical Characterization Of The Nsp12-Nsp7-Nsp8 Core Polymerase Complex From SARS-Cov-2. *Cell Rep* **2020**, *31*, 107774, Doi:10.1016/J.Celrep.2020.107774.
95. Wang, Q.; Luo, Y.; Shang, W.; Shi, Z.; Xiao, G.; Zhang, L. Comprehensive Interactome Analysis Of The Spike Protein Of Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus. *Biosaf Health* **2021**, Doi:10.1016/J.Bsheal.2021.05.002.
96. Sutton, G.; Fry, E.; Carter, L.; Sainsbury, S.; Walter, T.; Nettleship, J.; Berrow, N.; Owens, R.; Gilbert, R.; Davidson, A.; Et Al. The Nsp9 Replicase Protein Of SARS-Coronavirus, Structure And Functional Insights. *Structure* **2004**, *12*, 341–353, Doi:10.1016/J.Str.2004.01.016.
97. Chen, Y.; Su, C.; Ke, M.; Jin, X.; Xu, L.; Zhang, Z.; Wu, A.; Sun, Y.; Yang, Z.; Tien, P.; Et Al. Biochemical And Structural Insights Into The Mechanisms Of SARS Coronavirus RNA Ribose 2'-O-Methylation By Nsp16/Nsp10 Protein Complex. *Plos Pathog* **2011**, *7*, E1002294, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1002294.
98. Bouvet, M.; Lugari, A.; Posthuma, C.C.; Zevenhoven, J.C.; Bernard, S.; Betzi, S.; Imbert, I.; Canard, B.; Guillemot, J.-C.; Lécine, P.; Et Al. Coronavirus Nsp10, A Critical Co-Factor For Activation Of Multiple Replicative Enzymes. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 25783–25796, Doi:10.1074/Jbc.M114.577353.
99. Fang, S.G.; Shen, H.; Wang, J.; Tay, F.P.L.; Liu, D.X. Proteolytic Processing Of Polyproteins 1a And 1ab Between Non-Structural Proteins 10 And 11/12 Of Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Is Dispensable For Viral Replication In Cultured Cells. *Virology* **2008**, *379*, 175–180, Doi:10.1016/J.Virol.2008.06.038.
100. Shu, T.; Huang, M.; Wu, D.; Ren, Y.; Zhang, X.; Han, Y.; Mu, J.; Wang, R.; Qiu, Y.; Zhang, D.-Y.; Et Al. SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses Ntpase And RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited By Bismuth Salts. *Virol Sin* **2020**, *35*, 321–329, Doi:10.1007/S12250-020-00242-1.

101. Yuen, C.-K.; Lam, J.-Y.; Wong, W.-M.; Mak, L.-F.; Wang, X.; Chu, H.; Cai, J.-P.; Jin, D.-Y.; To, K.K.-W.; Chan, J.F.-W.; Et Al. SARS-Cov-2 Nsp13, Nsp14, Nsp15 And Orf6 Function As Potent Interferon Antagonists. *Emerg Microbes Infect* **2020**, *9*, 1418–1428, Doi:10.1080/22221751.2020.1780953.
102. Ogando, N.S.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Van Der Meer, Y.; Bredenbeek, P.J.; Posthuma, C.C.; Snijder, E.J. The Enzymatic Activity Of The Nsp14 Exoribonuclease Is Critical For Replication Of MERS-Cov And SARS-Cov-2. *Journal Of Virology* *94*, E01246-20, Doi:10.1128/JVI.01246-20.
103. Deng, X.; Hackbart, M.; Mettelman, R.C.; O'Brien, A.; Mielech, A.M.; Yi, G.; Kao, C.C.; Baker, S.C. Coronavirus Nonstructural Protein 15 Mediates Evasion Of Dsrna Sensors And Limits Apoptosis In Macrophages. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **2017**, *114*, E4251–E4260, Doi:10.1073/Pnas.1618310114.
104. Snijder, E.J.; Decroly, E.; Ziebuhr, J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis And Processing. *Adv Virus Res* **2016**, *96*, 59–126, Doi:10.1016/Bs.Aivir.2016.08.008.
105. Hulswit, R.J.G.; De Haan, C.A.M.; Bosch, B.-J. Coronavirus Spike Protein And Tropism Changes. *Adv Virus Res* **2016**, *96*, 29–57, Doi:10.1016/Bs.Aivir.2016.08.004.
106. Li, F. Structure, Function, And Evolution Of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* **2016**, *3*, 237–261, Doi:10.1146/Annurev-Virology-110615-042301.
107. Belouzard, S.; Millet, J.K.; Licitra, B.N.; Whittaker, G.R. Mechanisms Of Coronavirus Cell Entry Mediated By The Viral Spike Protein. *Viruses* **2012**, *4*, 1011–1033, Doi:10.3390/V4061011.
108. Jaimes, J.A.; Millet, J.K.; Stout, A.E.; André, N.M.; Whittaker, G.R. A Tale Of Two Viruses: The Distinct Spike Glycoproteins Of Feline Coronaviruses. *Viruses* **2020**, *12*, Doi:10.3390/V12010083.
109. Xiong, X.; Tortorici, M.A.; Snijder, J.; Yoshioka, C.; Walls, A.C.; Li, W.; McGuire, A.T.; Rey, F.A.; Bosch, B.-J.; Veesler, D. Glycan Shield And Fusion Activation Of A Deltacoronavirus Spike Glycoprotein Fine-Tuned For Enteric Infections. *J Virol* **2018**, *92*, E01628-17, Doi:10.1128/JVI.01628-17.
110. Schoeman, D.; Fielding, B.C. Coronavirus Envelope Protein: Current Knowledge. *Virol J* **2019**, *16*, 69, Doi:10.1186/S12985-019-1182-0.
111. Dediego, M.L.; Nieto-Torres, J.L.; Jimenez-Guardeño, J.M.; Regla-Nava, J.A.; Castaño-Rodríguez, C.; Fernandez-Delgado, R.; Usera, F.; Enjuanes, L. Coronavirus Virulence Genes With Main Focus On SARS-Cov Envelope Gene. *Virus Res* **2014**, *194*, 124–137, Doi:10.1016/J.Virusres.2014.07.024.
112. Tseng, Y.-T.; Wang, S.-M.; Huang, K.-J.; Wang, C.-T. SARS-Cov Envelope Protein Palmitoylation Or Nucleocapid Association Is Not Required For Promoting Virus-Like Particle Production. *Journal Of Biomedical Science* **2014**, *21*, 34, Doi:10.1186/1423-0127-21-34.
113. Alvarez, E.; Dediego, M.L.; Nieto-Torres, J.L.; Jiménez-Guardeño, J.M.; Marcos-Villar, L.; Enjuanes, L. The Envelope Protein Of Severe Acute Respiratory

- Syndrome Coronavirus Interacts With The Non-Structural Protein 3 And Is Ubiquitinated. *Virology* **2010**, *402*, 281–291, Doi:10.1016/J.Virol.2010.03.015.
114. Pan, J.; Peng, X.; Gao, Y.; Li, Z.; Lu, X.; Chen, Y.; Ishaq, M.; Liu, D.; Dediego, M.L.; Enjuanes, L.; Et Al. Genome-Wide Analysis Of Protein-Protein Interactions And Involvement Of Viral Proteins In SARS-Cov Replication. *Plos One* **2008**, *3*, E3299, Doi:10.1371/Journal.Pone.0003299.
  115. Mcclenaghan, C.; Hanson, A.; Lee, S.-J.; Nichols, C.G. Coronavirus Proteins As Ion Channels: Current And Potential Research. *Front Immunol* **2020**, *11*, 573339, Doi:10.3389/Fimmu.2020.573339.
  116. Westerbeck, J.W.; Machamer, C.E. A Coronavirus E Protein Is Present In Two Distinct Pools With Different Effects On Assembly And The Secretory Pathway. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9313–9323, Doi:10.1128/JVI.01237-15.
  117. Fung, T.S.; Liu, D.X. Post-Translational Modifications Of Coronavirus Proteins: Roles And Function. *Future Virol* **2018**, *13*, 405–430, Doi:10.2217/Fvl-2018-0008.
  118. Dediego, M.L.; Alvarez, E.; Almazán, F.; Rejas, M.T.; Lamirande, E.; Roberts, A.; Shieh, W.-J.; Zaki, S.R.; Subbarao, K.; Enjuanes, L. A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks The E Gene Is Attenuated In Vitro And In Vivo. *J Virol* **2007**, *81*, 1701–1713, Doi:10.1128/JVI.01467-06.
  119. Kuo, L.; Masters, P.S. The Small Envelope Protein E Is Not Essential For Murine Coronavirus Replication. *J Virol* **2003**, *77*, 4597–4608, Doi:10.1128/Jvi.77.8.4597-4608.2003.
  120. Ortego, J.; Ceriani, J.E.; Patiño, C.; Plana, J.; Enjuanes, L. Absence Of E Protein Arrests Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Maturation In The Secretory Pathway. *Virology* **2007**, *368*, 296–308, Doi:10.1016/J.Virol.2007.05.032.
  121. M - Membrane Protein - Feline Coronavirus (Strain FIPV WSU-79/1146) (Fcov) - M Gene & Protein Available Online: <https://www.uniprot.org/uniprot/P25878> (Accessed On 16 August 2021).
  122. Hu, Y.; Wen, J.; Tang, L.; Zhang, H.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, J.; Han, Y.; Li, G.; Shi, J.; Et Al. The M Protein Of SARS-Cov: Basic Structural And Immunological Properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2003**, *1*, 118–130, Doi:10.1016/S1672-0229(03)01016-7.
  123. Neuman, B.W.; Kiss, G.; Kunding, A.H.; Bhella, D.; Baksh, M.F.; Connelly, S.; Droese, B.; Klaus, J.P.; Makino, S.; Sawicki, S.G.; Et Al. A Structural Analysis Of M Protein In Coronavirus Assembly And Morphology. *J Struct Biol* **2011**, *174*, 11–22, Doi:10.1016/J.Jsb.2010.11.021.
  124. Chang, C.; Hou, M.-H.; Chang, C.-F.; Hsiao, C.-D.; Huang, T. The SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein – Forms And Functions. *Antiviral Res* **2014**, *103*, 39–50, Doi:10.1016/J.Antiviral.2013.12.009.
  125. Diemer, C.; Schneider, M.; Seebach, J.; Quaas, J.; Frösner, G.; Schätzl, H.M.; Gilch, S. Cell Type-Specific Cleavage Of Nucleocapsid Protein By Effector Caspases During SARS Coronavirus Infection. *J Mol Biol* **2008**, *376*, 23–34, Doi:10.1016/J.Jmb.2007.11.081.

126. Cong, Y.; Ulasli, M.; Schepers, H.; Mauthe, M.; V'kovski, P.; Kriegenburg, F.; Thiel, V.; De Haan, C.A.M.; Reggiori, F. Nucleocapsid Protein Recruitment To Replication-Transcription Complexes Plays A Crucial Role In Coronaviral Life Cycle. *J Virol* **2020**, *94*, E01925-19, Doi:10.1128/JVI.01925-19.
127. Lai, F.W.; Stephenson, K.B.; Mahony, J.; Lichty, B.D. Human Coronavirus OC43 Nucleocapsid Protein Binds Microrna 9 And Potentiates NF-KB Activation. *J Virol* **2014**, *88*, 54–65, Doi:10.1128/JVI.02678-13.
128. McBride, R.; Van Zyl, M.; Fielding, B.C. The Coronavirus Nucleocapsid Is A Multifunctional Protein. *Viruses* **2014**, *6*, 2991–3018, Doi:10.3390/V6082991.
129. Zeng, Q.; Langereis, M.A.; Van Vliet, A.L.W.; Huizinga, E.G.; De Groot, R.J. Structure Of Coronavirus Hemagglutinin-Esterase Offers Insight Into Corona And Influenza Virus Evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 9065–9069, Doi:10.1073/Pnas.0800502105.
130. Bakkers, M.J.G.; Lang, Y.; Feitsma, L.J.; Hulswit, R.J.G.; De Poot, S.A.H.; Van Vliet, A.L.W.; Margine, I.; De Groot-Mijnes, J.D.F.; Van Kuppeveld, F.J.M.; Langereis, M.A.; Et Al. Betacoronavirus Adaptation To Humans Involved Progressive Loss Of Hemagglutinin-Esterase Lectin Activity. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 356–366, Doi:10.1016/J.Chom.2017.02.008.
131. Lee, J.Y.; Bae, S.; Myoung, J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus-Encoded Accessory Proteins Impair MDA5-And TBK1-Mediated Activation Of NF-KB. *J Microbiol Biotechnol* **2019**, *29*, 1316–1323, Doi:10.4014/Jmb.1908.08004.
132. Fang, P.; Fang, L.; Ren, J.; Hong, Y.; Liu, X.; Zhao, Y.; Wang, D.; Peng, G.; Xiao, S. Porcine Deltacoronavirus Accessory Protein NS6 Antagonizes Interferon Beta Production By Interfering With The Binding Of RIG-I/MDA5 To Double-Stranded RNA. *J Virol* **2018**, *92*, E00712-18, Doi:10.1128/JVI.00712-18.
133. Shi, C.-S.; Qi, H.-Y.; Boullaran, C.; Huang, N.-N.; Abu-Asab, M.; Shelhamer, J.H.; Kehrl, J.H. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-9b Suppresses Innate Immunity By Targeting Mitochondria And The MAVS/TRAF3/TRAF6 Signalosome. *J Immunol* **2014**, *193*, 3080–3089, Doi:10.4049/Jimmunol.1303196.
134. Wu, J.; Shi, Y.; Pan, X.; Wu, S.; Hou, R.; Zhang, Y.; Zhong, T.; Tang, H.; Du, W.; Wang, L.; Et Al. SARS-Cov-2 ORF9b Inhibits RIG-I-MAVS Antiviral Signaling By Interrupting K63-Linked Ubiquitination Of NEMO. *Cell Rep* **2021**, *34*, 108761, Doi:10.1016/J.Celrep.2021.108761.
135. Fang, P.; Fang, L.; Xia, S.; Ren, J.; Zhang, J.; Bai, D.; Zhou, Y.; Peng, G.; Zhao, S.; Xiao, S. Porcine Deltacoronavirus Accessory Protein NS7a Antagonizes IFN-B Production By Competing With TRAF3 And IRF3 For Binding To Ikkε. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 257, Doi:10.3389/Fcimb.2020.00257.
136. Kopecky-Bromberg, S.A.; Martínez-Sobrido, L.; Frieman, M.; Baric, R.A.; Palese, P. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, And Nucleocapsid Proteins Function As Interferon Antagonists. *J Virol* **2007**, *81*, 548–557, Doi:10.1128/JVI.01782-06.
137. Wong, H.H.; Fung, T.S.; Fang, S.; Huang, M.; Le, M.T.; Liu, D.X. Accessory Proteins 8b And 8ab Of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

- Suppress The Interferon Signaling Pathway By Mediating Ubiquitin-Dependent Rapid Degradation Of Interferon Regulatory Factor 3. *Virology* **2018**, *515*, 165–175, Doi:10.1016/J.Virol.2017.12.028.
138. Canton, J.; Fehr, A.R.; Fernandez-Delgado, R.; Gutierrez-Alvarez, F.J.; Sanchez-Aparicio, M.T.; García-Sastre, A.; Perlman, S.; Enjuanes, L.; Sola, I. MERS-Cov 4b Protein Interferes With The NF-KB-Dependent Innate Immune Response During Infection. *Plos Pathog* **2018**, *14*, E1006838, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1006838.
  139. Goldstein, S.A.; Thornbrough, J.M.; Zhang, R.; Jha, B.K.; Li, Y.; Elliott, R.; Quiroz-Figueroa, K.; Chen, A.I.; Silverman, R.H.; Weiss, S.R. Lineage A Betacoronavirus NS2 Proteins And The Homologous Torovirus Berne Pp1a Carboxy-Terminal Domain Are Phosphodiesterases That Antagonize Activation Of Rnase L. *J. Virol.* **2017**, *91*, Doi:10.1128/JVI.02201-16.
  140. Thornbrough, J.M.; Jha, B.K.; Yount, B.; Goldstein, S.A.; Li, Y.; Elliott, R.; Sims, A.C.; Baric, R.S.; Silverman, R.H.; Weiss, S.R. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host Rnase L Activation. *Mbio* **2016**, *7*, E00258, Doi:10.1128/Mbio.00258-16.
  141. Dedeurwaerder, A.; Olyslaegers, D.A.J.; Desmarests, L.M.B.; Roukaerts, I.D.M.; Theuns, S.; Nauwynck, H.J. ORF7-Encoded Accessory Protein 7a Of Feline Infectious Peritonitis Virus As A Counteragent Against IFN-A-Induced Antiviral Response. *J Gen Virol* **2014**, *95*, 393–402, Doi:10.1099/Vir.0.058743-0.
  142. Siu, K.-L.; Yuen, K.-S.; Castaño-Rodriguez, C.; Ye, Z.-W.; Yeung, M.-L.; Fung, S.-Y.; Yuan, S.; Chan, C.-P.; Yuen, K.-Y.; Enjuanes, L.; Et Al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF3a Protein Activates The NLRP3 Inflammasome By Promoting TRAF3-Dependent Ubiquitination Of ASC. *FASEB J* **2019**, *33*, 8865–8877, Doi:10.1096/Fj.201802418R.
  143. Ye, Z.; Wong, C.K.; Li, P.; Xie, Y. A SARS-Cov Protein, ORF-6, Induces Caspase-3 Mediated, ER Stress And JNK-Dependent Apoptosis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2008**, *1780*, 1383–1387, Doi:10.1016/J.Bbagen.2008.07.009.
  144. Wang, K.; Lu, W.; Chen, J.; Xie, S.; Shi, H.; Hsu, H.; Yu, W.; Xu, K.; Bian, C.; Fischer, W.B.; Et Al. PEDV ORF3 Encodes An Ion Channel Protein And Regulates Virus Production. *FEBS Lett* **2012**, *586*, 384–391, Doi:10.1016/J.Febslet.2012.01.005.
  145. Zhang, R.; Wang, K.; Lv, W.; Yu, W.; Xie, S.; Xu, K.; Schwarz, W.; Xiong, S.; Sun, B. The ORF4a Protein Of Human Coronavirus 229E Functions As A Viroporin That Regulates Viral Production. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, 1088–1095, Doi:10.1016/J.Bbamem.2013.07.025.
  146. Zhang, R.; Wang, K.; Ping, X.; Yu, W.; Qian, Z.; Xiong, S.; Sun, B. The Ns12.9 Accessory Protein Of Human Coronavirus OC43 Is A Viroporin Involved In Virion Morphogenesis And Pathogenesis. *J Virol* **2015**, *89*, 11383–11395, Doi:10.1128/JVI.01986-15.
  147. Kint, J.; Langereis, M.A.; Maier, H.J.; Britton, P.; Van Kuppeveld, F.J.; Koumans, J.; Wiegertjes, G.F.; Forlenza, M. Infectious Bronchitis Coronavirus Limits

- Interferon Production By Inducing A Host Shutoff That Requires Accessory Protein 5b. *J Virol* **2016**, *90*, 7519–7528, Doi:10.1128/JVI.00627-16.
148. Tanaka, T.; Kamitani, W.; Dediego, M.L.; Enjuanes, L.; Matsuura, Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nsp1 Facilitates Efficient Propagation In Cells Through A Specific Translational Shutoff Of Host MRNA. *J Virol* **2012**, *86*, 11128–11137, Doi:10.1128/JVI.01700-12.
149. Le Poder, S.; Pham-Hung d'Alexandry d'Orangiani, A.-L.; Duarte, L.; Fournier, A.; Horhoge, C.; Pinhas, C.; Vabret, A.; Eloit, M. Infection Of Cats With Atypical Feline Coronaviruses Harboring A Truncated Form Of The Canine Type I Non-Structural ORF3 Gene. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *20*, 488–494, Doi:10.1016/J.Meegid.2013.09.024.
150. Bálint, Á.; Farsang, A.; Szeredi, L.; Zádori, Z.; Belák, S. Recombinant Feline Coronaviruses As Vaccine Candidates Confer Protection In SPF But Not In Conventional Cats. *Veterinary Microbiology* **2014**, *169*, 154–162, Doi:10.1016/J.Vetmic.2013.10.015.
151. Hsieh, L.-E.; Huang, W.-P.; Tang, D.-J.; Wang, Y.-T.; Chen, C.-T.; Chueh, L.-L. 3C Protein Of Feline Coronavirus Inhibits Viral Replication Independently Of The Autophagy Pathway. *Res Vet Sci* **2013**, *95*, 1241–1247, Doi:10.1016/J.Rvsc.2013.08.011.
152. Li, W.; Hulswit, R.J.G.; Widjaja, I.; Raj, V.S.; McBride, R.; Peng, W.; Widagdo, W.; Tortorici, M.A.; Van Dieren, B.; Lang, Y.; Et Al. Identification Of Sialic Acid-Binding Function For The Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, E8508–E8517, Doi:10.1073/Pnas.1712592114.
153. Huang, X.; Dong, W.; Milewska, A.; Golda, A.; Qi, Y.; Zhu, Q.K.; Marasco, W.A.; Baric, R.S.; Sims, A.C.; Pyrc, K.; Et Al. Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid As An Attachment Receptor Determinant And Employs Hemagglutinin-Esterase Protein As A Receptor-Destroying Enzyme. *J Virol* **2015**, *89*, 7202–7213, Doi:10.1128/JVI.00854-15.
154. Tortorici, M.A.; Walls, A.C.; Lang, Y.; Wang, C.; Li, Z.; Koerhuis, D.; Boons, G.-J.; Bosch, B.-J.; Rey, F.A.; De Groot, R.J.; Et Al. Structural Basis For Human Coronavirus Attachment To Sialic Acid Receptors. *Nat Struct Mol Biol* **2019**, *26*, 481–489, Doi:10.1038/S41594-019-0233-Y.
155. Milewska, A.; Zarebski, M.; Nowak, P.; Stozek, K.; Potempa, J.; Pyrc, K. Human Coronavirus NL63 Utilizes Heparan Sulfate Proteoglycans For Attachment To Target Cells. *J Virol* **2014**, *88*, 13221–13230, Doi:10.1128/JVI.02078-14.
156. Yeager, C.L.; Ashmun, R.A.; Williams, R.K.; Cardellicchio, C.B.; Shapiro, L.H.; Look, A.T.; Holmes, K.V. Human Aminopeptidase N Is A Receptor For Human Coronavirus 229E. *Nature* **1992**, *357*, 420–422, Doi:10.1038/357420a0.
157. Delmas, B.; Gelfi, J.; Kut, E.; Sjöström, H.; Noren, O.; Laude, H. Determinants Essential For The Transmissible Gastroenteritis Virus-Receptor Interaction Reside Within A Domain Of Aminopeptidase-N That Is Distinct From The Enzymatic Site. *J Virol* **1994**, *68*, 5216–5224, Doi:10.1128/JVI.68.8.5216-5224.1994.

158. Li, B.X.; Ge, J.W.; Li, Y.J. Porcine Aminopeptidase N Is A Functional Receptor For The PEDV Coronavirus. *Virology* **2007**, *365*, 166–172, Doi:10.1016/J.Virol.2007.03.031.
159. Wang, B.; Liu, Y.; Ji, C.-M.; Yang, Y.-L.; Liang, Q.-Z.; Zhao, P.; Xu, L.-D.; Lei, X.-M.; Luo, W.-T.; Qin, P.; Et Al. Porcine Deltacoronavirus Engages The Transmissible Gastroenteritis Virus Functional Receptor Porcine Aminopeptidase N For Infectious Cellular Entry. *J Virol* **2018**, *92*, E00318-18, Doi:10.1128/JVI.00318-18.
160. Li, W.; Moore, M.J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S.K.; Berne, M.A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T.C.; Et Al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is A Functional Receptor For The SARS Coronavirus. *Nature* **2003**, *426*, 450–454, Doi:10.1038/Nature02145.
161. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Et Al. SARS-Cov-2 Cell Entry Depends On ACE2 And TMPRSS2 And Is Blocked By A Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271-280.E8, Doi:10.1016/J.Cell.2020.02.052.
162. Ge, X.-Y.; Li, J.-L.; Yang, X.-L.; Chmura, A.A.; Zhu, G.; Epstein, J.H.; Mazet, J.K.; Hu, B.; Zhang, W.; Peng, C.; Et Al. Isolation And Characterization Of A Bat SARS-Like Coronavirus That Uses The ACE2 Receptor. *Nature* **2013**, *503*, 535–538, Doi:10.1038/Nature12711.
163. Hofmann, H.; Pyrc, K.; Van Der Hoek, L.; Geier, M.; Berkhout, B.; Pöhlmann, S. Human Coronavirus NL63 Employs The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor For Cellular Entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 7988–7993, Doi:10.1073/Pnas.0409465102.
164. Cui, T.; Theuns, S.; Xie, J.; Van Den Broeck, W.; Nauwynck, H.J. Role Of Porcine Aminopeptidase N And Sialic Acids In Porcine Coronavirus Infections In Primary Porcine Enterocytes. *Viruses* **2020**, *12*, E402, Doi:10.3390/V12040402.
165. Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A. Virus Entry By Endocytosis. *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 803–833, Doi:10.1146/Annurev-Biochem-060208-104626.
166. Lu, Y.; Liu, D.X.; Tam, J.P. Lipid Rafts Are Involved In SARS-Cov Entry Into Vero E6 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *369*, 344–349, Doi:10.1016/J.Bbrc.2008.02.023.
167. Wang, H.; Yang, P.; Liu, K.; Guo, F.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Jiang, C. SARS Coronavirus Entry Into Host Cells Through A Novel Clathrin- And Caveolae-Independent Endocytic Pathway. *Cell Res* **2008**, *18*, 290–301, Doi:10.1038/Cr.2008.15.
168. Milewska, A.; Nowak, P.; Owczarek, K.; Szczepanski, A.; Zarebski, M.; Hoang, A.; Berniak, K.; Wojarski, J.; Zeglen, S.; Baster, Z.; Et Al. Entry Of Human Coronavirus NL63 Into The Cell. *Journal Of Virology* **2018**, *92*, E01933-17, Doi:10.1128/JVI.01933-17.
169. Owczarek, K.; Szczepanski, A.; Milewska, A.; Baster, Z.; Rajfur, Z.; Sarna, M.; Pyrc, K. Early Events During Human Coronavirus OC43 Entry To The Cell. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 7124, Doi:10.1038/S41598-018-25640-0.

170. Van Hamme, E.; Dewerchin, H.L.; Cornelissen, E.; Verhasselt, B.; Nauwynck, H.J. Clathrin- And Caveolae-Independent Entry Of Feline Infectious Peritonitis Virus In Monocytes Depends On Dynamin. *J Gen Virol* **2008**, *89*, 2147–2156, Doi:10.1099/Vir.0.2008/001602-0.
171. Van Hamme, E.; Dewerchin, H.L.; Cornelissen, E.; Nauwynck, H.J. Attachment And Internalization Of Feline Infectious Peritonitis Virus In Feline Blood Monocytes And Crandell Feline Kidney Cells. *J Gen Virol* **2007**, *88*, 2527–2532, Doi:10.1099/Vir.0.82991-0.
172. Storz, J.; Zhang, X.M. Infectious Mechanisms Of Enteropathogenic Bovine Coronaviruses. *Behring Inst Mitt* **1991**, 130–137.
173. Kooi, C.; Cervin, M.; Anderson, R. Differentiation Of Acid-Ph-Dependent And - Nondependent Entry Pathways For Mouse Hepatitis Virus. *Virology* **1991**, *180*, 108–119, Doi:10.1016/0042-6822(91)90014-3.
174. Matsuyama, S.; Taguchi, F. Two-Step Conformational Changes In A Coronavirus Envelope Glycoprotein Mediated By Receptor Binding And Proteolysis. *J Virol* **2009**, *83*, 11133–11141, Doi:10.1128/JVI.00959-09.
175. Shirato, K.; Kanou, K.; Kawase, M.; Matsuyama, S. Clinical Isolates Of Human Coronavirus 229E Bypass The Endosome For Cell Entry. *J Virol* **2017**, *91*, Doi:10.1128/JVI.01387-16.
176. Nikolakaki, E.; Giannakouros, T. SR/RS Motifs As Critical Determinants Of Coronavirus Life Cycle. *Front Mol Biosci* **2020**, *7*, 219, Doi:10.3389/Fmolb.2020.00219.
177. Inoue, Y.; Tanaka, N.; Tanaka, Y.; Inoue, S.; Morita, K.; Zhuang, M.; Hattori, T.; Sugamura, K. Clathrin-Dependent Entry Of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Into Target Cells Expressing ACE2 With The Cytoplasmic Tail Deleted. *J. Virol.* **2007**, *81*, 8722–8729, Doi:10.1128/JVI.00253-07.
178. Rabaan, A.A.; Al-Ahmed, S.H.; Sah, R.; Alqumber, M.A.; Haque, S.; Patel, S.K.; Pathak, M.; Tiwari, R.; Yattoo, M.I.; Haq, A.U.; Et Al. MERS-Cov: Epidemiology, Molecular Dynamics, Therapeutics, And Future Challenges. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2021**, *20*, 8, Doi:10.1186/S12941-020-00414-7.
179. Wang, H.; Yuan, X.; Sun, Y.; Mao, X.; Meng, C.; Tan, L.; Song, C.; Qiu, X.; Ding, C.; Liao, Y. Infectious Bronchitis Virus Entry Mainly Depends On Clathrin Mediated Endocytosis And Requires Classical Endosomal/Lysosomal System. *Virology* **2019**, *528*, 118–136, Doi:10.1016/J.Virol.2018.12.012.
180. Promkuntod, N.; Van Eijndhoven, R.E.W.; De Vrieze, G.; Gröne, A.; Verheije, M.H. Mapping Of The Receptor-Binding Domain And Amino Acids Critical For Attachment In The Spike Protein Of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Virology* **2014**, *448*, 26–32, Doi:10.1016/J.Virol.2013.09.018.
181. Pu, Y.; Zhang, X. Mouse Hepatitis Virus Type 2 Enters Cells Through A Clathrin-Mediated Endocytic Pathway Independent Of Eps15. *J Virol* **2008**, *82*, 8112–8123, Doi:10.1128/JVI.00837-08.

182. Nash, T.C.; Buchmeier, M.J. Entry Of Mouse Hepatitis Virus Into Cells By Endosomal And Nonendosomal Pathways. *Virology* **1997**, *233*, 1–8, Doi:10.1006/Viro.1997.8609.
183. Yang, N.; Shen, H.-M. Targeting The Endocytic Pathway And Autophagy Process As A Novel Therapeutic Strategy In COVID-19. *Int J Biol Sci* **2020**, *16*, 1724–1731, Doi:10.7150/Ijbs.45498.
184. Bayati, A.; Kumar, R.; Francis, V.; Mcpherson, P.S. SARS-Cov-2 Infects Cells After Viral Entry Via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal Of Biological Chemistry* **2021**, *296*, Doi:10.1016/J.Jbc.2021.100306.
185. Szczepanski, A.; Owczarek, K.; Bzowska, M.; Gula, K.; Drebot, I.; Ochman, M.; Maksym, B.; Rajfur, Z.; Mitchell, J.A.; Pyrc, K. Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, And Human Coronavirus OC43: Receptors And Attachment Factors. *Viruses* **2019**, *11*, 328, Doi:10.3390/V11040328.
186. Szczepanski, A.; Owczarek, K.; Milewska, A.; Baster, Z.; Rajfur, Z.; Mitchell, J.A.; Pyrc, K. Canine Respiratory Coronavirus Employs Caveolin-1-Mediated Pathway For Internalization To HRT-18G Cells. *Vet. Res.* **2018**, *49*, 55, Doi:10.1186/S13567-018-0551-9.
187. Wei, X.; She, G.; Wu, T.; Xue, C.; Cao, Y. PEDV Enters Cells Through Clathrin-, Caveolae-, And Lipid Raft-Mediated Endocytosis And Traffics Via The Endo-/Lysosome Pathway. *Vet Res* **2020**, *51*, 10, Doi:10.1186/S13567-020-0739-7.
188. O'Leary, V.B.; Dolly, O.J.; Höschl, C.; Černa, M.; Ovsepián, S.V. Unpacking Pandora From Its Box: Deciphering The Molecular Basis Of The SARS-Cov-2 Coronavirus. *Int J Mol Sci* **2020**, *22*, 386, Doi:10.3390/Ijms22010386.
189. Robertson, M.P.; Igel, H.; Baertsch, R.; Haussler, D.; Ares, M.; Scott, W.G. The Structure Of A Rigorously Conserved RNA Element Within The SARS Virus Genome. *Plos Biol* **2005**, *3*, E5, Doi:10.1371/Journal.Pbio.0030005.
190. Denison, M.R.; Perlman, S. Translation And Processing Of Mouse Hepatitis Virus Virion RNA In A Cell-Free System. *J Virol* **1986**, *60*, 12–18, Doi:10.1128/JVI.60.1.12-18.1986.
191. Hsu, M.-F.; Kuo, C.-J.; Chang, K.-T.; Chang, H.-C.; Chou, C.-C.; Ko, T.-P.; Shr, H.-L.; Chang, G.-G.; Wang, A.H.-J.; Liang, P.-H. Mechanism Of The Maturation Process Of SARS-Cov 3CL Protease. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 31257–31266, Doi:10.1074/Jbc.M502577200.
192. Schubert, K.; Karousis, E.D.; Jomaa, A.; Scaiola, A.; Echeverria, B.; Gurzeler, L.-A.; Leibundgut, M.; Thiel, V.; Mühlemann, O.; Ban, N. SARS-Cov-2 Nsp1 Binds The Ribosomal mRNA Channel To Inhibit Translation. *Nat Struct Mol Biol* **2020**, *27*, 959–966, Doi:10.1038/S41594-020-0511-8.
193. Kamitani, W.; Narayanan, K.; Huang, C.; Lokugamage, K.; Ikegami, T.; Ito, N.; Kubo, H.; Makino, S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nsp1 Protein Suppresses Host Gene Expression By Promoting Host mRNA Degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 12885–12890, Doi:10.1073/Pnas.0603144103.

194. Wolff, G.; Limpens, R.W.A.L.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Laugks, U.; Zheng, S.; De Jong, A.W.M.; Koning, R.I.; Agard, D.A.; Grünewald, K.; Koster, A.J.; Et Al. A Molecular Pore Spans The Double Membrane Of The Coronavirus Replication Organelle. *Science* **2020**, *369*, 1395–1398, Doi:10.1126/Science.Abd3629.
195. Kirchdoerfer, R.N.; Ward, A.B. Structure Of The SARS-Cov Nsp12 Polymerase Bound To Nsp7 And Nsp8 Co-Factors. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2342, Doi:10.1038/S41467-019-10280-3.
196. Chen, J.; Malone, B.; Llewellyn, E.; Grasso, M.; Shelton, P.M.M.; Olinares, P.D.B.; Maruthi, K.; Eng, E.T.; Vatandaslar, H.; Chait, B.T.; Et Al. Structural Basis For Helicase-Polymerase Coupling In The SARS-Cov-2 Replication-Transcription Complex. *Cell* **2020**, *182*, 1560-1573.E13, Doi:10.1016/J.Cell.2020.07.033.
197. Gribble, J.; Stevens, L.J.; Agostini, M.L.; Anderson-Daniels, J.; Chappell, J.D.; Lu, X.; Pruijssers, A.J.; Routh, A.L.; Denison, M.R. The Coronavirus Proofreading Exoribonuclease Mediates Extensive Viral Recombination. *PLOS Pathogens* **2021**, *17*, E1009226, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1009226.
198. Mateos-Gomez, P.A.; Morales, L.; Zuñiga, S.; Enjuanes, L.; Sola, I. Long-Distance RNA-RNA Interactions In The Coronavirus Genome Form High-Order Structures Promoting Discontinuous RNA Synthesis During Transcription. *J Virol* **2013**, *87*, 177–186, Doi:10.1128/JVI.01782-12.
199. Nakagawa, K.; Lokugamage, K.G.; Makino, S. Viral And Cellular MRNA Translation In Coronavirus-Infected Cells. *Adv Virus Res* **2016**, *96*, 165–192, Doi:10.1016/Bs.Aivir.2016.08.001.
200. Hohdatsu, T.; Okada, S.; Ishizuka, Y.; Yamada, H.; Koyama, H. The Prevalence Of Types I And II Feline Coronavirus Infections In Cats. *J Vet Med Sci* **1992**, *54*, 557–562, Doi:10.1292/Jvms.54.557.
201. Kummrow, M.; Meli, M.L.; Haessig, M.; Goenczi, E.; Poland, A.; Pedersen, N.C.; Hofmann-Lehmann, R.; Lutz, H. Feline Coronavirus Serotypes 1 And 2: Seroprevalence And Association With Disease In Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol* **2005**, *12*, 1209–1215, Doi:10.1128/CDLI.12.10.1209-1215.2005.
202. Kipar, A.; Kremendahl, J.; Addie, D.D.; Leukert, W.; Grant, C.K.; Reinacher, M. Fatal Enteritis Associated With Coronavirus Infection In Cats. *J Comp Pathol* **1998**, *119*, 1–14, Doi:10.1016/S0021-9975(98)80067-4.
203. Pedersen, N.C.; Boyle, J.F.; Floyd, K.; Fudge, A.; Barker, J. An Enteric Coronavirus Infection Of Cats And Its Relationship To Feline Infectious Peritonitis. *Am J Vet Res* **1981**, *42*, 368–377.
204. Chang, H.-W.; Egberink, H.F.; Halpin, R.; Spiro, D.J.; Rottier, P.J.M. Spike Protein Fusion Peptide And Feline Coronavirus Virulence. *Emerg Infect Dis* **2012**, *18*, 1089–1095, Doi:10.3201/Eid1807.120143.
205. Bálint, Á.; Farsang, A.; Zádori, Z.; Hornyák, Á.; Dencso, L.; Almazán, F.; Enjuanes, L.; Belák, S. Molecular Characterization Of Feline Infectious Peritonitis Virus Strain DF-2 And Studies Of The Role Of ORF3abc In Viral Cell Tropism. *J Virol* **2012**, *86*, 6258–6267, Doi:10.1128/JVI.00189-12.

206. Dedeurwaerder, A.; Desmarests, L.M.; Olyslaegers, D.A.J.; Vermeulen, B.L.; Dewerchin, H.L.; Nauwynck, H.J. The Role Of Accessory Proteins In The Replication Of Feline Infectious Peritonitis Virus In Peripheral Blood Monocytes. *Vet Microbiol* **2013**, *162*, 447–455, Doi:10.1016/J.Vetmic.2012.10.032.
207. Regan, A.D.; Cohen, R.D.; Whittaker, G.R. Activation Of P38 MAPK By Feline Infectious Peritonitis Virus Regulates Pro-Inflammatory Cytokine Production In Primary Blood-Derived Feline Mononuclear Cells. *Virology* **2009**, *384*, 135–143, Doi:10.1016/J.Virol.2008.11.006.
208. Takano, T.; Azuma, N.; Hashida, Y.; Satoh, R.; Hohdatsu, T. B-Cell Activation In Cats With Feline Infectious Peritonitis (FIP) By FIP-Virus-Induced B-Cell Differentiation/Survival Factors. *Arch Virol* **2009**, *154*, 27–35, Doi:10.1007/S00705-008-0265-9.
209. Guidez, L. Diagnostic De La Péritonite Infectieuse Féline : Étude Rétrospective Sur 40 Cas À L'école Nationale Vétérinaire D'alfort Entre Octobre 2008 Et Mai 2014 À Partir De Données Cliniques, Paracliniques Et Virologiques 2014.
210. Crawford, A.H.; Stoll, A.L.; Sanchez - Masian, D.; Shea, A.; Michaels, J.; Fraser, A.R.; Beltran, E. Clinicopathologic Features And Magnetic Resonance Imaging Findings In 24 Cats With Histopathologically Confirmed Neurologic Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Intern Med* **2017**, *31*, 1477–1486, Doi:10.1111/Jvim.14791.
211. Addie, D.D.; Schaap, I. A. T.; Nicolson, L.; Jarrett, O. Persistence And Transmission Of Natural Type I Feline Coronavirus Infection. *J Gen Virol* **2003**, *84*, 2735–2744, Doi:10.1099/Vir.0.19129-0.
212. Li, C.; Liu, Q.; Kong, F.; Guo, D.; Zhai, J.; Su, M.; Sun, D. Circulation And Genetic Diversity Of Feline Coronavirus Type I And II From Clinically Healthy And FIP-Suspected Cats In China. *Transbound Emerg Dis* **2019**, *66*, 763–775, Doi:10.1111/Tbed.13081.
213. Benetka, V.; Kübber-Heiss, A.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Hofmann-Parisot, M.; Möstl, K. Prevalence Of Feline Coronavirus Types I And II In Cats With Histopathologically Verified Feline Infectious Peritonitis. *Vet Microbiol* **2004**, *99*, 31–42, Doi:10.1016/J.Vetmic.2003.07.010.
214. Barlough, J.E.; Stoddart, C.A.; Sorresso, G.P.; Jacobson, R.H.; Scott, F.W. Experimental Inoculation Of Cats With Canine Coronavirus And Subsequent Challenge With Feline Infectious Peritonitis Virus. *Lab Anim Sci* **1984**, *34*, 592–597.
215. Stoddart, C.A.; Barlough, J.E.; Baldwin, C.A.; Scott, F.W. Attempted Immunisation Of Cats Against Feline Infectious Peritonitis Using Canine Coronavirus. *Res Vet Sci* **1988**, *45*, 383–388.
216. Woods, R.D.; Pedersen, N.C. Cross-Protection Studies Between Feline Infectious Peritonitis And Porcine Transmissible Gastroenteritis Viruses. *Veterinary Microbiology* **1979**, *4*, 11–16, Doi:10.1016/0378-1135(79)90025-7.
217. Barlough, J.E.; Johnson-Lussenburg, C.M.; Stoddart, C.A.; Jacobson, R.H.; Scott, F.W. Experimental Inoculation Of Cats With Human Coronavirus 229E And

- Subsequent Challenge With Feline Infectious Peritonitis Virus. *Can J Comp Med* **1985**, *49*, 303–307.
218. Pedersen, N.C.; Evermann, J.F.; Mckeirnan, A.J.; Ott, R.L. Pathogenicity Studies Of Feline Coronavirus Isolates 79-1146 And 79-1683. *Am J Vet Res* **1984**, *45*, 2580–2585.
  219. Weiss, R.C.; Scott, F.W. Antibody-Mediated Enhancement Of Disease In Feline Infectious Peritonitis: Comparisons With Dengue Hemorrhagic Fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **1981**, *4*, 175–189, Doi:10.1016/0147-9571(81)90003-5.
  220. Hebben, M.; Duquesne, V.; Cronier, J.; Rossi, B.; Aubert, A. Modified Vaccinia Virus Ankara As A Vaccine Against Feline Coronavirus: Immunogenicity And Efficacy. *J Feline Med Surg* **2004**, *6*, 111–118, Doi:10.1016/J.Jfms.2003.12.011.
  221. Hohdatsu, T.; Yamato, H.; Ohkawa, T.; Kaneko, M.; Motokawa, K.; Kusuhara, H.; Kaneshima, T.; Arai, S.; Koyama, H. Vaccine Efficacy Of A Cell Lysate With Recombinant Baculovirus-Expressed Feline Infectious Peritonitis (FIP) Virus Nucleocapsid Protein Against Progression Of FIP. *Vet Microbiol* **2003**, *97*, 31–44, Doi:10.1016/J.Vetmic.2003.09.016.
  222. Glansbeek, H.L.; Haagmans, B.L.; Te Lintelo, E.G.; Egberink, H.F.; Duquesne, V.; Aubert, A.; Horzinek, M.C.; Rottier, P.J.M. Adverse Effects Of Feline IL-12 During DNA Vaccination Against Feline Infectious Peritonitis Virus. *J Gen Virol* **2002**, *83*, 1–10, Doi:10.1099/0022-1317-83-1-1.
  223. Le Poder, S. Péritonite Infectieuse Féline. *EMC - Vétérinaire* **2005**, *2*, 169–178, Doi:10.1016/J.Emcvet.2005.10.001.
  224. Mochizuki, M.; Nakatani, H.; Yoshida, M. Inhibitory Effects Of Recombinant Feline Interferon On The Replication Of Feline Enteropathogenic Viruses In Vitro. *Vet Microbiol* **1994**, *39*, 145–152, Doi:10.1016/0378-1135(94)90095-7.
  225. Addie, D.; Belák, S.; Boucraut-Baralon, C.; Egberink, H.; Frymus, T.; Gruffydd-Jones, T.; Hartmann, K.; Hosie, M.J.; Lloret, A.; Lutz, H.; Et Al. Feline Infectious Peritonitis. ABCD Guidelines On Prevention And Management. *J Feline Med Surg* **2009**, *11*, 594–604, Doi:10.1016/J.Jfms.2009.05.008.
  226. Weiss, R.C.; Toivio-Kinnucan, M. Inhibition Of Feline Infectious Peritonitis Virus Replication By Recombinant Human Leukocyte (Alpha) Interferon And Feline Fibroblastic (Beta) Interferon. *Am J Vet Res* **1988**, *49*, 1329–1335.
  227. Weiss, R.C.; Cox, N.R.; Oostrom-Ram, T. Effect Of Interferon Or Propionibacterium Acnes On The Course Of Experimentally Induced Feline Infectious Peritonitis In Specific-Pathogen-Free And Random-Source Cats. *Am J Vet Res* **1990**, *51*, 726–733.
  228. Legendre, A.M.; Kuritz, T.; Galyon, G.; Baylor, V.M.; Heidel, R.E. Polypropenyl Immunostimulant Treatment Of Cats With Presumptive Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis In A Field Study. *Front Vet Sci* **2017**, *4*, 7, Doi:10.3389/Fvets.2017.00007.
  229. Doki, T.; Takano, T.; Koyama, Y.; Hohdatsu, T. Identification Of The Peptide Derived From S1 Domain That Inhibits Type I And Type II Feline Infectious

- Peritonitis Virus Infection. *Virus Res* **2015**, *204*, 13–20, Doi:10.1016/J.Virusres.2015.04.011.
230. Liu, I.-J.; Tsai, W.-T.; Hsieh, L.-E.; Chueh, L.-L. Peptides Corresponding To The Predicted Heptad Repeat 2 Domain Of The Feline Coronavirus Spike Protein Are Potent Inhibitors Of Viral Infection. *PLOS ONE* **2013**, *8*, E82081, Doi:10.1371/Journal.Pone.0082081.
  231. Chen, H.-W.; Cheng, J.X.; Liu, M.-T.; King, K.; Peng, J.-Y.; Zhang, X.-Q.; Wang, C.-H.; Shrestha, S.; Schooley, R.T.; Liu, Y.-T. Inhibitory And Combinatorial Effect Of Diphyllin, A V-Atpase Blocker, On Influenza Viruses. *Antiviral Res* **2013**, *99*, 371–382, Doi:10.1016/J.Antiviral.2013.06.014.
  232. Hu, C.-M.J.; Chang, W.-S.; Fang, Z.-S.; Chen, Y.-T.; Wang, W.-L.; Tsai, H.-H.; Chueh, L.-L.; Takano, T.; Hohdatsu, T.; Chen, H.-W. Nanoparticulate Vacuolar Atpase Blocker Exhibits Potent Host-Targeted Antiviral Activity Against Feline Coronavirus. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 13043, Doi:10.1038/S41598-017-13316-0.
  233. Van Der Meer, F.J.U.M.; De Haan, C.A.M.; Schuurman, N.M.P.; Haijema, B.J.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Delputte, P.L.; Balzarini, J.; Egberink, H.F. Antiviral Activity Of Carbohydrate-Binding Agents Against Nidovirales In Cell Culture. *Antiviral Res* **2007**, *76*, 21–29, Doi:10.1016/J.Antiviral.2007.04.003.
  234. Kono, M.; Tatsumi, K.; Imai, A.M.; Saito, K.; Kuriyama, T.; Shirasawa, H. Inhibition Of Human Coronavirus 229E Infection In Human Epithelial Lung Cells (L132) By Chloroquine: Involvement Of P38 MAPK And ERK. *Antiviral Res* **2008**, *77*, 150–152, Doi:10.1016/J.Antiviral.2007.10.011.
  235. Murray, S.M.; Down, C.M.; Boulware, D.R.; Stauffer, W.M.; Cavert, W.P.; Schacker, T.W.; Brenchley, J.M.; Douek, D.C. Reduction Of Immune Activation With Chloroquine Therapy During Chronic HIV Infection. *J Virol* **2010**, *84*, 12082–12086, Doi:10.1128/JVI.01466-10.
  236. Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects Of Chloroquine On Viral Infections: An Old Drug Against Today's Diseases? *Lancet Infect Dis* **2003**, *3*, 722–727, Doi:10.1016/S1473-3099(03)00806-5.
  237. Vincent, M.J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B.R.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Seidah, N.G.; Nichol, S.T. Chloroquine Is A Potent Inhibitor Of SARS Coronavirus Infection And Spread. *Virol J* **2005**, *2*, 69, Doi:10.1186/1743-422X-2-69.
  238. Liu, J.; Cao, R.; Xu, M.; Wang, X.; Zhang, H.; Hu, H.; Li, Y.; Hu, Z.; Zhong, W.; Wang, M. Hydroxychloroquine, A Less Toxic Derivative Of Chloroquine, Is Effective In Inhibiting SARS-Cov-2 Infection In Vitro. *Cell Discov* **2020**, *6*, 16, Doi:10.1038/S41421-020-0156-0.
  239. Mcdonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. Identification And Characterisation Of Small Molecule Inhibitors Of Feline Coronavirus Replication. *Veterinary Microbiology* **2014**, *174*, 438–447, Doi:10.1016/J.Vetmic.2014.10.030.
  240. Mcchesney, E.W. Animal Toxicity And Pharmacokinetics Of Hydroxychloroquine Sulfate. *Am J Med* **1983**, *75*, 11–18, Doi:10.1016/0002-9343(83)91265-2.

241. Takano, T.; Satoh, K.; Doki, T.; Tanabe, T.; Hohdatsu, T. Antiviral Effects Of Hydroxychloroquine And Type I Interferon On In Vitro Fatal Feline Coronavirus Infection. *Viruses* **2020**, *12*, Doi:10.3390/V12050576.
242. Takano, T.; Katoh, Y.; Doki, T.; Hohdatsu, T. Effect Of Chloroquine On Feline Infectious Peritonitis Virus Infection In Vitro And In Vivo. *Antiviral Res* **2013**, *99*, 100–107, Doi:10.1016/J.Antiviral.2013.04.016.
243. Murphy, B.G.; Perron, M.; Murakami, E.; Bauer, K.; Park, Y.; Eckstrand, C.; Liepnieks, M.; Pedersen, N.C. The Nucleoside Analog GS-441524 Strongly Inhibits Feline Infectious Peritonitis (FIP) Virus In Tissue Culture And Experimental Cat Infection Studies. *Veterinary Microbiology* **2018**, *219*, 226–233, Doi:10.1016/J.Vetmic.2018.04.026.
244. Pedersen, N.C.; Perron, M.; Bannasch, M.; Montgomery, E.; Murakami, E.; Liepnieks, M.; Liu, H. Efficacy And Safety Of The Nucleoside Analog GS-441524 For Treatment Of Cats With Naturally Occurring Feline Infectious Peritonitis. *J Feline Med Surg* **2019**, *21*, 271–281, Doi:10.1177/1098612X19825701.
245. Dickinson, P.J.; Bannasch, M.; Thomasy, S.M.; Murthy, V.D.; Vernau, K.M.; Liepnieks, M.; Montgomery, E.; Knickelbein, K.E.; Murphy, B.; Pedersen, N.C. Antiviral Treatment Using The Adenosine Nucleoside Analogue GS-441524 In Cats With Clinically Diagnosed Neurological Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Intern Med* **2020**, *34*, 1587–1593, Doi:10.1111/Jvim.15780.
246. Yin, Y.; Li, T.; Wang, C.; Liu, X.; Ouyang, H.; Ji, W.; Liu, J.; Liao, X.; Li, J.; Hu, C. A Retrospective Study Of Clinical And Laboratory Features And Treatment On Cats Highly Suspected Of Feline Infectious Peritonitis In Wuhan, China. *Sci Rep* **2021**, *11*, 5208, Doi:10.1038/S41598-021-84754-0.
247. Addie, D.D.; Curran, S.; Bellini, F.; Crowe, B.; Sheehan, E.; Ukrainchuk, L.; Decaro, N. Oral Mutian®X Stopped Faecal Feline Coronavirus Shedding By Naturally Infected Cats. *Res Vet Sci* **2020**, *130*, 222–229, Doi:10.1016/J.Rvsc.2020.02.012.
248. Addie, D.D.; Covell-Ritchie, J.; Jarrett, O.; Fosbery, M. Rapid Resolution Of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis With An Oral Adenosine Nucleoside Analogue And Feline Interferon Omega. *Viruses* **2020**, *12*, 1216, Doi:10.3390/V12111216.
249. Weiss, R.C.; Ostrom-Ram, T. Inhibitory Effects Of Ribavirin Alone Or Combined With Human Alpha Interferon On Feline Infectious Peritonitis Virus Replication In Vitro. *Vet Microbiol* **1989**, *20*, 255–265, Doi:10.1016/0378-1135(89)90049-7.
250. Weiss, R.C.; Cox, N.R.; Martinez, M.L. Evaluation Of Free Or Liposome-Encapsulated Ribavirin For Antiviral Therapy Of Experimentally Induced Feline Infectious Peritonitis. *Res Vet Sci* **1993**, *55*, 162–172, Doi:10.1016/0034-5288(93)90076-R.
251. Merigan, T.C. Systemic Antivirals For Therapy Of Herpesvirus Diseases. *Dev Biol Stand* **1982**, *52*, 527–533.

252. Barlough, J.E.; Scott, F.W. Effectiveness Of Three Antiviral Agents Against FIP Virus In Vitro. *Veterinary Record* **1990**, *126*, 556–558.
253. Barlough, J.E.; Shacklett, B.L. Antiviral Studies Of Feline Infectious Peritonitis Virus In Vitro. *Vet Rec* **1994**, *135*, 177–179, Doi:10.1136/Vr.135.8.177.
254. Qureshi, A.; Tantray, V.G.; Kirmani, A.R.; Ahangar, A.G. A Review On Current Status Of Antiviral Sirna. *Rev Med Virol* **2018**, *28*, Doi:10.1002/Rmv.1976.
255. Mcdonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. Combination Sirna Therapy Against Feline Coronavirus Can Delay The Emergence Of Antiviral Resistance In Vitro. *Veterinary Microbiology* **2015**, *176*, 10–18, Doi:10.1016/J.Vetmic.2014.12.009.
256. Mcdonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. In Vitro Inhibition Of Feline Coronavirus Replication By Small Interfering Rnas. *Veterinary Microbiology* **2011**, *150*, 220–229, Doi:10.1016/J.Vetmic.2011.01.023.
257. Knauert, M.P.; Glazer, P.M. Triplex Forming Oligonucleotides: Sequence-Specific Tools For Gene Targeting. *Human Molecular Genetics* **2001**, *10*, 2243–2251, Doi:10.1093/Hmg/10.20.2243.
258. Choong, O.K.; Mehrbod, P.; Tejo, B.A.; Omar, A.R. In Vitro Antiviral Activity Of Circular Triple Helix Forming Oligonucleotide RNA Towards Feline Infectious Peritonitis Virus Replication. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, Doi:10.1155/2014/654712.
259. Kim, Y.; Shivanna, V.; Narayanan, S.; Prior, A.M.; Weerasekara, S.; Hua, D.H.; Kankanamalage, A.C.G.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Broad-Spectrum Inhibitors Against 3C-Like Proteases Of Feline Coronaviruses And Feline Caliciviruses. *Journal Of Virology* **2015**, *89*, 4942–4950, Doi:10.1128/JVI.03688-14.
260. Kim, Y.; Mandadapu, S.R.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Potent Inhibition Of Feline Coronaviruses With Peptidyl Compounds Targeting Coronavirus 3C-Like Protease. *Antiviral Research* **2013**, *97*, 161–168, Doi:10.1016/J.Antiviral.2012.11.005.
261. Kim, Y.; Lovell, S.; Tiew, K.-C.; Mandadapu, S.R.; Alliston, K.R.; Battaile, K.P.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Broad-Spectrum Antivirals Against 3C Or 3C-Like Proteases Of Picornaviruses, Noroviruses, And Coronaviruses. *Journal Of Virology* **2012**, *86*, 11754–11762, Doi:10.1128/JVI.01348-12.
262. Kim, Y.; Liu, H.; Kankanamalage, A.C.G.; Weerasekara, S.; Hua, D.H.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O.; Pedersen, N.C. Reversal Of The Progression Of Fatal Coronavirus Infection In Cats By A Broad-Spectrum Coronavirus Protease Inhibitor. *PLOS Pathogens* **2016**, *12*, E1005531, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1005531.
263. Pedersen, N.C.; Kim, Y.; Liu, H.; Galasiti Kankanamalage, A.C.; Eckstrand, C.; Groutas, W.C.; Bannasch, M.; Meadows, J.M.; Chang, K.-O. Efficacy Of A 3C-Like Protease Inhibitor In Treating Various Forms Of Acquired Feline Infectious Peritonitis. *J Feline Med Surg* **2018**, *20*, 378–392, Doi:10.1177/1098612X17729626.
264. Perera, K.D.; Rathnayake, A.D.; Liu, H.; Pedersen, N.C.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O.; Kim, Y. Characterization Of Amino Acid Substitutions In Feline Coronavirus 3C-Like Protease From A Cat With Feline Infectious Peritonitis Treated With A Protease Inhibitor. *Vet Microbiol* **2019**, *237*, 108398, Doi:10.1016/J.Vetmic.2019.108398.

265. Yamamoto, N.; Yang, R.; Yoshinaka, Y.; Amari, S.; Nakano, T.; Cinatl, J.; Rabenau, H.; Doerr, H.W.; Hunsmann, G.; Otaka, A.; Et Al. HIV Protease Inhibitor Nelfinavir Inhibits Replication Of SARS-Associated Coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *318*, 719–725, Doi:10.1016/J.Bbrc.2004.04.083.
266. Hsieh, L.-E.; Lin, C.-N.; Su, B.-L.; Jan, T.-R.; Chen, C.-M.; Wang, C.-H.; Lin, D.-S.; Lin, C.-T.; Chueh, L.-L. Synergistic Antiviral Effect Of Galanthus Nivalis Agglutinin And Nelfinavir Against Feline Coronavirus. *Antiviral Research* **2010**, *88*, 25–30, Doi:10.1016/J.Antiviral.2010.06.010.
267. Takano, T.; Endoh, M.; Fukatsu, H.; Sakurada, H.; Doki, T.; Hohdatsu, T. The Cholesterol Transport Inhibitor U18666A Inhibits Type I Feline Coronavirus Infection. *Antiviral Res* **2017**, *145*, 96–102, Doi:10.1016/J.Antiviral.2017.07.022.
268. Doki, T.; Tarusawa, T.; Hohdatsu, T.; Takano, T. In Vivo Antiviral Effects Of U18666A Against Type I Feline Infectious Peritonitis Virus. *Pathogens* **2020**, *9*, Doi:10.3390/Pathogens9010067.
269. Van Damme, E.; De Meyer, S.; Bojkova, D.; Ciesek, S.; Cinatl, J.; De Jonghe, S.; Jochmans, D.; Leyssen, P.; Buyck, C.; Neyts, J.; Et Al. In Vitro Activity Of Itraconazole Against SARS-Cov-2. *J Med Virol* **2021**, *93*, 4454–4460, Doi:10.1002/Jmv.26917.
270. Takano, T.; Akiyama, M.; Doki, T.; Hohdatsu, T. Antiviral Activity Of Itraconazole Against Type I Feline Coronavirus Infection. *Vet Res* **2019**, *50*, Doi:10.1186/S13567-019-0625-3.
271. Boothe, D.M.; Herring, I.; Calvin, J.; Way, N.; Dvorak, J. Itraconazole Disposition After Single Oral And Intravenous And Multiple Oral Dosing In Healthy Cats. *Am J Vet Res* **1997**, *58*, 872–877.
272. Kameshima, S.; Kimura, Y.; Doki, T.; Takano, T.; Park, C.-H.; Itoh, N. Clinical Efficacy Of Combination Therapy Of Itraconazole And Prednisolone For Treating Effusive Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Med Sci* **2020**, *82*, 1492–1496, Doi:10.1292/Jvms.20-0049.
273. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Osawa, S.; Inoue, M.; Tanaka, S.; Sasaki, T. Suppression Of Feline Coronavirus Replication In Vitro By Cyclosporin A. *Veterinary Research* **2012**, *43*, 41, Doi:10.1186/1297-9716-43-41.
274. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Takahashi, D.; Matsumoto, H.; Sasaki, T. Treatment Of A Case Of Feline Infectious Peritonitis With Cyclosporin A. *Veterinary Record Case Reports* **2015**, *3*, E000134, Doi:10.1136/Vetreccr-2014-000134.
275. Delaplace, M.; Huet, H.; Gambino, A.; Le Poder, S. Feline Coronavirus Antivirals: A Review. *Pathogens* **2021**, *10*, 1150, Doi:10.3390/Pathogens10091150.
276. Hu, C.-M.J.; Chang, W.-S.; Fang, Z.-S.; Chen, Y.-T.; Wang, W.-L.; Tsai, H.-H.; Chueh, L.-L.; Takano, T.; Hohdatsu, T.; Chen, H.-W. Nanoparticulate Vacuolar Atpase Blocker Exhibits Potent Host-Targeted Antiviral Activity Against Feline Coronavirus. *Sci Rep* **2017**, *7*, Doi:10.1038/S41598-017-13316-0.
277. Van Der Meer, F.J.U.M.; De Haan, C. A. M.; Schuurman, N.M.P.; Haijema, B.J.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Delputte, P.L.; Balzarini, J.; Egberink, H.F.

- Antiviral Activity Of Carbohydrate-Binding Agents Against Nidovirales In Cell Culture. *Antiviral Res* **2007**, *76*, 21–29, Doi:10.1016/J.Antiviral.2007.04.003.
278. Yang, C.-W.; Peng, T.-T.; Hsu, H.-Y.; Lee, Y.-Z.; Wu, S.-H.; Lin, W.-H.; Ke, Y.-Y.; Hsu, T.-A.; Yeh, T.-K.; Huang, W.-Z.; Et Al. Repurposing Old Drugs As Antiviral Agents For Coronaviruses. *Biomed J* **2020**, *43*, 368–374, Doi:10.1016/J.Bj.2020.05.003.
279. Barlough, J.E.; Scott, F.W. Effectiveness Of Three Antiviral Agents Against FIP Virus In Vitro. *Vet Rec* **1990**, *126*, 556–558.
280. Ke, Y.-Y.; Peng, T.-T.; Yeh, T.-K.; Huang, W.-Z.; Chang, S.-E.; Wu, S.-H.; Hung, H.-C.; Hsu, T.-A.; Lee, S.-J.; Song, J.-S.; Et Al. Artificial Intelligence Approach Fighting COVID-19 With Repurposing Drugs. *Biomed J* **2020**, *43*, 355–362, Doi:10.1016/J.Bj.2020.05.001.
281. Doki, T.; Toda, M.; Hasegawa, N.; Hohdatsu, T.; Takano, T. Therapeutic Effect Of An Anti-Human-TNF-Alpha Antibody And Itraconazole On Feline Infectious Peritonitis. *Arch Virol* **2020**, 1–10, Doi:10.1007/S00705-020-04605-7.
282. González-Grande, R.; Jiménez-Pérez, M.; González Arjona, C.; Mostazo Torres, J. New Approaches In The Treatment Of Hepatitis C. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 1421–1432, Doi:10.3748/Wjg.V22.I4.1421.
283. Heo, Y.-A.; Deeks, E.D. Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir: A Review In Chronic Hepatitis C. *Drugs* **2018**, *78*, 577–587, Doi:10.1007/S40265-018-0895-5.
284. Perelson, A.S.; Essunger, P.; Cao, Y.; Vesanen, M.; Hurley, A.; Saksela, K.; Markowitz, M.; Ho, D.D. Decay Characteristics Of HIV-1-Infected Compartments During Combination Therapy. *Nature* **1997**, *387*, 188–191, Doi:10.1038/387188a0.
285. Cook, S.E.; Vogel, H.; Castillo, D.; Olsen, M.; Pedersen, N.; Murphy, B.G. A Rational Approach To Identifying Effective Combined Anticoronaviral Therapies Against Feline Coronavirus. *Biorxiv* **2020**, 2020.07.09.195016, Doi:10.1101/2020.07.09.195016.
286. Wang, P.; Heitman, J. The Cyclophilins. *Genome Biol* **2005**, *6*, 226, Doi:10.1186/Gb-2005-6-7-226.
287. Ahmed-Belkacem, A.; Colliandre, L.; Ahnou, N.; Nevers, Q.; Gelin, M.; Bessin, Y.; Brillet, R.; Cala, O.; Douguet, D.; Bourguet, W.; Et Al. Fragment-Based Discovery Of A New Family Of Non-Peptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors With Potent Antiviral Activities. *Nature Communications* **2016**, *7*, 12777.
288. Thai, V.; Renesto, P.; Fowler, C.A.; Brown, D.J.; Davis, T.; Gu, W.; Pollock, D.D.; Kern, D.; Raoult, D.; Eisenmesser, E.Z. Structural, Biochemical, And In Vivo Characterization Of The First Virally Encoded Cyclophilin From The Mimivirus. *J Mol Biol* **2008**, *378*, 71–86, Doi:10.1016/J.Jmb.2007.08.051.
289. Xue, C.; Sowden, M.P.; Berk, B.C. Extracellular And Intracellular Cyclophilin A, Native And Post-Translationally Modified, Show Diverse And Specific Pathological Roles In Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2018**, *38*, 986–993, Doi:10.1161/ATVBAHA.117.310661.
290. Satoh, K.; Shimokawa, H.; Berk, B.C. Cyclophilin A. *Circ J* **2010**, *74*, 2249–2256.

291. Jin, Z.-G.; Melaragno, M.G.; Liao, D.-F.; Yan, C.; Haendeler, J.; Suh, Y.-A.; Lambeth, J.D.; Berk, B.C. Cyclophilin A Is A Secreted Growth Factor Induced By Oxidative Stress. *Circulation Research* **2000**, *87*, 789–796, Doi:10.1161/01.RES.87.9.789.
292. Sherry, B.; Yarlett, N.; Strupp, A.; Cerami, A. Identification Of Cyclophilin As A Proinflammatory Secretory Product Of Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 3511–3515, Doi:10.1073/Pnas.89.8.3511.
293. Terajima, M.; Taga, Y.; Cabral, W.A.; Nagasawa, M.; Sumida, N.; Hattori, S.; Marini, J.C.; Yamauchi, M. Cyclophilin B Deficiency Causes Abnormal Dentin Collagen Matrix. *J Proteome Res* **2017**, *16*, 2914–2923, Doi:10.1021/Acs.Jproteome.7b00190.
294. Price, E.R.; Jin, M.; Lim, D.; Pati, S.; Walsh, C.T.; Mckeon, F.D. Cyclophilin B Trafficking Through The Secretory Pathway Is Altered By Binding Of Cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 3931–3935, Doi:10.1073/Pnas.91.9.3931.
295. Ure, D.R.; Trepanier, D.J.; Mayo, P.R.; Foster, R.T. Cyclophilin Inhibition As A Potential Treatment For Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Expert Opinion On Investigational Drugs* **2020**, *29*, 163–178, Doi:10.1080/13543784.2020.1703948.
296. Dawar, F.U.; Xiong, Y.; Khattak, M.N.K.; Li, J.; Lin, L.; Mei, J. Potential Role Of Cyclophilin A In Regulating Cytokine Secretion. *J Leukoc Biol* **2017**, *102*, 989–992, Doi:10.1189/Jlb.3RU0317-090RR.
297. Yuan, W.; Ge, H.; He, B. Pro-Inflammatory Activities Induced By Cypa-EMMPRIN Interaction In Monocytes. *Atherosclerosis* **2010**, *213*, 415–421, Doi:10.1016/J.Atherosclerosis.2010.09.033.
298. Porter, G.A.; Beutner, G. Cyclophilin D, Somehow A Master Regulator Of Mitochondrial Function. *Biomolecules* **2018**, *8*, 176, Doi:10.3390/Biom8040176.
299. Mesa, A.; Somarelli, J.A.; Herrera, R.J. Spliceosomal Immunophilins. *FEBS Lett* **2008**, *582*, 2345–2351, Doi:10.1016/J.Febslet.2008.06.006.
300. Obchoei, S.; Wongkhan, S.; Wongkham, C.; Li, M.; Yao, Q.; Chen, C. Cyclophilin A: Potential Functions And Therapeutic Target For Human Cancer. *Med Sci Monit* **2009**, *15*, RA221-232.
301. Meng, Y.; Fan, X.-Y.; Yang, L.-J.; Xu, B.-Q.; He, D.; Xu, Z.; Wu, D.; Wang, B.; Cui, H.-Y.; Wang, S.-J.; Et Al. Detachment Activated Cypa/CD147 Induces Cancer Stem Cell Potential In Non-Stem Breast Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 543856, Doi:10.3389/Fcell.2020.543856.
302. Qi, Z.-Y.; Wang, F.; Yue, Y.-Y.; Guo, X.-W.; Guo, R.-M.; Li, H.-L.; Xu, Y.-Y. CYP A Promotes The Progression And Metastasis Of Serous Ovarian Cancer (SOC) In Vitro And In Vivo. *J Ovarian Res* **2019**, *12*, 118, Doi:10.1186/S13048-019-0593-2.
303. Guo, Y.; Jiang, M.; Zhao, X.; Gu, M.; Wang, Z.; Xu, S.; Yue, W. Cyclophilin A Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis Via P38 MAPK. *Thorac Cancer* **2018**, *9*, 120–128, Doi:10.1111/1759-7714.12548.

304. Guo, F.; Zhang, Y.; Zhao, C.-N.; Li, L.; Guo, Y.-J. Effects Of Gene Silencing Of Cypb On Gastric Cancer Cells. *Asian Pac J Trop Med* **2015**, *8*, 319–324, Doi:10.1016/S1995-7645(14)60338-2.
305. Liu, J.; Zuo, Y.; Qu, G.-M.; Song, X.; Liu, Z.-H.; Zhang, T.-G.; Zheng, Z.-H.; Wang, H.-K. Cypb Promotes Cell Proliferation And Metastasis In Endometrial Carcinoma. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 747, Doi:10.1186/S12885-021-08374-7.
306. Naoumov, N.V. Cyclophilin Inhibition As Potential Therapy For Liver Diseases. *Journal Of Hepatology* **2014**, *61*, 1166–1174, Doi:10.1016/J.jhep.2014.07.008.
307. Akhlaghi, F.; Trull, A.K. Distribution Of Cyclosporin In Organ Transplant Recipients. *Clin Pharmacokinet* **2002**, *41*, 615–637, Doi:10.2165/00003088-200241090-00001.
308. Gallardo-Flores, C.E.; Colpitts, C.C. Cyclophilins And Their Roles In Hepatitis C Virus And Flavivirus Infections: Perspectives For Novel Antiviral Approaches. *Pathogens* **2021**, *10*, 902, Doi:10.3390/Pathogens10070902.
309. Zeuzem, S.; Flisiak, R.; Vierling, J.M.; Mazur, W.; Mazzella, G.; Thongsawat, S.; Abdurakhmanov, D.; Van Kinh, N.; Calistru, P.; Heo, J.; Et Al. Randomised Clinical Trial: Alisporivir Combined With Peginterferon And Ribavirin In Treatment-Naïve Patients With Chronic HCV Genotype 1 Infection (ESSENTIAL II). *Aliment Pharmacol Ther* **2015**, *42*, 829–844, Doi:10.1111/Apt.13342.
310. Converse, P.J.; Hess, A.D.; Tutschka, P.J.; Santos, G.W. Effect Of Cyclosporine On The Response Of Normal Human Lymphocytes To Cytomegalovirus In Vitro. *Infect Immun* **1983**, *41*, 1226–1233, Doi:10.1128/Iai.41.3.1226-1233.1983.
311. Luban, J.; Bossolt, K.L.; Franke, E.K.; Kalpana, G.V.; Goff, S.P. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Binds To Cyclophilins A And B. *Cell* **1993**, *73*, 1067–1078, Doi:10.1016/0092-8674(93)90637-6.
312. Chen, M.-M.; Jiang, M.; Shang, J.; Lan, X.; Yang, F.; Huang, J.; Nuss, D.L.; Chen, B. CYP1, A Hypovirus-Regulated Cyclophilin, Is Required For Virulence In The Chestnut Blight Fungus. *Mol Plant Pathol* **2011**, *12*, 239–246, Doi:10.1111/J.1364-3703.2010.00665.X.
313. Chertova, E.; Chertov, O.; Coren, L.V.; Roser, J.D.; Trubey, C.M.; Bess, J.W.; Sowder, R.C.; Barsov, E.; Hood, B.L.; Fisher, R.J.; Et Al. Proteomic And Biochemical Analysis Of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produced From Infected Monocyte-Derived Macrophages. *J Virol* **2006**, *80*, 9039–9052, Doi:10.1128/JVI.01013-06.
314. Ni, T.; Gerard, S.; Zhao, G.; Dent, K.; Ning, J.; Zhou, J.; Shi, J.; Anderson-Daniels, J.; Li, W.; Jang, S.; Et Al. Intrinsic Curvature Of HIV-1 CA Hexamer Underlies Capsid Topology And Interaction With Cyclophilin A. *Nat Struct Mol Biol* **2020**, *27*, 855–862, Doi:10.1038/S41594-020-0467-8.
315. Kim, K.; Dauphin, A.; Komurlu, S.; Mccauley, S.M.; Yurkovetskiy, L.A.; Carbone, C.; Diehl, W.E.; Strambio-De-Castillia, C.; Campbell, E.M.; Luban, J. Cyclophilin A Protects HIV-1 From Restriction By Human TRIM5 $\alpha$ . *Nat Microbiol* **2019**, *4*, 2044–2051, Doi:10.1038/S41564-019-0592-5.

316. Chopard, C.; Tong, P.B.V.; Tóth, P.; Schatz, M.; Yezid, H.; Debaisieux, S.; Mettling, C.; Gross, A.; Pugnière, M.; Tu, A.; Et Al. Cyclophilin A Enables Specific HIV-1 Tat Palmitoylation And Accumulation In Uninfected Cells. *Nat Commun* **2018**, *9*, 2251, Doi:10.1038/S41467-018-04674-Y.
317. Schaller, T.; Ocwieja, K.E.; Rasaiyaah, J.; Price, A.J.; Brady, T.L.; Roth, S.L.; Hué, S.; Fletcher, A.J.; Lee, K.; Kewalramani, V.N.; Et Al. HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting And Replication Efficiency. *Plos Pathog* **2011**, *7*, E1002439, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1002439.
318. Deboer, J.; Madson, C.J.; Belshan, M. Cyclophilin B Enhances HIV-1 Infection. *Virology* **2016**, *489*, 282–291, Doi:10.1016/J.Virol.2015.12.015.
319. Watashi, K.; Hijikata, M.; Hosaka, M.; Yamaji, M.; Shimotohno, K. Cyclosporin A Suppresses Replication Of Hepatitis C Virus Genome In Cultured Hepatocytes. *Hepatology* **2003**, *38*, 1282–1288, Doi:10.1053/Jhep.2003.50449.
320. Hopkins, S.; Gallay, P. Cyclophilin Inhibitors: An Emerging Class Of Therapeutics For The Treatment Of Chronic Hepatitis C Infection. *Viruses* **2012**, *4*, 2558–2577, Doi:10.3390/V4112558.
321. Fernandes, F.; Poole, D.S.; Hoover, S.; Middleton, R.; Andrei, A.-C.; Gerstner, J.; Striker, R. Sensitivity Of Hepatitis C Virus To Cyclosporine A Depends On Nonstructural Proteins NS5A And NS5B. *Hepatology* **2007**, *46*, 1026–1033, Doi:10.1002/Hep.21809.
322. Heck, J.A.; Meng, X.; Frick, D.N. Cyclophilin B Stimulates RNA Synthesis By The HCV RNA Dependent RNA Polymerase. *Biochem Pharmacol* **2009**, *77*, 1173–1180, Doi:10.1016/J.Bcp.2008.12.019.
323. Dujardin, M.; Madan, V.; Gandhi, N.S.; Cantrelle, F.-X.; Launay, H.; Huvent, I.; Bartenschlager, R.; Lippens, G.; Hanouille, X. Cyclophilin A Allows The Allosteric Regulation Of A Structural Motif In The Disordered Domain 2 Of NS5A And Thereby Fine-Tunes HCV RNA Replication. *J Biol Chem* **2019**, *294*, 13171–13185, Doi:10.1074/Jbc.RA119.009537.
324. Shanmugam, S.; Nichols, A.K.; Saravanabalaji, D.; Welsch, C.; Yi, M. HCV NS5A Dimer Interface Residues Regulate HCV Replication By Controlling Its Self-Interaction, Hyperphosphorylation, Subcellular Localization And Interaction With Cyclophilin A. *Plos Pathog* **2018**, *14*, E1007177, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1007177.
325. Abe, T.; Minami, N.; Bawono, R.G.; Matsui, C.; Deng, L.; Fukuhara, T.; Matsuura, Y.; Shoji, I. Isgylation Of Hepatitis C Virus NS5A Protein Promotes Viral RNA Replication Via Recruitment Of Cyclophilin A. *J Virol* **2020**, *94*, E00532-20, Doi:10.1128/JVI.00532-20.
326. Chatterji, U.; Bobardt, M.; Schaffer, L.; Wood, M.; Gallay, P.A. Cyclophilin Inhibitors Remodel The Endoplasmic Reticulum Of HCV-Infected Cells In A Unique Pattern Rendering Cells Impervious To A Reinfection. *Plos One* **2016**, *11*, Doi:10.1371/Journal.Pone.0159511.

327. Liu, Z.; Yang, F.; Robotham, J.M.; Tang, H. Critical Role Of Cyclophilin A And Its Prolyl-Peptidyl Isomerase Activity In The Structure And Function Of The Hepatitis C Virus Replication Complex. *J Virol* **2009**, *83*, 6554–6565, Doi:10.1128/JVI.02550-08.
328. Ngure, M.; Issur, M.; Shkriabai, N.; Liu, H.-W.; Cosa, G.; Kvaratskhelia, M.; Götte, M. Interactions Of The Disordered Domain II Of Hepatitis C Virus NS5A With Cyclophilin A, NS5B, And Viral RNA Show Extensive Overlap. *ACS Infect Dis* **2016**, *2*, 839–851, Doi:10.1021/Acsinfecdis.6b00143.
329. Colpitts, C.C.; Ridewood, S.; Schneiderman, B.; Warne, J.; Tabata, K.; Ng, C.F.; Bartenschlager, R.; Selwood, D.L.; Towers, G.J. Hepatitis C Virus Exploits Cyclophilin A To Evade PKR. *Elife* **2020**, *9*, E52237, Doi:10.7554/Elife.52237.
330. Qing, M.; Yang, F.; Zhang, B.; Zou, G.; Robida, J.M.; Yuan, Z.; Tang, H.; Shi, P.-Y. Cyclosporine Inhibits Flavivirus Replication Through Blocking The Interaction Between Host Cyclophilins And Viral NS5 Protein. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 3226–3235, Doi:10.1128/AAC.00189-09.
331. Kambara, H.; Tani, H.; Mori, Y.; Abe, T.; Katoh, H.; Fukuhara, T.; Taguwa, S.; Moriishi, K.; Matsuura, Y. Involvement Of Cyclophilin B In The Replication Of Japanese Encephalitis Virus. *Virology* **2011**, *412*, 211–219, Doi:10.1016/J.Virol.2011.01.011.
332. Yang, T.-C.; Li, S.-W.; Lai, C.-C.; Lu, K.-Z.; Chiu, M.-T.; Hsieh, T.-H.; Wan, L.; Lin, C.-W. Proteomic Analysis For Type I Interferon Antagonism Of Japanese Encephalitis Virus NS5 Protein. *Proteomics* **2013**, *13*, 3442–3456, Doi:10.1002/Pmic.201300001.
333. Rosales Ramirez, R.; Ludert, J.E. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Is Secreted From Mosquito Cells In Association With The Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex. *J Virol* **2019**, *93*, E01985-18, Doi:10.1128/JVI.01985-18.
334. Liu, X.; Zhao, Z.; Liu, W. Insights Into The Roles Of Cyclophilin A During Influenza Virus Infection. *Viruses* **2013**, *5*, 182–191, Doi:10.3390/V5010182.
335. Mahesutihan, M.; Zheng, W.; Cui, L.; Li, Y.; Jiao, P.; Yang, W.; Liu, W.; Li, J.; Fan, W.; Yang, L.; Et Al. Cypa Regulates AIP4-Mediated M1 Ubiquitination Of Influenza A Virus. *Virol Sin* **2018**, *33*, 440–448, Doi:10.1007/S12250-018-0058-6.
336. Li, J.; Chen, C.; Wong, G.; Dong, W.; Zheng, W.; Li, Y.; Sun, L.; Zhang, L.; Gao, G.F.; Bi, Y.; Et Al. Cyclophilin A Protects Mice Against Infection By Influenza A Virus. *Sci Rep* **2016**, *6*, 28978, Doi:10.1038/Srep28978.
337. Liu, X.; Zhao, Z.; Li, Z.; Xu, C.; Sun, L.; Chen, J.; Liu, W. Cyclosporin A Inhibits The Influenza Virus Replication Through Cyclophilin A-Dependent And -Independent Pathways. *Plos One* **2012**, *7*, E37277, Doi:10.1371/Journal.Pone.0037277.
338. Hamamoto, I.; Harazaki, K.; Inase, N.; Takaku, H.; Tashiro, M.; Yamamoto, N. Cyclosporin A Inhibits The Propagation Of Influenza Virus By Interfering With A Late Event In The Virus Life Cycle. *Jpn J Infect Dis* **2013**, *66*, 276–283, Doi:10.7883/Yoken.66.276.

339. Kovalev, N.; Nagy, P.D. Cyclophilin A Binds To The Viral RNA And Replication Proteins, Resulting In Inhibition Of Tombusviral Replicase Assembly. *Journal Of Virology* **2013**, *87*, 13330–13342, Doi:10.1128/JVI.02101-13.
340. He, H.; Zhou, D.; Fan, W.; Fu, X.; Zhang, J.; Shen, Z.; Li, J.; Li, J.; Wu, Y. Cyclophilin A Inhibits Rotavirus Replication By Facilitating Host IFN-I Production. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *422*, 664–669, Doi:10.1016/J.Bbrc.2012.05.050.
341. He, H.; Mou, Z.; Li, W.; Fei, L.; Tang, Y.; Zhang, J.; Yan, P.; Chen, Z.; Yang, X.; Shen, Z.; Et Al. Proteomic Methods Reveal Cyclophilin A Function As A Host Restriction Factor Against Rotavirus Infection. *Proteomics* **2013**, *13*, 1121–1132, Doi:10.1002/Pmic.201100579.
342. A Abdullah, A.; Abdullah, R.; A Nazariah, Z.; N Balakrishnan, K.; Firdaus J Abdullah, F.; A Bala, J.; Mohd-Lila, M.-A. Cyclophilin A As A Target In The Treatment Of Cytomegalovirus Infections. *Antivir Chem Chemother* **2018**, *26*, 2040206618811413, Doi:10.1177/2040206618811413.
343. Chen, J.; Xia, S.; Yang, X.; Chen, H.; Li, F.; Liu, F.; Chen, Z. Human Cytomegalovirus Encoded Mir-US25-1-5p Attenuates CD147/EMMPRIN-Mediated Early Antiviral Response. *Viruses* **2017**, *9*, E365, Doi:10.3390/V9120365.
344. Kawasaki, H.; Mocarski, E.S.; Kosugi, I.; Tsutsui, Y. Cyclosporine Inhibits Mouse Cytomegalovirus Infection Via A Cyclophilin-Dependent Pathway Specifically In Neural Stem/Progenitor Cells. *J Virol* **2007**, *81*, 9013–9023, Doi:10.1128/JVI.00261-07.
345. Keyes, L.R.; Bego, M.G.; Soland, M.; St Jeor, S. Cyclophilin A Is Required For Efficient Human Cytomegalovirus DNA Replication And Reactivation. *J Gen Virol* **2012**, *93*, 722–732, Doi:10.1099/Vir.0.037309-0.
346. Milbradt, J.; Webel, R.; Auerochs, S.; Sticht, H.; Marschall, M. Novel Mode Of Phosphorylation-Triggered Reorganization Of The Nuclear Lamina During Nuclear Egress Of Human Cytomegalovirus. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 13979–13989, Doi:10.1074/Jbc.M109.063628.
347. Chapman, D.C.; Stocki, P.; Williams, D.B. Cyclophilin C Participates In The US2-Mediated Degradation Of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Plos One* **2015**, *10*, E0145458, Doi:10.1371/Journal.Pone.0145458.
348. Bose, S.; Mathur, M.; Bates, P.; Joshi, N.; Banerjee, A.K. Requirement For Cyclophilin A For The Replication Of Vesicular Stomatitis Virus New Jersey Serotype. *J Gen Virol* **2003**, *84*, 1687–1699, Doi:10.1099/Vir.0.19074-0.
349. Damaso, C.R.; Moussatché, N. Inhibition Of Vaccinia Virus Replication By Cyclosporin A Analogues Correlates With Their Affinity For Cellular Cyclophilins. *J Gen Virol* **1998**, *79* ( Pt 2), 339–346, Doi:10.1099/0022-1317-79-2-339.
350. Redistribution Of Cyclophilin A To Viral Factories During Vaccinia Virus Infection And Its Incorporation Into Mature Particles - Pubmed Available Online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12885921/> (Accessed On 15 July 2021).

351. Watanabe, A.; Yoneda, M.; Ikeda, F.; Terao-Muto, Y.; Sato, H.; Kai, C. CD147/EMMPRIN Acts As A Functional Entry Receptor For Measles Virus On Epithelial Cells. *J Virol* **2010**, *84*, 4183–4193, Doi:10.1128/JVI.02168-09.
352. Becker, M.; Greune, L.; Schmidt, M.A.; Schelhaas, M. Extracellular Conformational Changes In The Capsid Of Human Papillomaviruses Contribute To Asynchronous Uptake Into Host Cells. *J Virol* **2018**, *92*, E02106-17, Doi:10.1128/JVI.02106-17.
353. Diguseppe, S.; Bienkowska-Haba, M.; Hilbig, L.; Sapp, M. The Nuclear Retention Signal Of HPV16 L2 Protein Is Essential For Incoming Viral Genome To Transverse The Trans-Golgi Network. *Virology* **2014**, *458–459*, 93–105, Doi:10.1016/J.Virol.2014.04.024.
354. Gallay, P.; Ure, D.; Bobardt, M.; Chatterji, U.; Ou, J.; Trepanier, D.; Foster, R. The Cyclophilin Inhibitor CRV431 Inhibits Liver HBV DNA And Hbsag In Transgenic Mice. *Plos One* **2019**, *14*, E0217433, Doi:10.1371/Journal.Pone.0217433.
355. Tian, X.; Zhao, C.; Zhu, H.; She, W.; Zhang, J.; Liu, J.; Li, L.; Zheng, S.; Wen, Y.-M.; Xie, Y. Hepatitis B Virus (HBV) Surface Antigen Interacts With And Promotes Cyclophilin A Secretion: Possible Link To Pathogenesis Of HBV Infection. *J Virol* **2010**, *84*, 3373–3381, Doi:10.1128/JVI.02555-09.
356. Watashi, K.; Sluder, A.; Daito, T.; Matsunaga, S.; Ryo, A.; Nagamori, S.; Iwamoto, M.; Nakajima, S.; Tsukuda, S.; Borroto-Esoda, K.; Et Al. Cyclosporin A And Its Analogs Inhibit Hepatitis B Virus Entry Into Cultured Hepatocytes Through Targeting A Membrane Transporter, Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP). *Hepatology* **2014**, *59*, 1726–1737, Doi:10.1002/Hep.26982.
357. Nkongolo, S.; Ni, Y.; Lempp, F.A.; Kaufman, C.; Lindner, T.; Esser-Nobis, K.; Lohmann, V.; Mier, W.; Mehrle, S.; Urban, S. Cyclosporin A Inhibits Hepatitis B And Hepatitis D Virus Entry By Cyclophilin-Independent Interference With The NTCP Receptor. *J Hepatol* **2014**, *60*, 723–731, Doi:10.1016/J.Jhep.2013.11.022.
358. Zhao, C.; Fang, C.-Y.; Tian, X.-C.; Wang, L.; Yang, P.-Y.; Wen, Y.-M. Proteomic Analysis Of Hepatitis B Surface Antigen Positive Transgenic Mouse Liver And Decrease Of Cyclophilin A. *J Med Virol* **2007**, *79*, 1478–1484, Doi:10.1002/Jmv.20945.
359. Zhao, K.; Li, J.; He, W.; Song, D.; Zhang, X.; Zhang, D.; Zhou, Y.; Gao, F. Cyclophilin B Facilitates The Replication Of Orf Virus. *Virol J* **2017**, *14*, 114, Doi:10.1186/S12985-017-0781-X.
360. Zhou, Y.; Gao, F.; Lv, L.; Wang, S.; He, W.; Lan, Y.; Li, Z.; Lu, H.; Song, D.; Guan, J.; Et Al. Host Factor Cyclophilin B Affects Orf Virus Replication By Interacting With Viral ORF058 Protein. *Vet Microbiol* **2021**, *258*, 109099, Doi:10.1016/J.Vetmic.2021.109099.
361. Barik, S. A Family Of Novel Cyclophilins, Conserved In The Mimivirus Genus Of The Giant DNA Viruses. *Comput Struct Biotechnol J* **2018**, *16*, 231–236, Doi:10.1016/J.Csbj.2018.07.001.
362. Claus, C.; Manssen, L.; Hübner, D.; Roßmark, S.; Bothe, V.; Petzold, A.; Große, C.; Reins, M.; Mankertz, A.; Frey, T.K.; Et Al. Activation Of The Mitochondrial

- Apoptotic Signaling Platform During Rubella Virus Infection. *Viruses* **2015**, *7*, 6108–6126, Doi:10.3390/V7122928.
363. Seizer, P.; Klingel, K.; Sauter, M.; Westermann, D.; Ochmann, C.; Schönberger, T.; Schleicher, R.; Stellos, K.; Schmidt, E.-M.; Borst, O.; Et Al. Cyclophilin A Affects Inflammation, Virus Elimination And Myocardial Fibrosis In Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **2012**, *53*, 6–14, Doi:10.1016/J.Yjmcc.2012.03.004.
364. Qing, J.; Wang, Y.; Sun, Y.; Huang, J.; Yan, W.; Wang, J.; Su, D.; Ni, C.; Li, J.; Rao, Z.; Et Al. Cyclophilin A Associates With Enterovirus-71 Virus Capsid And Plays An Essential Role In Viral Infection As An Uncoating Regulator. *Plos Pathog* **2014**, *10*, E1004422, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1004422.
365. Wang, Y.; Zhou, X.; Debing, Y.; Chen, K.; Van Der Laan, L.J.W.; Neyts, J.; Janssen, H.L.A.; Metselaar, H.J.; Peppelenbosch, M.P.; Pan, Q. Calcineurin Inhibitors Stimulate And Mycophenolic Acid Inhibits Replication Of Hepatitis E Virus. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1775–1783, Doi:10.1053/J.Gastro.2014.02.036.
366. Wu, X.; Thi, V.L.D.; Liu, P.; Takacs, C.N.; Xiang, K.; Andrus, L.; Gouttenoire, J.; Moradpour, D.; Rice, C.M. Pan-Genotype Hepatitis E Virus Replication In Stem Cell-Derived Hepatocellular Systems. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 663-674.E7, Doi:10.1053/J.Gastro.2017.10.041.
367. Vidotto, A.; Morais, A.T.S.; Ribeiro, M.R.; Pacca, C.C.; Terzian, A.C.B.; Gil, L.H.V.G.; Mohana-Borges, R.; Gallay, P.; Nogueira, M.L. Systems Biology Reveals NS4B-Cyclophilin A Interaction: A New Target To Inhibit YFV Replication. *J Proteome Res* **2017**, *16*, 1542–1555, Doi:10.1021/Acs.Jproteome.6b00933.
368. Qing, M.; Yang, F.; Zhang, B.; Zou, G.; Robida, J.M.; Yuan, Z.; Tang, H.; Shi, P.-Y. Cyclosporine Inhibits Flavivirus Replication Through Blocking The Interaction Between Host Cyclophilins And Viral NS5 Protein. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 3226–3235, Doi:10.1128/AAC.00189-09.
369. Bienkowska-Haba, M.; Williams, C.; Kim, S.M.; Garcea, R.L.; Sapp, M. Cyclophilins Facilitate Dissociation Of The Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 From The L2/DNA Complex Following Virus Entry. *J Virol* **2012**, *86*, 9875–9887, Doi:10.1128/JVI.00980-12.
370. De Wilde, A.H.; Pham, U.; Posthuma, C.C.; Snijder, E.J. Cyclophilins And Cyclophilin Inhibitors In Nidovirus Replication. *Virology* **2018**, *522*, 46–55, Doi:10.1016/J.Virol.2018.06.011.
371. Pfefferle, S.; Schöpf, J.; Kögl, M.; Friedel, C.C.; Müller, M.A.; Carbajo-Lozoya, J.; Stellberger, T.; Von Dall'Armi, E.; Herzog, P.; Kallies, S.; Et Al. The SARS-Coronavirus-Host Interactome: Identification Of Cyclophilins As Target For Pan-Coronavirus Inhibitors. *Plos Pathog* **2011**, *7*, E1002331, Doi:10.1371/Journal.Ppat.1002331.
372. Zhang, J.; Han, Y.; Shi, H.; Chen, J.; Zhang, X.; Wang, X.; Zhou, L.; Liu, J.; Zhang, J.; Ji, Z.; Et Al. Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus-Induced Apoptosis

- Is Caspase- And Cyclophilin D- Dependent. *Emerg Microbes Infect* **2020**, *9*, 439–456, Doi:10.1080/22221751.2020.1722758.
373. Kim, Y.; Lee, C. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Induces Caspase-Independent Apoptosis Through Activation Of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. *Virology* **2014**, *460–461*, 180–193, Doi:10.1016/J.Virol.2014.04.040.
374. Dittmar, M.; Lee, J.S.; Whig, K.; Segrist, E.; Li, M.; Kamalia, B.; Castellana, L.; Ayyanathan, K.; Cardenas-Diaz, F.L.; Morrisey, E.E.; Et Al. Drug Repurposing Screens Reveal Cell-Type-Specific Entry Pathways And FDA-Approved Drugs Active Against SARS-Cov-2. *Cell Rep* **2021**, *35*, 108959, Doi:10.1016/J.Celrep.2021.108959.
375. De Wilde, A.H.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Van Der Meer, Y.; Thiel, V.; Narayanan, K.; Makino, S.; Snijder, E.J.; Van Hemert, M.J. Cyclosporin A Inhibits The Replication Of Diverse Coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2542–2548, Doi:10.1099/Vir.0.034983-0.
376. Li, H.S.; Kuok, D.I.T.; Cheung, M.C.; Ng, M.M.T.; Ng, K.C.; Hui, K.P.Y.; Peiris, J.S.M.; Chan, M.C.W.; Nicholls, J.M. Effect Of Interferon Alpha And Cyclosporine Treatment Separately And In Combination On Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-Cov) Replication In A Human In-Vitro And Ex-Vivo Culture Model. *Antiviral Res* **2018**, *155*, 89–96, Doi:10.1016/J.Antiviral.2018.05.007.
377. De Wilde, A.H.; Li, Y.; Van Der Meer, Y.; Vuagniaux, G.; Lysek, R.; Fang, Y.; Snijder, E.J.; Van Hemert, M.J. Cyclophilin Inhibitors Block Arterivirus Replication By Interfering With Viral RNA Synthesis. *J Virol* **2013**, *87*, 1454–1464, Doi:10.1128/JVI.02078-12.
378. Sauerhering, L.; Kupke, A.; Meier, L.; Dietzel, E.; Hoppe, J.; Gruber, A.D.; Gattenloehner, S.; Witte, B.; Fink, L.; Hofmann, N.; Et Al. Cyclophilin Inhibitors Restrict Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Via Interferon- $\Lambda$  In Vitro And In Mice. *Eur Respir J* **2020**, *56*, 1901826, Doi:10.1183/13993003.01826-2019.
379. De Wilde, A.H.; Boomaars-Van Der Zanden, A.L.; De Jong, A.W.M.; Bárcena, M.; Snijder, E.J.; Posthuma, C.C. Adaptive Mutations In Replicase Transmembrane Subunits Can Counteract Inhibition Of Equine Arteritis Virus RNA Synthesis By Cyclophilin Inhibitors. *J Virol* **2019**, *93*, E00490-19, Doi:10.1128/JVI.00490-19.
380. Carbajo-Lozoya, J.; Ma-Lauer, Y.; Malešević, M.; Theuerkorn, M.; Kahlert, V.; Prell, E.; Von Brunn, B.; Muth, D.; Baumert, T.F.; Drosten, C.; Et Al. Human Coronavirus NL63 Replication Is Cyclophilin A-Dependent And Inhibited By Non-Immunosuppressive Cyclosporine A-Derivatives Including Alisporivir. *Virus Res* **2014**, *184*, 44–53, Doi:10.1016/J.Virusres.2014.02.010.
381. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Sasaki, T. Feline Coronavirus Replication Is Affected By Both Cyclophilin A And Cyclophilin B. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 190–200, Doi:10.1099/Jgv.0.000663.
382. De Wilde, A.H.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Beugeling, C.; Chatterji, U.; De Jong, D.; Gallay, P.; Szuhai, K.; Posthuma, C.C.; Snijder, E.J. Coronaviruses And

- Arteriviruses Display Striking Differences In Their Cyclophilin A-Dependence During Replication In Cell Culture. *Virology* **2018**, *517*, 148–156, Doi:10.1016/J.Virol.2017.11.022.
383. Neuman, B.W.; Joseph, J.S.; Saikatendu, K.S.; Serrano, P.; Chatterjee, A.; Johnson, M.A.; Liao, L.; Klaus, J.P.; Yates, J.R.; Wüthrich, K.; Et Al. Proteomics Analysis Unravels The Functional Repertoire Of Coronavirus Nonstructural Protein 3. *J Virol* **2008**, *82*, 5279–5294, Doi:10.1128/JVI.02631-07.
384. Von Brunn, A.; Ciesek, S.; Von Brunn, B.; Carbajo-Lozoya, J. Genetic Deficiency And Polymorphisms Of Cyclophilin A Reveal Its Essential Role For Human Coronavirus 229E Replication. *Curr Opin Virol* **2015**, *14*, 56–61, Doi:10.1016/J.Coviro.2015.08.004.
385. Favreau, D.J.; Meessen-Pinard, M.; Desforges, M.; Talbot, P.J. Human Coronavirus-Induced Neuronal Programmed Cell Death Is Cyclophilin D Dependent And Potentially Caspase Dispensable. *J. Virol.* **2012**, *86*, 81–93, Doi:10.1128/JVI.06062-11.
386. Von Hahn, T.; Schiene-Fischer, C.; Van, N.D.; Pfaender, S.; Karavul, B.; Steinmann, E.; Potthoff, A.; Strassburg, C.; Hamdi, N.; Abdelaziz, A.I.; Et Al. Hepatocytes That Express Variants Of Cyclophilin A Are Resistant To HCV Infection And Replication. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 439-447.E1, Doi:10.1053/J.Gastro.2012.04.053.
387. Ma-Lauer, Y.; Zheng, Y.; Malešević, M.; Von Brunn, B.; Fischer, G.; Von Brunn, A. Influences Of Cyclosporin A And Non-Immunosuppressive Derivatives On Cellular Cyclophilins And Viral Nucleocapsid Protein During Human Coronavirus 229E Replication. *Antiviral Res* **2020**, *173*, 104620, Doi:10.1016/J.Antiviral.2019.104620.
388. Lee, Y.J.; Lee, C. Porcine Deltacoronavirus Induces Caspase-Dependent Apoptosis Through Activation Of The Cytochrome C-Mediated Intrinsic Mitochondrial Pathway. *Virus Res* **2018**, *253*, 112–123, Doi:10.1016/J.Virusres.2018.06.008.
389. Luo, C.; Luo, H.; Zheng, S.; Gui, C.; Yue, L.; Yu, C.; Sun, T.; He, P.; Chen, J.; Shen, J.; Et Al. Nucleocapsid Protein Of SARS Coronavirus Tightly Binds To Human Cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *321*, 557–565, Doi:10.1016/J.Bbrc.2004.07.003.
390. Chen, Z.; Mi, L.; Xu, J.; Yu, J.; Wang, X.; Jiang, J.; Xing, J.; Shang, P.; Qian, A.; Li, Y.; Et Al. Function Of Hab18g/CD147 In Invasion Of Host Cells By Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Infect Dis* **2005**, *191*, 755–760, Doi:10.1086/427811.
391. Redzic, J.S.; Lee, E.; Born, A.; Issaian, A.; Henen, M.A.; Nichols, P.J.; Blue, A.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A.; Vögeli, B.; Et Al. The Inherent Dynamics And Interaction Sites Of The SARS-Cov-2 Nucleocapsid N-Terminal Region. *J Mol Biol* **2021**, *433*, 167108, Doi:10.1016/J.Jmb.2021.167108.

392. Liu, C.; Von Brunn, A.; Zhu, D. Cyclophilin A And CD147: Novel Therapeutic Targets For The Treatment Of COVID-19. *Med Drug Discov* **2020**, *7*, 100056, Doi:10.1016/J.Medidd.2020.100056.
393. Lutomski, C.A.; El-Baba, T.J.; Bolla, J.R.; Robinson, C.V. Proteoforms Of The SARS-Cov-2 Nucleocapsid Protein Are Primed To Proliferate The Virus And Attenuate The Antibody Response. *Biorxiv* **2020**, 2020.10.06.328112, Doi:10.1101/2020.10.06.328112.
394. Pawlotsky, J.-M. COVID-19 Pandemic: Time To Revive The Cyclophilin Inhibitor Alisporivir. *Clin Infect Dis* **2020**, *71*, 2191–2194, Doi:10.1093/Cid/Ciaa587.
395. Hök, K. Morbidity, Mortality And Coronavirus Antigen In Previously Coronavirus Free Kittens Placed In Two Catteries With Feline Infectious Peritonitis. *Acta Vet Scand* **1993**, *34*, 203–210.
396. Bandera, A.; Gori, A.; Clerici, M.; Sironi, M. Phylogenies In ART: HIV Reservoirs, HIV Latency And Drug Resistance. *Curr Opin Pharmacol* **2019**, *48*, 24–32, Doi:10.1016/J.Coph.2019.03.003.
397. Falade-Nwulia, O.; Suarez-Cuervo, C.; Nelson, D.R.; Fried, M.W.; Segal, J.B.; Sulkowski, M.S. Oral Direct-Acting Agent Therapy For Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med* **2017**, *166*, 637–648, Doi:10.7326/M16-2575.
398. Tekes, G.; Thiel, H.-J. Feline Coronaviruses. *Adv Virus Res* **2016**, *96*, 193–218, Doi:10.1016/Bs.Aivir.2016.08.002.
399. Nucleoside And Nucleotide HIV Reverse Transcriptase Inhibitors: 25 Years After Zidovudine - Pubmed Available Online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887088/> (Accessed On 18 October 2021).
400. Rozbeh, R.; Forchhammer, K. Split Nanoluc Technology Allows Quantitation Of Interactions Between PII Protein And Its Receptors With Unprecedented Sensitivity And Reveals Transient Interactions. *Sci Rep* **2021**, *11*, 12535, Doi:10.1038/S41598-021-91856-2.
401. Choi, S.G.; Olivet, J.; Cassonnet, P.; Vidalain, P.-O.; Luck, K.; Lambourne, L.; Spirohn, K.; Lemmens, I.; Dos Santos, M.; Demeret, C.; Et Al. Maximizing Binary Interactome Mapping With A Minimal Number Of Assays. *Nat Commun* **2019**, *10*, 3907, Doi:10.1038/S41467-019-11809-2.
402. Bryche, B.; St Albin, A.; Murri, S.; Lacôte, S.; Pulido, C.; Ar Gouilh, M.; Lesellier, S.; Servat, A.; Wasniewski, M.; Picard-Meyer, E.; 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* **2020**, *89*, 579–586, Doi:10.1016/J.Bbi.2020.06.032.
403. Geng, J.; Chen, L.; Yuan, Y.; Wang, K.; Wang, Y.; Qin, C.; Wu, G.; Chen, R.; Zhang, Z.; Wei, D.; Et Al. CD147 Antibody Specifically And Effectively Inhibits Infection And Cytokine Storm Of SARS-Cov-2 And Its Variants Delta, Alpha, Beta, And Gamma. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 347, Doi:10.1038/S41392-021-00760-8.

# Annexes

Review

# Feline Coronavirus Antivirals: A Review

Manon Delaplace , Hélène Huet, Adèle Gambino and Sophie Le Poder \*

1UMR 1161 Virologie, INRAE-ENVA-ANSES,  cole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 94704 Paris, France; manon.delaplace@vet-alfort.fr (M.D.); helene.huet@vet-alfort.fr (H.H.); a.gambino@anses.fr (A.G.)

\* Correspondence: sophie.lepoder@vet-alfort.fr; Tel.: +33-143967325

**Abstract:** Feline coronaviruses (FCoV) are common viral pathogens of cats. They usually induce asymptomatic infections but some FCoV strains, named Feline Infectious Peritonitis Viruses (FIPV) lead to a systematic fatal disease, the feline infectious peritonitis (FIP). While no treatments are approved as of yet, numerous studies have been explored with the hope to develop therapeutic compounds. In recent years, two novel molecules (GS-441524 and GC376) have raised hopes given the encouraging results, but some concerns about the use of these molecules persist, such as the fear of the emergence of viral escape mutants or the difficult tissue distribution of these antivirals in certain affected organs. This review will summarize current findings and leads in the development of antiviral therapy against FCoV both in vitro and in vivo, with the description of their mechanisms of action when known. It highlights the molecules, which could have a broader effect on different coronaviruses. In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, the development of antivirals is an urgent need and FIP could be a valuable model to help this research area.

**Keywords:** FIPV; feline coronavirus; antivirals; combination therapy; viral escape mutants



**Citation:** Delaplace, M.; Huet, H.; Gambino, A.; Le Poder, S. Feline Coronavirus Antivirals: A Review. *Pathogens* **2021**, *10*, 1150. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091150>

Academic Editors: Alessia Giordano and Stefania Lauzi

Received: 31 July 2021

Accepted: 2 September 2021

Published: 7 September 2021

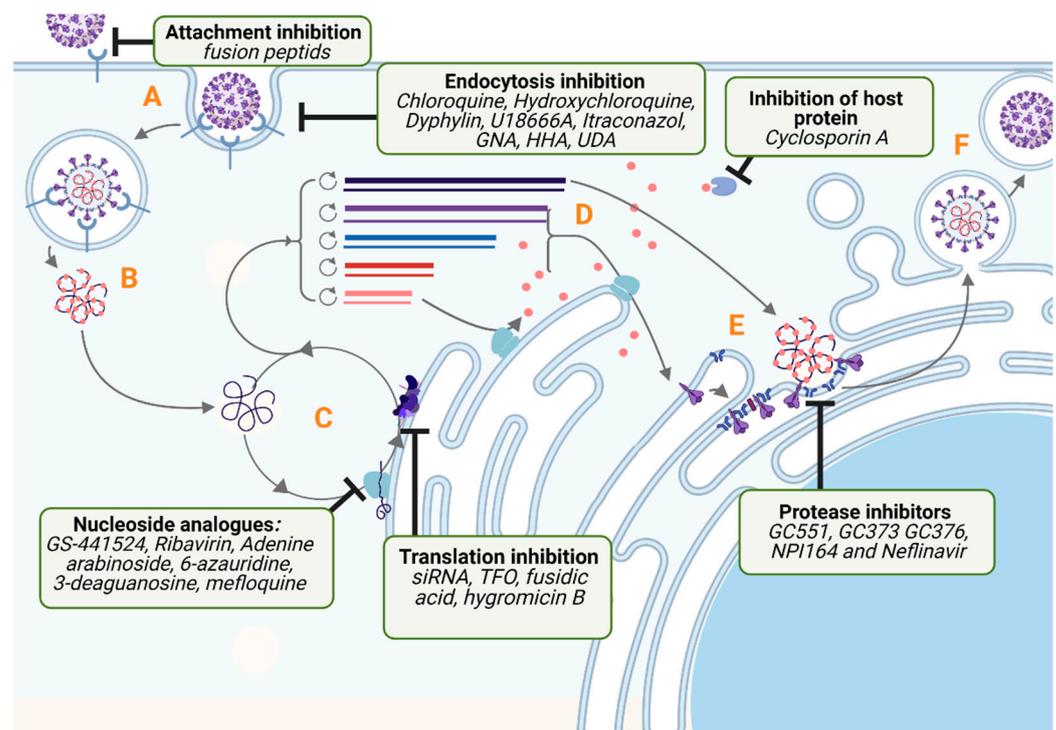
**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:**   2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Coronaviruses (CoV) are RNA positive single strand viruses belonging to the *Coronaviridae* family within the Nidovirales order. They are classified into four genera: Alpha-, Beta-, Gamma- and Delta-coronavirus genus. Gamma- and Delta-coronaviruses mostly infect birds, with the exception of some mammals. Alpha and Beta-coronaviruses exclusively infect mammals. Coronaviruses display the largest genome among RNA viruses, which ranges from 26 to 32 kB (kilobases). It is a single-strand positive-sense RNA, with a capped 5' end and a polyA tail on the 3' end. The genomic organisation is quite similar for all the coronaviruses: the first two-thirds correspond to the ORF1a/b, which encodes the 16 non-structural proteins essential for the virus replication (nsp1–nsp16), followed by the structural genes, always in the same order S (spike)-E (envelope)-M (matrix)-N (nucleocapsid). Interspaced between the structural genes are found additional ORFs encoding for accessory proteins. Those accessory proteins differ in number, size and position on the genome for each viral species of *Coronaviridae*. After binding to the receptor, coronaviruses enter the cell host either via direct fusion at the plasma membrane or endocytosis. Once the nucleocapsid is delivered into the cytoplasm, viral RNA is uncoated for translation of the ORF1a/1b gene into a polyprotein that encodes the 16 non-structural proteins. Synthesized proteins proceed to form the replicase-transcriptase complex (RTC). The RTC will initiate the transcription of full-length negative RNA and negative subgenomic (sg)RNAs. In turn, they will serve as a template for the synthesis of positive full-length RNA and positive sgRNAs. Viral proteins are translated from the positive sgRNAs. After synthesis, they undergo maturation in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Endoplasmic Reticulum-Golgi apparatus Intermediary Compartment (ERGIC) and assemble to form the novel viral particles. The viral particles maturation occurs during their transit in the Golgi apparatus and are in fine secreted out of the cell by exocytosis (Figure 1).



**Figure 1.** FCoV life cycle and mechanisms of actions of current FIPV antivirals. Letters A–F represent major steps of FIPV replication: (A) Attachment to cell and endocytosis. (B) Liberation of Ribonucleocapsid following fusion of viral and cell membranes and decapsidation. (C) Transcription of viral RNAs and creation of Replication/Transcription Complex. (D) Translation of the viral structural proteins. (E) Assembly of virion in the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. (F) Budding of virus in the ERGIC and exocytosis. HHA: Hippeastrum hybrid agglutinin; UDA: Urtica dioica Lectin; GNA: Galanthus nivalis agglutinin; TFO: Triple Helix Forming Oligonucleotides. Created with Biorender.

Among the six known human coronaviruses, three are highly pathogenic: MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2. All of them originated from bat coronaviruses [1]. For SARS-CoV and MERS-CoV, intermediate hosts, civet cats and camels, respectively, served as a relay to the human infection. No intermediate host has been determined for SARS-CoV-2 as of yet, but this virus is able to infect multiple animals, including ferrets, minks, non-human primates, dogs, domestic cats and wild *felidae* [2]. As seen with MERS-CoV in camels [3], animals may become a reservoir for the virus and induce recurring transmission to humans. Therefore, it is important to study and find ways to control CoV infection in animals to prevent future epidemics. In addition, animal coronaviruses cause some highly pathogenic diseases in animals, which result in economic losses. Veterinary coronaviruses were the first known CoVs, with the discovery of Infectious Bronchitis Virus in chicken in 1931 [4], 35 years before the report of the first human coronavirus [5], HCoV-229E. Many livestock, wildlife and pet species are affected by different coronaviruses, including bats, cows, horses, camelids, poultry, pigs, dogs and even ferrets [6–9]. Cats are susceptible to the feline CoVs (FCoV), an Alphacoronavirus [10].

FCoVs are classified into two biotypes based on their pathobiology. Avirulent strains, which usually induce mild or subclinical digestive symptoms, are referred to as feline enteric coronavirus (FECV). FECV is endemic in cats with seropositivity of 20 to 60%, reaching up to 90% of positive cats in multiple cats households [11]. Virulent strains are responsible for feline infectious peritonitis (FIP) disease and are called feline infectious peritonitis viruses (FIPV). FIPV results from spontaneous mutations of FECV, which modify the spike glycoprotein, the 3c accessory protein and potentially the accessory protein 7b. While FECV is largely restricted to the intestinal tract, FIPV is able to infect monocytes

and macrophages [12], which leads to the spread of the virus until a systemic infection is established. Two clinical forms of FIP are observed: the effusive form characterized by fluid-filled cavities and the dry form with multiple pyogranulomatous lesions in various organs.

FCoV is also subdivided, based on serological responses, into two serotypes: FCoV-I, the source of most natural infection amongst cats [13], and FCoV-II, resulting from the recombination between FCoV-I and the canine coronavirus, CCoV-II. FCoV-II is usually the laboratory model used due to its ease of replication in cell lines such as CRFK (Crandell-Rees Feline Kidney) or fcwf-4.

Attempts at developing a vaccine have been made, but the efficacy of currently available FCoV vaccines is limited [14,15]. There is still a need for the development of therapeutic compounds against FIPV. Moreover, the SARS-CoV-2 pandemic shows the importance of developing antiviral treatments against coronaviruses. In this perspective, FIP is a good natural animal model to test wide-spectrum antiviral molecules. The purpose of this review is to provide an update on current antiviral molecules tested against FIPV either in vitro or in vivo with a description of their cellular mechanisms of action. Within this framework, we propose to detail the molecules according to the viral cycle step targeted by the antiviral molecules. This review also includes effective immunostimulant molecules. Table 1 lists the values of IC50 (half maximal inhibitory concentration) and CC50 (half cytotoxic concentration) of the different inhibitors addressed in this review.

**Table 1.** Compounds with antiviral effect against FCoV.

Compound	Strain	IC50 <sup>1</sup> (μM)	CC50 <sup>1</sup> (μM)	SI	In Vivo Test	Ref
HR peptides (FP5)	FIPV-II NTU156	1.33	>200	>150		[16]
Dyphillin	FIPV-II NTU156	0.59	5.99	10.15		[17]
Dyphillin nanoparticle	FIPV-II NTU156	0.098	77.26	7883.67		
GNA	FIPV-II 79-1146	0.2 <sup>oo</sup>	>2 <sup>**</sup>			
	FIPV-I Black	0.012 <sup>oo</sup>				
HHA	FIPV-II 79-1146	0.06 <sup>oo</sup>	>2 <sup>**</sup>			[18]
	FIPV-I Black	0.004 <sup>oo</sup>				
UDA	FIPV-II 79-1146	0.17 <sup>oo</sup>				
	FIPV-I Black	0.02 <sup>oo</sup>	2.2 <sup>**</sup>			
Chloroquine	FIPV-II 79-1146	21.2 <sup>*</sup>	325.3 (timing not specified)	15.34		[20]
Chloroquine (diphosphate)	FIPV-II NTU156	27.92 <sup>*</sup>	37.50 <sup>*</sup>	1.34	SPF cats [19]	[21]
Chloroquine	FIPV-II 79-1146	0.38	82.31 <sup>***</sup>	216		[22]
Hydroxychloroquine	FIPV-I KU-2	48.7 <sup>*</sup>	515.7 (timing not specified)	10.59		[20]
	FIPV-II 79-1146	30.3 <sup>*</sup>	515.7 (timing not specified)	17.02		[20]
GS-441524	FIPV-II NTU156	3.5 <sup>*</sup>	>100 <sup>*</sup>	>28.57		[21]
	FIPV-II 79-1146	0.78 <sup>*</sup>	>100→10 <sup>**</sup>		clinical trials [23,24]	[25]
Mefloquine	FIPV-II 79-1146	0.74–5.71 <sup>*</sup> –7.89 <sup>**</sup>	15.13 <sup>***</sup>		Pharmacokinetics only [26]	[22]
Ribavirin	FIPV-II 79-1146	41.7 <sup>**</sup>	NA	NA	SPF cats [27]	[28]
Adenosine arabinoside	FIPV-II 79-1146	125	NA	NA		[28]
3-Deazaguanosine	FIPV-II 79-1146	10.37 <sup>**</sup>	323.32 <sup>**</sup>	31.18		[29]
6-azauridine	FIPV-II 79-1146	0.16 <sup>**</sup>	19.4 <sup>**</sup>	121.25		[29]
siRNA L2 (leader 2)	FIPV-II 79-1146	0.0012 <sup>□</sup>	NA	NA		[30]
siRNA N1 (nucleocapsid 1)	FIPV-II 79-1146	0.0018 <sup>□</sup>	NA	NA		[30]
Fusidic acid	FIPV-II 79-1146	75 <sup>**</sup>	232.56 <sup>**</sup>	3.1		[29]
Hygromycin B	FIPV-II 79-1146	2.25 <sup>**</sup>	29.94 <sup>**</sup>	13,31		[29]
GC376	FIPV-II 79-1146	0.04	>150	>3750		[33]
	FIPV-II NTU156	0.4–2 <sup>*</sup>	>50 <sup>*</sup>	>25	Clinical trials [31,32]	[34]
NPI64	FIPV-II 79-1146	0.04	61.91	1547.75	Pharmacokinetics only [31]	[33]
Nelfinavir	FIPV-II NTU156	8.19 <sup>◊</sup>	11.45 <sup>**</sup>			[35]
U18666A	FIPV II 79-1146	>50 <sup>**</sup>	97.6 <sup>**</sup>	488	SPF cats [36]	[36]
	FIPV-I KU-2	0.2 <sup>**</sup>				

Table 1. Cont.

Compound	Strain	IC50 <sup>1</sup> (μM)	CC50 <sup>1</sup> (μM)	SI	In Vivo Test	Ref
Itraconazol	FIPV-I KU-2	0.219 **	208 **	950.6	SPF cats [37]	[37]
	FIPV-I UCD1	0.597 **	208 **	348.7		
	FIPV-I UCD4	0.146 **	208 **	1425.9		
	FIPV-II 79-1146	>160 **	208 **	<1.3		
	FIPV-I KU-2	0.7	121 **	172.9		

<sup>1</sup> indicates the timing post-infection: \* 48 h, \*\* 72 h, \*\*\* 96 h, □ 36 h, ° 15 h, °° for 6 h and no symbol 24 h. SI is the ratio of CC50/IC50. GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin. UDA: *Urtica dioica* agglutinin. HHA: *Hippeastrum* hybrid agglutinin. NA: Not Available, SPF: Specific Pathogens Free, SI: Selectivity Index.

## 2. FCoV Inhibitors

### 2.1. Inhibition of FCoV Cell Entry

The S protein is responsible for the attachment of CoV to the cellular receptor and the fusion between the cell and the viral membrane for all coronaviruses. The large N-terminal ectodomain of S is subdivided into S1 and S2 subunits that contain the receptor binding domain (RBD) and the fusion domain, respectively. The FCoV-II receptor is the feline aminopeptidase-N (APN) protein, a cell-membrane-bound metalloprotease. The FCoV-I receptor is still unknown. Feline DC-SIGN is also an important entry cofactor in monocytes, at least for feline serotype II strains [39]. Coronaviruses' entry into cells is complex, as many coronaviruses are able to use both endocytosis and direct membrane fusion to enter host cells [40]. FCoV seems to infect cells via endocytosis in a clathrin- and caveolin-independent but dynamin-dependent manner, at least in monocytes [41]. Molecules inhibiting the virus's cell entry usually target the interface between the cellular receptor and the viral receptor binding site, harboured by the S protein in CoVs, but some of them inhibit the cellular processes of entry after the viral attachment step.

Different molecules inhibiting the FCoV viral attachment have been attempted. Peptides targeting the S1 domain of Spike, which contains the RBD, were developed. At 160 μM, three peptides corresponding to the amino acids 471–490 (peptide I-S1-9, including the RBD of spike), 541–560 (peptide I-S1-16), and 601–620 (peptide I-S1-22) inhibited around 80% of viral replication of FIPV-I KU-2 strain in fcwf-4 cells. I-S1-9 and I-S1-16 also significantly inhibited FIPV-I UCD-1 and Black strains and, more surprisingly, the FIPV-II 79-1146 strain, despite the sequence heterogeneity between the spike proteins from FCoV serotype I and II. It was therefore hypothesized that the inhibitory effect may be due to a competition between peptides and viral particles to bind to cell receptors, in a non-serotype-specific manner [42].

Peptides corresponding to the Heptad Repeat (HR) region 2 of the S2 subunit of the Spike protein of FIPV-II NTU156 strain were also developed. As HR regions are critical for the fusion of the viral envelope with the host membrane, those peptides could block the virus's entry. By preincubating FIPV for 1 h with HR 2 peptides, the authors noted a dose-dependent inhibition of infection. Out of five tested peptides, the most efficient, named FP5 had an IC50 of 1.33 μM and a CC50 over 200 μM [16]. None of the peptides were tested in vivo.

Different drugs blocking the endocytosis process of viral particles have also been tested. Among them, diphylin is a natural compound extracted from the plant *Cleistanthus collinus* and acts as a vacuolar ATPase blocker. It has previously been shown to inhibit Dengue virus and Influenza virus [43]. By inhibiting the proton H<sup>+</sup> pump in endosomal compartments, diphylin blocks the endosomal acidification and thus the fusion activity of the spike protein, preventing cell infection. In fcwf-4 cells, diphylin inhibited an FIPV-II strain, NTU156 at 0.6 μM with a CC50 of 6 μM. By delivering diphylin, thanks to polymeric nanoparticles, the antiviral effect and the safety of the molecule increased (IC50 of 9.8 nM and CC50 of 77 μM) [17].

Carbohydrate-binding agents (CBA) attach to N-glycosylated molecules such as the spike and M proteins. Their antiviral activity is due to the inhibition of the viral endo-

cytosis process at the post-attachment stage. CBA compounds such as the plant lectins *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA), *Hippeastrum* hybrid agglutinin (HHA) and *Urtica dioica* agglutinin (UDA) have been tested against FCoV-I and II. HHA and UDA inhibited FCoV-I at IC<sub>50</sub> of 4 and 2 nM and FCoV-II at 60 and 170 nM, respectively. CC<sub>50</sub> was estimated at 24 h 9.9 µM for UDA and >2 µM for HHA. IC<sub>50</sub> of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) was estimated at around 0.012 µM for FCoV-I and 0.2 µM for FCoV-II with a CC<sub>50</sub> over 2 µM [18].

Chloroquine (CQ) and its derivative hydroxychloroquine (HCQ) have been described as having an inhibitory effect on early stages infection on different viruses in vitro, including human immunodeficiency virus (HIV), influenza A/H5N1 virus, SARS-CoV and SARS-CoV-2 [44–48]. CQ and HCQ prevent viral replication by blocking the endosome-mediated viral entry. They might also impair post-translational modification of viral glycoproteins, which occur in the endoplasmic reticulum and Trans Golgi Network vesicles. For FCoV, CQ reached maximum efficiency when present before or at the time of infection and started to lose its inhibitory effect when added 1 h post-infection (p.i) of CRFK cells with the FIPV-II 79 1146 strain. Chloroquine had an IC<sub>50</sub> of 0.38 µM 24 p.i. while its CC<sub>50</sub> reached 82.31 µM after 24 h [22]. Another research team confirmed the antiviral effect of chloroquine on the infection of fcwf-4 and on monocyte cells with the same viral strain. Chloroquine at 10 µM reduced virus titer by 1000-fold in fcwf-4 cells and by 10-fold in macrophages. Hydroxychloroquine, a derivative of chloroquine, is supposed to be less toxic in some animals [49]. In fcwf-4 cells, at 48 h p.i, hydroxychloroquine had a CC<sub>50</sub> of 515.7 µM and an IC<sub>50</sub> of 48.7 µM against FIPV-I strain KU-2 and of 30.3 µM against FIPV-II. In comparison with CQ, HQ appears to be one-third less cytotoxic [20].

As of yet, in vivo experiments were conducted only with CQ. Three groups of three SPF cats experimentally inoculated with the FIPV-II 79-146 strain were treated with 10 mg/kg of chloroquine (or a saline solution as control), administered subcutaneously. One group was treated 3 days prior to infection and every 3 days thereafter, while another group was treated with chloroquine only 12 days post-infection and every 3 days afterwards. Compared to the control group, both chloroquine-treated groups had slightly lower viral mRNA levels in PBMC 21 days post-infection, as well as slightly lower inflammatory cytokine mRNA levels. Mean numbers of survival days of chloroquine treated cats were higher (34.3 and 31.7 days post-infection) than in the control group (21 days p.i.) though not statistically significant. No treated cats survived the FIPV infection. In addition, despite an improvement of the clinical score of CQ treated cats, an increase of alanine aminotransferase (ALT) due to the treatment was noticed. In conclusion, chloroquine may be an interesting lead to treat FIP but that it may be used in combination with other anti-FIPV drugs, as high doses had severe side effects [19].

## 2.2. Inhibition of the Viral Replication and Transcription

Coronaviruses have a unique system of genome replication and transcription. The first event that follows the release of the genomic RNA is the translation of the ORF1a and 1b. ORF1a is translated into a polyprotein named pp1a and codes for 11 non-structural proteins (nsp1–nsp11asct). The primary translated products are processed by 2 proteases (nsp3 and nsp5) embedded within the polyproteins into 16 nsps. Coronavirus's nonstructural proteins comprise a helicase and exoribonuclease, which allow the possibility to correct some mutations in their genome, an exclusive characteristic amongst RNA viruses. Together with N and possibly with cellular proteins, the nsps proceed to form the replicase-transcriptase complex (RTC). This structure is tightly connected to the endoplasmic reticulum, as the RTC is made from modified endoplasmic reticulum membranes, induced during Coronavirus infection. The RTC thus has two distinguishable activities: first, as a replicase, it will recognize the genome as a template for copies of genomic strands, and second, as a transcriptase, it will generate copies into subgenomic mRNAs for viral translation. Coronavirus viral polymerase synthesises both genome-length strand and multiple subgenomic

RNAs (sgRNAs) through a unique discontinuous transcription mechanism. The sgRNAs serve as templates for the translation of both structural and accessory proteins [50].

Antivirals targeting viral replication follow different strategies. The inhibition the viral polymerase is a classic mechanism of action used for antiviral therapies against HIV or HCV.

### 2.2.1. Nucleoside Analogues

Nucleoside analogues are similar to natural nucleosides, but the differences with a standard nucleoside induce different base pairing when used to synthesize DNA/RNA and inhibit further viral replication. They are often used as antivirals (HIV, Herpesvirus, etc.). Cells are able to remove and correct the presence of these analogues, whereas viruses cannot.

#### GS-441524

GS-441524 is an adenosine analogue and the active form of Remdesivir (Gilead). GS-441524 has been tested *in vitro* and *in vivo* for its effect against FIPV. *In vitro*, GS-441524 was able to completely inhibit RNA expression of FIPV-II 79 1146 in CRFK cells at 10  $\mu$ M and partially at 1  $\mu$ M. No cytotoxic effect of the compound was noticed up to 10  $\mu$ M. This compound was efficient when added 1 h post-infection. In macrophages obtained from ascites fluid of naturally infected cats, 10  $\mu$ M of GS-441524 reduced viral RNA by 1000-fold 72 h after treatment.

In 10 cats experimentally infected and expressing clinical symptoms of FIP, a daily treatment during 2 weeks of 2 mg/kg or 5 mg/kg of GS-441524 2 to 3 days after symptoms apparition resulted in a remission of FIP symptoms. A recurrence of clinical signs occurred for two cats, four or six weeks after stopping the treatment. With further administration over two weeks, these cats also recovered from their symptoms. All cats remained asymptomatic 10 months after treatment [25].

A clinical study on 31 cats suffering naturally from various forms of FIP (nervous form excluded) was conducted. Five cats died or were euthanized due to severe symptoms. After 12 weeks of treatment at 2.0 mg/kg per 24 h, 18 cats remained healthy 44 weeks later. Eight cats relapsed within 3 to 84 days and were treated again for another 2 weeks at 2 mg/kg or 4 mg/kg. Two of them relapsed a second time and were treated a third time at 4 mg/kg. All but one remained healthy afterwards [23]. The monitoring of viral RNA demonstrated a rapid decrease of the viral amount within one week of treatment in most cats. The serotype of FCoV was not identified, but as serotype-I is the most prevalent in natural infections, cats included in this study were probably infected by FCoV-I strains. A second clinical study was conducted a year later on four cats presenting a neurological form of FIP. The cats were treated with 5–10 mg/kg of GS-441524 for at least 12 weeks with daily injection. Three of the four cats treated were alive 254 to 528 days after treatment. The last cat had to be euthanized after relapses following two sessions of treatment, 216 days after treatment initiation [24]. GS-441524 may also be efficacious to treat nervous forms of FIP but with a higher dose up to 10 mg/kg than for the non-neurological forms.

Even though FIP diagnosis was not confirmed in all cases included in the two field studies conducted, GS-441524 appears as the most encouraging FIPV inhibitor with successful treatment on different FIP forms in natural infections. Despite these promising results, GS-441524 has not yet been authorized for veterinary treatment.

Another retrospective study on cats highly suspected of FIP showed that 23 out of 24 cats treated with GS-441524 recovered from FIP. The remaining cat relapsed after 4 weeks of treatment, and its owner decided to not pursue further treatment [51].

Another GS-441524-like drug named Mutian X has also been administered in multiple-cat households, with the aim to stop fecal shedding FCoV and prevent viral transmission in catteries. An observational study followed FCoV fecal secretion in 29 cats treated orally with the Mutian X in catteries [52]. A dose of 4 mg/kg per 24 h significantly reduced the excretion of FCoV within four days. This could be an interesting alternative to avoid viral transmission among cats and in turn prevent the development of FIP. Mutian X was also

used to treat one cat with success. A 2-year-old male cat presenting a uveitis was diagnosed with a non-effusive FIP. He was treated with systemic and topical prednisolone for 6 days, and with 8 mg/kg of Mutian X per 24 h given orally for 19 days (days 6 to 25), then 6 mg/kg for 21 more days. Fifty days after the beginning of Mutian X treatment, symmetric dimethylarginine (SMDA), an early indicator of kidney disease, peaked at 28 µg/dL, twice the reference range (<14 µg/dL). Since the cat's uveitis and other symptoms (weight loss, anemia, elevated alpha-1 acid glycoprotein level) had resolved, the clinicians decided to stop Mutian X treatment and replaced it with 100,000 units of feline interferon omega (IFN $\omega$ ), given orally. SMDA fell to 19 µg/dL 35 days after the discontinuation of Mutian X treatment, which could indicate that elevated SMDA level is a side effect of Mutian treatment. IFN $\omega$  treatment continued for at least 100 days at the time of the article writing. Three out of four cats living in the same household as the FIP cat were found to be shedding FCoV and were preventively treated with 4 mg/kg of Mutian for five days, which successfully stopped shedding in feces. All six cats were alive and well 6 months after diagnosis and treatment initiation [53].

Given the potential success of GS-441524 in treating FIP cats, many cat owners have independently treated their pets with unlicensed GS-441524-like drugs. A recent study conducted a survey via the Internet of owners who have attempted to treat FIP with unapproved GS-44-1524 drugs. According to their reports, 54% of them considered their cats to be cured of FIP, and most of the treated animals were alive during the 12 weeks of monitoring. This study highlights the potential benefit of GS-441524 drugs, but many concerns remain about the widespread use of these unapproved treatments, including the potential emergence of resistant viral strains [54].

#### Other Nucleoside Analogues

Mefloquine is another adenosine analogue used as a treatment and prophylactic anti-malarial drug for people. Its antiviral mechanism of action is not fully understood. In vitro, its efficiency was maximal when added prior to or concurrent with infection, but remained greater than 50% when added at the latest tested time point of 6 h post-infection with the FCoV-II 79-1683 strain in CRFK cells. Its IC<sub>50</sub> was 0.74 µM at 24 h p.i and 5.71 µM 48 p.i with a CC<sub>50</sub> of 15.13 µM at 24 h [22]. Given these encouraging results, the pharmacokinetics of mefloquine was recently investigated. Seven healthy cats were orally administered at 62.5 mg four times over the course of two weeks. The peak plasma concentration was 2.71 µg/mL 15 h after a single oral dose. When administered with food, the peak means climbed to 4.06 µg/mL, which could be sufficient to inhibit FIPV. Cats treated with mefloquine showed a mild increase of serum symmetric dimethylarginine. Some cats given mefloquine without food have vomited [50]. Given the good safety data, clinical trials on cats suffering from FIP could be engaged.

Ribavirin, a guanosine analogue, is widely used in human antiviral therapy. It efficiently reduced FIPV 79-1146 strain infection in vitro with a maximal effect of over 10,000-fold of FIPV titer reduction when added 1 h post-infection. The necessary dose, 50–100 mg/mL, was, however, cytotoxic [51]. In vivo, 50 kittens were experimentally infected with the FPV 79-1146 strain and treated 18 h post-infection with 16.5 mg/kg given per os, intramuscularly or intravenously, once daily for three consecutive days, then once each week for three weeks. Cats treated with ribavirin demonstrated exacerbated symptoms. The toxicity and severe side effects induced by ribavirin may be responsible for these observations [55]. Ribavirin is not recommended for FIP treatment.

Other nucleoside analogues were also tested in vitro on the FIPV 79-1146 strain: the adenine arabinoside purine analogue, used in treatment against HHV-1 and HHV-3 [56] and the 6-azauridine, an analogue of uridine and 3-deazaguanosine, an analogue of guanosine. Adenine arabinoside inhibited significantly FIPV in vitro with an IC<sub>50</sub> of 125 µg/mL at 72 h p.i. but only when delivered before or at the same time as the viral inoculum. No cytotoxic effect was observed up to 250 µg/mL [28] 3-deazaguanosine, and 6-azauridine inhibited FIPV in vitro with respective IC<sub>50</sub> of 10.37 µg/mL and of 0.16 µg/mL. Their

cytotoxicity ranged from 323.32 for 3-deazaguanoside to 19.4 µg/mL for 6-azauridine. The antiviral effect of these nucleoside analogues was lost if added 1 h after viral infection [29].

### 2.2.2. siRNA

siRNA is an antiviral therapeutic concept based on RNA interference. It consists of the degradation of mRNA via sequence-specific complementary short RNA. As such, siRNA can be extremely selective and specific to even novel viruses. However, RNA viruses with their high mutation rate and low sequence fidelity rapidly become resistant to siRNA. Success against RNA viruses has been observed by combining multiple siRNAs against different targets. Some are even being tested in clinical trials against HIV, HBV or HCV [57], for example.

A combination of 30 nM of a siRNA mix against the 5' leader sequence, nucleocapsid and membrane RNA sequences inhibited infection by over 100-fold in the pre-treatment of CRFK cells infected with FIPV-II 79-1146. At 24 h p.i, 5 nM of each siRNA against the nucleocapsid or untranslated 5' region were sufficient to inhibit over 80% of FIPV infection [30]. No viral escape was notified after five passages in cells. Single or dual siRNA therapy was less efficient and rapidly led to the emergence of viral escape mutants [58]. No in vivo experiments were attempted.

Triple Helix Forming Oligonucleotides (TFO) are homopyrimidine that bind in the major groove of duplex nucleotides strands on specific targets, typically 10–30 nt in length with purine on one strand and pyrimidine on the other [59]. Although TFOs are usually complex with double strand DNA, they can also bind to double strand RNA or DNA–RNA hybrids. Five TFOs targeting different regions of the FIPV genome (based on the strain FIPV 79-1146) were tested in vitro. Three targeted ORF1a/b, one the 3'UTR sequence and the other the 5'UTR sequence of the genome. CRFK cells were transfected with 100 nM of TFOs 6 h before infection. All TFOs inhibited FIPV significantly by approximately 10<sup>5</sup>-fold except for the one directed against the 3'UTR sequence. The authors tested the TFO1, targeting the 5'UTR, at different concentrations. It was observed that 25 nM of TFO1 did not significantly reduce FIPV infection, while 50 nM reduced infection by 10<sup>5</sup>-fold [60]. The antiviral effect of TFOs seems to be more pronounced than with siRNA treatment, however, further studies are needed, especially to investigate the possibility of viral escape emergence.

### 2.3. Protein Synthesis Inhibitors

Two proteins synthesis inhibitors have been tested in vitro: fusidic acid and hygromycin B. Both are antibiotics. The fusidic acid binds to the elongation factor G (EF-G) and prevents its replacement in the ribosome, thereby inhibiting protein synthesis. Hygromycin B is an aminoglycoside inhibiting protein synthesis by stabilizing tRNA in the ribosomal acceptor site. Both molecules reduced FIPV-induced ECP by three- to sixfold in vitro when added at 2.6 µg/mL for Hygromycin B and 50 µg/mL for fusidic acid. Both molecules had a similar effect when added 1 h before, during or 1 h after infection [29].

### 2.4. Protease Inhibitors

The post-translational maturation of viral non-structural proteins is carried out by two main viral proteases. Nsp3 allows the release of nsp1, nsp2 and nsp3. The second protease is nsp5, which is responsible for the release of the remaining 13 nsps. Due to its similarities with the 3C proteinase of the Picornavirus, nsp5 is often designated as 3C-like proteinase (3CLpro).

Different derivatives of peptidyl compounds targeting 3CL pro could inhibit FIPV in vitro when adding just before the infection. IC<sub>50</sub> of compounds ranged from 0.02 µM to 0.86 µM with a CC<sub>50</sub> at 24 h ranging from 20 µM to more than 150 µM [61]. Among these compounds, the most promising were GC376 and GC373. With a respective IC<sub>50</sub> of 0.07 and 0.15 µM against FIPV-II at 24 h p.i and a CC<sub>50</sub> superior to 500 µM, their therapeutic index (calculated from the ratio of IC<sub>50</sub>/CC<sub>50</sub>) was excellent. Their antiviral activity increased when the molecules are added in pretreatment [33].

GC376 and NPI64, a homologous compound to GC376 with an additional residue of 1-naphthylalanine, have been studied *in vivo*. GC376 inhibits 3CLPro by forming a covalent bond with a cysteine residue of the protease, after conversion of GC376 in an aldehyde form [62].

Before *in vivo* studies of FIP treatment, the pharmacokinetics of GC376 and NPI64 in two SPF cats have been studied. A peak plasma level of GC376 was observed two hours after subcutaneous injection of 10 mg/kg, and drug concentrations remained above IC50 (8 ng/mL) for 18 h. NPI64 was less readily absorbed into the blood, and the plasma drug level remained above IC50 (12 ng/mL) only for 12 h post-injection of 5 mg/kg. SPF cats injected twice a day with 10 mg/kg for four weeks with GC376 showed no adverse effects. Given these results, efficacy studies were conducted with GC376. In total, eight SPF cats were experimentally infected with FIPV-I. In the first group of four cats, treatment with 5–10 mg/kg of GC376 twice a day started when moderate FIP symptoms appeared (starting at day 15 p.i for the first cat and day 20 p.i for the last one). In the second group, treatment started when severe FIP symptoms appeared, notably, the occurrence of ascites fluid. These cats were first treated with palliative care (the anti-inflammatory compound meloxicam as well as subcutaneous fluids), then, starting at day 18 for the first cat and day 21 for the last, palliative treatments were replaced by twice-daily injection of GC376 at 5–10 mg/kg. All cats were treated until day 34 p.i., except for two cats from the second group that had to be euthanized due to severe symptoms. In all six remaining cats, symptoms disappeared after treatment, and no relapse was observed up to 8 months after the end of treatment. The two euthanized cats showed signs of pancreatitis after necropsy but mild or no lesions typical of FIP. Observed pancreatitis could be a complication due to the meloxicam treatment [60].

Given these encouraging results, GC376 was evaluated on client-owned cats suffering from FIP. FIP diagnosis was based on clinical symptoms, hematological and biochemical abnormalities and detection of the virus by RT-qPCR. Cats with neurological symptoms were excluded. Cats were treated with 15 mg/kg of GC376 injected subcutaneously twice-daily. Out of the 20 treated cats, symptoms improved for 19 of them within 2 weeks of treatment. Nevertheless, 1 to 7 weeks after treatments, symptoms recurred, and the cats were treated for a minimum of 12 weeks. Thirteen cats relapsed and failed to respond to treatment within one to seven weeks of initial or repeat treatment. Eight of those thirteen cats developed severe neurological FIP, and five had recurrence of abdominal lesions. The FIP diagnosis was confirmed at necropsy for 12 of them. Five cats (aged 3.3–4.4 months) with wet FIP were still in remission 5–14 months after the 12 weeks treatment. Another kitten had a relapse 10 weeks after initial treatment but was responding to repeated treatment at the time of writing of that study. Another 6.8-year-old cat relapsed three times and required over 10 months of treatment before remission. In total, 7 out of the 20 cats studied survived after treatments with GC376, mostly kittens with the wet form of FIP [61]. Analyses of viral protease sequences in five treated cats did not demonstrate any mutations except for one. Three mutations were observed in the viral protease sequence after a long duration of treatment, but only one seems to slightly diminish the efficacy of GC376 [63]. Despite these reassuring results regarding the low emergence of resistance variants, surveillance of such events remained to be carried out when the long-term antiviral treatments were implemented.

Another protease inhibitor, nelfinavir, a compound used to treat HIV-infected patients, has been shown to efficiently inhibit SARS-CoV. *In vitro*, nelfinavir inhibited FCoV-II NTU156 in fcfw-4 cells with an IC50 of 8.19  $\mu$ M. This was higher than the inhibition of SARS-CoV (IC50: 0.048  $\mu$ M), probably due to the sequence differences between FCoV and SARS-CoV 3CLPro protease. Indeed, only 7 out of 18 binding sites for nelfinavir identified on SARS-CoV 3CLPro are conserved in FCoV. In contrast to what was observed with SARS-CoV [64], nelfinavir lost its antiviral activity against FCoV when added after virus entry into cells. Encouragingly, nelfinavir was also given orally to nine healthy FCoV shedding cats at 6.25 mg to 50 mg/kg/day without any side effects. The authors did not specify the impact of nelfinavir on FCoV shedding [35].

### 2.5. Inhibition of Host Cellular Proteins

Designing antiviral directly targeting RNA viruses is challenging due to their high mutation rate and inhibition escape potential. A possible strategy to avoid this problem is to design compounds targeting the host proteins that are used by the virus. As such, viral escape through mutation is less likely.

U18666A is a cationic amphiphilic drug that suppresses cholesterol transporters and prevents cholesterol release from lysosomes by targeting the host Niemann-Pick C1 (NPC1) protein, which is involved in cellular cholesterol trafficking. The CC50 value of U18666A was 97.6  $\mu\text{M}$ . U18666A had an inhibitory effect on four FCoV-I strains in pre-treatment at doses ranging between 0.2 and 20  $\mu\text{M}$  but no effect on FCoV-II replication in vitro [65]. U18666A was later tested in vivo in SPF cats. After infection with FIPV-I KU-2 strain, U18666A was injected subcutaneously at 2.5 mg/kg on day 0, and 1.25 mg/kg on days 2 and 4. PBS was instead injected to the control group. Two out of five control cats developed FIP, as did one out of five cats in the treated group. All cats regardless of treatment shed FIPV RNA in their feces. This in vivo experience was declared non-conclusive due to the low number of symptomatic cats in the control group [36].

Itraconazol (ICZ), such as U18666A, interacts with cellular NCP1 (Niemann-Pick C1 protein) and induces cholesterol accumulation in lysosomes, inhibiting host cellular cholesterol transport. Alternatively, itraconazol inhibits ergosterol biosynthesis by acting on the oxysterol-binding protein (OSBP) [66]. Itraconazol is an antifungal compound used in veterinary medicine to treat fungal infection in cats and dogs. ICZ inhibited FCoV-I replication efficiently (with a selectivity index between 349 and 1426 for three FCoV-I strains) both as a pre-treatment of cells and when added 1 or 3 h post-infection. However, FCoV-II replication was only slightly decreased in the presence of ICZ [37]. As an approved veterinary treatment, the pharmacokinetics of ICZ in cats has previously been described: 10 mg/kg per os was associated with a blood peak concentration of 1.6  $\mu\text{M}$  of ICZ, which reached 4.8  $\mu\text{M}$  when cats were treated twice in a 12 h span [67]. As the IC50 necessary to inhibit FCoV-I was below 1  $\mu\text{M}$ , ICZ could be an interesting therapeutic agent. A study evaluated the antiviral effect of itraconazol in combination with ADA, an anti-human TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor). Three out of ten SPF cats infected with FCoV-I KU-2 strain developed FIP symptoms. Treatment with ADA and ICZ started at the onset of symptoms, which corresponded to days 21, 32 and 34 post-infection for the three cats. Each cat was treated twice in the first 4 days with 10 mg of ADA and daily with 50 mg of ICZ during each of the 30 days of the treatment. During this time, clinical symptoms improved for two cats while the third cat, the only one with ascites, did not respond to the treatment and had to be euthanized [38]. In a case report, a client-owned kitten with effusive FIP was treated with 10 mg/kg of ICZ twice a day and 1 mg/kg of prednisolone once a day. Fecal FCoV RNA and pleural fluid accumulation initially decreased but the cat start showing neurological symptoms and had to be euthanized after 38 days [68]. A post-mortem examination confirmed the FIP diagnosis. Despite some improvement of the symptoms, itraconazol failed to cure FIP disease.

Cyclosporine A (CsA) is an immunosuppressive macromolecule that binds to cyclophilins, chaperone proteins able to catalyze the cis/trans conformation change of proline residues. This interaction blocks the calcineurin pathway, which in turn inhibits the translocation of nuclear factor of activated T cells from the cytosol into the nucleus. The antiviral effect of CsA is probably due to its interaction with cellular cyclophilins, as numerous studies demonstrated they are essential factors for coronaviruses' lifecycles. In fwcf-4 cells, CsA was cytotoxic at a high dose (CC50 of 14.1  $\mu\text{M}$ ) and inhibited FIPV in a dose-dependent manner at CsA concentrations between 0.16 and 10  $\mu\text{M}$  in post-infection treatment [69]. CsA treatment was attempted in a client-owned cat suffering from an effusive form of FIP. Administration of CsA ranged at doses from 25 mg/kg to 75 mg/kg. The symptoms and the effusion regressed, but relapse occurred at day 251 post-treatment, and the cat died of respiratory failure after 264 days of treatment [70]. However, without post-mortem examination, the diagnosis of FIP was not confirmed.

## 2.6. Immunostimulant Molecules

Immunomodulation is a strategy used for many antiviral therapies, including veterinary medicine. Interferons (IFN) are widely used in this context. A feline interferon omega (fIFN $\omega$ ) is even commercially available. In vitro, fIFN $\omega$  reduced the viral yield less than 10-fold when cells are treated continually for 48 h p.i. with 10,000 U of IFN molecule. The antiviral effect was not observed when the molecule was used in pre-treatment [71]. In vivo, a placebo-controlled study was conducted on 37 diagnosed client-owned FIP cats [72]. Cats from the interferon group (21 cats) received 106 U/kg (0.1 mL/kg) fIFN $\omega$  subcutaneously every 24 h for a week, then the same dose once a week until euthanasia. The control group received a saline solution. All cats were treated with glucocorticoids. No benefit of the treatment was observed. Human Interferon-alpha (hIFN $\alpha$ ) had an inhibitory effect in a dose-dependent manner in vitro [73], but no inhibitory effect was observed in an experimental trial [74]. In conclusion, the main interest of IFN could be in combination with other antiviral molecules (see below) [75].

Polyprenyl Immunostimulant (PI) is a compound used in the treatment of feline herpesvirus. Its antiviral effect may be due to the upregulation of Th-1 cytokines. In a field study, 60 cats diagnosed with a non-effusive form of FIP were treated with PI at 3 mg/kg orally three times per week. While no cats recovered, seven cats survived for over 300 days, with a record of 1829 days for one cat. Importantly, cats treated concomitantly with PI and corticosteroids survived a mean of 47.5 days, while cats treated with PI and without corticosteroids survived a mean of 201 [76]. There may be an adverse effect of treating cats with corticosteroids and PI simultaneously.

## 2.7. Combination Therapy

Another solution to the escape potential of viruses against therapeutics antivirals is combination therapy. Efficient treatments for chronic infection with HCV [77,78] and HIV [79] are based on this strategy. A combination of compounds targeting different steps of the viral replication cycle can have synergistic effects and allow for the use of a lower dose than monotherapy, with potentially lower cytotoxicity or side effects.

This was the case for the combination therapy between nelfinavir and GNA for example. When added to cells pre-infected with an MOI 0.1, nelfinavir and GNA had no significant antiviral activities below cytotoxic doses. However the addition of Nelfinavir at 9.41  $\mu$ M with doses of GNA ranging between 0.12 and 0.48 nM, or the addition of 0.48 nM of GNA with Nelfinavir doses between 6.27 and 9.41  $\mu$ M completely inhibited FCoV infection, without cytotoxicity [35].

A yet-to-be-peer-reviewed study [80] screened 89 compounds against FIPV-II (including some described in this review) and then evaluated the antiviral activity with different combinations of compounds. GC376 at 20  $\mu$ M was used in combination with nine other compounds at 10  $\mu$ M. The combination with the most efficient antiviral activity was GC376 at 20  $\mu$ M with 10  $\mu$ M of amodiaquine, a molecule used in malaria treatment. This combination reduced FIPV RNA by  $10^7$ -fold and showed a great synergetic effect compared to monotherapy.

Takano et al. evaluated the antiviral effect of a combination of HCQ and Interferon omega (IFN- $\omega$ ) on fcwf-4 cells. After 24 h exposure to 100  $\mu$ M of hydroxychloroquine and 10,000 U/mL of IFN- $\omega$ , cell viability was 95%. The antiviral effect of this combination was then evaluated on three FIPV-I strains, UCD1, UCD4 and KU2, as well as on FIPV-II 79-1146. HCQ at 100  $\mu$ M and IFN- $\omega$  at 10,000 U/mL incubated independently for 1 h reduced viral titers by approximately 10-fold in each case, but for the 3 tested FIPV-I and FIPV-II strains, a combination of HCQ and IFN- $\omega$  strongly reduced viral replication by more than 1000-fold, at least [20].

Lee et al. also observed a synergic inhibitory effect when cells infected with FIPV-II were treated with a combination of the peptide FFP5 targeting the HR2 domain of the spike protein and Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ). The combination of 10  $\mu$ M FP5 with 1000 IU of IFN- $\alpha$  with reduced the viral titre up to  $10^4$ -fold [16].

Despite these promising results, combination therapies were not attempted, to date, in vivo in FIP infected cats.

### 3. Conclusions

As many authors noticed, one of the challenges in the search for an effective therapy is that for many compounds, FIPV-inhibitory doses can be toxic or have severe side effects. Since no approved treatments exist as of yet, efforts in finding adequate treatment for FIP have to be continued. As has been suggested, a combination of antiviral molecules with overall lower doses could be an interesting lead. Another advantage of combination therapy would be to avoid the emergence of antiviral escape mutants, which could be a real concern of the use of some molecules based on targeting viral proteins or nucleoside analogues.

Outside the obvious interest for cats and cat owners, developing antivirals against FIPV has proved to be a useful proof of concept for the development of antivirals against human coronaviruses. Table 2 lists the inhibitors with a broad spectrum on different coronaviruses. For example, a recent study described the antiviral effect on SARS-CoV-2 of an improved version of GC376, a compound initially tested against FIPV [81]. GS-441524 is a parent nucleoside to Remdesivir that has been considered for the SARS-CoV-2 treatment [82]. Some of these inhibitors, such as lectins, have the potential to inhibit all coronaviruses from the different genera [83]. However, most studies have been conducted in vitro and in vivo considerations in animal models are necessary to avoid disappointment such as the hydroxychloroquine treatment against SARS-CoV-2.

**Table 2.** FIPV antivirals effect on other coronaviruses.

Inhibitor	Antiviral Effect on Other Coronaviruses
Dyphillin	SARS-CoV-2 [84]
GNA	IBV, TGEV [18], SARS-CoV [85], MHV [86]
HHA	IBV, TGEV [18], SARS-CoV [85], MHV [86]
UDA	IBV, TGEV [18], SARS-CoV [85], MHV [86]
Chloroquine	BCoV [87], SARS-CoV [88], HCoV-229E [44], HCoV-OC43 [89], MERS-CoV [90], PHEV [91], SARS-CoV-2 [92]
Hydroxychloroquine	SARS-CoV-2 [93]
Mefloquine	SARS-CoV-2 [94]
Ribavirin	MHV [95], SARS-CoV [96]
6-azauridine	MHV [95], SARS-CoV [96]
GS-441524	MHV, SARS-CoV, MERS-CoV [97], SARS-CoV-2 [98]
Hygromycin B	MHV [99], BCoV [100]
GC376	SARS-CoV-2 [81], TGEV, SARS-CoV, MHV, HCoV-229E, BCoV [62], HCoV-OC43, HCoV-NL63, MERS-CoV [101]
U18666A	SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-229E [102]
Itraconazol	SARS-CoV-2 [66] MHV [95]

SARS: Severe acute respiratory syndrome, TGEV: Transmissible gastroenteritis virus, MHV: Murine hepatitis virus, MERS: Middle-East respiratory syndrome, BCoV: Bovine coronavirus, PHEV: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, IBV: Infectious bronchitis virus GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin. UDA: *Urtica dioica* agglutinin. HHA: *Hippeastrum hybrid* agglutinin.

The SARS-CoV-2 pandemic, which follows on the of SARS-CoV and MERS-CoV epidemics, has highlighted the need to prepare for the emergence of novel coronaviruses in the human population. Developing antivirals to treat FIP and other veterinary coronaviruses will not only save the lives of many pets but will also help to prevent future coronavirus outbreaks.

**Funding:** Manon Delaplace benefits from a DGER and DIM1Health (Région Ile-de-France) grant. This work was supported by the “CycloCov” program, funded by ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ye, G.; Wang, X.; Tong, X.; Shi, Y.; Fu, Z.F.; Peng, G. Structural Basis for Inhibiting Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication with the 3C-Like Protease Inhibitor GC376. *Viruses* **2020**, *12*, 240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Prince, T.; Smith, S.L.; Radford, A.D.; Solomon, T.; Hughes, G.L.; Patterson, E.I. SARS-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses* **2021**, *13*, 494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mackay, I.M.; Arden, K.E. MERS Coronavirus: Diagnostics, Epidemiology and Transmission. *Virol. J.* **2015**, *12*, 222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Schalk, A.F. An Apparently New Respiratory Disease of Baby Chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1931**, *78*, 413–423.
5. Hamre, D.; Procknow, J.J. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1966**, *121*, 190–193. [[CrossRef](#)]
6. Cavanagh, D. Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *Vet. Res.* **2007**, *38*, 281–297. [[CrossRef](#)]
7. Haake, C.; Cook, S.; Pusterla, N.; Murphy, B. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses* **2020**, *12*, 1023. [[CrossRef](#)]
8. Amer, H.M. Bovine-like Coronaviruses in Domestic and Wild Ruminants. *Anim. Health Res. Rev.* **2018**, *19*, 113–124. [[CrossRef](#)]
9. Williams, B.H.; Kiupel, M.; West, K.H.; Raymond, J.T.; Grant, C.K.; Glickman, L.T. Coronavirus-Associated Epizootic Catarrhal Enteritis in Ferrets. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2000**, *217*, 526–530. [[CrossRef](#)]
10. Pedersen, N.C. An Update on Feline Infectious Peritonitis: Diagnostics and Therapeutics. *Vet. J.* **2014**, *201*, 133–141. [[CrossRef](#)]
11. Leibowitz, J.; Kaufman, G.; Liu, P. Coronaviruses: Propagation, Quantification, Storage, and Construction of Recombinant Mouse Hepatitis Virus. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2011**, *21*, 15E-1. [[CrossRef](#)]
12. Rottier, P.J.M.; Nakamura, K.; Schellen, P.; Volders, H.; Haijema, B.J. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14122–14130. [[CrossRef](#)]
13. Kummrow, M.; Meli, M.L.; Haessig, M.; Goenczi, E.; Poland, A.; Pedersen, N.C.; Hofmann-Lehmann, R.; Lutz, H. Feline Coronavirus Serotypes 1 and 2: Seroprevalence and Association with Disease in Switzerland. *Clin. Vaccine Immunol.* **2005**, *12*, 1209–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bálint, Á.; Farsang, A.; Szeredi, L.; Zádori, Z.; Belák, S. Recombinant Feline Coronaviruses as Vaccine Candidates Confer Protection in SPF but Not in Conventional Cats. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 154–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fehr, D.; Holznagel, E.; Bolla, S.; Hauser, B.; Herrewegh, A.A.; Horzinek, M.C.; Lutz, H. Placebo-Controlled Evaluation of a Modified Life Virus Vaccine against Feline Infectious Peritonitis: Safety and Efficacy under Field Conditions. *Vaccine* **1997**, *15*, 1101–1109. [[CrossRef](#)]
16. Liu, I.-J.; Tsai, W.-T.; Hsieh, L.-E.; Chueh, L.-L. Peptides Corresponding to the Predicted Heptad Repeat 2 Domain of the Feline Coronavirus Spike Protein Are Potent Inhibitors of Viral Infection. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82081. [[CrossRef](#)]
17. Hu, C.-M.J.; Chang, W.-S.; Fang, Z.-S.; Chen, Y.-T.; Wang, W.-L.; Tsai, H.-H.; Chueh, L.-L.; Takano, T.; Hohdatsu, T.; Chen, H.-W. Nanoparticulate Vacuolar ATPase Blocker Exhibits Potent Host-Targeted Antiviral Activity against Feline Coronavirus. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Van der Meer, F.J.U.M.; de Haan, C.A.M.; Schuurman, N.M.P.; Haijema, B.J.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Delputte, P.L.; Balzarini, J.; Egberink, H.F. Antiviral Activity of Carbohydrate-Binding Agents against Nidovirales in Cell Culture. *Antivir. Res.* **2007**, *76*, 21–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Takano, T.; Katoh, Y.; Doki, T.; Hohdatsu, T. Effect of Chloroquine on Feline Infectious Peritonitis Virus Infection in Vitro and in Vivo. *Antivir. Res.* **2013**, *99*, 100–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Takano, T.; Satoh, K.; Doki, T.; Tanabe, T.; Hohdatsu, T. Antiviral Effects of Hydroxychloroquine and Type I Interferon on In Vitro Fatal Feline Coronavirus Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 576. [[CrossRef](#)]
21. Yang, C.-W.; Peng, T.-T.; Hsu, H.-Y.; Lee, Y.-Z.; Wu, S.-H.; Lin, W.-H.; Ke, Y.-Y.; Hsu, T.-A.; Yeh, T.-K.; Huang, W.-Z.; et al. Repurposing Old Drugs as Antiviral Agents for Coronaviruses. *Biomed. J.* **2020**, *43*, 368–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. McDonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. Identification and Characterisation of Small Molecule Inhibitors of Feline Coronavirus Replication. *Vet. Microbiol.* **2014**, *174*, 438–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pedersen, N.C.; Perron, M.; Bannasch, M.; Montgomery, E.; Murakami, E.; Liepnieks, M.; Liu, H. Efficacy and Safety of the Nucleoside Analog GS-441524 for Treatment of Cats with Naturally Occurring Feline Infectious Peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* **2019**, *21*, 271–281. [[CrossRef](#)]
24. Dickinson, P.J.; Bannasch, M.; Thomasy, S.M.; Murthy, V.D.; Vernau, K.M.; Liepnieks, M.; Montgomery, E.; Knickelbein, K.E.; Murphy, B.; Pedersen, N.C. Antiviral Treatment Using the Adenosine Nucleoside Analogue GS-441524 in Cats with Clinically Diagnosed Neurological Feline Infectious Peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 1587–1593. [[CrossRef](#)]
25. Murphy, B.G.; Perron, M.; Murakami, E.; Bauer, K.; Park, Y.; Eckstrand, C.; Liepnieks, M.; Pedersen, N.C. The Nucleoside Analog GS-441524 Strongly Inhibits Feline Infectious Peritonitis (FIP) Virus in Tissue Culture and Experimental Cat Infection Studies. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 226–233. [[CrossRef](#)]
26. Yu, J.; Kimble, B.; Norris, J.M.; Govendir, M. Pharmacokinetic Profile of Oral Administration of Mefloquine to Clinically Normal Cats: A Preliminary In-Vivo Study of a Potential Treatment for Feline Infectious Peritonitis (FIP). *Animals* **2020**, *10*, 1000. [[CrossRef](#)]
27. Weiss, R.C.; Ostrom-Ram, T. Inhibitory Effects of Ribavirin Alone or Combined with Human Alpha Interferon on Feline Infectious Peritonitis Virus Replication in Vitro. *Vet. Microbiol.* **1989**, *20*, 255–265. [[CrossRef](#)]

28. Barlough, J.E.; Scott, F.W. Effectiveness of Three Antiviral Agents against FIP Virus in Vitro. *Vet. Rec.* **1990**, *126*, 556–558.
29. Barlough, J.E.; Shacklett, B.L. Antiviral Studies of Feline Infectious Peritonitis Virus in Vitro. *Vet. Rec.* **1994**, *135*, 177–179. [[CrossRef](#)]
30. McDonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. Combination siRNA Therapy against Feline Coronavirus Can Delay the Emergence of Antiviral Resistance in Vitro. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kim, Y.; Liu, H.; Galasiti Kankanamalage, A.C.; Weerasekara, S.; Hua, D.H.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O.; Pedersen, N.C. Reversal of the Progression of Fatal Coronavirus Infection in Cats by a Broad-Spectrum Coronavirus Protease Inhibitor. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005650. [[CrossRef](#)]
32. Pedersen, N.C.; Kim, Y.; Liu, H.; Galasiti Kankanamalage, A.C.; Eckstrand, C.; Groutas, W.C.; Bannasch, M.; Meadows, J.M.; Chang, K.-O. Efficacy of a 3C-like Protease Inhibitor in Treating Various Forms of Acquired Feline Infectious Peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* **2018**, *20*, 378–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kim, Y.; Mandadapu, S.R.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Potent Inhibition of Feline Coronaviruses with Peptidyl Compounds Targeting Coronavirus 3C-like Protease. *Antivir. Res.* **2013**, *97*, 161–168. [[CrossRef](#)]
34. Ke, Y.-Y.; Peng, T.-T.; Yeh, T.-K.; Huang, W.-Z.; Chang, S.-E.; Wu, S.-H.; Hung, H.-C.; Hsu, T.-A.; Lee, S.-J.; Song, J.-S.; et al. Artificial Intelligence Approach Fighting COVID-19 with Repurposing Drugs. *Biomed. J.* **2020**, *43*, 355–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hsieh, L.-E.; Lin, C.-N.; Su, B.-L.; Jan, T.-R.; Chen, C.-M.; Wang, C.-H.; Lin, D.-S.; Lin, C.-T.; Chueh, L.-L. Synergistic Antiviral Effect of Galanthus Nivalis Agglutinin and Nelfinavir against Feline Coronavirus. *Antivir. Res.* **2010**, *88*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Doki, T.; Tarusawa, T.; Hohdatsu, T.; Takano, T. In Vivo Antiviral Effects of U18666A Against Type I Feline Infectious Peritonitis Virus. *Pathogens* **2020**, *9*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Takano, T.; Akiyama, M.; Doki, T.; Hohdatsu, T. Antiviral Activity of Itraconazole against Type I Feline Coronavirus Infection. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Doki, T.; Toda, M.; Hasegawa, N.; Hohdatsu, T.; Takano, T. Therapeutic Effect of an Anti-Human-TNF-Alpha Antibody and Itraconazole on Feline Infectious Peritonitis. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1197–1206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Regan, A.D.; Whittaker, G.R. Utilization of DC-SIGN for Entry of Feline Coronaviruses into Host Cells. *J. Virol.* **2008**, *82*, 11992–11996. [[CrossRef](#)]
40. Shirato, K.; Kanou, K.; Kawase, M.; Matsuyama, S. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01387-16. [[CrossRef](#)]
41. Van Hamme, E.; Dewerchin, H.L.; Cornelissen, E.; Verhasselt, B.; Nauwynck, H.J. Clathrin- and Caveolae-Independent Entry of Feline Infectious Peritonitis Virus in Monocytes Depends on Dynamin. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 2147–2156. [[CrossRef](#)]
42. Doki, T.; Takano, T.; Koyama, Y.; Hohdatsu, T. Identification of the Peptide Derived from S1 Domain That Inhibits Type I and Type II Feline Infectious Peritonitis Virus Infection. *Virus Res.* **2015**, *204*, 13–20. [[CrossRef](#)]
43. Chen, H.-W.; Cheng, J.X.; Liu, M.-T.; King, K.; Peng, J.-Y.; Zhang, X.-Q.; Wang, C.-H.; Shresta, S.; Schooley, R.T.; Liu, Y.-T. Inhibitory and Combinatorial Effect of Diphyllin, a v-ATPase Blocker, on Influenza Viruses. *Antivir. Res.* **2013**, *99*, 371–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kono, M.; Tatsumi, K.; Imai, A.M.; Saito, K.; Kuriyama, T.; Shirasawa, H. Inhibition of Human Coronavirus 229E Infection in Human Epithelial Lung Cells (L132) by Chloroquine: Involvement of P38 MAPK and ERK. *Antivir. Res.* **2008**, *77*, 150–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Murray, S.M.; Down, C.M.; Boulware, D.R.; Stauffer, W.M.; Cavert, W.P.; Schacker, T.W.; Brenchley, J.M.; Douek, D.C. Reduction of Immune Activation with Chloroquine Therapy during Chronic HIV Infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12082–12086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of Chloroquine on Viral Infections: An Old Drug against Today's Diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722–727. [[CrossRef](#)]
47. Vincent, M.J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B.R.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Seidah, N.G.; Nichol, S.T. Chloroquine Is a Potent Inhibitor of SARS Coronavirus Infection and Spread. *Virol. J.* **2005**, *2*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Liu, J.; Cao, R.; Xu, M.; Wang, X.; Zhang, H.; Hu, H.; Li, Y.; Hu, Z.; Zhong, W.; Wang, M. Hydroxychloroquine, a Less Toxic Derivative of Chloroquine, Is Effective in Inhibiting SARS-CoV-2 Infection in Vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. McChesney, E.W. Animal Toxicity and Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine Sulfate. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 11–18. [[CrossRef](#)]
50. Sawicki, S.G.; Sawicki, D.L. Coronaviruses Use Discontinuous Extension for Synthesis of Subgenome-Length Negative Strands. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1995**, *380*, 499–506. [[CrossRef](#)]
51. Yin, Y.; Li, T.; Wang, C.; Liu, X.; Ouyang, H.; Ji, W.; Liu, J.; Liao, X.; Li, J.; Hu, C. A Retrospective Study of Clinical and Laboratory Features and Treatment on Cats Highly Suspected of Feline Infectious Peritonitis in Wuhan, China. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Addie, D.D.; Curran, S.; Bellini, F.; Crowe, B.; Sheehan, E.; Ukrainchuk, L.; Decaro, N. Oral Mutian®X Stopped Faecal Feline Coronavirus Shedding by Naturally Infected Cats. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *130*, 222–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Addie, D.D.; Covell-Ritchie, J.; Jarrett, O.; Fosbery, M. Rapid Resolution of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis with an Oral Adenosine Nucleoside Analogue and Feline Interferon Omega. *Viruses* **2020**, *12*, 1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Jones, S.; Novicoff, W.; Nadeau, J.; Evans, S. Unlicensed GS-441524-Like Antiviral Therapy Can Be Effective for at-Home Treatment of Feline Infectious Peritonitis. *Animals* **2021**, *11*, 2257. [[CrossRef](#)]

55. Weiss, R.C.; Cox, N.R.; Martinez, M.L. Evaluation of Free or Liposome-Encapsulated Ribavirin for Antiviral Therapy of Experimentally Induced Feline Infectious Peritonitis. *Res. Vet. Sci.* **1993**, *55*, 162–172. [[CrossRef](#)]
56. Merigan, T.C. Systemic Antivirals for Therapy of Herpesvirus Diseases. *Dev. Biol. Stand.* **1982**, *52*, 527–533.
57. Qureshi, A.; Tantray, V.G.; Kirmani, A.R.; Ahangar, A.G. A Review on Current Status of Antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28*, e1976. [[CrossRef](#)]
58. McDonagh, P.; Sheehy, P.A.; Norris, J.M. In Vitro Inhibition of Feline Coronavirus Replication by Small Interfering RNAs. *Vet. Microbiol.* **2011**, *150*, 220–229. [[CrossRef](#)]
59. Knauert, M.P.; Glazer, P.M. Triplex Forming Oligonucleotides: Sequence-Specific Tools for Gene Targeting. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2243–2251. [[CrossRef](#)]
60. Choong, O.K.; Mehrbod, P.; Tejo, B.A.; Omar, A.R. In Vitro Antiviral Activity of Circular Triple Helix Forming Oligonucleotide RNA towards Feline Infectious Peritonitis Virus Replication. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 654712. [[CrossRef](#)]
61. Kim, Y.; Shivanna, V.; Narayanan, S.; Prior, A.M.; Weerasekara, S.; Hua, D.H.; Kankanamalage, A.C.G.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Broad-Spectrum Inhibitors against 3C-Like Proteases of Feline Coronaviruses and Feline Caliciviruses. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4942–4950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kim, Y.; Lovell, S.; Tiew, K.-C.; Mandadapu, S.R.; Alliston, K.R.; Battaile, K.P.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O. Broad-Spectrum Antivirals against 3C or 3C-Like Proteases of Picornaviruses, Noroviruses, and Coronaviruses. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11754–11762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Perera, K.D.; Rathnayake, A.D.; Liu, H.; Pedersen, N.C.; Groutas, W.C.; Chang, K.-O.; Kim, Y. Characterization of Amino Acid Substitutions in Feline Coronavirus 3C-like Protease from a Cat with Feline Infectious Peritonitis Treated with a Protease Inhibitor. *Vet. Microbiol.* **2019**, *237*, 108398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yamamoto, N.; Yang, R.; Yoshinaka, Y.; Amari, S.; Nakano, T.; Cinatl, J.; Rabenau, H.; Doerr, H.W.; Hunsmann, G.; Otaka, A.; et al. HIV Protease Inhibitor Nelfinavir Inhibits Replication of SARS-Associated Coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *318*, 719–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Takano, T.; Endoh, M.; Fukatsu, H.; Sakurada, H.; Doki, T.; Hohdatsu, T. The Cholesterol Transport Inhibitor U18666A Inhibits Type I Feline Coronavirus Infection. *Antivir. Res.* **2017**, *145*, 96–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Van Damme, E.; De Meyer, S.; Bojkova, D.; Ciesek, S.; Cinatl, J.; De Jonghe, S.; Jochmans, D.; Leyssen, P.; Buyck, C.; Neyts, J.; et al. In Vitro Activity of Itraconazole against SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 4454–4460. [[CrossRef](#)]
67. Boothe, D.M.; Herring, I.; Calvin, J.; Way, N.; Dvorak, J. Itraconazole Disposition after Single Oral and Intravenous and Multiple Oral Dosing in Healthy Cats. *Am. J. Vet. Res.* **1997**, *58*, 872–877.
68. Kameshima, S.; Kimura, Y.; Doki, T.; Takano, T.; Park, C.-H.; Itoh, N. Clinical Efficacy of Combination Therapy of Itraconazole and Prednisolone for Treating Effusive Feline Infectious Peritonitis. *J. Vet. Med. Sci.* **2020**, *82*, 1492–1496. [[CrossRef](#)]
69. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Osawa, S.; Inoue, M.; Tanaka, S.; Sasaki, T. Suppression of Feline Coronavirus Replication In Vitro by Cyclosporin A. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 41. [[CrossRef](#)]
70. Tanaka, Y.; Sato, Y.; Takahashi, D.; Matsumoto, H.; Sasaki, T. Treatment of a Case of Feline Infectious Peritonitis with Cyclosporin A. *Vet. Rec. Case Rep.* **2015**, *3*, e000134. [[CrossRef](#)]
71. Mochizuki, M.; Nakatani, H.; Yoshida, M. Inhibitory Effects of Recombinant Feline Interferon on the Replication of Feline Enteropathogenic Viruses in Vitro. *Vet. Microbiol.* **1994**, *39*, 145–152. [[CrossRef](#)]
72. Ritz, S.; Egberink, H.; Hartmann, K. Effect of Feline Interferon-Omega on the Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 1193–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Weiss, R.C.; Toivio-Kinnucan, M. Inhibition of Feline Infectious Peritonitis Virus Replication by Recombinant Human Leukocyte (Alpha) Interferon and Feline Fibroblastic (Beta) Interferon. *Am. J. Vet. Res.* **1988**, *49*, 1329–1335.
74. Weiss, R.C.; Cox, N.R.; Ostrom-Ram, T. Effect of Interferon or Propionibacterium Acnes on the Course of Experimentally Induced Feline Infectious Peritonitis in Specific-Pathogen-Free and Random-Source Cats. *Am. J. Vet. Res.* **1990**, *51*, 726–733.
75. Addie, D.; Belák, S.; Boucraut-Baralon, C.; Egberink, H.; Frymus, T.; Gruffydd-Jones, T.; Hartmann, K.; Hosie, M.J.; Lloret, A.; Lutz, H.; et al. Feline Infectious Peritonitis. ABCD Guidelines on Prevention and Management. *J. Feline Med. Surg.* **2009**, *11*, 594–604. [[CrossRef](#)]
76. Legendre, A.M.; Kuritz, T.; Galyon, G.; Baylor, V.M.; Heidel, R.E. Polyphenyl Immunostimulant Treatment of Cats with Presumptive Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis In a Field Study. *Front. Vet. Sci.* **2017**, *4*, 7. [[CrossRef](#)]
77. González-Grande, R.; Jiménez-Pérez, M.; González Arjona, C.; Mostazo Torres, J. New Approaches in the Treatment of Hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 1421–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Heo, Y.-A.; Deeks, E.D. Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir: A Review in Chronic Hepatitis C. *Drugs* **2018**, *78*, 577–587. [[CrossRef](#)]
79. Perelson, A.S.; Essunger, P.; Cao, Y.; Vesanen, M.; Hurley, A.; Saksela, K.; Markowitz, M.; Ho, D.D. Decay Characteristics of HIV-1-Infected Compartments during Combination Therapy. *Nature* **1997**, *387*, 188–191. [[CrossRef](#)]
80. Cook, S.E.; Vogel, H.; Castillo, D.; Olsen, M.; Pedersen, N.; Murphy, B.G. A Rational Approach to Identifying Effective Combined Anticoronaviral Therapies against Feline Coronavirus. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
81. Vuong, W.; Fischer, C.; Khan, M.B.; van Belkum, M.J.; Lamer, T.; Willoughby, K.D.; Lu, J.; Arutyunova, E.; Joyce, M.A.; Saffran, H.A.; et al. Improved SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors Based on Feline Antiviral Drug GC376: Structural Enhancements, Increased Solubility, and Micellar Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *222*, 113584. [[CrossRef](#)]

82. Yan, V.C.; Muller, F.L. Advantages of the Parent Nucleoside GS-441524 over Remdesivir for COVID-19 Treatment. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1361–1366. [[CrossRef](#)]
83. Barre, A.; Van Damme, E.J.M.; Simplicien, M.; Le Poder, S.; Klonjkowski, B.; Benoist, H.; Peyrade, D.; Rougé, P. Man-Specific Lectins from Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria, as Potential Blockers for SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronaviruses: Biomedical Perspectives. *Cells* **2021**, *10*, 1619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Stefanik, M.; Strakova, P.; Haviernik, J.; Miller, A.D.; Ruzek, D.; Eyer, L. Antiviral Activity of Vacuolar ATPase Blocker Diphyllin against SARS-CoV-2. *Microorganisms* **2021**, *9*, 471. [[CrossRef](#)]
85. Keyaerts, E.; Vijgen, L.; Pannecouque, C.; Van Damme, E.; Peumans, W.; Egberink, H.; Balzarini, J.; Van Ranst, M. Plant Lectins Are Potent Inhibitors of Coronaviruses by Interfering with Two Targets in the Viral Replication Cycle. *Antivir. Res.* **2007**, *75*, 179–187. [[CrossRef](#)]
86. Van der Meer, F.J.U.M.; de Haan, C.A.M.; Schuurman, N.M.P.; Haijema, B.J.; Verheije, M.H.; Bosch, B.J.; Balzarini, J.; Egberink, H.F. The Carbohydrate-Binding Plant Lectins and the Non-Peptidic Antibiotic Pradimicin A Target the Glycans of the Coronavirus Envelope Glycoproteins. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 741–749. [[CrossRef](#)]
87. Payne, H.R.; Storz, J.; Henk, W.G. Initial Events in Bovine Coronavirus Infection: Analysis through Immunogold Probes and Lysosomotropic Inhibitors. *Arch. Virol.* **1990**, *114*, 175–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Keyaerts, E.; Vijgen, L.; Maes, P.; Neyts, J.; Van Ranst, M. In Vitro Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 264–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Keyaerts, E.; Li, S.; Vijgen, L.; Rysman, E.; Verbeeck, J.; Van Ranst, M.; Maes, P. Antiviral Activity of Chloroquine against Human Coronavirus OC43 Infection in Newborn Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3416–3421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. De Wilde, A.H.; Jochmans, D.; Posthuma, C.C.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; van Nieuwkoop, S.; Bestebroer, T.M.; van den Hoogen, B.G.; Neyts, J.; Snijder, E.J. Screening of an FDA-Approved Compound Library Identifies Four Small-Molecule Inhibitors of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4875–4884. [[CrossRef](#)]
91. Ding, N.; Zhao, K.; Lan, Y.; Li, Z.; Lv, X.; Su, J.; Lu, H.; Gao, F.; He, W. Induction of Atypical Autophagy by Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Contributes to Viral Replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wang, M.; Cao, R.; Zhang, L.; Yang, X.; Liu, J.; Xu, M.; Shi, Z.; Hu, Z.; Zhong, W.; Xiao, G. Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) in Vitro. *Cell Res.* **2020**, *30*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yao, X.; Ye, F.; Zhang, M.; Cui, C.; Huang, B.; Niu, P.; Liu, X.; Zhao, L.; Dong, E.; Song, C.; et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 732–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Shionoya, K.; Yamasaki, M.; Iwanami, S.; Ito, Y.; Fukushi, S.; Ohashi, H.; Saso, W.; Tanaka, T.; Aoki, S.; Kuramochi, K.; et al. Mefloquine, a Potent Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Drug as an Entry Inhibitor in Vitro. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 651403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cao, J.; Forrest, J.C.; Zhang, X. A Screen of the NIH Clinical Collection Small Molecule Library Identifies Potential Anti-Coronavirus Drugs. *Antivir. Res.* **2015**, *114*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Chandra, P.; Rabenau, H.; Doerr, H. Glycyrrhizin, an Active Component of Licorice Roots, and Replication of SARS-Associated Coronavirus. *Lancet* **2003**, *361*, 2045–2046. [[CrossRef](#)]
97. Agostini, M.L.; Andres, E.L.; Sims, A.C.; Graham, R.L.; Sheahan, T.P.; Lu, X.; Smith, E.C.; Case, J.B.; Feng, J.Y.; Jordan, R.; et al. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *MBio* **2018**, *9*, e00221-18. [[CrossRef](#)]
98. Li, Y.; Cao, L.; Li, G.; Cong, F.; Li, Y.; Sun, J.; Luo, Y.; Chen, G.; Li, G.; Wang, P.; et al. Remdesivir Metabolite GS-441524 Effectively Inhibits SARS-CoV-2 Infection in Mouse Models. *J. Med. Chem.* **2021**. [[CrossRef](#)]
99. Macintyre, G.; Curry, B.; Wong, F.; Anderson, R. Hygromycin B Therapy of a Murine Coronaviral Hepatitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 2125–2127. [[CrossRef](#)]
100. Kapil, S.; Richardson, K.L.; Maag, T.R.; Goyal, S.M. Characterization of Bovine Coronavirus Isolates/ from Eight Different States in the USA. *Vet. Microbiol.* **1999**, *67*, 221–230. [[CrossRef](#)]
101. Hu, Y.; Ma, C.; Szeto, T.; Hurst, B.; Tarbet, B.; Wang, J. Boceprevir, Calpain Inhibitors II and XII, and GC-376 Have Broad-Spectrum Antiviral Activity against Coronaviruses in Cell Culture. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
102. Wrensch, F.; Winkler, M.; Pöhlmann, S. IFITM Proteins Inhibit Entry Driven by the MERS-Coronavirus Spike Protein: Evidence for Cholesterol-Independent Mechanisms. *Viruses* **2014**, *6*, 3683–3698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France

Corinne Sailleau<sup>1</sup>  | Marine Dumarest<sup>1</sup> | Jessica Vanhomwegen<sup>2,3</sup> | Manon Delaplace<sup>1</sup> | Valerie Caro<sup>2,3</sup> | Aurélie Kwasiborski<sup>2,3</sup> | Véronique Hourdel<sup>2,3</sup> | Patrick Chevaillier<sup>4</sup> | Alix Barbarino<sup>5</sup> | Loïc Comtet<sup>6</sup> | Philippe Pourquier<sup>6</sup> | Bernard Klonjowski<sup>1</sup> | Jean-Claude Manuguerra<sup>2,3</sup> | Stephan Zientara<sup>1</sup> | Sophie Le Poder<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR VIROLOGIE, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, Laboratoire de santé animale, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup>Environment and Infectious Risk Unit, Laboratory for Urgent Response to Biological Threats, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>3</sup>The OIE Collaborating Centre for Detection and Identification in Humans of Emerging Animal Pathogens, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>4</sup>Clinique vétérinaire, Savigny sur Orge, France

<sup>5</sup>CHUVA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

<sup>6</sup>IDVET, Grabels, France

## Correspondence

Sophie Le Poder, UMR Virologie, ENVA, Anses, INRAE, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France.  
Email: sophie.lepoder@vet-alfort.fr

## Abstract

After its first description in Wuhan (China), SARS-CoV-2 the agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19) rapidly spread worldwide. Previous studies suggested that pets could be susceptible to SARS-CoV-2. Here, we investigated the putative infection by SARS-CoV-2 in 22 cats and 11 dogs from owners previously infected or suspected of being infected by SARS-CoV-2. For each animal, rectal, nasopharyngeal swabs and serum were taken. Swabs were submitted to RT-qPCR assays targeting 2 genes of SARS-CoV-2. All dogs were tested SARS-CoV-2 negative. One cat was tested positive by RT-qPCR on rectal swab. Nasopharyngeal swabs from this animal were tested negative. This cat showed mild respiratory and digestive signs. Serological analysis confirms the presence of antibodies against the SARS-CoV-2 in both serum samples taken 10 days apart. Genome sequence analysis revealed that the cat SARS-CoV-2 belongs to the phylogenetic clade A2a like most of the French human SARS-CoV-2. This study reports for the first time the natural infection of a cat in France (near Paris) probably through their owners. There is currently no evidence that cats can spread COVID-19 and owners should not abandon their pets or compromise their welfare.

## KEYWORDS

cats, ELISA, luminex, next-generation sequencing, pets, SARS-CoV-2

## 1 | INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first reported in Wuhan (Wu et al., 2020; Zou et al., 2020), China, and rapidly spread worldwide. Previous studies suggested cats could be a susceptible species to SARS-CoV-2 (Shi et al., 2020; Zhang et al., 2020). Two cases of natural infection in dogs, without symptoms, were also reported in Hong Kong (Sit et al., 2020). Only 4 naturally infected cats have been reported to date (ProMED posts

or OIE notifications). Among them, two exhibited cough and another one mild respiratory and digestive signs. SARS-CoV-2 infection was also reported in lions and tigers in the zoo in New York, suggesting susceptibility of wild *Felidae* to this virus.

We investigated the putative infection by SARS-CoV-2 in cats and dogs from owners previously confirmed or suspected of being infected by SARS-CoV-2. Among them, one cat was tested positive by RT-qPCR on rectal swabs and serological analysis. The SARS-CoV-2 genome has been almost completely sequenced and clusters with the French human sequences circulating among infected humans.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Cohort—sample collection

A total of 22 cats and 11 dogs were sampled from veterinary clinics (in the Paris or Grand Est area) or the pet hospital of the Alfort veterinary school (CHUVA) in April 2020. All animals selected in this study showed clinical signs and belonged to owners confirmed or suspected of having COVID-19. The clinical pictures reported were anorexia, hyperthermia, lethargy, diarrhoea, cough, bronchopneumonia and respiratory distress. Cats and dogs ranged in age from 6 months to 16 years and 2.5 months to 14 years, respectively.

Serum, nasopharyngeal (NP) and rectal (R) swabs were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The time between sampling and the appearance of the first symptoms ranged from 0 to 21 days depending on the animals.

### 2.2 | RNA extraction and RT-PCR

NP and R swabs were resuspended by vortexing in 300  $\mu\text{l}$  of PBS. Total RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of supernatant using either the robotic workstation 'QIAcube' and the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen; reference: 52,906) or robotic method based on magnetic beads (KingFisher with the MagVet Universal Isolation kit) according to the manufacturer's instructions and the protocols classically used in our laboratory for other viruses such as foot-and-mouth disease, bluetongue or West Nile viruses. Five  $\mu\text{l}$  of eluted RNA was used for the RT-qPCR assay using the commercial kit Bio-T kit® Covid-19 (BioSella) targeting the E gene.

At the same time, all the rectal swabs were tested by RT-qPCR targeting the feline coronavirus (FCoV) using the protocol previously described (d'Orengiani, Duarte, Pavio, & Le Poder, 2015).

SARS-CoV-2 confirmatory tests were carried out in the OIE collaborating Centre in Institut Pasteur using the real-time duplex RT-PCR (targeting two regions of the RdRP gene) developed by the French National Reference Centre for Respiratory Viruses and the real-time RT-qPCR (targeting the E gene) from the Charité protocol (see WHO coronavirus disease COVID-19 technical guidance: laboratory testing for 2019-nCoV in humans, available from <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf>).

### 2.3 | Next-generation sequencing

#### 2.3.1 | Specimen RNA pre-treatment and amplicon-based protocol

The ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) was used to obtain single-strand cDNA from SARS-CoV-2-positive specimen RNA extract using random hexamers. For the multiplex PCR approach, the general method of multiplex PCR was applied using Version 3 of amplicon sets, as described in (<https://artic.network/ncov-2019>). After 40 rounds of amplification, the PCR products were

cleaned up with AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) and quantified with the Qubit 2.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific).

#### 2.3.2 | Illumina iSeq100 system sequencing

The sequencing-ready library was prepared using the Nextera DNA Flex Prep kit (Illumina, USA). The library was qualified on an Agilent Technologies 2,100 Bioanalyzer using a high-sensitivity DNA chip following the manufacturer's instructions. The resulting library was sequenced using the iSeq100™ System (Illumina), generating  $2 \times 150$  bp read length data.

#### 2.3.3 | Illumina bioinformatics workflow

To remove low-quality reads, trim off low-quality and contaminant residues and filter out duplicated reads, fqCleaner v.0.5.0 was used, with Phred quality score of 28. Filtered reads were mapped against SARS-CoV-2 reference (NC\_045512) using Burrows-Wheeler Aligner MEM algorithm (BWA-MEM) (v0.7.7). SAMtools were used to sort BAM files, to generate alignment statistics and to obtain consensus sequence.

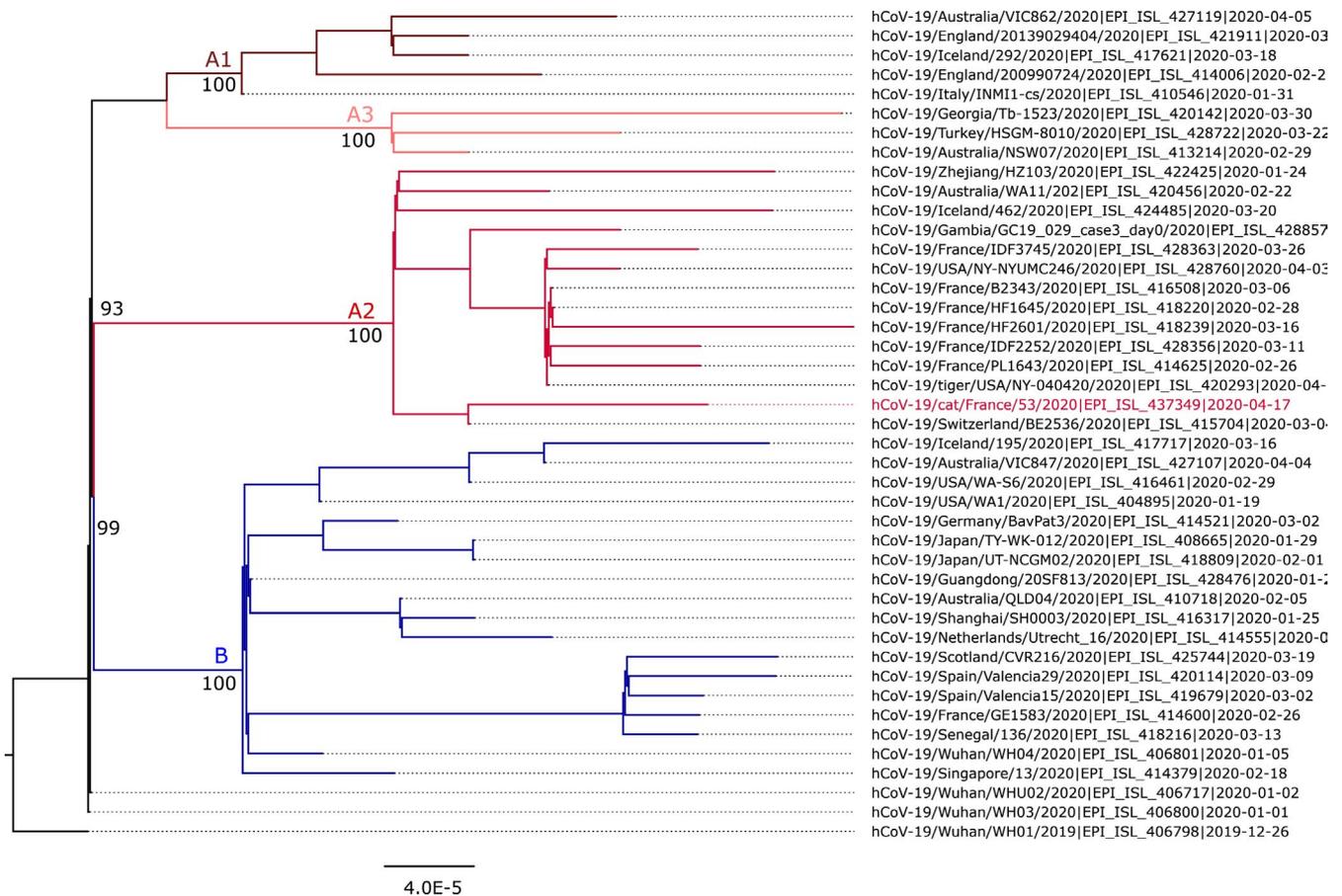
## 2.4 | Serological analysis

### 2.4.1 | Microsphere immunoassay—MIA—« luminex »

Serum samples were tested using a microsphere immunoassay (MIA) for the presence of specific immunoglobulins against 5 coronavirus antigens: the SARS-CoV-2, SARS-CoV, NL63 and 229E nucleoproteins (NP) and the MERS-CoV spike (S) protein. Distinct MagPlex microsphere sets (Luminex Corp.) were bound to the recombinant viral proteins using the amine coupling kit (Bio-Rad Laboratories) according to manufacturers' instructions. The MIA procedure was performed as described previously with minor modifications (Vanhomwegen et al., 2017). Briefly, microsphere mixtures were sequentially incubated in the dark under constant shaking with a 1:400 dilution of serum samples, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  biotinylated protein A (Thermo Fisher Scientific) and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptavidin-R-phycoerythrin (Life technologies). After the final incubation, the median fluorescence intensity (MFI) of each antigen-coupled microsphere set was quantified for each sample using a BioPlex 200 instrument (Bio-Rad Laboratories). The seropositivity cut-off value was calculated for each antigen as three standard deviations above the mean MFI of ten negative control sera (sampled before 2019).

### 2.4.2 | ELISA

Cat sera were tested by an adapted version of the ID screen® SARS-CoV-2-N IgG indirect ELISA (IDvet). The kit specifically detects



**FIGURE 1** Phylogenetic analysis of French cat SARS-CoV-2 genome sequence. Multiple sequence alignment of 43 SARS-CoV-2 genomes (available in GISAID database) was obtained using MAFFT version 7.023b (Katoh & Standley, 2013). The unrooted phylogenetic tree was constructed using RAxML (Stamatakis, Hoover, & Rougemont, 2008) with general time-reversible plus gamma distribution substitution model and a rapid bootstrap (i.e. model GTR + I + G, bootstrap = 1,000). Nextstrain clades are indicated next to the corresponding nodes, and branches are coloured distinctly [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies. For this study, the conjugate supplied in the kit was changed to a multi-species conjugate to detect cat antibodies. Briefly, samples to be tested were diluted 1:20 in the sample dilution buffer and incubated for 45 min at room temperature. After washes, the multi-species conjugate, diluted in conjugate buffer, was added for 30 min at room temperature. The TMB substrate was added after the final washes, and the optical densities read at 450 nm after addition of stop solution. Calculation of ELISA cut-off value was established by the analysis of 16 negative cat control sera (sampled before 2019). The mean ( $\bar{x}$ ) and standard deviation (SD) of these 16 negative sera were calculated. The cut-off value was taken as  $\bar{x} + 3SD$ . OD values above this value were considered positive.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

All dogs were found SARS-CoV-2 PCR negative. Out of the 22 cats tested, one was SARS-CoV-2 RT-qPCR positive with a Ct of 29 from the rectal swab whereas nasopharyngeal swabs were negative. Another cat was found positive for the feline coronavirus (Ct 25.6).

The RNA was sent to Institut Pasteur for confirmation of SARS-CoV-2 and was confirmed PCR positive (CT 43, 30 and 32 with RdRp IP2, RdRp IP4 and E genes).

The rectal swab extract found positive by RT-qPCR was subjected to targeted iSeq100 system sequencing, and the run produced 3,858,853 raw reads with a Phred quality score of 28. By using BWA-MEM, the mapping against SARS-CoV-2 reference (NC\_045512) allowed the retrieval of high-quality viral genomic sequences, with a read depth of 30x, covering around 94% of the full-length genome (sequence data have been deposited in GISAID with accession number EPI\_ISL\_437349).

Sequence analysis of the cat SARS-CoV-2 genome showed that it belongs to the Nextstrain (<https://nextstrain.org/>) proposed phylogenetic clade A2a, which is consistent with the phylogenetic analysis of the recent human French SARS-CoV-2. Compared to the Wuhan reference sequence, and on the basis of the 94% covered genome, the cat SARS-CoV-2 sequence displays eight nucleotide mutations, with two not yet described in ORF1ab (T10800C and A13394G). Among these mutations, five have led to amino acid mutations, of which four in ORF1ab (T265I, I3512T, K4377E and P4715L). It should also be noted that the cat SARS-CoV-2 genome presents the amino

acid mutation D614G in the spike glycoprotein, specific of the clade A2 and encompassing most of the French SARS-CoV-2 sequences (Figure 1).

The confirmed positive cat was a 9-year-old female of European breed. It has been hospitalized on 13 April due to anorexia, vomiting and cough. These clinical signs occurred 17 days after her owner has been sick from COVID-19. The first samples (NP and R swabs, serum) were taken on 17 of April, eight days after the beginning of symptoms. A second set of samples was taken on cat that was healed (on 27 April), and the PCR results were negative for both swabs. These results suggest a rapid clearance of the virus from the intestinal tract, which is consistent with experimental infection of cats suggesting presence of infectious virus only until day 6 post-infection (Shi et al., 2020). Serological analysis by MIA showed a strong positive signal against SARS-CoV-2 for the two sera taken at 10 days apart (Figure 2). The value of fluorescence emitted was 36 times higher than the average of the values emitted by control cats (sera sampled before the appearance of COVID-19). A cross-reactivity was observed with the N SARS-CoV antigen but given the high sequence identity between the two antigens, this result was expected. Both sera were also confirmed positive by ELISA. The mean value of the sixteen cats sampled before 2019, and the apparition of the SARS-CoV-2 virus gave a mean OD value of 0,074, with a standard deviation of 0.0116. Therefore, the cut-off was OD450nm: 0.109 (mean of negative values + 3x SD). The two sera taken at 10 days apart gave a mean value of 0.682 and 0.356, respectively. These OD values, clearly above the standard cut-off criteria (OD450 nm 0.109), reveal the presence of specific antibodies to the SARS-CoV-2. The serological results (MIA + ELISA) confirm that the cat was able to replicate SARS-CoV-2.

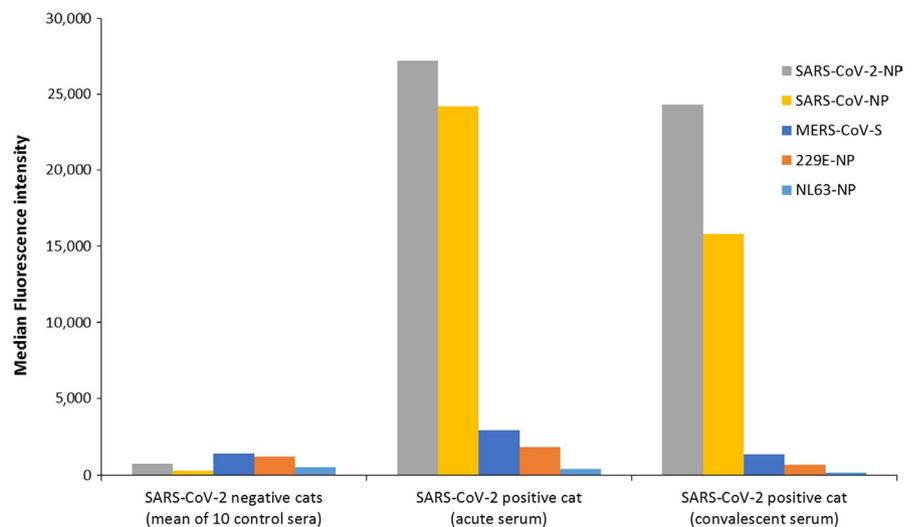
Cats had already been tested positive for the SARS-CoV-2 in the United States, Belgium, Hong Kong and Wuhan, China, where outbreaks occurred. In the cases reported in Belgium and in the United States, clinical signs were reported (diarrhoea, vomiting and breathing difficulty for the first and respiratory illness for the second) whereas no clinical sign was detected in Hong Kong. Experimentally, pulmonary lesions have been described in young cats (Shi et al.,

2020). Serological tests carried out on cats in Wuhan demonstrated that that SARS-CoV-2 has infected cat populations in Wuhan during the outbreak (15 of 102 tested were positive in ELISA, and 11 had neutralizing antibodies with titres ranging from 1/20 to 1/1080). The highest titres correspond to cats living with owners with confirmed COVID-19. No information on clinical signs in any of the tested cats is available. Recently, Halfmann et al. (2020) showed the possible transmission of SARS-CoV-2 between domestic cats in close contact. In this study, the virus could be detected only in faeces. In other natural infections (the two cats in New York for instance), the virus was detected only in nasopharyngeal swabs whereas for the cat described in Belgium, the virus was found in the stool and vomits. The localization of the virus may vary during the clinical phase of the disease or may depend on the clinical form. The cat described in this study and the one from Belgium developed digestive symptoms which could explain the presence of the virus in faeces whereas both cats in New York developed only respiratory symptoms. Further studies are needed to confirm the value of rectal versus nasopharyngeal sampling for better detection of the virus in infected animals, and right now it would be better to investigate both samples.

As in previously identified cases worldwide, the French cat was living with a person who was confirmed positive for COVID-19. However, a previous study carried out on the animals of veterinary students of the Alfort veterinary school (Enva, Maisons-Alfort), also infected by SARS-CoV-2 suggested that cats and dogs are not easily infected by the SARS-CoV-2, even when they are in close contact with infected owners (Temmam et al., 2020). Large serological analyses will be necessary to evaluate the real circulation of the SARS-CoV-2 among pets.

Concerning the infection of dogs with SARS-CoV-2, two cases have been reported in Honk Kong in February and March 2020 (Sit et al., 2020). In both cases, dogs were placed under quarantine after their owner was hospitalized due to COVID-19. Samples taken from the dogs were tested positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR and serological analysis. Both animals did not exhibit any specific clinical signs. Shi et al., (2020) have shown by experimental infection that dogs have low susceptibility to SARS-CoV-2. In our investigations,

**FIGURE 2** Comparison of SARS-CoV-2 antibody levels detected in the acute and convalescent serum samples of the SARS-CoV-2-positive cat and a panel of 10 negative control sera using a pentaplex Multiplex Immunoassay (MIA). The pentaplex MIA comprised a mixture of microspheres coupled to the nucleoproteins (NP) of SARS-CoV-2, SARS-CoV, 229E and NL63 and the spike protein (S) of MERS-CoV. The relative antibody levels in the serum samples are expressed as median fluorescence intensities (MFI) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



none of the 11 dogs tested were PCR positive despite having been in close contact with their infected owners and exhibiting clinical signs.

Even though the risk of transmission of the SARS-CoV-2 to the cat appears to be low, the authors therefore advise people with COVID-19 to limit close contact with their cats, without compromising their welfare.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the veterinary practitioners for contributing to this study, the AFVAC (Association Française des Animaux de Compagnie) and the SNVEL of region Ile de France for their help. We are also grateful to Dr Meriadeg Le Gouil and Pr Astrid Vabret for helpful discussions. We thank Damien Hoinard for the technical support provided for the serological analysis. Manon Delaplace is supported by a PhD fellowship from the DIM 1Health (Region Ile de France) and the Direction Générale de l'Enseignement et la Recherche from the French ministry of Agriculture (DGER).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there they have no conflict of interests regarding the publication of this study.

## ETHICAL STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. The Directive 2010/63/EU was followed.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Corinne Sailleau  <https://orcid.org/0000-0001-9077-6934>

## REFERENCES

d'Orengiani, A. L., Duarte, L., Pavio, N., & Le Poder, S. (2015). Characterisation of different forms of the accessory gp3 canine

- coronavirus type I protein identified in cats. *Virus Research*, 202, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.027>
- Halfmann, P. J., Hatta, M., Chiba, S., Maemura, T., Fan, S., Takeda, M., ... Kawaoka, Y. (2020). Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. *The New England Journal of Medicine*, <https://doi.org/10.1056/NEJMc2013400>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Sit, T. H. C., Brackman, C. J., Ip, S. M., Tam, K. W. S., Law, P. Y. T., To, E. M. W., ... Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>
- Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57(5), 758–771. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
- Temmam, S., Barbarino, A., Maso, D., Behillil, S., Enouf, V., Huon, C., ... (2020). Absence of SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in close contact with a cluster of COVID-19 patients in a veterinary campus. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029090>
- Vanhomwegen, J., Beck, C., Despres, P., Figuerola, A., Garcia, R., Lecollinet, S., ... Serra-Cobo, J. (2017). Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17, 340–346. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2042>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579, 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Zhang, Q., Zhang, H., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., Gao, J., ... Jin, M. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: A serological investigation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.01.021196>
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., ... Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *The New England Journal of Medicine*, 382, 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>

**How to cite this article:** Sailleau C, Dumarest M,

Vanhomwegen J, et al. First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67:2324–2328. <https://doi.org/10.1111/tbed.13659>



# Myocarditis and Subclinical-Like Infection Associated With SARS-CoV-2 in Two Cats Living in the Same Household in France: A Case Report With Literature Review

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sibylle Maria Kneissl,  
University of Veterinary Medicine  
Vienna, Austria

### Reviewed by:

Hussein Awad Hussein,  
Assiut University, Egypt  
Christina Pettan-Brewer,  
University of Washington,  
United States  
Ayman Abdel-Aziz Swelum,  
Zagazig University, Egypt

### \*Correspondence:

Valérie Chetboul  
valerie.chetboul@vet-alfort.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Veterinary Imaging,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 28 July 2021

**Accepted:** 13 September 2021

**Published:** 21 October 2021

### Citation:

Chetboul V, Foulex P, Kartout K, Klein AM, Sailleau C, Dumarest M, Delaplace M, Gouilh MA, Mortier J and Le Poder S (2021) Myocarditis and Subclinical-Like Infection Associated With SARS-CoV-2 in Two Cats Living in the Same Household in France: A Case Report With Literature Review. *Front. Vet. Sci.* 8:748869. doi: 10.3389/fvets.2021.748869

Valérie Chetboul<sup>1,2\*</sup>, Pierre Foulex<sup>1</sup>, Kahina Kartout<sup>1</sup>, Anne Marie Klein<sup>3</sup>, Corinne Sailleau<sup>4</sup>, Marine Dumarest<sup>4</sup>, Manon Delaplace<sup>4</sup>, Meriadeg Ar Gouilh<sup>5</sup>, Jeremy Mortier<sup>6</sup> and Sophie Le Poder<sup>4</sup>

<sup>1</sup> École Nationale Vétérinaire d'Alfort, CHUVA, Unité de Cardiologie d'Alfort (UCA), Maisons-Alfort, France, <sup>2</sup> Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Créteil, France, <sup>3</sup> Clinique Vétérinaire, Paris, France, <sup>4</sup> École Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR VIROLOGIE, INRAE, ANSES, Laboratoire de santé animale, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France, <sup>5</sup> Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Université, UNICAEN, 13 UNIROUEN, Caen, France, <sup>6</sup> École Nationale Vétérinaire d'Alfort, CHUVA, Service d'Imagerie Médicale, Maisons-Alfort, France

This report provides the first clinical, radiographic, echocardiographic, and biological description of SARS-CoV-2-associated myocarditis with a 6-month follow-up in a 5-year-old obese male domestic shorthair cat (Cat-1) presented for refractory congestive heart failure, with high cardiac troponin-I level (5.24 ng/ml), and a large lingual ulcer. The animal was SARS-CoV-2 positive on serology. The other cat living in the same household (Cat-2) never showed any clinical sign but was also confirmed SARS-CoV-2 positive on serology. Both cats were SARS-CoV-2 PCR negative. Cat-1 had closer contact than Cat-2 with their owner, who had been in close contact with a coworker tested PCR positive for COVID-19 (Alpha (B.1.1.7) variant) 4 weeks before Cat-1's first episode of congestive heart failure. A focused point-of-care echocardiography at presentation revealed for Cat-1 numerous B-lines, pleural effusion, severe left atrial dilation and dysfunction, and hypertrophic cardiomyopathy phenotype associated with focal pulmonary consolidations. Both myocarditis and pneumonia were suspected, leading to the prescription of cardiac medications and antibiotics. One month later, Cat-1 recovered, with normalization of left atrial size and function, and radiographic and echocardiography disappearance of heart failure signs and pulmonary lesions. An extensive literature review of SARS-CoV-2-related cardiac injury in pets in comparison with human pathology is discussed.

**Keywords:** cat, COVID-19, echocardiography, heart failure, myocarditis, SARS-CoV-2, troponin-I

## INTRODUCTION

Since December 2019, a new coronavirus, the severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has emerged in the human population, leading to an unprecedented pandemic. In February 2020, the first description of SARS-CoV-2 infection of a dog was provided by the authority from Hong Kong (1). This dog was living with a SARS-CoV-2-infected owner and remained asymptomatic. In March 2020, the first clinical case of SARS-CoV-2 infection in a cat, living in Belgium, was reported, with the expression of digestive and respiratory symptoms (2). Since then, numerous infections have been reported in cats and dogs living in households with COVID-19-infected owners (3–8). Recently, infection of pets with the Alpha SARS-CoV-2 variant (previously named B.1.1.7) has been described in the USA, Spain, and the UK (9–11). Although the majority of SARS-CoV-2-infected domestic pets remain asymptomatic, few of them may develop digestive, ocular, respiratory, and cardiac signs (3, 10, 12, 13). Interestingly, COVID-19 is also known to be associated with cardiac injury and dysfunction in human patients (14–21).

In the present report, we describe for the first time the clinical, radiographic, echocardiographic, and biological features and follow-up of a SARS-CoV-2-related myocarditis diagnosed in a domestic cat presented for refractory congestive heart failure, living with a SARS-CoV-2-positive asymptomatic cat mate.

Furthermore, an extensive literature review of both SARS-CoV-2-related cardiac injury in human patients and in pets is conducted.

## CASE REPORT DESCRIPTION

A 5-year-old obese (8.5 kg; body condition score of 8/9) neutered male domestic shorthair cat (Cat-1) was referred to the Alfort Cardiology Unit at the Veterinary Hospital of the Alfort National Veterinary School in April 2021 for refractory congestive heart failure (CHF) and general health status worsening over the past 4 weeks, associated with high cardiac troponin-I level (cTnI = 5.24 ng/ml; reference range <0.06 ng/ml). The cat was receiving oral furosemide (1.2 mg/kg q8h), pimobendan (0.07 mg/kg q12h), and clopidogrel (2.2 mg/kg q24h).

Cat-1 was living in a strictly indoor life environment with another domestic shorthair cat (Cat-2; 6.9 kg, body condition score of 6/9). Cat-1 had closer contact than Cat-2 with their owner (e.g., sharing her bed, unlike Cat-2), who had been exposed to a COVID-19-positive and ill coworker [Alpha (B.1.1.7) variant] the day before her coworker's clinical signs onset and 4 weeks before Cat-1's clinical signs occurrence, i.e., acute onset of lethargy, inappetence, and tachypnea/dyspnea. The owner had a negative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) nasal test for COVID-19 4 days after close contact with her coworker.

At admission, Cat-1 was lethargic. Physical examination at presentation revealed marked dyspnea with tachypnea (respiratory rate = 80 breaths per minute) and paradoxical breathing, associated with a gallop sound, a grade 1/6 left apical systolic heart murmur, and irregular cardiac rhythm. A large ulcer was also found at the tongue base (**Figure 1**).

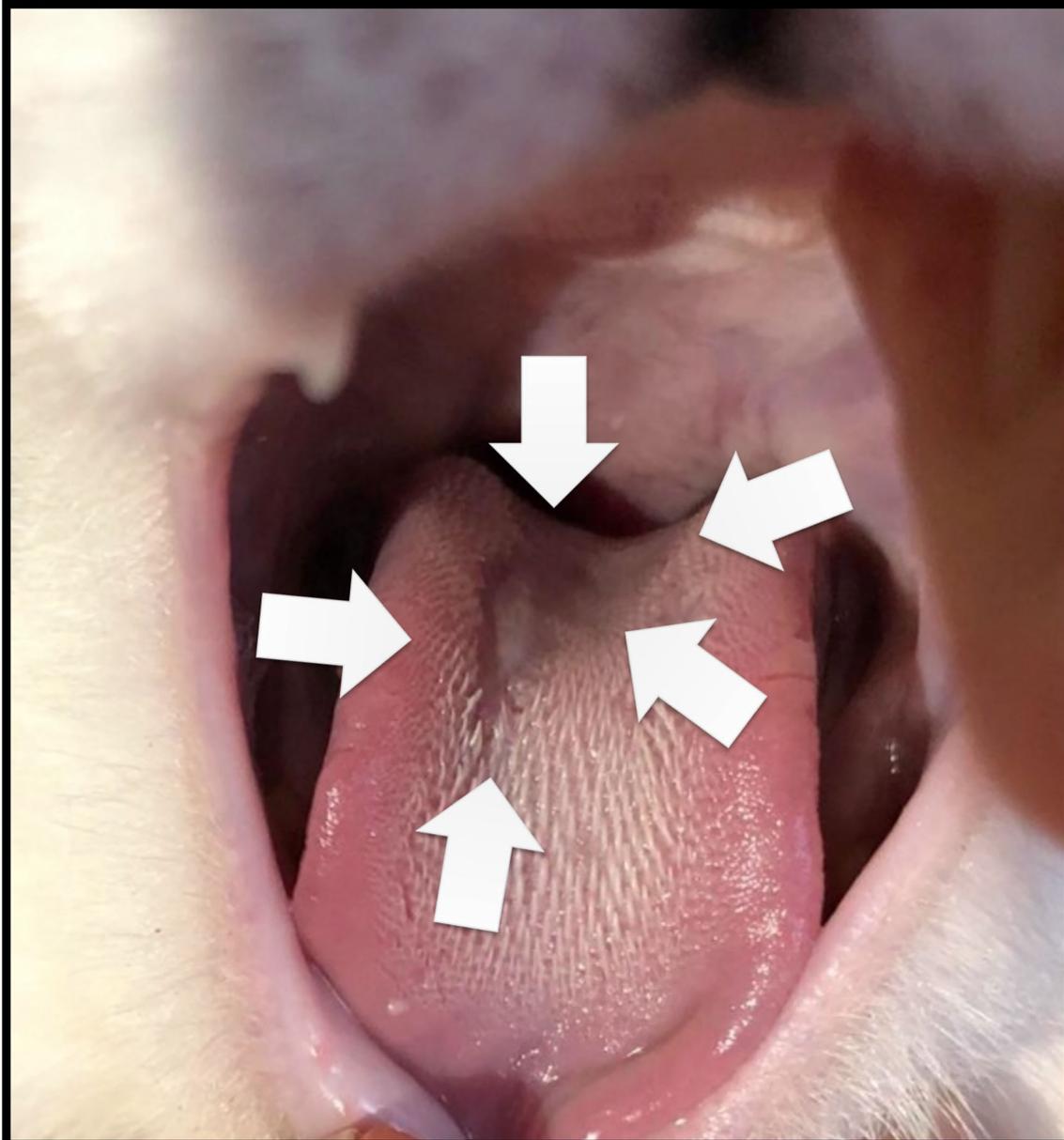
Flow-by oxygen therapy and an intramuscular injection of furosemide (2 mg/kg) were implemented. A six-lead ECG was then performed, showing some isolated left premature ventricular complexes with a mean heart rate of 190 bpm. Because the cat was clinically unstable, a focused point-of-care echocardiographic examination was performed by a boarded-certified cardiologist (V.C., Dipl. ECVIM-CA Cardiology), as recommended by the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) consensus guidelines (22, 23). To minimize stress during the examination, the cat was gently restrained in standing position, as previously validated by our group and also recommended by the ACVIM consensus guidelines (22, 24).

The focused point-of-care ultrasound examination revealed numerous B-lines suggestive of pulmonary alveolar disease (e.g., pulmonary edema), mild pleural effusion, and severe left atrial dilation as confirmed by high values of end-diastolic left atrium-to-aorta ratio [LA:Ao = 2.09; reference range  $\leq 1.2$  (25); **Figure 2A**], maximum LA diameter on right parasternal 4-chamber view [Max LAD = 22.0 mm; reference range <16.0 mm (26)], and end-systolic LA volume (LAV<sub>s</sub>) assessed by the modified Simpson method of discs from the right parasternal 4-chamber view [6.10 mL; reference range <1.96 mL/cat (27)]. The LA fractional shortening (LA<sub>FS%</sub>) was dramatically decreased [8.4%; reference range >17.5% (28); **Figure 2B**] confirming marked alteration of LA function associated with blood stasis as shown by decreased LA appendage velocities [maximal velocity = 0.2 m/s; reference range 0.24–1.00 (29)], and spontaneous echo-contrast within the LA and the left auricle.

A hypertrophic cardiomyopathy (HCM) phenotype was also observed, with an irregular thickened pericardium (up to 3.0 mm), and several focal pulmonary consolidations nearby the LA and the left ventricle (LV; **Figure 2C**). Lastly, important amount of fat was found within both pericardial and pleural spaces.

Thoracic radiographs performed and reviewed by a board-certified radiologist (J.M., Dipl. ECVDI) showed borderline cardiomegaly (vertebral heart score of 8) with subjectively enlarged pulmonary vessels, thin interlobar fissure lines indicative of mild pleural effusion, and a generalized yet inhomogeneous unstructured interstitial lung pattern that was slightly more severe in the right caudal lung lobe. A large quantity of sternal and/or pericardial fat was also present, in agreement with the ultrasound examination (**Figures 3A,B**).

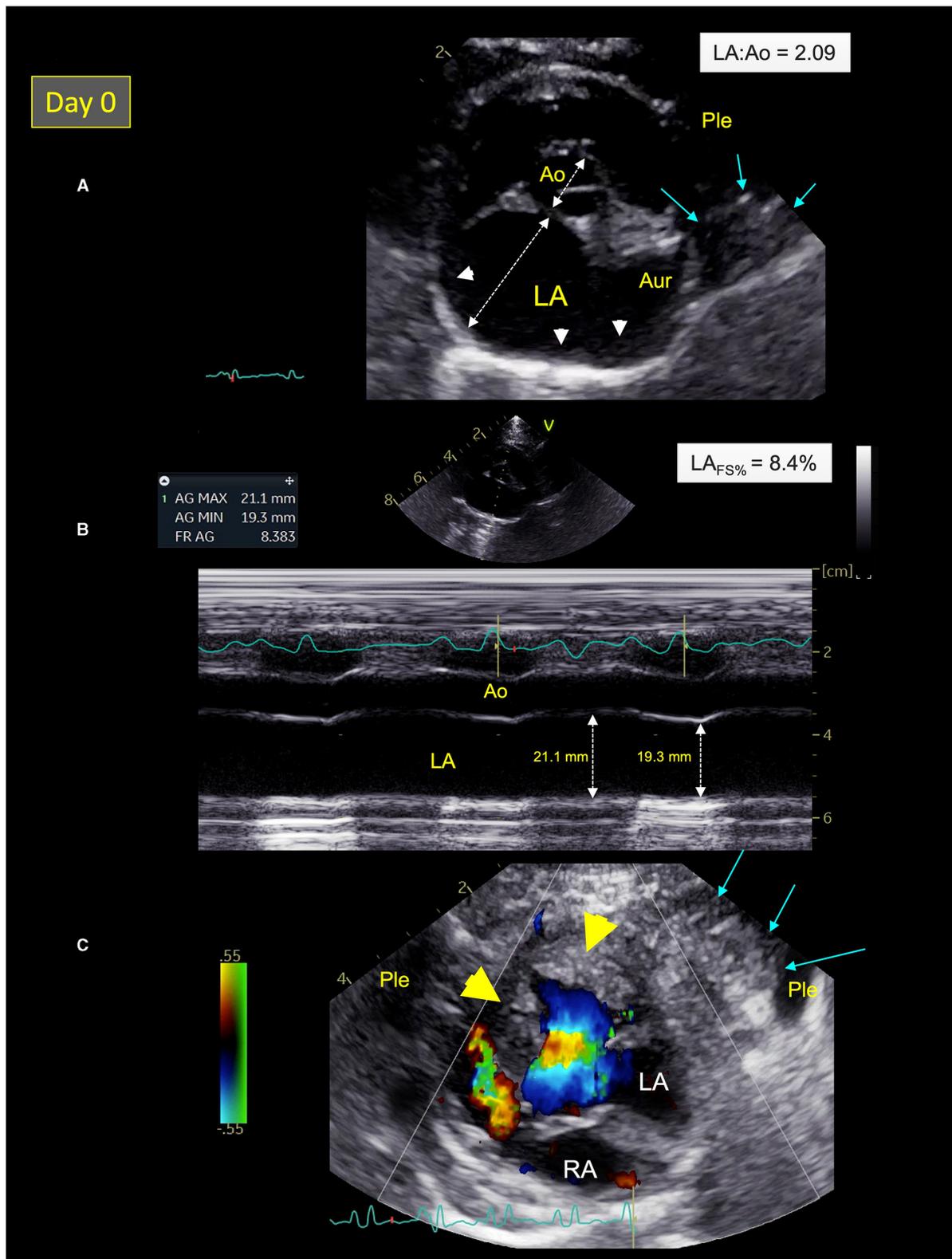
Considering history, clinical, radiographic, and echocardiographic findings, ACVIM stage C (i.e., decompensated) myocarditis associated with pneumonia was suspected. The cat was discharged with pimobendan and clopidogrel at initial dosages. Oral furosemide was switched for subcutaneous furosemide injections (1.2 mg/kg q8h) and food was supplemented with taurine (700 mg q12h). In addition, dual antibiotic therapy was prescribed: oral clindamycin (9.4 mg/kg q24h) and subcutaneous marbofloxacin injection (2 mg/kg q24h). Extensive investigations were performed, including complete blood count, serum amyloid A protein, serum biochemistry, electrolytes, plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), and infectious disease testing, i.e., serology for *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma*



**FIGURE 1** | Large ulcer (arrows) observed at the tongue base of Cat-1 at day 0.

*phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* (IDEXX SNAP 4Dx), feline leukemia virus (FeLV) p27 antigen and feline immunodeficiency virus (FIV) antibodies (IDEXX laboratory), 16S rRNA PCR test and PCR blood test for *Bartonella henselae*, and calicivirus PCR test (oropharyngeal swab). Lastly, blood sample and nasal, oropharyngeal, and rectal swabs were also collected for SARS-CoV-2 testing, as previously described by our group (4). Serological analyses were performed with two methodologies. Cats' sera were tested with the ID Screen ELISA, SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-species (IDvet, Grabels, France) according to the manufacturer's instructions. The kit specifically detects anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid

antibodies. The sera were also tested by seroneutralization. Briefly, after heat inactivated treatment, at 56°C for 1 h, serial twofold dilutions of the sera were added to SARS-CoV-2 virus (strain *BetaCoV/France/IDF/200107/2020*, kindly provided by Dr. J.C. Manuguerra, CIBU, Pasteur Institute) at a 50% tissue culture infective dose (TCID50) of 100. After incubation at 37°C for 1 h, the virus serum dilution was inoculated onto Vero E6 cells for 1 h at 37°C. Then, cells were incubated for 3 days. The neutralization titers were determined by the highest dilution that prevented cytopathic effect. In addition, nasal, oropharyngeal, and rectal swabs were submitted to RT-qPCR assays. Briefly, RNA extracts were submitted to standardized



**FIGURE 2 |** Two-dimensional (2D) right parasternal short-axis view **(A)**, M-mode echocardiogram **(B)**, and color-flow Doppler mode **(C)** from Cat-1 at presentation (day 0). **(A)** This 2D right parasternal short-axis view taken at end-diastole at the level of the aortic valve shows marked dilation of the left atrium (LA) and the left auricle (Aur) with an increased LA:aorta ratio (LA:Ao = 2.09), spontaneous echo contrast (white arrow heads), associated with pleural effusion (Ple), and a pulmonary

*(Continued)*

**FIGURE 2** | consolidation near the left auricle (blue arrows). **(B)** This M-mode image obtained from the 2D right parasternal short-axis view taken at the level of the aortic valve confirms a markedly decreased LA fractional shortening ( $LA_{FS\%} = 8.4\%$ ). **(C)** This 2D left apical 5-chamber view taken at end-systole shows left ventricular hypertrophy (yellow arrow heads) and a pulmonary consolidation near the left ventricle (blue arrows) surrounded by Ple. RA, right atrium.

one-step RT-PCR 3-Allplex 2019-nCoV assay (Seegene, CE IVD) used as routine diagnosis for SARS-CoV-2 in the virology unit of the University Hospital of Caen, using the manufacturer's instructions, CFX-96 RT System C1000 Thermal Cycler (Biorad) and SARS-CoV2 Viewer for Real-Time instrument version 3.19.003.010 (Seegene). This multiplex system simultaneously targets Orf1, S, and N genes.

All tests were unremarkable, except for high NT-proBNP plasma level (527 pmol/L; reference range <100 pmol/L) and a SARS-CoV-2 serology positive by ELISA (OD value: 1.425; % positivity: 426%). Seroneutralization assay confirmed the presence of specific SARS-CoV-2 antibodies with a serological titer of 1:640. Nasal, oropharyngeal, and rectal swabs were SARS-CoV-2 PCR negative.

Given these results, the other cat living in the same household (Cat-2) was also sampled for the same SARS-CoV-2 tests as well as for NT-proBNP and cTnI levels. Like Cat-1, Cat-2 was found SARS-CoV-2 positive by ELISA (OD value: 0.636; % positivity: 202%) and seroneutralization (titer 1:20), but all collected swabs were RT-qPCR negative. However, NT-proBNP and cTnI levels remained within reference ranges (<24 pmol/L and 0.02 ng/ml, respectively).

Cat-1's condition gradually improved after treatment adjustment, with no recurrence of respiratory distress at home after 2 weeks and progressive decrease of the size of the lingual ulcer. The cat was re-assessed 1 month later. cTnI level had markedly decreased (0.82 ng/ml). Seroneutralization confirmed the presence of antibodies against SARS-CoV-2 with again a titer of 1:640. Best practice echocardiographic examination with concurrent ECG tracing was performed (22). A dramatic decrease in LA size ( $LA:Ao = 1.26$ ; max LAD = 12.2 mm; LAVs = 1.50 mL), associated with both normalization of LA function ( $LA_{FS\%} = 40.7\%$ ) and Doppler LA appendage maximal velocities (0.73 m/s), was found (**Figures 4A,B**). Moreover, spontaneous echo-contrast within the LA and the left auricle, pleural effusion, B-lines, and consolidated pulmonary lesions were no longer observed. Similarly, no arrhythmia was detected on the concomitant ECG tracing. An HCM phenotype was confirmed (**Figure 4C**), associated with impaired LV relaxation, as shown by an inverted maximal early:late diastolic mitral flow velocities ratio [E:A ratio = 0.67; reference range >1 (25, 26)] and decreased mitral annular (E') velocity [4 cm/s; reference range >6 cm/s (26)], respectively assessed by pulsed-wave Doppler mode and pulsed-wave tissue Doppler imaging, with an E:E' ratio within upper ranges [11.6; reference range <12 (26)].

Follow-up thoracic radiographs showed a decrease in size of the cardiac silhouette (vertebral heart score of 7.8) and pulmonary vessels with resolution of the pulmonary lesions and pleural effusion (**Figures 3C,D**).

Owing to the spectacular improvement of LA size and function despite persistent LV hypertrophy, an atrial myocarditis

was highly suspected. Hence, the prior medical treatment was continued, with increase of taurine supplementation, addition of fish oil supplementation once a day, and progressive switch of subcutaneous furosemide injections for oral furosemide (1.2 mg/kg q8h).

Six months after onset of clinical signs, Cat-1 is still doing well. Serological analyses were performed again in July 2021 for a follow-up of antibody titers. Cat-1 seroneutralization titer was stable at 1:640 and Cat-2 titer slightly increased to 1:40.

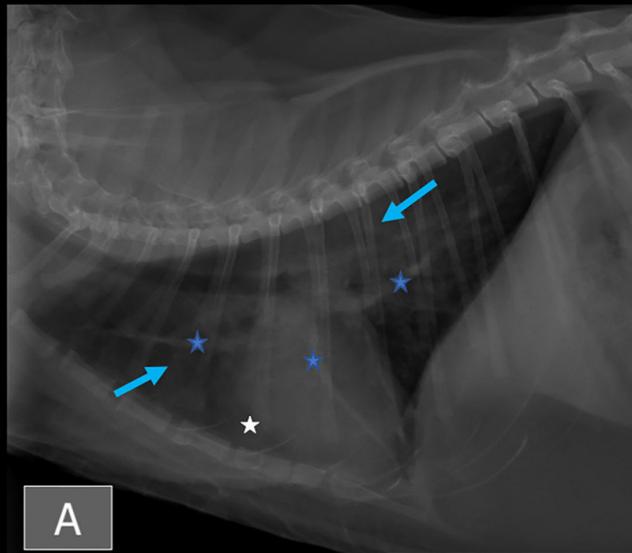
## DISCUSSION

At the end of December 2019, an outbreak of SARS-CoV-2-related pneumonia cases was reported in human patients from Wuhan (Hubei province, China). The corresponding infectious disease, also named COVID-19 (coronavirus disease 19), then rapidly spread all over the world and became a global pandemic declared as public health emergency of international concern by WHO in January 2020 (30). Since then, various human-to-animal SARS-CoV-2 transmissions have been reported, i.e., owner-to-domestic pets [cats and dogs, (1–8, 31)], human-to-wild felids (32, 33), and human-to-mink (34). The susceptibility of several domestic animal species to SARS-CoV-2 infection has also been investigated experimentally, showing that Syrian hamsters, ferrets, and cats are highly permissive to SARS-CoV-2 infection, with possible airborne transmission among these animals (35). Conversely, SARS-CoV-2 replicates poorly in dogs, pigs, cows, and not in chickens and ducks (35). At the time of writing, although human-to-cat transmission has been reported, there is no evidence of transmission in the opposite direction, i.e., cat-to-human transmission (36).

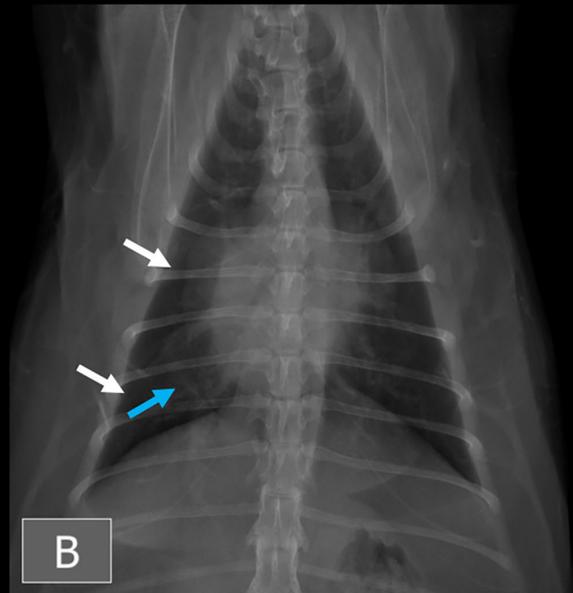
The majority of SARS-CoV-2-infected domestic pets are reported to be subclinical, with few of them showing mild to severe ocular, digestive, and respiratory signs, e.g., conjunctivitis, rhinitis, sneezing, cough, and less commonly respiratory distress (3, 12, 13). The present report provides the first clinical, radiographic, echocardiographic, and biological accurate description, with a 6-month follow-up, of a SARS-CoV-2-related myocarditis in a domestic shorthair cat (Cat-1) referred for refractory CHF, characterized by combined pulmonary edema and pleural effusion. Interestingly, a sudden rise in incidence of myocarditis (i.e., from 1.4 to 12.8%; 8.5% in cats and 4.3% in dogs) has been recorded in a British veterinary Cardiology Department between December 2020 and February 2021 concomitantly to the outbreak of COVID-19 human pandemic in the UK (10). Myocarditis was reported by these authors in six domestic pets (four cats and two dogs) infected by the Alpha (B.1.1.7) variant of SARS-CoV-2, as confirmed by either positive serology or by RT-qPCR assays from rectal swabs (10). In the latter report (10), none of the six affected pets had a previous history of heart disease and

## Thoracic radiographs

Day 0

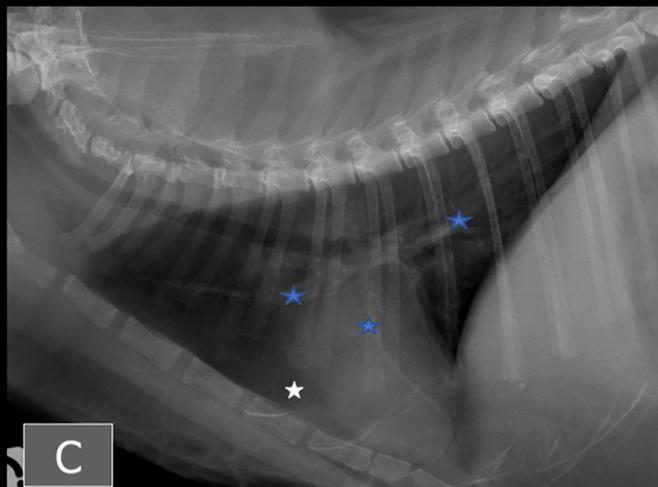


A



B

1 month later



C



D

**FIGURE 3 |** Thoracic radiographs from Cat-1 at presentation (**A,B**) and after 1 month (**C,D**). An ill-defined unstructured interstitial lung pattern (blue arrows) and thin interlobar fissures (white arrows) consistent with mild pleural effusion are present at presentation. Mild cardiomegaly and subjectively enlarged pulmonary vessels are present at presentation. (Continued)

**FIGURE 3** | also noted (blue stars). After 1 month, the pulmonary pattern and interlobar fissures have resolved, and the cardiac silhouette and pulmonary vessels have decreased in size. On (A,C), a large amount of fat is visible around the apex of the cardiac silhouette (white stars).

their clinical presentation was similar, characterized by acute onset of lethargy, inappetence, tachypnea/dyspnea secondary to CHF with profound impairment of the general health status, and elevated cTnI, as was exactly the case here for Cat-1.

In humans, SARS-CoV-2 is known to affect multiple organ systems, particularly the lungs and heart, with a wide spectrum of presentations including acute myocardial injury reported in up to 38% of hospitalized patients (14–21). SARS-CoV-2-related acute myocardial injury results from various pathophysiologic mechanisms, e.g., coronary microvascular thrombosis, respiratory failure and hypoxemia with secondary ischemic myocardial lesions, and also myocarditis mainly related to hyper-inflammation and cytokine storm mediated through pathologic T cells and monocytes (14, 15, 20, 21). Myocardial SARS-CoV-2 infection, which is common in patients dying from COVID-19 but often with only rare infected cells, can also contribute to a lesser extent to the development of inflammatory cardiac lesions (20, 21). In addition, SARS-CoV-2 has been demonstrated to use the angiotensin I converting enzyme 2 (ACE2) as a cellular entry receptor (37, 38). ACE2 is a peptidase involved in the renin–angiotensin–aldosterone system regulation, expressed in abundance in several tissues, including intestine, heart muscle, kidneys, and lungs (37, 38). Binding of SARS-CoV-2 spike protein to ACE2 leads to viral entry in target cells, but also to renin–angiotensin–aldosterone imbalance, with decreased conversion of angiotensin II to angiotensin (1–7), which may contribute to cardiovascular injury and CHF (37, 38). In the present report, endomyocardial biopsies under general anesthesia could not be performed because Cat-1 was suffering from severe CHF, so the presence of SARS-CoV-2 within the myocardium could not be investigated. Whether SARS-CoV-2 directly induced Cat-1's myocarditis or indirectly, e.g., through a multisystem inflammatory syndrome as described in human patients (14, 15, 20, 21), thus remains unknown.

Interestingly, unlike Cat-2, Cat-1 was an obese cat, with an 8/9 body condition score and important amount of fat within the pericardial and pleural spaces at both echocardiographic and radiographic examinations. In human patients, obesity is a well-known major risk factor for COVID-19 cardio-pulmonary complications and mortality, as is the amount of epicardial adipose tissue (39, 40). Epicardial adipose tissue has been suggested to play a role in COVID-19-related myocarditis (40, 41), as it expresses high levels of ACE2 and as it also represents an inflammatory depot in contiguity with the myocardium, characterized by macrophage infiltrates and proinflammatory cytokines (e.g., interleukin-6). This can lead to myocardial inflammation directly *via* the vasa vasorum or through paracrine pathways (40).

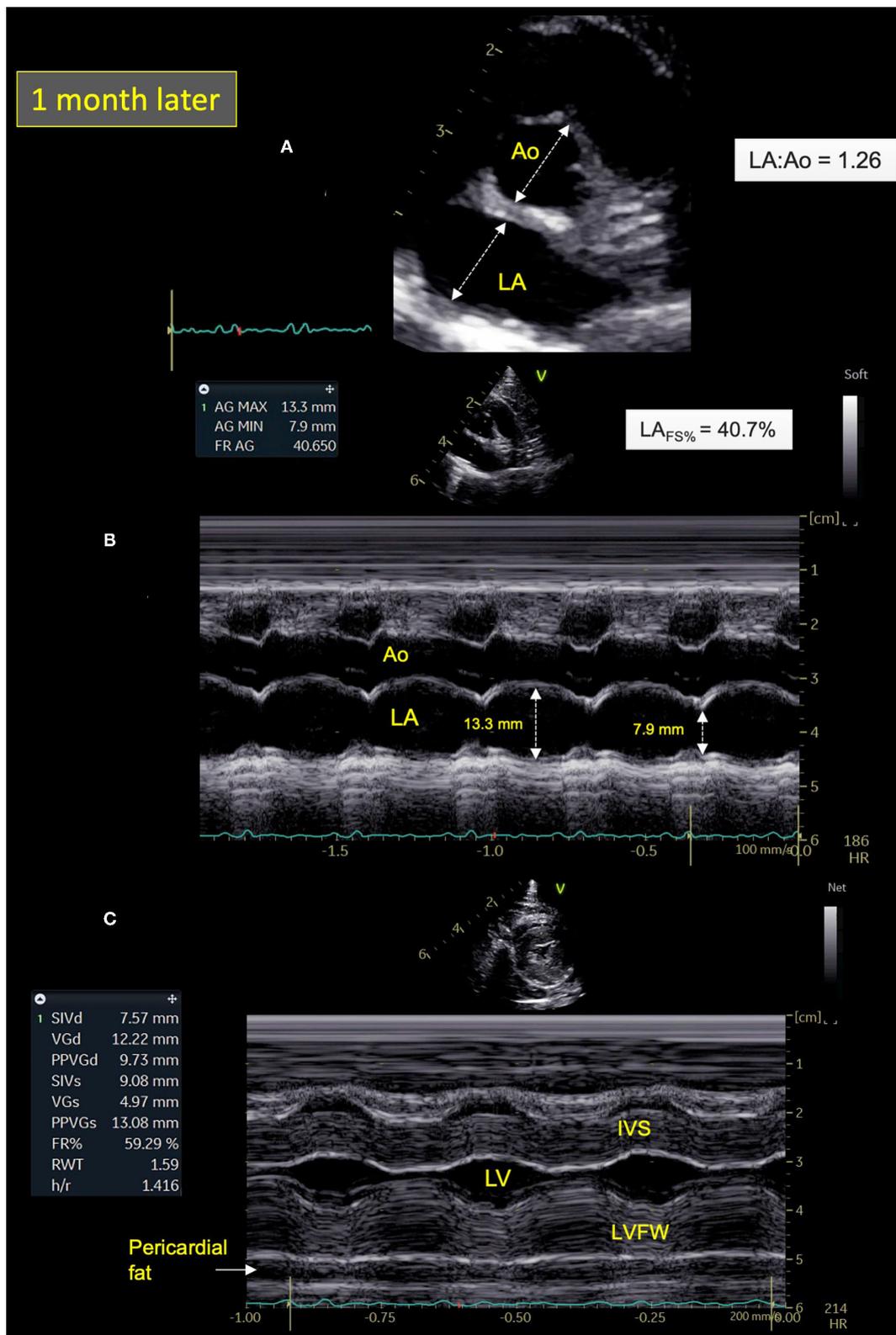
The thoracic radiographs of Cat-1 revealed mild cardiomegaly and enlarged pulmonary vessels, consistent with the echocardiographic diagnosis of myocarditis and left-sided CHF. The pulmonary lesions could be explained either by the presence

of cardiogenic pulmonary edema and/or by COVID-19-related pneumonia. A bilateral unstructured interstitial lung pattern has been described in human patients with COVID-19, although consolidations are more frequent (42, 43). The distribution of the pulmonary lesions is variable in COVID-19 pneumonia, and although it is more frequently peripheral, perihilar and diffuse patterns are not uncommon (42, 43). Similarly, mild pleural effusion has been described both in human patients with COVID-19 and in cats with left-sided congestive heart failure; therefore, its origin in our cat is debatable (42–44).

In the present report, a large ulcer was also found on Cat-1's tongue base at the time of presentation, which may have contributed to inappetence. Various oral manifestations of COVID-19 have been reported in human patients, including dry mouth, gustatory impairment, gingivitis, sialadenitis, vesicular and ulcerative mucosal lesions predominantly located on dorsal surface of the tongue (as in our case), hard palate, and labial mucosa (45–47). The exact pathogenesis of such oral signs remains uncertain, probably involving several mechanisms, such as deterioration of the general health status, hypersensitivity of drugs used for COVID-19 treatment, stress, immunosuppression, vasculitis, and hyper-inflammatory response secondary to SARS-CoV-2 infection as predisposing factors (45–47). In addition, high expression of ACE2, recognized as the SARS-CoV-2 entry ligand receptor, has been reported in cells of the oral cavity, predominantly in epithelial cells of the tongue, and in buccal and gingival tissues at a lesser extent, thus predisposing to oral SARS-CoV-2 infection with a local virus effect (48).

In the present report, both cats were shown SARS-CoV-2 positive by serology but displayed negative RT-qPCR results for rectal, nasal, and oropharyngeal swabs. Given the clinical manifestation with lung pathology, RT-qPCR on fine-needle lung cytoponction would have been interesting for analysis. However, swab samples were collected quite late after Cat-1's onset of clinical signs (i.e., 1 month after), which may explain the negative RT-qPCR results. In experimental infections, cats shed virus only up to 14 days (49). Serological titers remain identical for Cat-1 during the 3 months of follow-up, thus preventing possible re-infection within a short time. However, long-term follow-up over one year will be necessary to evaluate the duration of immunity.

The two cats were living in the same household and had no outdoor access, thus highly supporting an owner-to-cat SARS-CoV-2 transmission. The asymptomatic owner was suspected of being infected by SARS-CoV-2 because of a close contact with an ill positive coworker (Alpha (B.1.1.7) variant) the day before clinical signs onset of the latter. Nevertheless, the owner was tested RT-qPCR negative for COVID-19 4 days after exposition to her coworker. However, false-negative results of initial RT-qPCR assays for COVID-19 have been reported in 1.8 to 5.8% infected human patients according to studies (50). This case report illustrates that, as recommended by the OIE (World Organisation



**FIGURE 4 |** Two-dimensional (2D) right parasternal short-axis view **(A)** and M-mode echocardiograms **(B,C)** from Cat-1 1 month after initial presentation. **(A)** As compared with day 0 (see **Figure 2A**), this 2D right parasternal short-axis view taken at end-diastole at the level of the aortic valve shows a markedly decreased left atrial size (left atrium:aorta ratio (LA:Ao) = 1.26 vs. 2.09) associated with disappearance of spontaneous echo contrast, pleural effusion, and pulmonary consolidation. *(Continued)*

**FIGURE 4 | (B)** This M-mode image obtained from the 2D right parasternal short-axis view taken at the level of the aortic valve confirms normalization of the LA fractional shortening ( $LA_{FS\%} = 40.7$  vs.  $8.4\%$ ). **(C)** This M-mode echocardiogram obtained from the right parasternal transventricular short-axis view confirms marked asymmetric left ventricular hypertrophy, more pronounced for the left ventricular free wall (LVFW) than the interventricular septum (IVS), i.e., end-diastolic thicknesses of 9.7 and 7.6 mm, respectively [normal values  $<6$  mm (22)]. Note also posteriorly the important amount of pericardial fat (maximal thickness of 6 mm). LV, left ventricle.

for Animal Health), people who are suspected or confirmed to be infected with SARS-CoV-2 should avoid close contact with their companion animals (50). Importantly, there is currently no justification in taking measures that may compromise the welfare and health of the latter, as there is no evidence that dogs and cats can infect humans (36, 51).

Cat-1 was more predisposed to develop clinical signs than Cat-2, owing to its body condition score (obesity), associated with the presence of epicardial adipose tissue confirmed by radiographic and ultrasound examination, and a closer contact with the owner (e.g., sharing her bed, unlike Cat-2). As cats have been shown to be susceptible to infection by SARS-CoV-2, which can then replicate efficiently and be transmissible to naïve cats (35), whether Cat-2 was infected by Cat-1 or by the owner remains unknown.

This report presents several limitations. First, thoracocentesis and fine-needle biopsy of the pulmonary lesions detected at presentation (using focused point-of-care ultrasound examination) were not performed for ethical reasons because Cat-1 was clinically unstable. The hypothesis that the virus initially caused focal pneumonia, which then led to cardiac infection, cannot therefore be excluded. Similarly, endomyocardial biopsies could not be performed for the same ethical reasons, and thus the link between SARS-CoV-2 infection and myocarditis remains a speculation for Cat-1. Lastly, primary HCM responsible at least in part for the HCM phenotype cannot also be excluded, as no echocardiographic examination was performed prior to CHF onset.

In conclusion, to the best of the authors' knowledge, the present case is the first clinical, radiographic, echocardiographic, and biological description of SARS-CoV-2-related myocarditis in a domestic cat, over a 6-month period after clinical signs onset. Obesity, epicardial adipose tissue, and close contact to the infected owner were highly probable predisposing factors of Cat-1 to cardiorespiratory failure, as compared with its SARS-CoV-2-positive but asymptomatic cat mate. Moreover, this case report illustrated that SARS-CoV-2 infection should currently be included in the differential diagnosis of feline myocarditis, unstructured interstitial lung pattern on thoracic radiographs, and tongue ulcer. Interestingly, most clinical abnormalities (e.g., obesity, large lingual ulcer, dyspnea) as well as biological and imaging alterations detected on Cat-1 were similar to those

reported in human SARS-Cov-2 infection, thus suggesting that small animals could be relevant spontaneous COVID-19 clinical models, potentially improving our knowledge on the human disease. Further prospective studies in large populations of cats and dogs living in households with COVID-19 infected owners are now needed to determine the proportion of animals with high cTnI levels suggestive of myocarditis. Inversely, clinical research including systematic SARS-CoV-2 testing on cats and dogs with presumed myocarditis would be of interest to better assess the potential link between SARS-CoV-2 infection and myocarditis in small animals.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the diagnosis, follow-up and interpretation for the 2 presented SARS-CoV-2 cats, regarding clinical and imaging examinations (VC, PF, KK, JM, and AK), virological tests (CS, MDu, MDe, MG, and SL), manuscript revision, read, and approved the submitted version. VC, PF, and KK wrote the first draft of the manuscript. JM and SL wrote sections of the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the European ICRAD MUSECoV project and by WHO through the SARS-CoV-2 EvoZoone project. The strain *BetaCoV/France/IDF/200107/20* was supplied by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Dr. Jean-Claude Manuguerra. The human sample from which strain *BetaCoV/France/IDF/200107/2020* was isolated has been provided by Dr. Paccoud from the La Pitié-Salpêtrière Hospital. We also sincerely acknowledge the Fondation Un Cœur (Foundation under the aegis of the Fondation de France) and the Vetoquinol company for having sponsored the research assistant position of PF.

## REFERENCES

- Sit THC, Brackman CJ, Ip SM, Tam KWS, Law PYT, To EMW, Yu VYT, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*. (2020) 586:776–8. doi: 10.1038/s41586-020-2334-5
- Garigliany M, Van Laere AS, Clercx C, Giet D, Escriou N, Huon C, et al. SARS-CoV-2 natural transmission from human to cat, Belgium, March 2020. *Emerg Infect Dis*. (2020) 26:3069–71. doi: 10.3201/eid2612.202223
- Hosie MJ, Epifano I, Herder V, Orton RJ, Stevenson A, Johnson N, et al. Detection of SARS-CoV-2 in respiratory

- samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *Vet Rec.* (2021) 188:e247. doi: 10.1002/vetr.247
4. Sailleau C, Dumarest M, Vanhomwegen J, Delaplace M, Caro V, Kwasiborski A, et al. First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. *Transbound Emerg Dis.* (2020) 67:2324–8. doi: 10.1111/tbed.13659
  5. Newman A, Smith D, Ghai RR, Wallace RM, Torchetti MK, Loiacono C, et al. First reported cases of SARS-CoV-2 infection in companion animals - New York, March-April 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* (2020) 69:710–3. doi: 10.15585/mmwr.mm6923e3
  6. Barrs VR, Peiris M, Tam KWS, Law PYT, Brackman CJ, To EMW Yu VYT, et al. SARS-CoV-2 in quarantined domestic cats from COVID-19 households or close contacts, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis.* (2020) 26:3071–4. doi: 10.3201/eid2612.202786
  7. Hamer SA, Pauvolid-Corrêa A, Zecca IB, Davila E, Auckland LD, Roundy CM, et al. SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. *Viruses.* (2021) 13:938. doi: 10.3390/v13050938
  8. Halfmann PJ, Hatta M, Chiba S, Maemura T, Fan S, Takeda M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. *N Engl J Med.* (2020) 383:592–4. doi: 10.1056/NEJMc2013400
  9. Barroso-Arévalo S, Rivera B, Domínguez L, Sánchez-Vizcaino JM. First detection of SARS-CoV-2 B.117 variant of concern in an asymptomatic dog in Spain. *Viruses.* (2021) 13:1379. doi: 10.3390/v13071379
  10. Ferasin L, Fritz M, Ferasin H, Becquart P, Legros V, Leroy EM. Myocarditis in naturally infected pets with the British variant of COVID-19. *bioRxiv [Preprint].* (2021). doi: 10.1101/2021.03.18.435945
  11. Hamer SA, Ghai RR, Zecca IB, Auckland LD, Roundy CM, Davila E, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant of concern detected in a pet dog and cat after exposure to a person with COVID-19, USA. *Transbound Emerg Dis.* (2021). doi: 10.21203/rs.3.rs-418665/v1. [Epub ahead of print].
  12. Klaus J, Palizzotto C, Zini E, Meli ML, Leo C, Egberink H, et al. SARS-CoV-2 infection and antibody response in a symptomatic cat from Italy with intestinal B-cell lymphoma. *Viruses.* (2021) 13:527. doi: 10.3390/v13030527
  13. Segalés J, Puig M, Rodon J, Avila-Nieto C, Carrillo J, Cantero G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2020) 117:24790–3. doi: 10.1073/pnas.2010817117
  14. Morris SB, Schwartz NG, Patel P, Abbo L, Beauchamps L, Balan S, et al. Case series of multisystem inflammatory syndrome in adults associated with SARS-CoV-2 infection - United Kingdom and United States, March-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* (2020) 69:1450–6. doi: 10.15585/mmwr.mm6940e1
  15. Valverde I, Singh Y, Sanchez-de-Toledo J, Theocharis P, Chikermane A, Di Filippo S, Kucińska B, Mannarino S, Tamariz-Martel A, Gutierrez-Larraya F, et al. Acute cardiovascular manifestations in 286 children with multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19 infection in Europe. *Circulation.* (2021) 143:21–32. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050065
  16. Kariyanna PT, Sutarjono B, Grewal E, Singh KP, Aurora L, Smith L, et al. A systematic review of COVID-19 and myocarditis. *Am J Med Case Rep.* (2020) 8:299–305. doi: 10.12691/ajmcr-8-9-11
  17. Alsatli RA. Cardiovascular complications related to COVID-19 disease. *Anesth Essays Res.* (2020) 14:359–65. doi: 10.4103/aer.AER\_105\_20
  18. Sawalha K, Abozenah M, Kadado AJ, Battisha A, Al-Akchar M, Salerno C, et al. systematic review of COVID-19 related myocarditis: insights on management and outcome. *Cardiovasc Res.* (2021) 23:107–13. doi: 10.1016/j.carrev.2020.08.028
  19. Siripanthong B, Nazarian S, Muser D, Deo R, Santangeli P, Khanji MY, et al. Recognizing COVID-19-related myocarditis: the possible pathophysiology and proposed guideline for diagnosis and management. *Heart Rhythm.* (2020) 17:1463–71. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.05.001
  20. Barse M, Hung YP, Krauson AJ, Bonanno L, Boyraz B, Harris CK, et al. Factors associated with myocardial SARS-CoV-2 infection, myocarditis, and cardiac inflammation in patients with COVID-19. *Mod Pathol.* (2021). doi: 10.1038/s41379-021-00790-1
  21. Bavishi C, Bonow RO, Trivedi V, Abbott JD, Messerli FH, Bhatt DL. Special article - acute myocardial injury in patients hospitalized with COVID-19 infection: a review. *Prog Cardiovasc Dis.* (2020) 63:682–9. doi: 10.1016/j.pcad.2020.05.013
  22. Luis Fuentes V, Abbott J, Chetboul V, Côté E, Fox PR, Häggström J, et al. Consensus statement guidelines for the classification, diagnosis, and management of cardiomyopathies in cats. *J Vet Intern Med.* (2020) 34:1062–77. doi: 10.1111/jvim.15745
  23. Ward JL, Lisciandro GR, Ware WA, Viall AK, Aona BD, Kurtz KA, et al. Evaluation of point-of-care thoracic ultrasound and NT-proBNP for the diagnosis of congestive heart failure in cats with respiratory distress. *J Vet Intern Med.* (2018) 32:1530–40. doi: 10.1111/jvim.15246
  24. Chetboul V, Concordet D, Pouchelon JL, Athanassiadis N, Muller C, Benigni L, et al. Effects of inter- and intra-observer variability on echocardiographic measurements in awake cats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* (2003) 50:326–31. doi: 10.1046/j.1439-0442.2003.00546.x
  25. Chetboul V, Carlos Sampedrano C, Tissier R, Gouni V, Saponaro V, Nicolle AP, et al. Quantitative assessment of velocities of the annulus of the left atrioventricular valve and left ventricular free wall in healthy cats by use of two-dimensional color tissue doppler imaging. *Am J Vet Res.* (2006) 67:250–8. doi: 10.2460/ajvr.67.2.250
  26. Schober KE, Chetboul V. Echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function in cats: hemodynamic determinants and pattern recognition. *J Vet Cardiol.* (2015) 17(Suppl. 1):S102–33. doi: 10.1016/j.jvc.2015.02.002
  27. Rauch J, Fehr M, Beyerbach M, Hungerbuehler SO. Comparative assessment of left atrial volume in healthy cats by two-dimensional and three-dimensional echocardiography. *BMC Vet Res.* (2020) 16:263. doi: 10.1186/s12917-020-02473-6
  28. Abbott JA, MacLean HN. Two-dimensional echocardiographic assessment of the feline left atrium. *J Vet Intern Med.* (2006) 20:111–9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02830.x
  29. Schober KE, Maerz I. Doppler echocardiographic assessment of left atrial appendage flow velocities in normal cats. *J Vet Cardiol.* (2005) 7:15–25. doi: 10.1016/j.jvc.2004.11.001
  30. World Health Organization. *Novel Coronavirus (2019-nCoV).* (2020). Available online at: [https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)) (accessed 25 June 2021).
  31. Neira V, Brito B, Agüero B, Berrios F, Valdés V, Gutierrez A, et al. A household case evidences shorter shedding of SARS-CoV-2 in naturally infected cats compared to their human owners. *Emerg Microbes Infect.* (2021) 10:376–83. doi: 10.1080/22221751.2020.1863132
  32. Bartlett SL, Diel DG, Wang L, Zec S, Laverack M, Martins M, et al. SARS-CoV-2 infection and longitudinal fecal screening in Malayan tigers (*Panthera tigris jacksoni*), Amur tigers (*Panthera tigris altaica*), and African lions (*Panthera leo krugeri*) at the Bronx zoo, New-York, USA. *J Zoo Wildl Med.* (2021) 51:733–44. doi: 10.1638/2020-0171
  33. McAloose D, Laverack M, Wang L, Killian ML, Caserta LC, Yuan F, et al. From people to panthera: natural SARS-CoV-2 infection in tigers and lions at the Bronx zoo. *mBio.* (2020) 11: e02220–20. doi: 10.1101/2020.07.22.213959
  34. Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Oude Munnink BB, Hakze-van der Honing RW, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.* (2020) 25:2001005. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005
  35. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* (2020) 368:1016–20. doi: 10.1126/science.abb7015
  36. Totton SC, Sargeant JM, O'Connor AM. How could we conclude cat-to-human transmission of SARS-CoV-2? *Zoonoses Public Health.* (2021) 68:67–8. doi: 10.1111/zph.12788
  37. Devaux CA, Rolain J-M, Raoult D. ACE2 receptor polymorphism: susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J Microbiol Immunol Infect.* (2020) 53:425–35. doi: 10.1016/j.jmii.2020.04.015
  38. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2021) 40:905–19. doi: 10.1007/s10096-020-04138-6

39. Petrakis D, Margină D, Tsarouhas K, Tekos F, Stan M, Nikitovic D, et al. Obesity - a risk factor for increased COVID-19 prevalence, severity and lethality (Review). *Mol Med Rep.* (2020) 22:9–19. doi: 10.3892/mmr.2020.11127
40. Malavazos AE, Goldberger JJ, Iacobellis G. Does epicardial fat contribute to COVID-19 myocardial inflammation? *Eur Heart J.* (2020) 41:2333. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa471
41. Iacobellis G, Malavazos AE, Corsi MM. Epicardial fat: from the biomolecular aspects to the clinical practice. *Int J Biochem Cell Bio.* (2011) 43:1651–4. doi: 10.1016/j.biocel.2011.09.006
42. Stephanie S, Shum T, Cleveland H, Challa SR, Herring A, Jacobson FL, et al. Determinants of chest X-ray sensitivity for COVID-19: a multi-institutional study in the United States. *Radiol Cardiothorac Imaging.* (2020) 2:e200337. doi: 10.1148/ryct.2020200337
43. Wong HYF, Lam HYS, Fong AH, Leung ST, Chin TW, Lo CSY, et al. Frequency and distribution of chest radiographic findings in patients positive for COVID-19. *Radiology.* (2020) 296:E72–8. doi: 10.1148/radiol.2020201160
44. Schober KE, Wetli E, Drost WT. Radiographic and echocardiographic assessment of left atrial size in 100 cats with acute left-sided congestive heart failure. *Vet Radiol Ultrasound.* (2014) 55:359–67. doi: 10.1111/vru.12131
45. Farid H, Khan M, Jamal S, Ghafoor R. Oral manifestations of Covid-19-A literature review. *Rev Med Virol.* (2021). doi: 10.1002/rmv.2248. [Epub ahead of print].
46. Nejabi MB, Noor NAS, Raufi N, Essar MY, Ehsan E, Shah J, et al. Tongue ulcer in a patient with COVID-19: a case presentation. *BMC Oral Health.* (2021) 21:273. doi: 10.1186/s12903-021-01635-8
47. Eghbali Zarch R, Hosseinzadeh P. COVID-19 from the perspective of dentists: a case report and brief review of more than 170 cases. *Dermatol Ther.* (2021) 34:e14717. doi: 10.1111/dth.14717
48. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* (2020) 12:1–5. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x
49. Gaudreault NN, Trujillo JD, Carossino M, Meekins DA, Morozov I, Madden DW, et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. *Emerg Microbes Infect.* (2020) 9:2322–32. doi: 10.1080/22221751.2020.1833687
50. Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, Zambrano-Achig P, Del Campo R, Ciapponi A, et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: a systematic review. *PLoS ONE.* (2020) 15:e0242958. doi: 10.1371/journal.pone.0242958
51. World Organisation for Animal Health (OIE). *Questions and Answers on COVID-19.* (2021). Available online at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/a-covid-22-01-2021.pdf> (accessed Sep 2, 2021)

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Chetboul, Foulex, Kartout, Klein, Sailleau, Dumarest, Delaplace, Gouilh, Mortier and Le Poder. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# LES CORONAVIRUS ANIMAUX : CE QU'ILS NOUS APPRENNENT

## ANIMAL CORONAVIRUSES : WHAT WE LEARN FROM THEM

Par Sophie LE PODER<sup>(1)</sup>, Manon DELAPLACE<sup>(2)</sup>, Hélène HUET<sup>(3)</sup>, Stéphan ZIENTARA<sup>(4)</sup>

(Communication présentée le 1er Octobre 2020,

Manuscrit accepté le 22 Novembre 2020)

### RÉSUMÉ

Les coronavirus sont présents chez de nombreuses espèces animales : chiens, chats, mais également porcs, ruminants, oiseaux, ainsi que dans la faune sauvage dont les chauves-souris. Les coronavirus infectant les mammifères domestiques et les chiroptères appartiennent aux genres *Alpha* ou *Betacoronavirus*. Le genre *Gammacoronavirus* comprend exclusivement des virus infectant les oiseaux et les mammifères marins tandis que les virus du genre *Deltacoronavirus* infectent soit les oiseaux soit certains mammifères. Il a été fait l'hypothèse que les virus du genre *Alpha* et *Betacoronavirus* trouvent leur origine parmi les coronavirus infectant les chauve-souris tandis que les virus du genre *Gamma* et *Deltacoronavirus* seraient issus de virus aviaires. Une même espèce animale peut être infectée par différents coronavirus parfois de genres différents. La multitude d'espèces animales infectées couplée aux possibilités importantes de variabilité du génome des Coronavirus favorisent les transmissions virales inter-espèces et l'émergence de nouveaux virus par recombinaison notamment.

**Mots-clés :** coronavirus animaux, transmission inter-espèce, pathogénicité.

### ABSTRACT

Coronaviruses are present in many animal species: dogs, cats, but also pigs, ruminants, birds, as well as wildlife including bats. Coronaviruses infecting domestic mammals and chiropterans belong to the genera *Alpha* or *Betacoronavirus*. The genus *Gammacoronavirus* comprises exclusively viruses infecting birds and marine mammals, while viruses of the genus *Deltacoronavirus* infect either birds or certain mammals. It has been hypothesised that viruses from the *Alpha* and *Betacoronavirus* genera originate from coronaviruses infecting bats, while viruses from the *Gamma* and *Deltacoronavirus* genera arise from avian viruses. A same animal species can be infected by different coronaviruses, sometimes of different genera. The multitude of infected animal species, coupled with the significant potential for variability in the coronavirus genome, promote inter-species viral transmission and the emergence of new viruses, particularly through recombination.

**Keywords:** animal coronaviruses, interspecies transmission, pathogenicity.

### INTRODUCTION

Les Coronavirus (CoVs) infectent de très nombreuses espèces animales, mammifères ou oiseaux. Le premier CoV décrit est celui responsable de la bronchite infectieuse aviaire en 1936, puis ce sera celui responsable de la gastro-entérite transmissible porcine en 1946. Le premier CoV humain ne sera décrit qu'en 1963, comme agent bénin impliqué dans les infections du tractus respiratoire supérieur. La famille des *Coronaviridae*, se divise en quatre genres: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*- et *Deltacoronavirus*. Les *Alpha*-

et *Betacoronavirus* ont pour hôte une grande variété de mammifères, notamment des chiroptères, tandis que les *Gamma*- et *Deltacoronavirus* infectent principalement des oiseaux et quelques mammifères (beluga et dauphin pour les *Gammacoronavirus*, et porc pour les *Deltacoronavirus*). Les récentes descriptions de nombreux nouveaux CoVs au sein de chacun de ces genres, ont amené à les re-subdiviser en sous-genres. Les coronavirus sont caractérisés par une importante capacité évolutive leur permet-

(1) Professeure de virologie, UMR Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRAE, ANSES, Université Paris-Est. Courriel : sophie.lepoder@vet-alfort.fr

(2) Doctorante, UMR Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRAE, ANSES, Université Paris-Est,

(3) Ingénieure d'Etude, UMR Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRAE, ANSES, Université Paris-Est,

(4) Directeur UMR, UMR Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRAE, ANSES, Université Paris-Est,

tant de changer d'hôte ou de tropisme tissulaire. Leur évolution génétique est rendue possible par l'apparition de mutations au sein de leur génome à ARN monocaténaire, et des possibilités de recombinaisons.

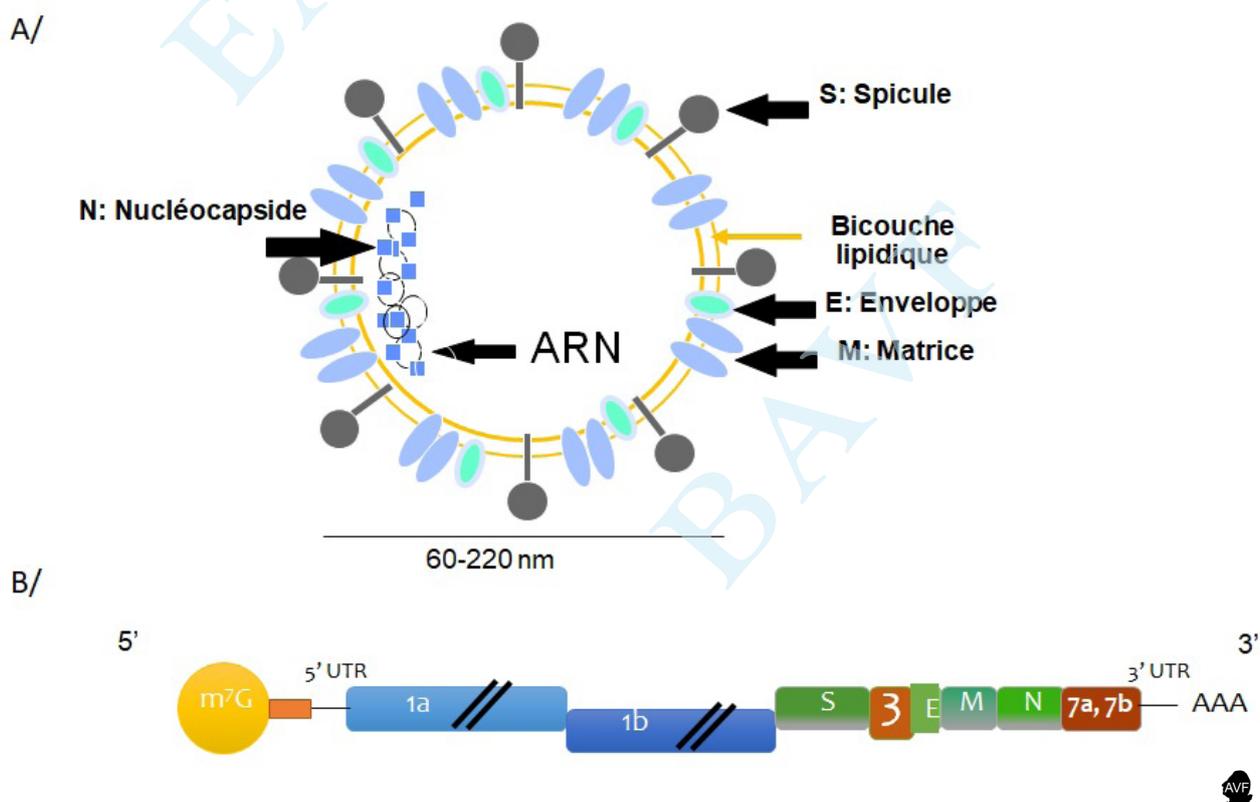
## PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES CORONAVIRUS

Les Coronavirus sont des particules virales enveloppées dont le diamètre varie entre 118 et 136 nm. Dans l'enveloppe virale sont enchâssées au moins trois protéines virales appelées S (Spicule), E (Enveloppe) et M (Matrice) (**Figure 1A**). Une quatrième protéine appelée HE (Hemagglutinine-Estérase) est présente aussi dans l'enveloppe de certains *Betacoronavirus*. La nucléocapside virale est formée par l'association de la protéine N (Nucléocapside) avec le génome viral. Elle possède une symétrie hélicoïdale ce qui est rare parmi les virus dont le génome est un ARN de polarité positive. De longueur variant de 25400 à 31700 nucléotides, le génome des *Coronaviridae* est la plus grande molécule d'ARN viral connue à ce jour. C'est un ARN monocaténaire de polarité positive avec une coiffe et une séquence leader à l'extrémité 5' et une queue poly A du côté 3'. L'organisation du génome viral est similaire pour tous les *Coronaviridae*. Les deux premiers tiers du génome comprennent un long cadre de lecture codant pour l'ensemble des protéines non-structurales (nsp1-nsp16) néces-

saires à la réplication et la transcription du génome viral. Ce premier cadre de lecture, appelé ORF1 est lui-même subdivisé en deux : l'ORF1a qui correspond aux gènes codant les protéines nsp1 à nsp11 et l'ORF1b codant pour les autres protéines. L'ORF1b est traduit uniquement dans un tiers des cas grâce à un phénomène de changement de cadre de lecture ou « frameshift » qui se produit entre l'ORF1a et l'ORF1b. Les cadres de lecture correspondant aux protéines de structure sont situés en aval de l'ORF1b, toujours dans le même ordre de 5' en 3' : HE si elle est présente (chez certains *Betacoronavirus*), puis S, E, M, et enfin N. Entre ces cadres de lecture se situent les gènes codant pour les protéines accessoires (**Figure 1B**). Leur nombre et leur localisation dans le génome viral est variable selon les virus.

## LES PRINCIPAUX CORONAVIRUS ANIMAUX

Si on exclut les arthropodes et les poissons, rares sont les espèces animales, pour lesquelles il n'est pas connu un ou plusieurs CoVs pouvant les infecter. Parmi, ces exceptions on peut noter l'absence d'identification de CoVs spécifiques des primates non-humains, même si ces espèces animales sont par ailleurs réceptives à l'infection par les CoVs humains. A contrario, chez certaines espèces animales, plusieurs CoVs spécifiques ont été identifiés (**Figure 2**).



**Figure 1** : A : Schéma de la particule virale, avec les protéines de structure S, E, M et N. B/ Représentation schématique du génome du coronavirus félin. En bleu les gènes codant pour les protéines non-structurales, en vert, les gènes codant pour les protéines de structures, en marron, les gènes codant pour les protéines accessoires.

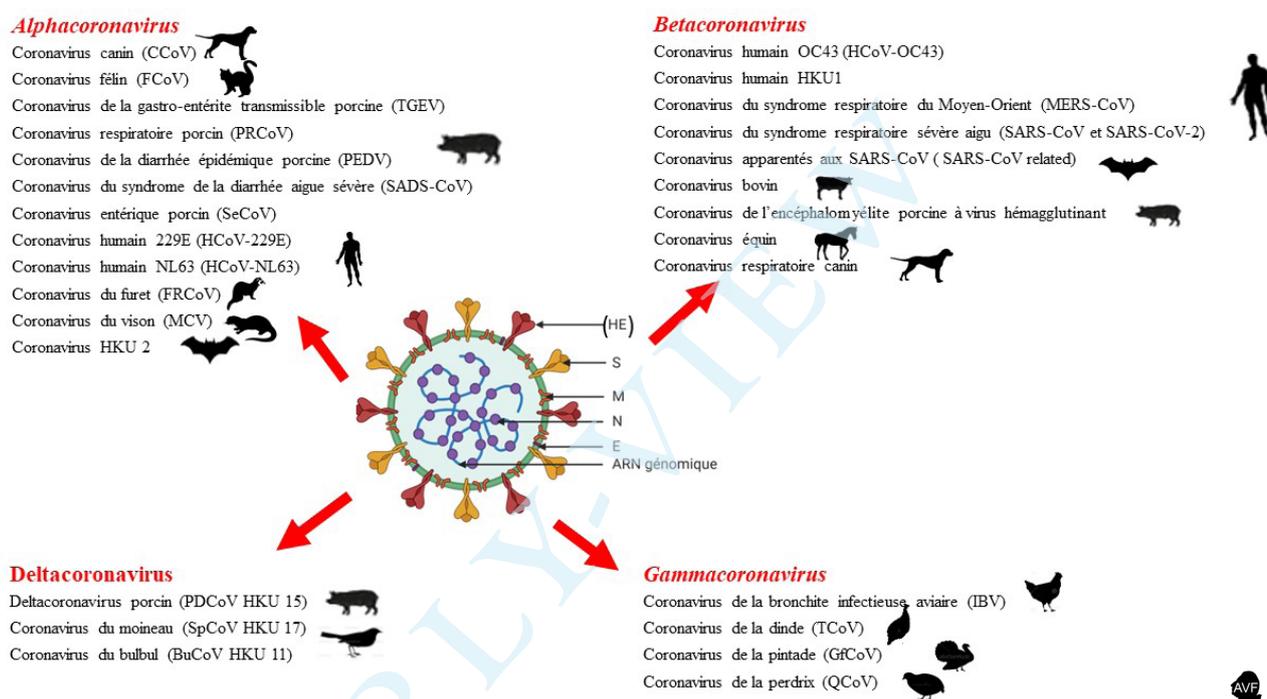


Figure 2 : Classification simplifiée des principaux coronavirus animaux.

### Chez les chiroptères

Ainsi, chez les chiroptères, l'organisation officielle de classification des virus (ICTV) reconnaît actuellement 17 CoVs différents de chauve-souris (Bat-CoV) et d'autres espèces virales sont en attente de classification. Ces virus appartiennent soit au genre *Alpha*, soit au genre *Betacoronavirus*. Les analyses phylogénétiques suggèrent que les chauve-souris sont d'ailleurs le réservoir naturel de ces virus et certains de ces virus sont à l'origine des CoVs de mammifères terrestres dont ceux infectant l'Homme (Decaro *et al*, 2020).

### Chez les suidés

Chez le porc, cinq CoVs différents sont maintenant décrits appartenant aux genre *Alpha*, *Beta* ou *Deltacoronavirus* :

- le virus de la gastro-entérite porcine (TGEV) et son variant respiratoire, le coronavirus respiratoire porcine,
- le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV),
- le coronavirus du syndrome de la diarrhée aigue sévère,
- le virus de l'encéphalomyélite porcine à virus hémagglutinant,
- le deltacoronavirus porcine.

Le virus SeCoV (*swine enteritis coronavirus*), est un virus recombinant, constitué d'un génome de TGEV dans lequel le gène S est remplacé par celui du PEDV.

### Chez les bovidés et les équidés

Chez les bovins, seul le coronavirus bovin (BCoV) est décrit. Il appartient au genre *Betacoronavirus* et peut infecter d'autres ruminants. Les virus infectant ces autres ruminants sont identifiés comme étant des souches « bovin-like ». Elles ont été mises en évidence chez les ovins, caprins, la girafe, différentes espèces d'antilopes, le caribou, le wapiti... Chez les équidés, un seul coronavirus est connu, le coronavirus équin (ECoV) appartenant aussi au genre *Betacoronavirus* et phylogéniquement proche du BCoV.

### Chez les carnivores

Chez les carnivores domestiques et sauvages, des coronavirus d'importance médicale sont aussi bien identifiés. Chez le chien, deux coronavirus différents sont connus : le coronavirus respiratoire canin du genre *Betacoronavirus* et le coronavirus entérique canin (CCoV) du genre *Alphacoronavirus*. Ce dernier est génétiquement très proche du coronavirus de la gastro-entérite transmissible porcine et du coronavirus félin (FCoV). Chez le chat, seul le FCoV est connu. Il peut aussi infecter des félinés sauvages. Deux CoVs spécifiques sont aussi maintenant répertoriés respectivement chez le vison et le furet, appelés coronavirus du vison et du furet. Ils appartiennent aussi au genre *Alphacoronavirus* mais sont génétiquement assez éloignés des CCoV et FCoV. Ces animaux peuvent aussi s'infecter par le virus SARS-CoV-2 (Hossain *et al*, 2020).

## Chez les oiseaux

Chez les oiseaux, de nombreux coronavirus sont maintenant décrits appartenant soit au genre *Gamma*, soit au genre *Deltacoronavirus*. Le virus de la bronchite infectieuse aviaire, premier coronavirus historiquement découvert, infecte essentiellement les poulets. De manière intéressante, le coronavirus infectant la dinde, celui de la pintade et celui infectant la perdrix sont apparentés génétiquement au virus de la bronchite infectieuse. Ils diffèrent entre eux au niveau du gène codant pour la protéine S tandis que le reste du génome viral est très similaire entre ces différents virus. De très nombreux coronavirus des oiseaux sauvages (moineau, héron, pigeon, faucon...) appartenant au genre *Deltacoronavirus* sont maintenant répertoriés.

## DES VIRUS INDUISANT DIVERSES PATHOLOGIES ANIMALES

### Des formes de gravité très variables

La gravité des infections provoquées par ces virus est très variable pouvant aller d'une infection asymptomatique à une maladie mortelle. Bon nombre de ces infections provoquent des maladies respiratoires comme la bronchite infectieuse aviaire chez les poulets, les CoVs respiratoires porcine ou canine, même si pour ces deux dernières infections les symptômes semblent modestes. D'autres CoVs animaux vont induire des troubles digestifs comme le virus de la gastro-entérite transmissible porcine ou celui de la diarrhée épidémique porcine, le CoV équin, les CoVs de la pintade ou de la dinde, par exemple. Le CoV bovin peut aussi induire des symptômes digestifs en particulier chez les jeunes veaux. Certaines de ces infections dues aux CoVs conduisent à une infection systémique et à la mort de l'animal.

C'est le cas de la Péritonite Infectieuse Féline (PIF) ou de la maladie systémique du furet.

### Chez le chat et félinés sauvages

La PIF est une maladie qui peut prendre différentes formes cliniques avec soit une forme humide avec accumulation de liquide dans l'abdomen soit une forme sèche due à la formation de granulomes dans différents organes (foie, rein, encéphale...). De nombreux chats s'infectent par le CoV félin sans pour autant déclarer de symptômes. Les études menées sur les infections FCoV suggèrent que la plupart des chats s'infectent par un FCoV ayant un tropisme entérique bénin, ce variant est appelé coronavirus entérique félin (FeCV). Chez certains chats, plutôt les animaux jeunes de moins de 2 ans, ce virus mute sur des portions bien particulières du génome viral (sur le gène codant pour la protéine d'enveloppe S ou/et le gène codant pour la protéine accessoire 3c). Ces mutations conduisent à l'émergence chez le chat infecté de souches virales très pathogènes, appelé coronavirus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) dont la cible cellulaire devient les monocytes/macrophages (Chang *et al*, 2010, Chang *et al*, 2012). Le virus FIPV, contrairement au

variant FeCV diffuse dans différents organes et l'infection des monocytes/macrophages conduit à la libération excédentaire de cytokines pro-inflammatoires. Cette réponse cytokinique est en grande partie responsable des lésions et symptômes observés dans les cas de PIF. Lorsque ces symptômes sont déclarés, la maladie se révèle systématiquement mortelle pour le chat. Le coronavirus félin peut infecter les félinés sauvages provoquant des symptômes apparentés à la PIF chez le guépard. L'infection par le SARS-CoV2 peut aussi toucher lions, tigres et puma, avec des symptômes respiratoires bénins comme l'a montré l'épisode survenu en avril 2020 dans le zoo de New-York (Hossain *et al*, 2020).

### Chez le furet

Une maladie très similaire à la PIF est maintenant bien décrite chez le furet. Le coronavirus entérique du furet, responsable de l'entérite catarrhale épizootique (virus appelé FRECV) peut évoluer parfois vers un virus à diffusion systémique, le coronavirus systémique du furet (FRSCV). Ce virus provoque alors des symptômes et des lésions chez le furet qui ne sont pas sans rappeler ceux observés lors de PIF chez le chat (Murray *et al*, 2010).

### Influence de l'âge

Les CoVs animaux nous apprennent que la gravité de l'infection ou l'expression clinique peut varier selon l'âge de l'animal. Ainsi la PIF est essentiellement décrite chez les chats de moins de 2 ans. Pour le PEDV, l'infection impacte surtout les porcelets non-sevrés, chez lesquels le taux de létalité peut atteindre 100% avec les souches les plus virulentes. Chez les porcs en engraissement, la morbidité est de 100% mais la mortalité reste faible (1 à 3%) et la guérison survient généralement une semaine après l'apparition des symptômes (Gallien *et al*, 2016).

## DES PASSAGES INTER-ESPÈCES POSSIBLES

### Origine animale des coronavirus humains

Les capacités évolutives des CoVs par recombinaison ou mutation favorisent le passage de ces virus d'une espèce hôte à une autre. Il est maintenant bien documenté que tous les CoVs humains ont une origine animale plus ou moins récente. Ainsi le HCoV-229E provient d'un CoV de chauve-souris qui se serait transmis à l'alpaga avant de s'adapter à l'espèce humaine. Au cours de cette adaptation, outre des modifications du gène codant pour la protéine S, un gène codant pour une protéine accessoire nommée ORF8 a disparu. Le HCoV-NL63 proviendrait d'une recombinaison entre un virus apparenté au HCoV-229E et un virus apparenté HCoV-NL63 détectés chez certaines chauve-souris. Le virus HCoV-OC43, proviendrait d'une adaptation du CoV bovin à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle à l'espèce humaine. L'origine du HCoV-HKU1 n'est pas complètement élucidée mais il est admis qu'il proviendrait d'un CoV de rongeur et aurait émergé chez l'Homme dans les années 50s. Le MERS-CoV, qui a été découvert en 2012, provient d'un virus apparenté identifié chez les chauve-souris mais sa transmission à l'Homme se fait

via un hôte intermédiaire, qui est le dromadaire. Le SARS-CoV trouve aussi son origine chez certaines espèces de chauve-souris. Il a émergé chez l'Homme après passage par un hôte intermédiaire qui est la civette (Forni *et al*, 2017). Le SARS-CoV-2 trouve aussi son origine chez les chauve-souris rhinolophes mais l'identité de l'éventuel hôte intermédiaire n'est pas élucidé.

### Transmissions inter-espèces des coronavirus FCoV et CCoV

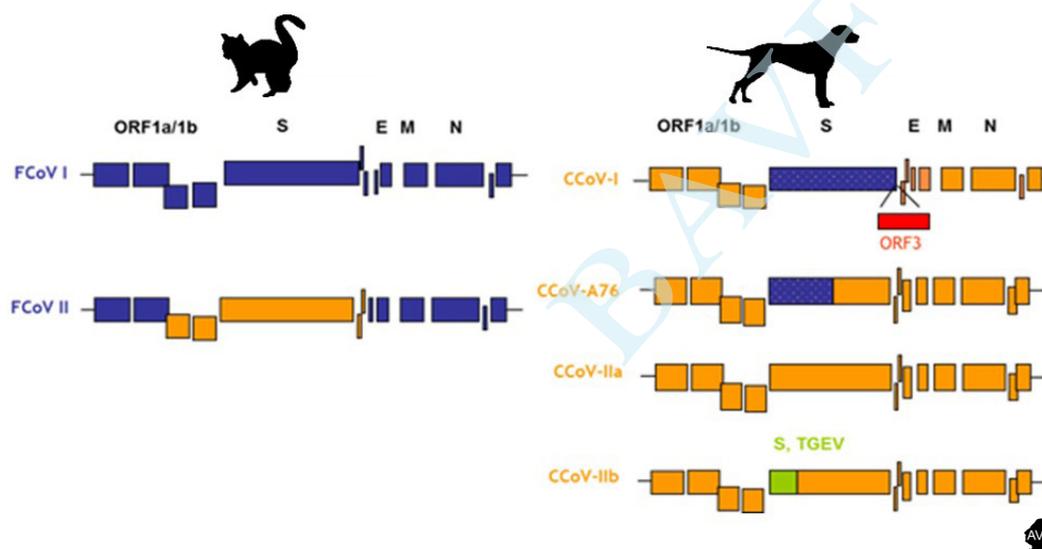
Les transmissions de CoVs inter-espèces animales sont aussi documentées. Ainsi l'analyse génétique des différents génotypes de FCoV et CCoV témoignent de recombinaisons homologues entre ces deux virus des espèces canines et félines. Deux principaux génotypes FCoV- I/FCoV-II et CCoV-I/CCoV-II sont maintenant décrits. Ainsi le virus FCoV-II résulte d'une double recombinaison entre le FCoV-I et le CCoV-II. Le gène S du FCoV-II provient du CCoV-II tandis que les gènes en amont et en aval de S proviennent du FCoV-I. Les sites de recombinaison ont été identifiés pour différentes souches de FCoV-II et sont différents pour chaque souche indiquant des événements de recombinaison indépendants (Herrewegh *et al.*, 1998). De même, les deux principaux génotypes CCoV-I et CCoV-II sont décrits, différant aussi principalement au niveau du gène S. En effet le gène S du CCoV-I partage plus de 80% d'identité avec celui du FCoV-I, le reste du génome s'apparentant plutôt au génome CCoV-I. Pour autant CCoV-I ne résulte pas d'une double recombinaison. En effet un gène supplémentaire unique de ce génotype est présent dans toutes les souches CCoV-I en aval du gène S : le gène accessoire ORF3 (Lorusso *et al.*, 2008). Le génotype CCoV-II résulterait d'un événement de recombinaison avec un CoV à ce jour inconnu qui aurait permis l'acquisition

d'un gène S différent. Le génotype CCoV-II est subdivisé en deux clades CCoV-IIa et CCoV-IIb, la différenciation se faisant de nouveau au niveau du gène S, avec la partie N-terminale du gène des souches CCoV-IIb provenant du virus de la gastro-entérite porcine. Enfin, récemment il a été mis en évidence des souches recombinantes CCoV-I/CCoV-II où l'extrémité N-terminale de S provient de CCoV-I et le reste du génome s'apparente au CCoV-II (Figure 3).

### Origine aviaire du deltacoronavirus porcine

Contrairement à la majorité des CoVs de mammifères qui aurait pour origine un CoV de chiroptères, il est probable que le deltacoronavirus porcine (PDCoV) ait pour origine un CoV aviaire. PDCoV, de manière intéressante, partage 85% d'identité de son génome complet avec un deltacoronavirus de moineau (SpCoV HKU17) et 83% avec celui d'une autre espèce de passereau (BuCoV HKU11). En revanche, deux protéines accessoires (ORF7b et ORF7c) présentes chez un certain nombre de *Deltacoronavirus*, y compris SpCoV HKU17 et BuCoV HKU11, sont absentes du génome de PDCoV. Il est possible que cette perte ainsi que les modifications du gène codant pour le spicule aient été des facteurs déterminants du franchissement de barrière d'espèces (Wang *et al*, 2019).

Ainsi, les exemples de transmissions de CoVs entre espèces hôtes sont nombreux et illustrent bien le potentiel évolutif de ces virus. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces transmissions ne sont pas encore bien compris et probablement très divers mais il apparaît généralement deux facteurs essentiels que sont les modifications de la protéine S accompagnées parfois d'altérations de certaines protéines accessoires.



**Figure 3 :** Les différents génotypes de coronavirus félines et canins. Le virus FCoV-II résulte d'une double recombinaison homologe entre CCoV-IIa et FCoV-I. Le virus CCoV-IIb résulte d'une double recombinaison homologe avec le virus TGEV. Les gènes représentés en bleu sont d'origine féline. Les gènes en orange sont d'origine canine. Les gènes en vert sont d'origine porcine. En rouge est représenté l'ORF3, découvert en 2008.

## CONCLUSION

En médecine humaine, l'apparition des infections dues au SARS-CoV puis du MERS-CoV a fait prendre conscience de la dangerosité des coronaviroses pour l'Homme. L'émergence fin 2019 du SARS-CoV-2 confirme que les CoVs humains ont aussi un potentiel hautement pathogène. Ce virus, comme les autres CoVs humains, résulte d'une transmission inter-espèces même si la chaîne de transmission n'est à ce jour pas complètement élucidée. Les Coronavirus animaux nous apprennent qu'ils peuvent avoir des capacités évolutives importantes, induire des pathologies diverses parfois très graves, autant de caractéristiques que l'on retrouve avec le SARS-CoV-2. Ce nouveau coronavirus humain peut infecter aussi certaines espèces animales notam-

ment les visons. Plusieurs pays (Pays-Bas, Danemark, États-Unis, Suède, Espagne et Grèce) ont notifié des infections par le SARS-CoV-2 survenues dans les élevages de visons. Il a été établi pour certains élevages que l'introduction de l'infection était due aux travailleurs eux-mêmes infectés, mais ultérieurement des transmissions zoonotiques des visons infectés vers des travailleurs indemnes ont aussi été documentés aux Pays-Bas et au Danemark (Hammer, *et al.* 2020). Plus que jamais, le concept « One health » s'impose pour faire progresser les connaissances et les moyens de lutte contre les CoVs pour un bénéfice mutuel en santé humaine et animale.

## BIBLIOGRAPHIE

- Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJM. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 2010; 91: 415-420.
- Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJM. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1089-1095.
- Decaro N, Lorusso A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2) : a lesson from animal coronaviruses. *Vet Microbiol.* 2020; 244:108693.
- Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* 2017; 25: 35-48.
- Gallien S, Le Poder S, Rose N, Grasland B. Diarrhée épidémique porcine : le retour d'une ancienne maladie. 2016. *Virologie.* 2016; 20(6): 335-351.
- Hammer AS, Quaade ML, Rasmussen TB, Fonager J, Rasmussen M, Mundbjerg K *et al.* SARS-CoV-2 Transmission between mink (*Neovison vison*) and humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2021; in press. Doi: 10.3201/eid2702.203794.
- Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol.* 1998; 72: 4508-4514.
- Hossain MG, Javed A, Akter S, Saha S. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020; 25: S1684-1182(20)30147-X
- Lau SKP, Wong EYM, Tsang CC, Ahmed SS, Au-Yeung RKH, Yuen KY *et al.* Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal Interspecies Jumping with Recombination as a Potential Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission. *J Virol.* 2018; 92: e00265-18.
- Lorusso, A., Decaro, N., Schellen, P., Rottier, P.J.M., Buonavoglia, C., Haijema, B.-J., and de Groot, R.J. Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol.* 2008; 82: 10312-10317.
- Murray J, Kiupel M, Maes RK. Ferret coronavirus-associated diseases. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2010; 13: 543-60.
- Wang Q, Vlasova A, Kenney S, Saif L. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr Opin Virol.* 2019; 34: 39-49.

# Le coronavirus chez le cheval

Le coronavirus équin, ou ECoV, est un coronavirus du cheval, distinct du SARS-CoV-2 (responsable de l'épidémie de Covid-19) et non transmissible à l'homme. Connu depuis 1999, ECoV peut causer essentiellement des troubles digestifs chez les chevaux.

Les *Coronaviridae* sont une famille de virus pouvant infecter de très nombreuses espèces. Les coronavirus se répartissent en quatre genres. Les alpha et beta-coronavirus infectent uniquement des mammifères. On en trouve chez l'homme (SARS-CoV-2, le virus responsable de l'épidémie de Covid-19 ou NL63, HKU1, OC43, HCoV-229E, responsables de rhumes) ainsi que chez d'autres mammifères comme les chauves-souris, les chiens ou les porcs. Les gamma et delta-coronavirus

infectent surtout des oiseaux, ainsi que quelques mammifères comme les dauphins. Le plus connu des coronavirus infectant les oiseaux est le virus de la bronchite infectieuse (IBV) qui affecte les poulets, mais des coronavirus ont aussi été retrouvés chez des oiseaux sauvages comme les faucons, les moineaux ou les pigeons.

Ces virus ont le plus souvent un spectre d'hôtes limité : un coronavirus n'infecte souvent qu'une espèce ou quelques espèces très proches (par exemple FCoV, un

coronavirus félin, infecte les chats domestiques et de grands félins comme les pumas).

Des exceptions existent comme le SARS-CoV-2, virus transmis d'un animal sauvage (probablement une espèce de chauve-souris) à l'homme. Ce phénomène de franchissement de la barrière des espèces est rare mais avait déjà été observé lors de l'émergence du SARS-CoV en 2002 puis du MERS-CoV en 2012. Le SARS-CoV-2 ne semble pas infecter les équidés.

## ECoV : le coronavirus du cheval

Chez le cheval, un coronavirus existe aussi. Nommé ECoV pour equine coronavirus, il est le seul coronavirus connu pouvant infecter les équidés (chevaux, ânes...) jusqu'à présent. À ce jour, aucune transmission à l'homme ou à d'autres espèces n'a été observée. Bien que ECoV et SARS-CoV-2 appartiennent au même genre de coronavirus, les beta-coronavirus, ils sont assez différents.

ECoV appartient à une lignée appelée 2-A qui contient, entre autres, des coronavirus de bovin et de lapin et un autre coronavirus humain appelé HCoV-OC43 provoquant majoritairement des rhumes chez l'homme. SARS-CoV-2 appartient à la lignée appelée 2-B contenant aussi le virus humain du SARS-CoV (responsable d'une épidémie en 2002) et quelques coronavirus de chauves-souris. Le coronavirus équin est un



13PIXELS/JOBE STOCK

virus comprenant quatre protéines dans son enveloppe (S, E, M et HE), à la différence du SARS-CoV-2 qui n'en comprend que trois (S, E et M).

## Épidémiologie

Depuis sa découverte en 1999 aux États-Unis, ECoV a été détecté dans plusieurs pays : en Arabie saoudite et à Oman, au Japon, en Irlande, au Royaume-Uni et en France. Sa présence sur au moins trois continents signifie que le coronavirus équin est très largement répandu dans le monde.

En France, le virus a été découvert pour la première fois en 2012. Sur les 595 échantillons, fécaux ou nasaux, récoltés dans 58 départements, 11 échantillons fécaux et un échantillon nasal étaient positifs. Tous sauf un provenaient de poulains présentant des pathologies entériques. Quatre échantillons provenaient du même foyer épidémique.

Une autre étude, en Californie, a identifié 20 échantillons de fèces positifs (dont 4 chevaux avec des sécrétions nasales également positives) sur 277 chevaux adultes testés qui présentaient de l'hyperthermie. D'autres épizooties d'ECoV aux États-Unis impliquaient en majorité des chevaux adultes présentant de la fièvre, de l'anorexie et de la léthargie.

Deux épidémies chez des chevaux miniatures ont été décrites en 2013. Une à New-York dans une ferme où 25 des 29 chevaux miniatures et un âne miniature ont été testés positifs par RT-PCR<sup>1</sup>. Sur les 25 chevaux positifs, cinq ont présenté des symptômes cliniques mais sans aucun décès. L'autre épidémie s'est déclarée dans deux foyers en Caroline et en Idaho sur des che-



Le virus a été découvert en 1999 aux États-Unis.

vaux et ânes miniatures récemment revenus du même show au Texas. 15 chevaux sur 27 étaient positifs en RT-PCR pour ECoV et dix d'entre eux ont eu des symptômes cliniques (fièvres, léthargie et coliques bénignes). Parmi les animaux symptomatiques, quatre sont décédés ou ont dû être euthanasiés, soit un taux de mortalité de 27 %. Parmi tous les foyers décrits, ce sont les seuls à avoir un taux de mortalité aussi important.

## Symptômes et traitements

Chez le poulain, des infections (symptomatiques ou non) à ECoV ont parfois été identifiées. Des poulains souffrant de diarrhées pré-

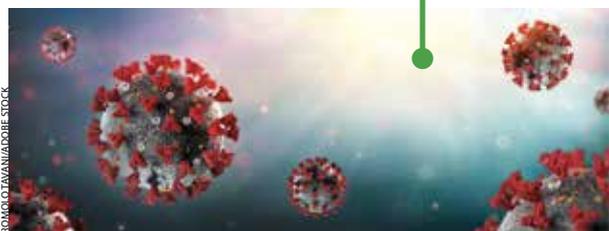
sentent parfois des co-infections ECoV avec un autre pathogène entérique.

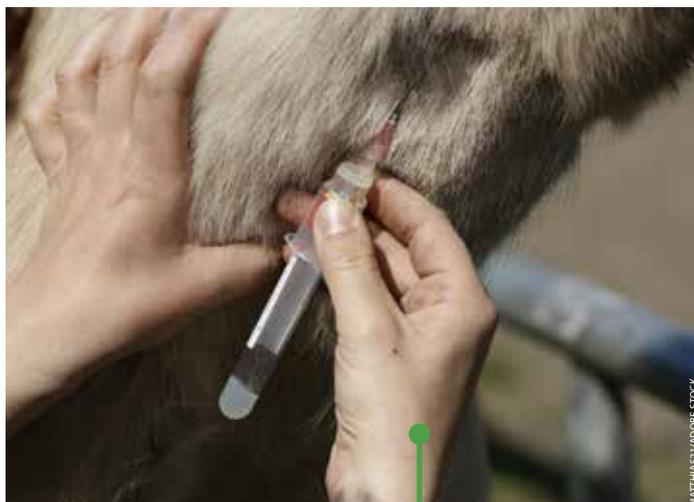
Chez le cheval adulte, la plupart du temps, aucune manifestation clinique n'est observée. Un cheval en bonne santé infecté par ECoV peut être contagieux et infecter d'autres chevaux avec qui il partage son environnement. L'infection d'un cheval se produit lorsque celui-ci va ingérer de l'eau ou de la nourriture contaminée par du crottin de cheval infecté.

En cas de maladie, les symptômes apparaissent deux à trois jours après l'infection. On observe le plus souvent de l'anorexie, de la léthargie et une hyperthermie (en moyenne

Des poulains souffrant de diarrhées présentent parfois des co-infections ECoV.

Les Coronaviridae sont une famille de virus pouvant infecter de très nombreuses espèces.





39,9 °C). Plus rarement (10 à 20 % des cas), les chevaux peuvent souffrir de diarrhées ou de coliques. Les chevaux infectés peuvent développer une encéphalite, mais ces cas sont exceptionnels ; l'infection par ECoV est rarement mortelle. Les chevaux infectés par ECoV n'ont le plus souvent pas ou peu besoin de soins, l'infection se terminant d'elle-même. Si les symptômes sont très sévères, des traitements symptomatiques peuvent être mis en œuvre. Il n'existe pas de traitement spécifique contre ECoV ni de vaccin.

### Diagnostic

Des anomalies peuvent être détectées lors d'un bilan sanguin : les chevaux infectés par ECoV présentent très souvent une leucopénie, une neutropénie et une lymphopénie. Pour confirmer une infection par ECoV, des tests plus spécifiques peuvent être demandés.

Pour cela, du crottin du cheval malade est envoyé en laboratoire. Si le cheval a été infecté par ECoV dans les deux à trois dernières semaines, le virus peut alors être détecté par un test RT-qPCR, qui recherche spécifiquement l'ARN génomique du ECoV.

D'autres méthodes plus anciennes existent, comme les tests Elisa qui détectent les protéines du virus, ou la microscopie électronique, qui permet de voir directement les virus

Si le cheval a été infecté dans le passé, il est possible de détecter les anticorps anti-ECoV dans le sérum.

## En cas de maladie, les symptômes apparaissent deux à trois jours après l'infection.

mais ces tests sont moins sensibles. Si le cheval a été infecté par le passé, il est possible de détecter les anticorps anti-ECoV dans le sérum. Ces tests sérologiques sont réalisés notamment lors d'enquêtes épidémiologiques, pour confirmer la présence de ECoV dans une nouvelle région ou pour déterminer a posteriori l'ampleur d'une épidémie par exemple.

Pour résumer, en cas de suspicion d'infection par ECoV, le cheval infecté peut être isolé pour éviter la contamination d'autres chevaux. De même, le prêt de matériel et le temps passé dans des lieux communs doivent être limités. ECoV n'étant pas transmissible à

l'homme, il n'y a pas de précautions particulières à prendre pour soigner un cheval infecté. Les symptômes éventuels devront être surveillés. Il n'existe ni traitement spécifique ni vaccin.

MANON DELAPLACE, STÉPHAN ZIENTARA, SOPHIE LE PODER  
UMR VIROLOGIE, INRA, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT, ANSES, UNIVERSITÉ PARIS-EST, MAISONS-ALFORT, 94700, FRANCE.

(1) RT-PCR : technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. Dans ce cas, l'ARN constitue le matériel génétique du virus ECoV et la technique permet donc de montrer la présence ou non du virus. Cf « Diagnostic ».

### Bibliographie

- Fielding, C.L., Higgins, J.K., Higgins, J.C., McIntosh, S., Scott, E., Giannitti, F., Mete, A., Pusterla, N., 2015. Disease associated with equine coronavirus infection and high case fatality rate. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 307–310. <https://doi.org/10.1111/jvim.12480>
- Hemida, M.G., Chu, D.K.W., Perera, R.A.P.M., Ko, R.L.W., So, R.T.Y., Ng, B.C.Y., Chan, S.M.S., Chu, S., Alnaeem, A.A., Alhamadi, M.A., Webby, R.J., Poon, L.L.M., Balasuriya, U.B.R., Peiris, M., 2017. Coronavirus infections in horses in Saudi Arabia and Oman. *Transbound Emerg Dis* 64, 2093–2103. <https://doi.org/10.1111/tbed.12630>
- Miszczak, F., Tesson, V., Kin, N., Dina, J., Balasuriya, U.B.R., Pronost, S., Vabret, A., 2014. First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe. *Veterinary Microbiology* 171, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.031>
- Nemoto, M., Schofield, W., Cullinane, A., 2019. The First Detection of Equine Coronavirus in Adult Horses and Foals in Ireland. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11100946>
- Pusterla, N., Vin, R., Leutenegger, C.M., Mittel, L.D., Divers, T.J., 2018. Enteric coronavirus infection in adult horses. *Vet. J.* 231, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.004>
- Sanz, M.G., Kwon, S., Pusterla, N., Gold, J.R., Bain, F., Evermann, J., 2019. Evaluation of equine coronavirus fecal shedding among hospitalized horses. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 918–922. <https://doi.org/10.1111/jvim.15449>
- Zhao, S., Smits, C., Schuurman, N., Barnum, S., Pusterla, N., Kuppeveld, F. van, Bosch, B.-J., Maanen, K. van, Egberink, H., 2019. Development and Validation of a S1 Protein-Based ELISA for the Specific Detection of Antibodies against Equine Coronavirus. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11121109>

**Title :** Role of cyclophilins in the replicative cycle of Coronavirus

**Keywords :** cyclophilin, coronavirus, antivirals, replicative cycle

**Abstract :**

Coronaviruses (CoVs) are viruses leading to fatal diseases in humans and animals for which there is no specific treatment. In cats, one of the feline coronaviruses, the feline infectious peritonitis virus (FIPV) causes a systematically lethal pathology in cats. Because of their genomic plasticity and their ability to infect multiple animal species, mammals or birds, CoVs represent a constant risk of emergence. The latest human emergences of SARS-CoV, MERS-CoV and more recently SARS-CoV-2 are the result of interspecific transmissions between wildlife and humans. Recent studies have shown that cyclophilins (CyP), which are highly conserved cellular proteins, are required for the replicative cycle of CoVs but the specific modes of action of these proteins are undetermined.

To investigate the role of cyclophilins in coronavirus replication, we used newly developed small molecule cyclophilin inhibitors (SM-Cypl), which are non-immunosuppressive. We screened 21 SM-Cypls as well as Cyclosporin A (CsA) as a reference inhibitor. Nine SM-Cypls had a greater FIPV replication inhibitory activity than CsA. Of the nine molecules, three were selected: the molecule named 83233, which was shown to be the best FIPV inhibitor and the molecules 832 and 833 from which 83233 was developed. Using these cyclophilin inhibitors and performing experiments where these antiviral compounds were applied at different times post-infection (1h, 3h, 6h, 9h and 12h) or before infection, we showed that the antiviral effect of these compounds was maximal when they were administered at the time of infection or 1h after. In all other experimental conditions, their antiviral effect was reduced. We thus determined that cyclophilins were essential at an early step of feline coronavirus replication. This step(s) would correspond to the decapsidation and/or the establishment of the viral replication complex.

To complement our study on the mechanisms of action of cyclophilins, we aimed to determine which viral proteins could interact with cellular cyclophilins, especially cyclophilin A. We identified that the N protein of the feline coronavirus interacts with feline cyclophilin A using a Proximity Ligation Assay (PLA). This interaction had so far only been shown in human models of coronavirus and cyclophilins. Thus, the mechanisms of interaction of cyclophilins with coronavirus proteins might be conserved. However, during inhibition tests with SM-Cypl against the avian infectious bronchitis virus, a gammacoronavirus, the inhibitory effect of the molecules was moderate.

This work has provided new insights into the role of cyclophilins in coronavirus replication and suggests that this role may be conserved at least in mammalian coronaviruses. Our data also enabled us to identify an interesting therapeutic target, as well as molecules presenting a major antiviral effect against various coronaviruses, which could lead to new therapeutic strategies.

**Titre :** Rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus

**Mots-clés :** cyclophilines, coronavirus, antiviraux, cycle de réplication

**Résumé :**

Les Coronavirus (CoVs) forment une famille regroupant de nombreux virus qui peuvent infecter l'Homme et les animaux. Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique des infections à coronavirus. Chez le chat, un des coronavirus félines, le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) provoque une pathologie systématiquement létale. De par leur plasticité génomique et leur capacité à infecter de multiples espèces animales, mammifères ou oiseaux, les CoVs représentent une menace d'émergence continue. Les dernières émergences chez l'Homme du SARS-CoV, du MERS-CoV et plus récemment de SARS-CoV-2 sont le fruit de transmissions interspécifiques entre la faune sauvage et l'Homme. Des études récentes ont montré que les cyclophilines (CyP), des protéines cellulaires très conservées, sont indispensables au cycle réplcatif des CoVs mais les modes d'actions précis de ces protéines ne sont pas connus.

Pour étudier le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus, nous avons utilisé de petites molécules inhibitrices des cyclophilines (SM-Cypl) développées récemment, qui sont non-immunosuppressives. Nous avons criblé 21 SM-Cypl ainsi que la Cyclosporine A (CsA) comme inhibiteur de référence. Neuf SM-Cypl avaient une activité inhibitrice de la réplication du FIPV supérieure à celle de la CsA. Sur les neuf molécules, trois ont été sélectionnées : la molécule nommée 83233, se révélant être le meilleur inhibiteur du virus FIPV, et les molécules 832 et 833 qui sont apparentées au 83233. Des expériences de temps d'addition où les molécules antivirales étaient appliquées à différents temps post-infection (1h, 3h, 6h, 9h et 12h) ou avant l'infection, ont montré que l'effet antiviral de ces molécules était maximal lorsqu'elles étaient appliquées au moment de l'infection ou 1h après. Dans toutes les autres conditions expérimentales, leur effet antiviral décroît. Nous avons ainsi déterminé que les cyclophilines étaient essentielles à une étape précoce de la réplication du coronavirus félin. Cette ou ces étapes correspondrai(ent) à la décapsidation et/ou la mise en place du complexe de réplication virale.

Pour compléter notre étude sur les mécanismes d'action des cyclophilines, nous avons entrepris de déterminer quelles seraient les protéines virales pouvant interagir avec les cyclophilines cellulaires, en particulier la cyclophiline A. Ainsi, par la technique de ligation de proximité (Proximity Ligation Assay (PLA) en anglais), nous avons pu identifier que la protéine N du coronavirus félin interagissait avec la cyclophiline A féline. Cette interaction n'avait jusqu'à présent été montrée que sur des modèles de coronavirus et cyclophilines humaines, suggérant que les mécanismes d'interaction des cyclophilines avec les protéines des coronavirus pourraient être conservés. Pourtant, lors de tests d'inhibition effectués avec les SM-Cypl sur le virus de la bronchite infectieuse aviaire, un gammacoronavirus, l'effet inhibiteur des molécules était modéré.

Ces travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le rôle des cyclophilines dans la réplication des coronavirus et suggèrent que ce rôle pourrait être conservé au moins au sein des coronavirus infectant les mammifères. Nos données ont également permis d'identifier une cible thérapeutique intéressante, ainsi que des molécules présentant un effet antiviral majeur contre certains coronavirus, permettant d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.