HAL
open science

Étude de l'effet du favipiravir sur l'évolution du génome du SARS-COV-2 in vivo

Paul-Rémi Petit

To cite this version:

Paul-Rémi Petit. Étude de l'effet du favipiravir sur l'évolution du génome du SARS-COV-2 in vivo. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03537437

HAL Id: dumas-03537437

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03537437v1

Submitted on 20 Jan 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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 20 octobre 2021

Par M. PETIT Paul-Rémi
Né le 28/12/1992 à LANGRES

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

ÉTUDE DE L'EFFET DU FAVIPIRAVIR SUR L'ÉVOLUTION DU GÉNOME DU SARS-COV-2 *IN VIVO*

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Caroline Solas
Membres : Pr. Xavier de Lamballerie, Dr Christine Zandotti, Dr Antoine Nougairède

Faculté de Pharmacie
Aix-Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Remerciements

Aux Membres du jury

Pr. Caroline Solas,

Je te remercie de me faire l'honneur de présider ce jury mais aussi pour ta bienveillance, ta disponibilité et toutes les connaissances que tu m'as transmises durant ces 6 derniers mois. Je vais quitter le service de pharmacologie avec nostalgie, mais je suis heureux savoir que je vais continuer à travailler avec toi par la suite.

Pr. Xavier de Lamballerie

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury et également de m'avoir permis de rejoindre l'UVE pour mon master 2 et d'y poursuivre ma thèse de science. Enfin je vous remercie pour votre accessibilité et vos conseils toujours inspirants.

Au Dr. Christine Zandotti

Tout d'abord, je vous remercie de votre présence dans de ce jury. Mais surtout je vous remercie pour les 2 ans que j'ai passé en stage auprès de vous, pour votre disponibilité sans faille, vos conseils toujours avisés et pour toutes les connaissances que vous m'avez prodiguées avec pédagogie et bienveillance. Merci d'avoir rendu votre engouement pour la virologie si contagieux, une passion transmissible que j'ai été heureux de contracter à vos côtés.

Au Dr. Antoine Nougairède

En tout premier lieu, je te prie de recevoir mon infinie gratitude, pour être venu quelques mois avant le début de la pandémie me proposer de réaliser mon master 2 avec toi, et de m'avoir ainsi permis de rejoindre l'UVE. Merci également pour tout ce que j'ai appris à tes cotés au laboratoire diagnostic : sauver des enfants, prononcer « jeanciclovir », le rôle central du FTD gastro dans la validation, la gestion des IgM non spécifiques en ELISA arbovirus et bien d'autres choses encore. Enfin plus sérieusement merci d'être toujours disponible et accessible, merci pour ton encadrement ces trois dernières années, et pour les trois prochaines.

Liste des abréviations 17
Liste des Tables 21
Liste des figures 20
RESUME 22
I - GENERALITES SUR LE SARS-COV-2 23
A - Chronologie 23
B - Taxonomie 24
C - Organisation génomique et protéique 25
1 - Organisation génomique 25
2 - Protéines structurales 26
i - Protéine Spike 26
ii - Protéines E, M et N 26
3 - Polyprotéines pp1a et pp1ab 27
i - Traduction des polyprotéines pp1a et pp1ab 27
ii - Les protéines non structurales 28
iii - Protéines accessoires 29
D - Cycle réplicatif 29
1 - Entrée du virus 29
2 - Synthèse des polyprotéines 30
3 - Réplication et transcription 31
E - Aspects cliniques 32
1 - Signes cliniques 32
2 - Histoire de la maladie et facteurs de gravité 32
F - Évolution : apparition et diffusion des variants 34
1 - Généralité et définitions 34
2 - Variant D614G 35
3 - Variant α 36
4 - Variant β 36
5 - Variant γ 36
6 - Variants δ et κ 37
G - STRATEGIES THERAPEUTIQUES 38
1 - Généralité 38
2 - Vaccination 38
i - Vaccins à ARN messager 39
ii - Vaccins à vecteur ADN 40
iii - Vaccins à vecteur viral non réplicatif 42
iv - Vaccins à base d'antigènes 45
v - Vaccins à base de virus atténué ou inactivé. 47
vi - Vaccins et émergence des variants 48
3 - Stratégies immunomodulatrices 49
i - Corticostéroïdes 50
ii - Autres stratégies immunomodulatrices 51
4 - Stratégies antivirales 51
i - Neutralisation 51
a) Plasma de convalescents 51
b) Anticorps monoclonaux 52
1. Isolement et production 52
2. Anticorps disponibles 53
3. Anticorps et variants 55
ii - Molécules antivirales 56
a) Inhibiteurs d'entrée 56

1. Umifénovir 56
b) Inhibiteurs de protéases 56
1. Association Lopinavir/Ritonavir 56
2. Inhibiteurs sélectifs de 3CLpro 57
c) Inhibiteurs de RdRp 58
1. Remdesivir 58
2. AT-527 59
3. β-D-N4-Hydroxycytidine et sa prodrogue le molnupiravir 59
d) Autres molécules 60
II - GENERALITES SUR LE FAVIPIRAVIR 63
A- Introduction 63
B- Structure 63
C- Métabolisme intracellulaire et mécanisme d'action 63
D- Spectre 65
1 - In vitro 65
2 - In vivo 67
E- Études cliniques 69
1 - Sur les virus grippaux 69
2 - Sur le virus Ebola 69
F- Pharmacocinétique 70
G- Tolérance et effets indésirables 70
III - MATERIELS ET METHODES 71
A- Modèle animal et infection 71
B- Charge virale et infectivité 72
1 - RT-qPCR 72
2 - TCID50 72
3 - Résultats 73
C- Mise au point d'une technique d'amplification du génome 73
1 - Extraction 74
2 - Conception des amorces 74
3 - One-step RT-PCR 75
4 - Two-step RT-PCR 75
5 - Électrophorèse sur Gel et purification 76
6 - NGS 76
7 - Analyse des données du NGS 77
IV - Résultats et Discussion 77
A- Échantillons analysés 77
B- Séquences consensus 77
C- Nombre total de mutations 78
D- Caractéristiques des mutations 80
E- Lien entre mutation et infectivité 81
F- Évolution parallèle 81
G- Discussion 83
Bibliographie 86

Liste des abréviations

-1PRF	Programmed Ribosomal -1 Frameshift
3CL-Pro	3 Chymotrypsin-Like Protéase
ACE-2	Angiotensin II Converting Enzyme / Enzyme de conversion de l'angiotensine II
AcM	Anticorps monoclonaux
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AdV	Adenovirus
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AO	Aldehyde Oxydase
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BAM	Bamlanivimab
BSL	BioSafety Level
C2EA	Comité d'Ethique en Expérimentation Animale
CAS	Casirivimab
CCHFV	Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
C_H	Constant Heavy / Domaine constant des chaines lourdes d'immunoglobulines
CIL	Cilgavimab
CIVD	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
C_L	Constant Light / Domaine constant des chaines légères d'immunoglobulines
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
$COVID_{19}$	COronaVIrus Disease 2019 / Maladie à coronavirus 2019
CPT	Convalescent Plasma Therapy / Thérapie par plasma de convalescents
CRP	C reactive protein / Protéine C réactive
CRPV	Centre Régional de PharmacoVigilance
CST	Comité Scientifique Temporaire
dpi	Day post infection / Jour après l'infection
EBOV	EbolaVirus
ECP	Effet CytoPathogène
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELIspot	Enzyme-linked immunospot
EMA	European Medecines Agency / Agence Européenne des Médicaments
ERGIC	Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment / Compartiment Intermédiaire Réticulum Endoplasmique-Golgi
ETE	Etesevimab
F-CoV	Felin Coronavirus / Coronavirus Félin
FcR	Récepteur au fragement Fc des immunoglobulines

FDA	Food and Drug Administration / Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FP	Fusion Peptide / Peptide de Fusion
HAdV	Human Adenovirus / Adénovirus Humain
HAE	Human Airway Epithelium
H-CoV	Human Coronavirus / Coronavirus Humain
HGPRT	Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl-Transférase
HR	Heptad Repeat / Répétition Heptamerique (motif structurel qui consiste en un motif répétitif de sept acides aminés)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses / Comité international de taxonomie des virus
IFR	Infection fatality rate / Ratio de létalité réel
IL	InterLeukine
IL_1R_I	Récepteur de type I à l'IL_1
IMD	Imdevimab
INF	Interféron
IT	Intracellular Tail / Queue Intracellulaire
LASV	Lassa Virus
MARV	Marburg marburgvirus
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome-related coronavirus
NendoU	Nidoviral uridylate-specific endoribonuclease / Uridylate endonucléae spécifique à la famille des *Nidovirales*
NGS	Next-Generation Sequencing / Séquençage nouvelle génération
NSP	Non structural Protein
NTD	N-Terminal Domain / Domaine N-terminal
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame / Cadres de lecture ouverts
PC	Plasma de convalescents
PCR	Polymerase Chain Reaction / amplification en chaîne par polymérase
PIF	Péritonite Infectieuse Féline
PL-Pro	Papaïne-Like Protéase
pp	polyprotéine
qPCR	Quantitative PCR
RBD	Recptor Binding Domain / Domaine de Liaison au Recepteur
RdRp	RNA-Dependent RNA Polymerase
REG	Regdanvimab
RNAse	RiboNuclease
RT	Reverse transcription
RTC	Replication-Transcription Complex / Complexe de Réplication-Transcription
RTP	Ribose Triphosphate
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus 2
SGTF	S-Gene Target Failure / Négativation de la detection du gène S
SOT	Sotrovimab

SSIII	SuperScript III®
TA	Transmembrane Anchor / Ancre Transmembranaire
$TCID_{50}$	fifty-percent-tissue-culture-infective-dose
TIPIV	Thrombopénie Immunitaire Prothrombotique Induite par le Vaccin
TIX	Tixagevimab
Tm	Temperature Melting / Température de Fusion
TMPRSS2	TransMembrane PRoteaSe, Serine 2 / Protéase transmembranaire à Sérine 2
TNF	Tumor Necrosis Factor / Facteur de nécrose tumorale
TRS	Transcriptional Regulatory Sequence / Séquence de Régulation de la Transcription
USA	United States of America
UVE	Unité des Virus Émergents
V_H	Variable Heavy / Domaine variable des chaines lourdes d'immunoglobulines
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
V_L	Variable Light / Domaine variable des chaines légères d'immunoglobulines
VOC	Variants Of Concern / Variants préoccupant
VOI	Variants Of Interest / Variants d'intérêts
VRS	Virus Respiratoire Syncytial
XO	Xanthine Oxydase

Liste des figures

Figure 1: Frise chronologiques des premiers mois de la pandémie. 23
Figure 2 : Arbre de maximum de vraisemblance du genre Betacoronavirus, d'après la réf.12 24
Figure 3: Présentation schématique de la structure du Virion, d'après la Réf.14 25
Figure 4 : Présentation schématique de l'organisation du génome du SRAS-CoV-2, des ARNm sous-génomiques canoniques et de la structure du virus, d'après la Réf.14 25
Figure 5: Structure détaillée de la protéine spike 26
Figure 6: Organisation génomique du Sars CoV-2 d'après la Réf. 20 27
Figure 7: Topologie des polyprotéines 1a et 1ab, d'après le site https://viralzone.expasy.org/9076 27
Figure 8 : Représentation de l'étape d'entrée du SARS-CoV-2 en présence de TMPRSS2 : entrée par fusion 29
Figure 9 : Représentation de l'étape d'entrée du SARS-CoV-2 en présence de TMPRSS2 : entrée par endocytose 30
Figure 10 : Représentation de la synthèse et de la maturation des polyprotéines 30
Figure 11 : Cycle de réplication du SARS-CoV-2 31
Figure 12 : L'évolution clinique de la COVID19 peut se décomposer en 3 Phases, d'après la Réf.45 33
Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences circulantes dans le monde depuis décembre 2019, d'après nextstrain.org (CC by 4.0) 34
Figure 14 : Mutations caractérisant les variants principaux du SARS-CoV-2, d'après la Réf.50 35
Figure 15 : Évolution temporelle de la fréquence de la mutation D614G début 2020, d'après la Réf. 51 36
Figure 16 : Graphique représentant pour chaque pays la proportion du nombre total de séquence pour certains VOC, d'après covariant.org (CC BY 4.0) 37
Figure 17 : Place des différentes stratégies thérapeutiques durant l'évolution de la maladie d'après la Ref.50 38
Figure 18 : Représentation des différentes plateformes vaccinales existantes 39
Figure 19: Efficacité des vaccins Cominraty et Spikevax d'après les réf. 59-60 40
Figure 20 : Efficacité du Vaccin Vaxzevria d'après le Ref.68 43
Figure 21: Efficacité du vaccin COVID-19 VACCINE JANSSEN d'après la Ref. 69 43
Figure 22 : Efficacité du vaccin Spoutnik V d'après la Réf.70 44
Figure 23 : Efficacité vaccinale du vaccin Novavax, d'après la Réf.74 45
Figure 24 : Taux d'anticorps neutralisants contre les variants du SRAS-CoV-2 chez des personnes non infectées après l'administration de différentes plateformes vaccinales, d'après la Réf. 84 48
Figure 25 : Squelette de base d'un corticostéroïde 50
Figure 26 : Mortalité à 28 jours chez les patients en fonction de leur statut respiratoire, d'après la Réf.90 50
Figure 27 : Stratégie générale d'identification et d'isolement d'anticorps monoclonaux à potentiel thérapeutique. 53
Figure 28 : Stratégie générale de production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes. 53
Figure 29 : Structure des inhibiteurs de 3CL-PRO les plus avancés 57
Figure 30 : Inhibiteurs de RdRp les plus étudiés. 58
Figure 31 : Cycle du SRAS-CoV-2 et mécanismes d'action potentiels des thérapies actuellement évaluées, d'après la Réf.153 61
Figure 32 : Structure du favipiravir 63
Figure 33 : Isomérie de rotation de la liaison carboxamide 63
Figure 34 : Métabolisme et mécanisme d'action du favipiravir 63
Figure 35 : Représentation schématique des mutations induites par le favipiravir lors de la synthèse des brins positifs et négatifs d'ARN, d'après la Réf.159 64
Figure 36 : Représentation de la chronologie de l'expérimentation 71
Figure 37 : Représentation du Protocol expérimental pour la quantification virale (Charge virale et titre infectieux) 72
Figure 38 : Données relatives au titre infectieux, la quantité d'ARN et l'infectivité. 73
Figure 39 : Protocol d'extraction de l'ARN viral 74
Figure 40 : Répartition des amorces le long du génome du SARS-CoV-2 74
Figure 41 : Résultats de l'électrophorèse sur gel lors des tests pour déterminer la sensibilité de la méthode 75
Figure 42 : Exemple d'électrophorèse sur gel pour l'un des homogénats pulmonaires 76
Figure 43 : Profondeur moyenne du séquençage pour chaque échantillon. 77
Figure 44 : Diversité génétique virale dans les homogénats clarifiés pulmonaires. 78
Figure 45 : Modèle de distribution des mutations sur l'ensemble du génome viral. 78

Figure 46 : Répartition des mutations dans les différents ORFs par rapport au pourcentage du génome complet occupé par ces ORFs. 79
Figure 47 : Nombre moyen de mutation pour chaque groupe d'échantillon 79
Figure 48 : Répartition des mutations selon leur type 80
Figure 49 : Caractéristique des mutations. 80
Figure 50 : Association entre la TCID50 et la fréquence de certains types de mutations 81
Figure 51 : Diagramme de Venn des mutations partagées entre les différents groupes de hamsters 81

Liste des Tables

Tableau 1 : Efficacité vaccinale en prévention des infections symptomatiques pour les principaux VOC, d'après la Ref 50 49
Tableau 2 : Principaux anticorps monoclonaux en cours d'évaluation, d'après la Réf.102 54
Tableau 3 : Facteur de réduction des taux de neutralisation de différents AcM envers différents variants ou différentes mutations d'après la Réf 50 55
Tableau 4 : Activité in vitro du favipiravir, d'après la Réf.159 66
Tableau 5 : Activité in vivo du favipiravir 68
Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'amplification du génome du SARS-CoV-2 74
Tableau 7 : Caractéristiques des mutations partagées entre les différents groupes de hamsters 82

RESUME

En décembre 2019, un nouveau coronavirus fait son apparition dans la ville de Wuhan en Chine. En raison de la mondialisation, le virus s'est rapidement répandu dans les deux hémisphères, et a été à l'origine d'une pandémie. Même si plus de cent molécules antivirales ont été développées depuis le premier antiviral, l'idoxuridine en 1962, celles-ci ne ciblent que 9 espèces virales différentes, et sont pour la grande majorité destinées à lutter contre le VIH et les hépatites virales B et C. A ce jour, les molécules ciblant les virus à tropisme respiratoire concernent uniquement la grippe et le VRS, et il n'existe pas de médicament approuvé contre la famille des *Coronaviridae,* qui comportent des virus hautement pathogènes tel que le MERS-CoV, le SARS-CoV et depuis peu le SARS-CoV-2.

L'unité des virus émergents dirigée par le Pr Xavier de Lamballerie possède une expertise dans le domaine de la recherche de molécules antivirales, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et a, entre autres, travaillé sur l'évaluation d'un antiviral large spectre lors des épidémies de virus Ébola entre 2013 et 2016. Cet antiviral, le Favipiravir, commercialisé au Japon pour la prise en charge des infections par le virus de la grippe, a montré une activité *in vitro* sur le SARS-CoV-2. L'UVE ayant les compétences nécessaires à son évaluation *in vivo*, mon master 2, sur lequel j'ai basé mon travail de thèse a été inclus dans un projet de recherche visant à étudier l'activité antivirale du Favipiravir *in vivo*, sur un modèle de hamster. Mon travail s'est concentré sur les effets du Favipiravir sur l'évolution du génome viral, dans le but d'essayer de déterminer par quels mécanismes le Favipiravir exerce son action antivirale *in vivo* sur le SARS-CoV-2.

Mots-clés : SARS-CoV-2 - Antiviraux - Favipiravir - Mutagénèse - *In vivo*

I - GENERALITES SUR LE SARS-COV-2

A - Chronologie

Aux alentours du 20 décembre 2019, des analyses sont lancés sur 4 cas de pneumopathies d'étiologie indéterminée recensés dans la ville de Wuhan, dans la province du Hubei en Chine.[1] Dans les jours qui suivent, les hôpitaux de la ville voient arriver plus d'une vingtaine de cas similaires ayant un lien direct ou indirect avec le marché aux fruits de mer de Huanan.

Le 31 décembre 2020, les autorités sanitaires de Wuhan, Pékin et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) révèlent au grand public l'existence d'une épidémie de pneumonie virale d'origine inconnue. Elles évoquent 27 cas, dont 7 graves[2]. Le virus est isolé le 07 janvier 2020 et sa séquence génétique est rendue publique par la Chine le 12 janvier. Il s'agit d'un nouveau coronavirus, d'abord appelé 2019-nCoV, puis rebaptisé par la suite SARS-CoV-2[3]. Le premier décès officiel a lieu le 9 janvier 2020 et dans les jours qui suivent, les premiers cas hors de Chine sont détectés, en Thaïlande et au Japon respectivement le 13 et le 15 janvier, en Europe, en Australie et aux États-Unis aux alentours du 20 janvier et enfin le premier cas africain est détecté en Égypte le 14 février. La pandémie est déclarée par l'OMS le 11 mars.

À la suite de rassemblements massifs (rassemblement religieux à Mulhouse le 15 février et match de football en Italie le 19 février) le virus se propage rapidement en Europe, qui devient après la Chine le second épicentre de l'épidémie, rapidement rattrapée par les États-Unis et l'Amérique latine. A ce jour (25/09/2021), l'infection a touché plus de 230 millions d'individus et causé plus de 4,5 millions de décès[4].(**Fig.1**)

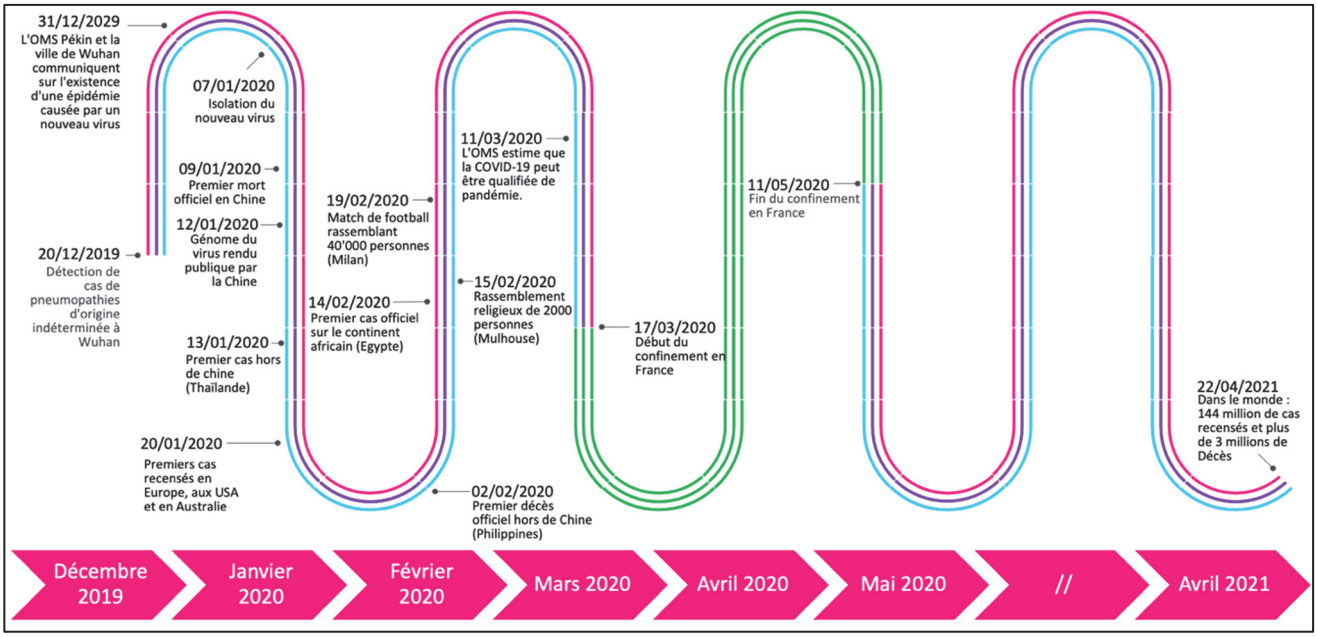


Figure 1: Frise chronologiques des premiers mois de la pandémie.

B - Taxonomie

La famille des *Coronaviridae,* incluse dans l'ordre des *Nidovirales*, compte actuellement 39 espèces réparties en 27 sous-genres, 5 genres, 2 sous-familles. Cette famille regroupe 8 virus pathogènes pour l'homme. D'une part, les 4 coronavirus communautaires responsables de pathologies bénignes chez l'immunocompétent : les coronavirus OC43, NL63, E229 et HKU1. D'autre part les trois coronavirus qui ont été à l'origine de trois grandes épidémies au 21ème siècle : Le SARS-CoV en 2003[5], le MERS-CoV en 2012[6], et le dernier apparu fin 2019.

Le premier article concernant ce nouveau virus est publié le 24 janvier et l'analyse de son génome montre qu'il appartient au genre *Betacoronavirus,* au sous-genre des *Sarbecovirus,* et à l'espèce *Severe acute respiratory syndrome related coronavirus* (*SARSr-CoV*) qui comprend également le SARS-CoV[1]. Au vu de la grande proximité génétique avec ce dernier, le 11 février 2020, l'ICTV annonce que ce virus est nommé SARS-CoV-2[7].(**Fig.2**)

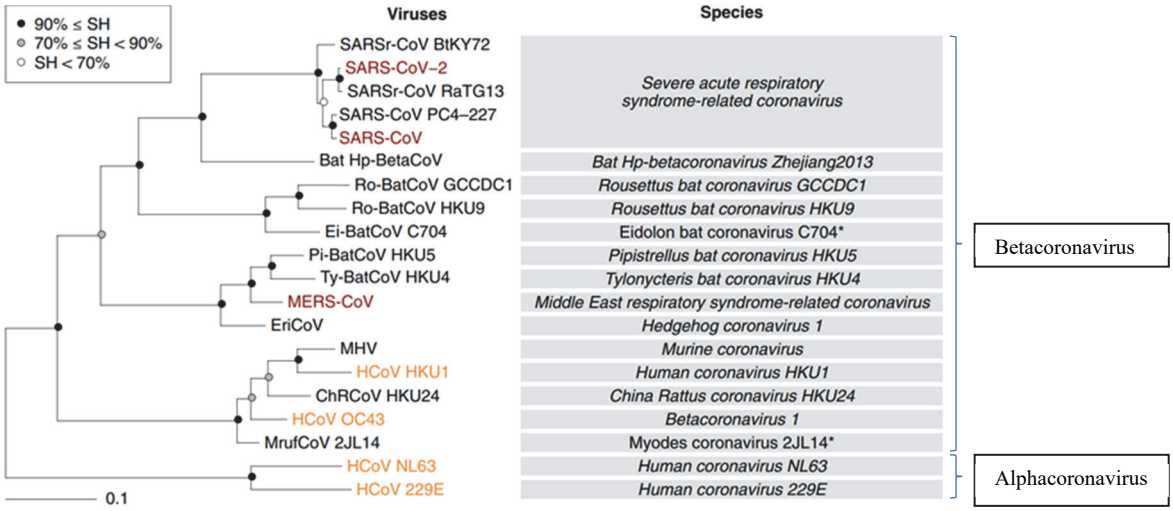


Figure 2 : Arbre de maximum de vraisemblance du genre Betacoronavirus, d'après la réf.12

C - Organisation génomique et protéique

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé, mesurant de 60 à 140 nm[1] à capside hélicoïdale[8]. Sa structure comprend 4 protéines structurales majeures (**Fig.3**) : La protéine Spike (S), la glycoprotéine d'enveloppe (E), la glycoprotéine de la membrane (M), et la protéine de la nucléocapside (N).

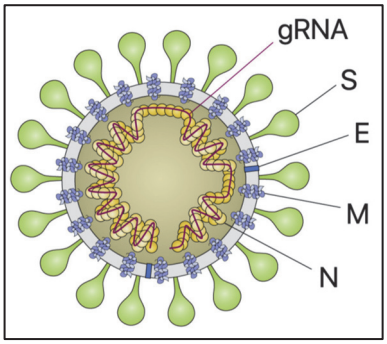


Figure 3: Présentation schématique de la structure du Virion, d'après la Réf.14

1 - Organisation génomique

Le SARS-CoV-2 possède un génome à ARN simple brin de polarité positive de 29'903 nucléotides. Comme les autres membres de la famille des *Coronaviridae*, il fait partie des virus à ARN infectant l'humain avec les génomes les plus longs. Son génome est organisé en 2 séquences non codantes en 5' et en 3' (séquence Leader L et queue poly A) et une partie codante. On dénombre 14 ORFs (Open Reading Frame : cadre de lecture ouvert) de taille très variable, en effet, les gènes ORF1a et ORF1b occupent les deux tiers du génome, tandis que le dernier tiers est occupé par les gènes codant les protéines structurales S, E, M et N. Entre ces gènes s'intercalent également neuf ORFs putatifs pour les facteurs accessoires. Les ORFs sont précédés de séquences régulatrices de la transcription[9] (TRSs : transcriptional regulatory sequences). (**Fig.4**)

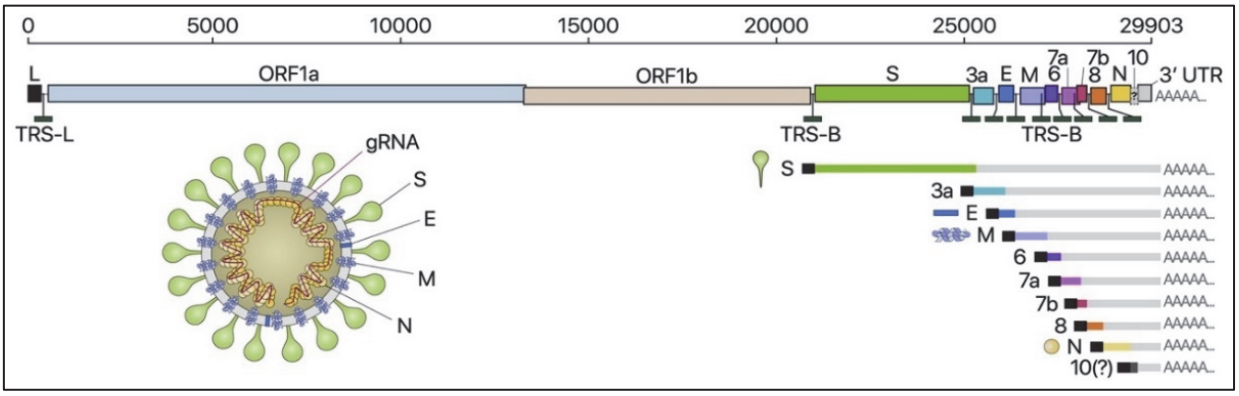


Figure 4 : Présentation schématique de l'organisation du génome du SRAS-CoV-2, des ARNm sous-génomiques canoniques et de la structure du virus, d'après la Réf.9

2 - Protéines structurales

i - Protéine Spike

La protéine Spike est une glycoprotéine présente à la surface du virus sous forme d'un homo-trimère composé de deux sous-unités. La sous-unité S_1 contient deux domaines : un domaine N terminal (NTD : N-Terminal Domain) et un domaine responsable de l'attachement du virus à son récepteur, le RBD (Receptor Biding Domain). La sous-unité S_2 est impliquée dans la fusion avec la membrane cellulaire[10] via le peptide de fusion FP et contient 4 autres domaines, HR1 et HR2 (Heptad Repeat) et deux domaines impliqués dans l'attachement à la membrane lipidique : l'ancre transmembranaire TA (Transmembrane Anchor) et la queue intracellulaire IT (Intracellular Tail)[11] (**Fig.5**). Elle possède au niveau de la jonction S1-S2 un site polybasique de clivage (TNSPRRA) par la furine.

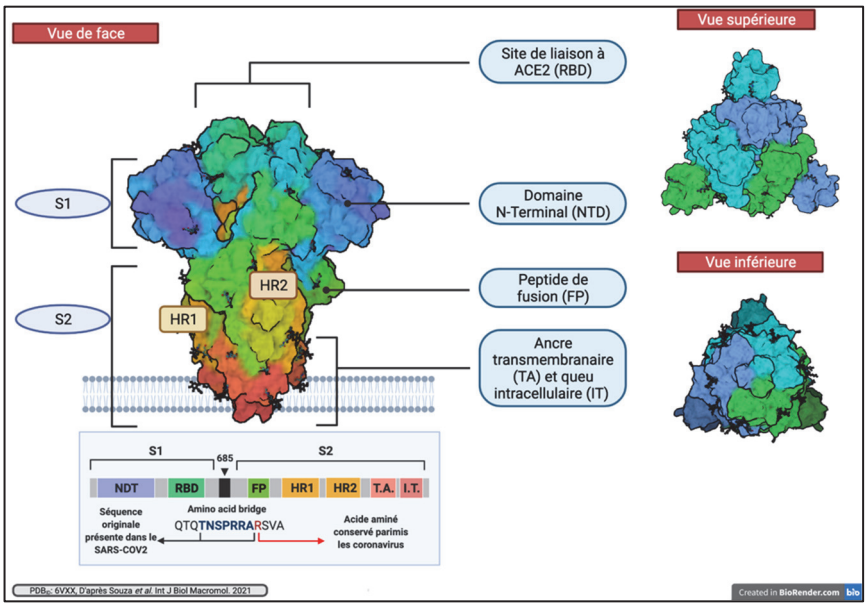


Figure 5: Structure détaillée de la protéine spike

ii - Protéines E, M et N

La protéine E est également une protéine transmembranaire, appartenant à la famille des viroporines, des protéines capables de se polymériser en canaux ioniques[12]. Elle joue un rôle dans l'assemblage, la maturation et la morphogénèse virale[13].

La protéine M est présente à la surface du virus sous forme d'homo-dimère. Elle a un rôle dans la forme et l'assemblage des virions en étant capable d'interagir avec les protéines E, S, N et aussi d'autres protéines dimères M[14].

La protéine N est la protéine structurale la plus abondante, elle est liée à l'ARN viral pour former une ribonucléoprotéine. Elle participe à l'entrée de l'ARN viral dans la cellule hôte et à l'assemblage des virions.

3 - Polyprotéines pp1a et pp1ab

i - Traduction des polyprotéines pp1a et pp1ab

Les polyprotéines pp1a et pp1ab sont issues de la traduction des ORF1a et ORF1ab[15] (**Fig.6**). La traduction se fait dans la majorité des cas de la NSP1 à la NSP11 pour donner la pp1A. Dans environ 10% des cas, la traduction peut se poursuivre et donner naissance à la pp1ab, grâce à un changement de cadre de lecture en amont du codon stop de la NSP11 au niveau d'une séquence dite de « glissement » (« slippery » sequence) par un mécanisme appelé -1 PRF (Programmed Ribosomal -1 Frameshift[16]).

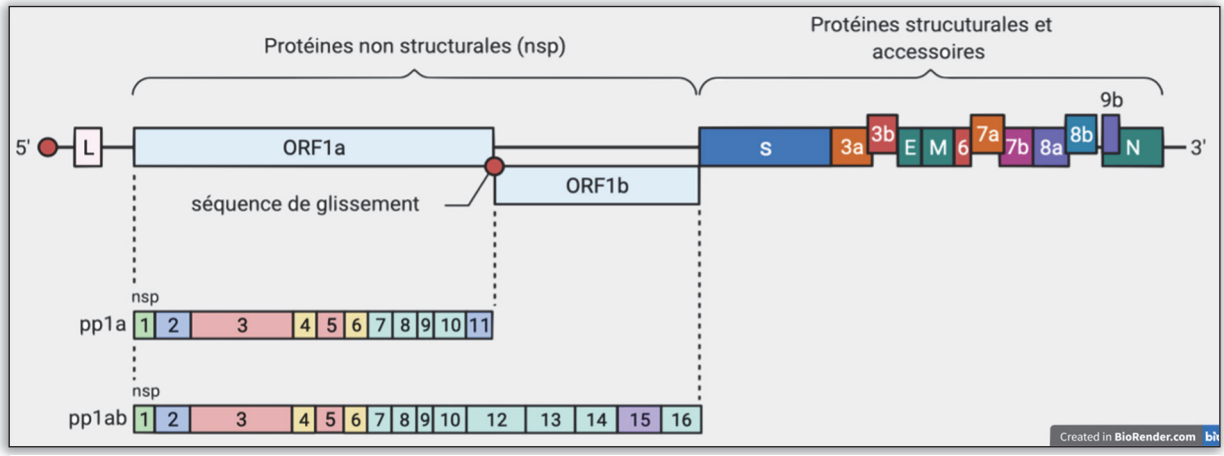


Figure 6: Organisation génomique du Sars CoV-2 d'après la Réf. 15

La pp1a et pp1ab contiennent respectivement 11 et 16 nsp (**Fig.7**). Ces polyprotéines sont par la suite clivées en protéines individuelles par les deux protéases qu'elles contiennent, la Papaïne-like Protéase (PL-Pro) et la 3 Chymotrypsin-Like Protéase (3CL-Pro).

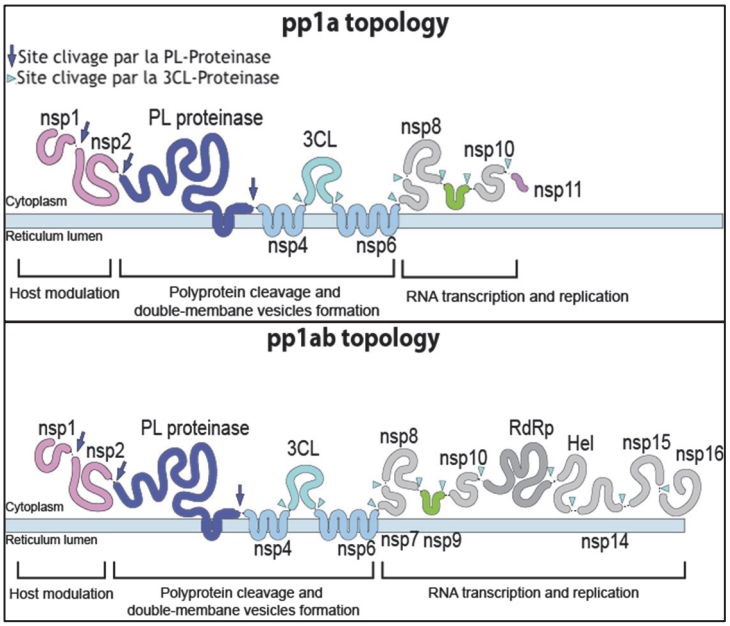


Figure 7: Topologie des polyprotéines 1a et 1ab, d'après le site https://viralzone.expasy.org/9076

ii - Les protéines non structurales

La nsp1 est une protéine impliquée dans l'échappement immunitaire en bloquant la traduction des ARN messagers cellulaires et la réponse antivirale dépendante de l'interféron[17]. Le rôle de la nsp2 n'est pas encore élucidé.

La nsp3 (PL-Pro) est l'une des deux protéases à l'origine du clivage des polyprotéines. Elle joue également un rôle dans la maturation des virions, en association avec les nsp4 et nsp6, où elles sont à l'origine de réarrangements membranaires, sur lesquels les complexes de réplication-transcription s'assemblent dans les cellules infectées[18].

La nsp5 (3CL-pro) est la seconde protéase impliquée dans la libération des nsp à partir des polyprotéines pp1a et pp1ab.

Les nsp7, 8 et 9 sont des cofacteurs de l'ARN-polymérase-ARN dépendante (RdRp = nsp12) du SARS-CoV-2. Elles améliorent la fixation à l'ARN et la processivité de la nsp12[19].

La nsp13 est une hélicase, son rôle est de rendre accessible l'ARN afin qu'il puisse servir de matrice à la réplication quand il est sous forme d'ARN double brin[20].

La nsp14 est une protéine avec une double fonction. Elle possède un domaine C-terminal à activité guanosine-N7-méthyl transférase responsable de la mise en place de la coiffe en 3' des ARN messagers, celle-ci étant nécessaire pour éviter leur dégradation par des RNAse cellulaires et permettre le recrutement des ribosomes. Son extrémité N-terminale contient un domaine à activité 3'-5' exonucléase capable de corriger les erreurs commises par la RdRp durant la réplication du génome, mais aussi d'exciser les analogues nucléotidiques utilisés comme antiviraux[21].

La nsp 15 est une endoribonucléase (NendoU : Nidoviral RNA uridylate-specific endoribonuclease), elle joue un rôle dans l'échappement immunitaire en dégradant les ARN viraux afin que ceux-ci ne puissent pas activer les mécanismes de défense antivirale aboutissant à la production d'interferon[22,23].

Enfin la nsp16, une 2'-o-méthylase, associée à la nsp10, forment un complexe protéique qui catalyse la méthylation de l'avant-dernier nucléotide de la coiffe d'ARN viral à la position 2' du ribose. Un tel processus de méthylation convertirait la coiffe d'ARN du virus pour imiter les ARN messagers (ARNm) cellulaires et ainsi empêcher la reconnaissance des ARN viraux par l'immunité innée de l'hôte[24].

iii - Protéines accessoires

Au moins cinq ORF codant pour des gènes accessoires ont été signalés pour le SARS-CoV-2 : les ORF 3a, 6, 7a, 7b et 8 et potentiellement les ORF 3b et 9b. Cependant, tous ces ORFs n'ont pas encore été vérifiés expérimentalement et le nombre exact de gènes accessoires du SARS-CoV-2 est toujours débattu[25,26]. Les gènes accessoires présentent une variabilité élevée parmi les groupes de coronavirus et ne présentent généralement aucune similitude de séquence avec d'autres protéines virales et cellulaires. Bien qu'ils ne soient pas nécessaires pour la réplication du virus en culture cellulaire, ils sont, au moins en partie, conservés au sein des espèces virales respectives et sont soupçonnés de jouer un rôle important dans l'hôte naturel, notamment dans l'échappement immunitaire.[27]

D - Cycle réplicatif

1 - Entrée du virus

Le processus d'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule débute par l'interaction entre le domaine RBD de la protéine Spike et son récepteur : ACE2 (Enzyme de conversion de l'angiotensine de type II). Cette protéine membranaire est fortement exprimée à la surface des cellules des voies aériennes et digestives[28] expliquant le tropisme du virus.

L'entrée du virus dans la cellule peut se faire de deux façons différentes suivant qu'elle exprime ou non une protéase appelée TMPRSS2 (TransMembrane PRoteaSe, Serine 2).

- Si elle est exprimée par la cellule hôte, comme c'est le cas dans les cellules des épithéliums des voies aériennes chez l'homme, il se déclenche alors une série de clivages de la spike conduisant à la fusion des membranes. Le premier clivage, entre les sous-unités S1 et S2 est réalisé par une protéase de type furine. Le deuxième clivage est réalisé par la TMPRSS2, dans la sous-unité S2, permettant un réarrangement conformationnel exposant le peptide de fusion qu'elle contient. Ceci est suivi par une insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule hôte qui aboutira à la fusion des membranes (**Fig.8**) et à la libération de la capside virale dans le cytoplasme.[29]

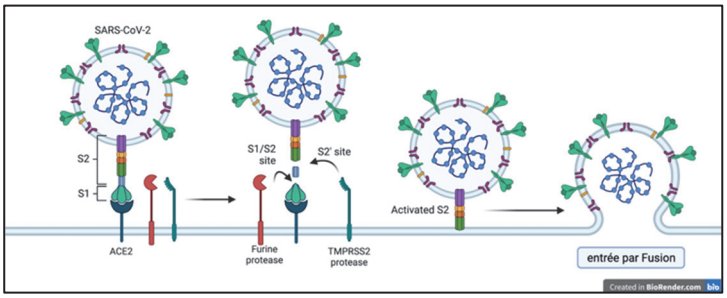


Figure 8 : Représentation de l'étape d'entrée du SARS-CoV-2 en présence de TMPRSS2 : entrée par fusion

- Si elle n'est pas exprimée, comme par exemple dans certaines cellules utilisées *in vitro* (cellules Véro E6), la voie d'entrée sera une endocytose (**Fig.9**) dépendante de la clathrine, suivie d'une maturation du virions sous l'action d'enzymes endosomales comme les cathepsines B et L, aboutissant à la fusion des membranes, virale et endosomale, qui libère ainsi l'ARN viral dans le cytoplasme[30].

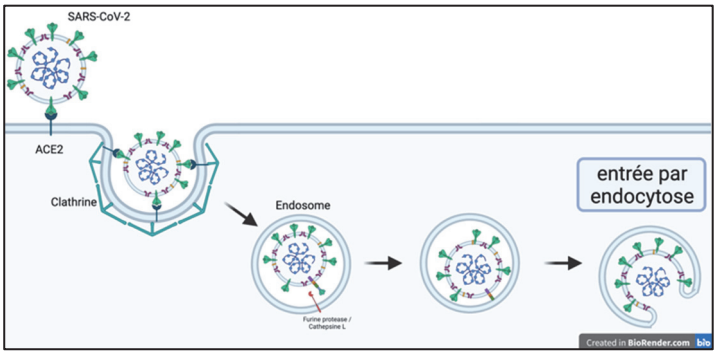


Figure 9 : Représentation de l'étape d'entrée du SARS-CoV-2 en présence de TMPRSS2 : entrée par endocytose

2 - Synthèse des polyprotéines

Une fois libéré dans le cytosol, l'ARN viral se désolidarise des nucléoprotéines N. Étant donné sa polarité positive, il peut être traduit directement par les ribosomes de la cellule hôte afin de synthétiser les polyprotéines pp1a et pp1ab. La libération de 3CL-pro et PL-pro à partir des pp1a et pp1ab se fait par autoclivage au niveau des sites flanquant chaque protéase. Elles clivent et libèrent ensuite les 13 autres nsp. (**Fig.10**)

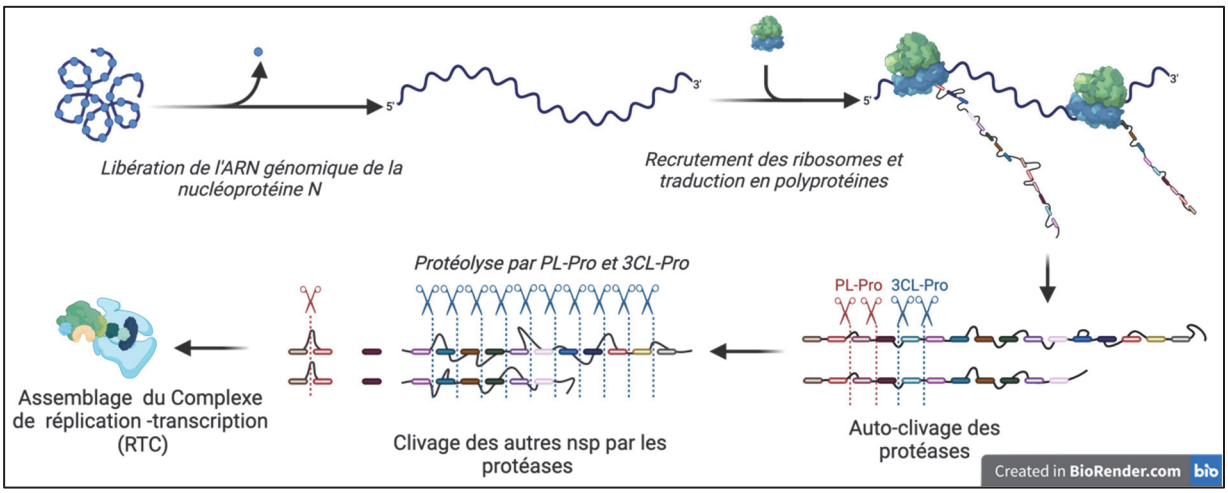


Figure 10 : Représentation de la synthèse et de la maturation des polyprotéines

3 - Réplication et transcription

Une fois le complexe de réplication-transcription (RTC) assemblé, débute la réplication de l'ARN viral, qui passe par l'intermédiaire d'un brin à polarité négative complémentaire du génome. Comme tous les membres de l'ordre des *Nidovirales*, les gènes postérieurs aux ORF1a et ORF1ab sont transcrits en 9 ARN subgénomiques de taille décroissante ayant tous en commun la séquence leader en 5' et une queue poly A en 3' identique[26]. Ces ARN subgénomiques sont ensuite traduits par les ribosomes de la cellule hôte pour donner les protéines structurales : S, E, M et N. La nucléocapside est ensuite formée dans le cytosol par assemblage de l'ARN génomique et de protéines N. S'en suit un bourgeonnement dans la lumière du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique-Golgi (ERGIC), où viennent s'ajouter les autres protéines structurales puis le virion est libéré de la cellule par exocytose.[31]**(Fig.11)**

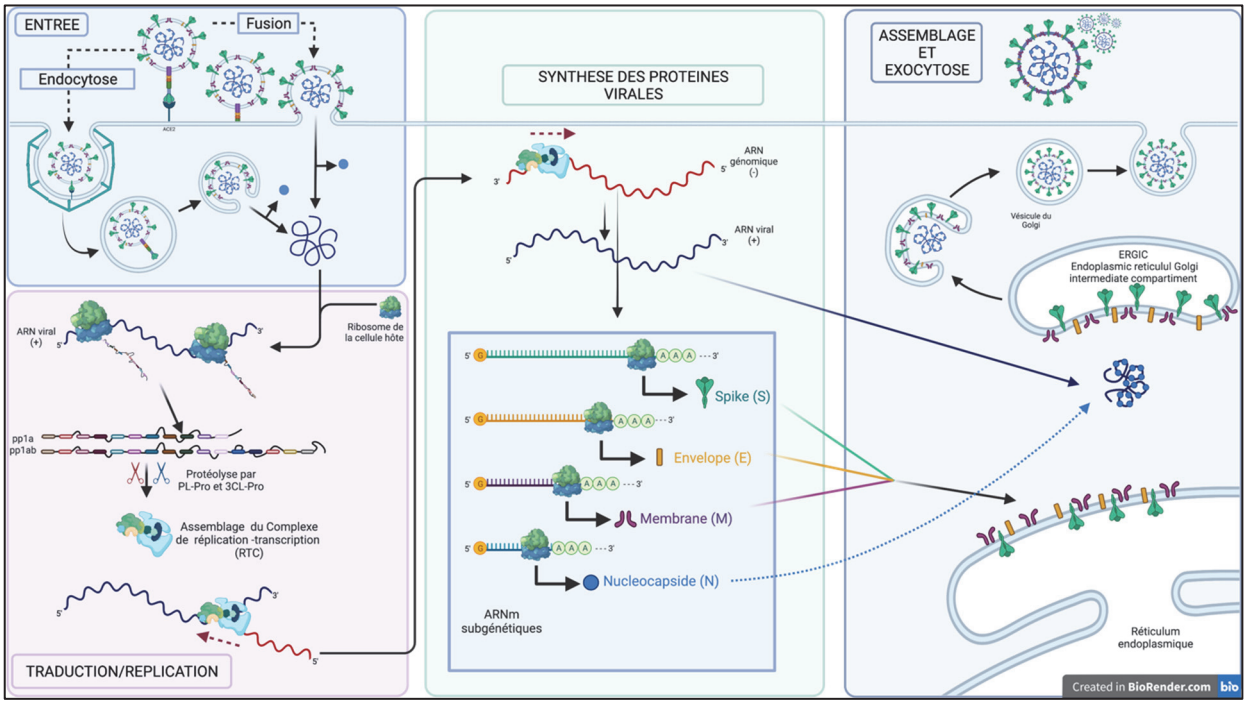


Figure 11 : Cycle de réplication du SARS-CoV-2

E - Aspects cliniques

1 - Signes cliniques

La maladie liée à l'infection par le SARS-CoV-2 a été nommée COVID-19 (CO$_{rona}$VI$_{rus}$ D$_{isease}$ $_{20}$19) par l'OMS[32]. La façon dont se manifeste la COVID-19 est très hétérogène car une part non négligeable des personnes qui sont infectées ne développent pas de symptômes. Néanmoins, malgré la difficulté d'évaluer cette proportion, la littérature internationale suggère que les infections asymptomatiques représentent entre 10 et 60% des infections[33]. Chez les autres, la nature et la sévérité des symptômes sont variables. Les manifestations les plus fréquemment citées par les patients, quel que soit leur âge, sont les signes classiques d'infection respiratoire : fièvre, toux et dyspnée. D'autres signes peuvent accompagner ou remplacer ces symptômes, de façon moins systématique : myalgies, céphalées, maux de gorge, congestion nasale, nausées, vomissements, diarrhées. La survenue brutale d'une perte de goût (agueusie) ou d'odorat (anosmie)[34] en l'absence de rhinite peut aussi être un signe de COVID-19[35]. Enfin, en particulier chez les personnes âgées, en raison de modifications physiologiques liées à l'âge, certains symptômes peuvent être moins marqués voire absents, et lorsqu'aucune autre cause n'est identifiable, certains signes apparus brutalement peuvent être des signes atypiques de la maladie, comme des malaises, des chutes à répétition ou un état confusionnel[36]. La COVID-19 est aussi associée à un état d'hypercoagulabilité, avec une élévation du risque d'évènements thromboemboliques veineux[37].

2 - Histoire de la maladie et facteurs de gravité

Les gouttelettes de Flügge et les contacts rapprochés sont la voie de transmission principale du SARS-CoV-2, mais le virus a déjà été détecté (par RT-PCR ou culture) dans des matières biologiques autre que la salive, comme les selles, l'urine et les larmes laissant supposer d'autres modes de contamination[38]. La période d'incubation moyenne dure de 3 à 6 jours (allant de 1,3 à 11,3 jours)[39], et dans 80% des cas environ, les symptômes restent légers ou modérés et disparaissent après 5 à 14 jours. La **Fig.12** résume les différentes phases de la maladie[40].

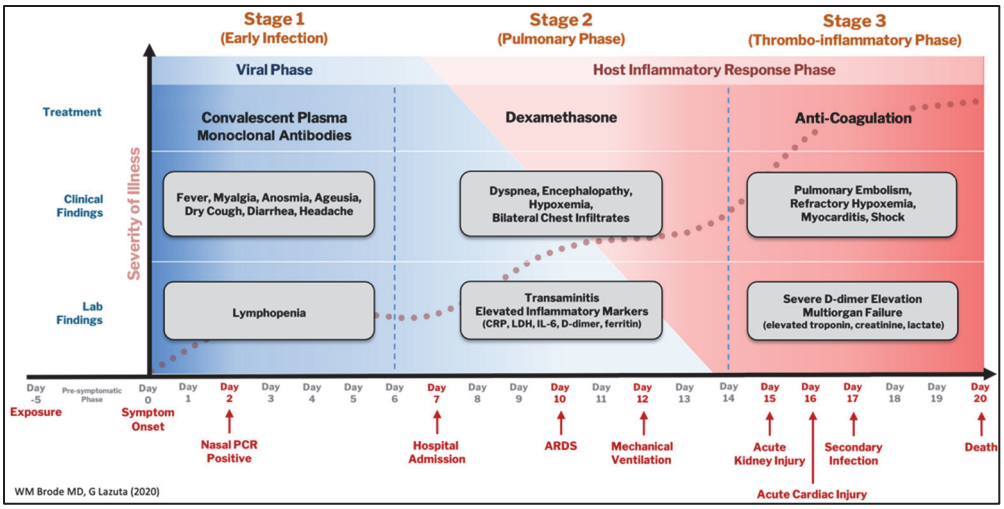


Figure 12 : L'évolution clinique de la COVID19 peut se décomposer en 3 Phases, d'après la Réf.40

Les formes graves caractérisées par l'apparition d'une pneumopathie hypoxémiante se développent dans la deuxième semaine suivant l'apparition des symptômes.

La durée entre l'apparition des symptômes et la dyspnée est en moyenne de 5 à 6 jours pouvant aboutir à une hospitalisation. Les patients peuvent sembler relativement stables au départ, mais ils se détériorent souvent rapidement avec une hypoxie sévère. L'intervalle entre l'apparition des symptômes et le développement d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est d'environ 8 à 12 jours[41] imposant l'admission en réanimation. Le ratio de létalité réel (IFR) défini par : $IFR(\%) = \frac{Nombre\ de\ décès\ liée\ à\ la\ maladie}{Nombre\ de\ persone\ infectées} \times 100$ est assez compliqué à calculer en raison de la part importante de patients asymptomatiques et son obtention nécessite la réalisation d'études séroépidémiologiques, mais une étude de novembre 2020 estime un IFR variant de 0,001 %, entre 5 et 9 ans, à 8,29 chez les personnes âgées de 80 ans et plus avec une augmentation moyenne de l'IFR de 0,59 % par tranche supplémentaire de 5 ans à partir de 10 ans[42], avec de grandes disparités entre les différents pays.

De nombreux facteurs de risque de progression vers une forme sévère de $COVID_{19}$ ont été identifiés. Ceux-ci comprennent[43] :

- La vieillesse
- Le sexe masculin
- Les comorbidités sous-jacentes : hypertension, diabète, obésité, maladies pulmonaires, cardiaques, hépatiques et rénales chroniques, tumeurs, déficits immunitaires et grossesse.

D'autres complications potentiellement graves peuvent apparaître, comme une insuffisance rénale, des troubles du rythme cardiaque, des événements thromboemboliques, des surinfections bactériennes ou des septicémies. En comparaison, la plupart des enfants semblent présenter une maladie bénigne.[44]

F - Évolution : apparition et diffusion des variants

1 - Généralité et définitions

Les virus se caractérisent par une évolution génétique constante plus ou moins rapide selon leur famille. Grâce à l'activité 3'-5' exonucléase de la nsp16, qui a la capacité de corriger les erreurs commises par la RdRp lors de la réplication virale, les coronavirus ont un taux de mutation spontanée inférieure à la plupart des virus à ARN. Néanmoins ce taux de mutation n'est pas nul et les données de la littérature l'estiment entre 0,004 et 0,02 mutations par nucléotide par an[45]. L'apparition de variants au cours de l'épidémie est donc un phénomène attendu. Des outils de bio-informatique ont été développés afin de pouvoir classer les séquences en clades (Nextrain.org) ou en lignages (Pango), qui représentent des groupes d'infections avec une ascendance partagée et mettent en évidence des événements épidémiologiques pertinents, tels que l'apparition du virus dans un nouvel emplacement, une augmentation rapide des cas ou l'apparition de virus avec de nouveaux phénotypes. **(Fig.13)**

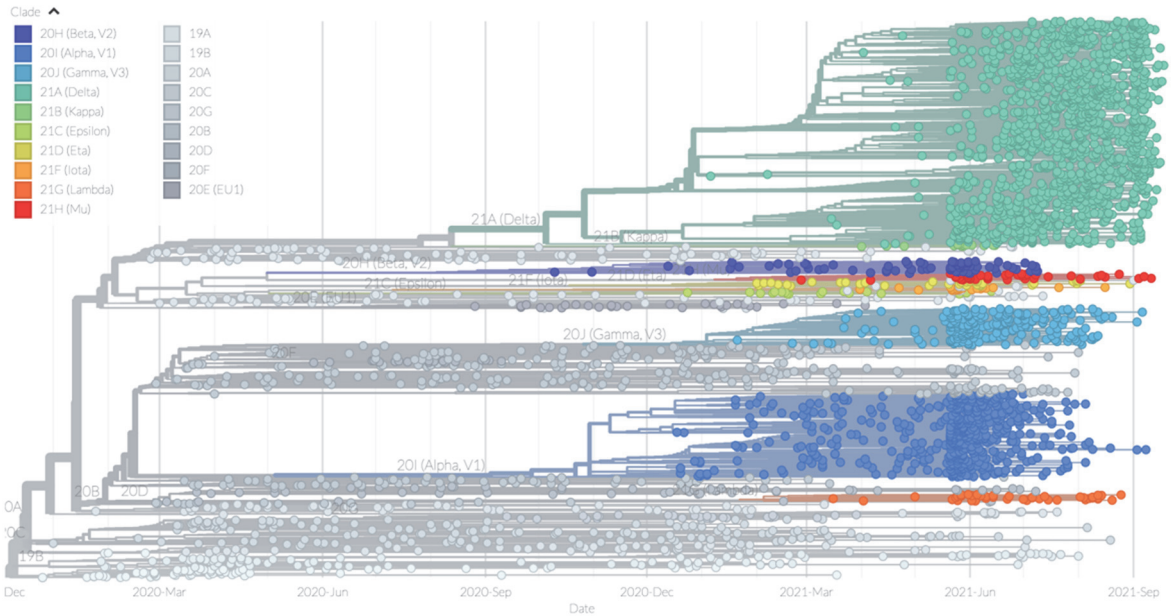


Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences circulantes dans le monde depuis décembre 2019, d'après nextstrain.org (CC by 4.0)

Parmi ces variants, certains sont définis par l'OMS comme préoccupants (VOC : variants of concern) s'ils sont associés à :

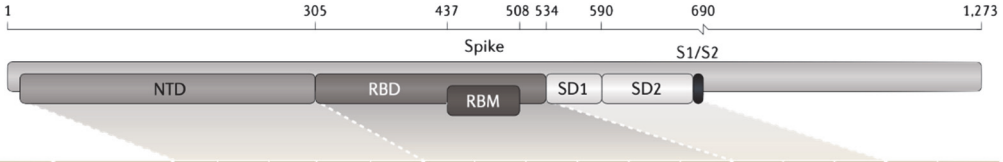
-une augmentation de la transmissibilité ou un changement préjudiciable dans l'épidémiologie.

-une augmentation de la virulence ou une modification de la présentation clinique de la maladie.

-une diminution de l'efficacité des mesures sociales et de santé publique, ou des moyens diagnostics, vaccinaux ou thérapeutiques disponibles.

D'autres variants émergents insuffisamment caractérisées sont définis comme variants d'intérêt (VOI : variants of interest)

En raison de la définition de ces variants, la majorité d'entre eux arborent des mutations dans le gène codant pour la protéine Spike en lien avec le rôle central de cette protéine dans le cycle du virus. En effet, étant responsable de l'étape d'entrée du virus dans la cellule, des mutations dans sa séquence peuvent être à l'origine d'une augmentation de la transmissibilité (par augmentation de l'affinité entre le RBD et l'ACE2) et/ou d'un échappement immunitaire (par perte d'affinité des anticorps neutralisants pour la protéine spike). Mais ils possèdent également des mutations dans d'autres parties du génome. **(Fig.14)**



WHO	PANGO lineage	Country of first identification	18	69	95	144	242	417	452	478	484	490	501	614	681	701	nsp6: 106	N:203/ 204
			L	H	T	Y	L	K	L	T	E	F	N	D	P	A	S	R/G
Alpha	B.1.1.7	UK		del		del							Y	G	H		del	K/R
Beta	B.1.351	South Africa	F				del	N			K		Y	G		V	del	
Gamma	P.1	Brazil	F					T			K		Y	G			del	K/R
Delta	B.1.617.2	India			I				R	K				G	R			M
Epsilon	B.1.427/9	USA							R					G				
Eta	B.1.525	Nigeria		del		del					K			G			del	
Theta	P.3	Philippines									K		Y	G	H			K/R
Iota	B.1.526	USA			I	del					K			G		V	del	
Kappa	B.1.617.1	India			I				R		Q			G	R			M
Zeta	P.2	Brazil									K			G				K/R
Lambda	C.37	Peru							Q			S		G			del	K/R

Figure 14 : Mutations caractérisant les variants principaux du SARS-CoV-2, d'après la Réf.45

2 - Variant D614G

En avril 2020, B.Korber et son équipe[46] ont mis en évidence qu'une mutation, responsable du changement d'un acide aspartique par une glycine en position 614 dans la séquence de la protéine spike, apparue en Europe en février 2021, était rapidement devenue majoritaire, et qu'elle devenait rapidement majoritaire dans les zones géographiques où elle s'implantait. Les études montraient, *in vitro*, une augmentation des titres viraux en culture cellulaire et, *in vivo*, une augmentation de la charge virale chez les patients porteurs, sans pour autant entraîner une

augmentation de la sévérité clinique. A ce jour, il ne reste quasiment plus de souche « sauvage » et tous les autres variants ayant émergé par la suite ont conservé cette mutation qui donne un avantage réplicatif. (**Fig.15**)

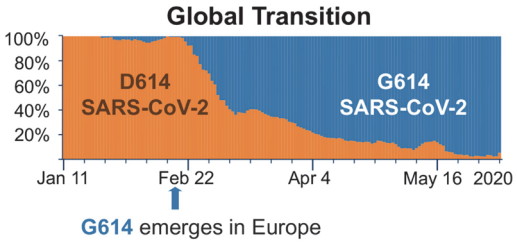


Figure 15 : Évolution temporelle de la fréquence de la mutation D614G début 2020, d'après la Réf. 46

3 - Variant α

Le variant α (B1.1.7/20I) présente dans la séquence de la protéine spike les mutations N501Y, P681H dans le RBD, et les délétions 69-70 et 144 dans le NTD. La délétion 69-70 qui a pour conséquence d'empêcher l'amplification par qRT-PCR du gène de la spike dans l'un des kits commerciaux les plus utilisés, a été l'un des premiers signes permettant de classifier ce variant comme VOC. Ce phénomène est appelé SGTF (S-gene Target Failure). Dès le mois d'avril 2021, soit 7 mois après son apparition au Royaume Uni (**Fig.16-A**), il est devenu le variant majoritaire en Europe. Des études épidémiologiques ont montré une transmissibilité accrue , en lien avec des charges virales plus élevées dans les voies aériennes, mais également une mortalité plus importante[45,47].

4 - Variant β

Le variant β (B.1.351/20H) contient 3 mutations caractéristiques dans la séquence de la protéine spike : K417N, E484K et N501Y dans le RBD, et 5 mutations dans le NTD dont une délétion 242-244. Il a été détecté initialement en Afrique du Sud en octobre 2020 en raison d'une élévation très importante du nombre de cas journaliers (**Fig.16-B**), passant de 2'000 à 20'000 par jour en quelques mois[48].

5 - Variant γ

Le variant γ (P.1/20J) est relativement proche du variant β, car il partage avec lui les mutations N501Y, et E484K dans le RBD, la mutation L18F dans le NTD. Il possède en revanche une mutation K417T en place de la K417N présente chez le variant β et ne possède pas la délétion 242-244. Ce variant a été identifié car il a provoqué une explosion de cas dans la région de Manaus au Brésil (**Fig.16-C**) où le taux d'infection dans la population était élevé laissant suspecter une capacité à infecter des personnes précédemment infectées par d'autres variants[49].

6 - Variants δ et κ

Les variants κ (B.1.617.1/21B) et δ (B.1.617.2/21A), qui partagent un ancêtre commun, sont apparus en Inde au début de l'année 2021 et ont rapidement représenté la majorité des cas (**Fig.16-D**). Ces deux variants partagent les mutations L452R dans le RBD, la P681R à proximité du site de clivage par la furine S1/S2, et plusieurs mutations dans les ORF3, ORF7 et la nucléocapside. Le variant κ arbore une E484Q tandis que le δ porte une T478K. Par la suite le variant δ est devenu le variant majoritaire en Inde et s'est répandu dans le reste du monde. En France, et plus généralement en Europe, il est devenu le variant majoritaire seulement 2 mois après son apparition au détriment du variant α.

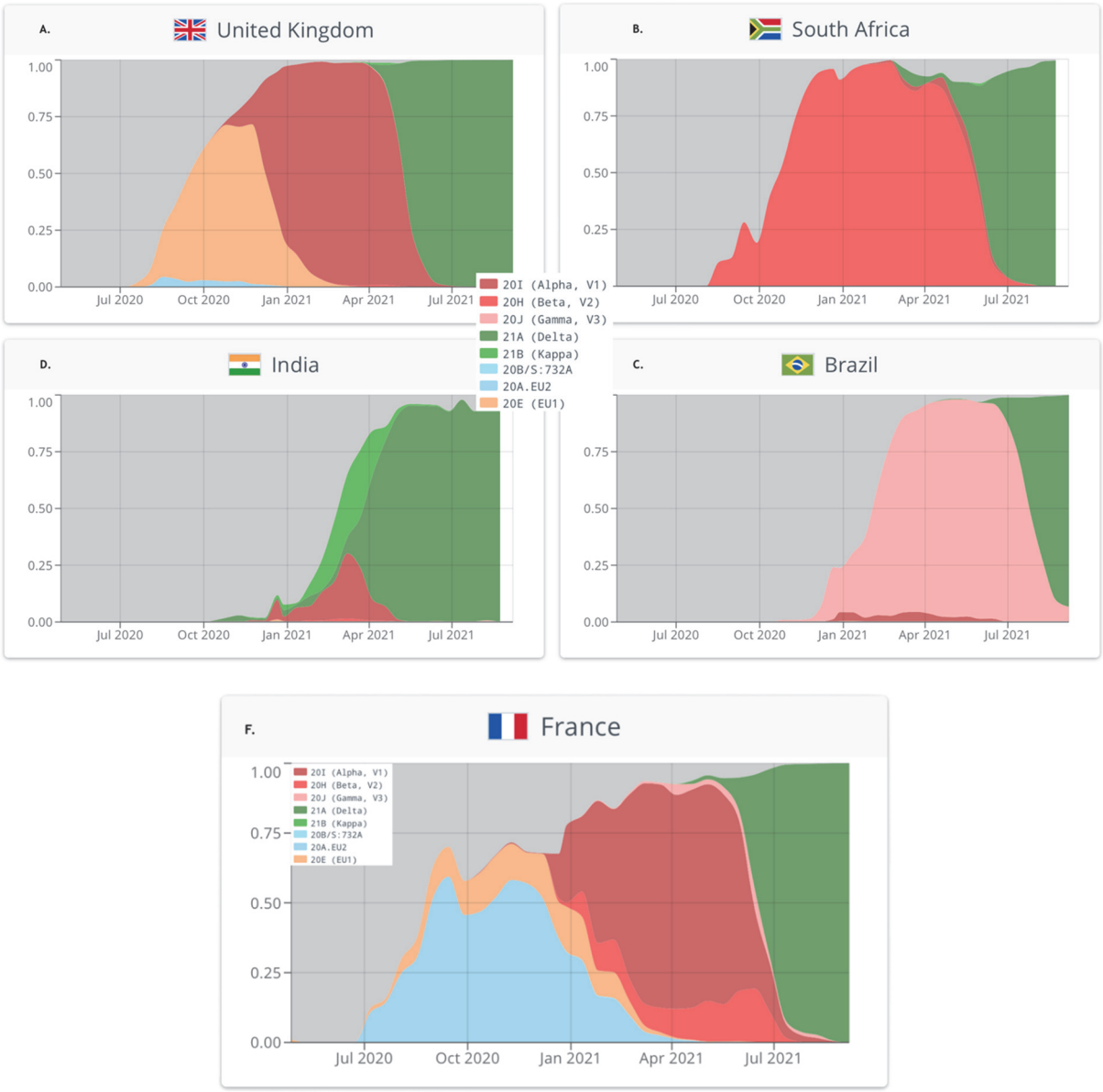


Figure 16 : Graphique représentant pour chaque pays la proportion du nombre total de séquence pour certains VOC, d'après covariant.org (CC BY 4.0)

G - STRATEGIES THERAPEUTIQUES

1 - Généralité

La majorité des personnes infectées par le SARS-CoV2 ne développe pas ou peu de symptômes et ne nécessite donc pas de traitement particulier. En revanche pour les personnes présentant des facteurs de risque de formes graves, la recherche de traitement aussi bien curatif que préventif représente un véritable enjeu de santé publique.

Les différentes stratégies thérapeutiques envisageables découlent de l'histoire naturelle de l'infection (**Fig.17**):

- La phase initiale, d'environ une semaine à dater de la contamination, au cours de laquelle prédomine la réplication virale, est celle où les thérapeutiques antivirales, aussi bien directes, qu'indirectes ont le plus de chance d'avoir un impact sur l'évolution de la maladie.
- La phase secondaire, à partir de la deuxième semaine, est dominée par des phénomènes inflammatoires et la réplication virale y est faible voire nulle. Durant cette phase, les thérapeutiques antivirales ont un intérêt plus modestes et les stratégies immunomodulatrices ont plus de chance d'être efficaces[50].

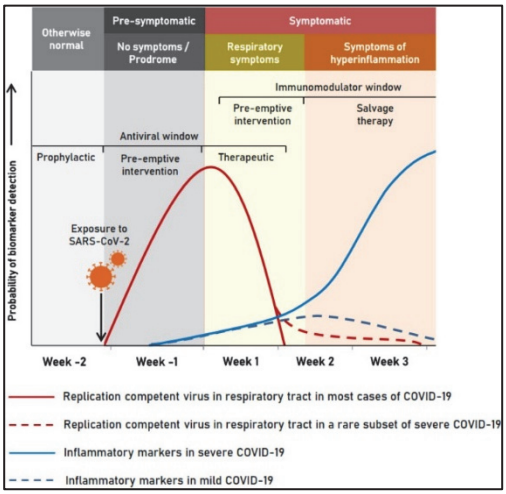


Figure 17 : Place des différentes stratégies thérapeutiques durant l'évolution de la maladie d'après la Ref.50

2 - Vaccination

Diverses plateformes ont été développées pour aboutir à un vaccin contre la COVID-19. Il s'agit notamment de technologies basées sur l'ARN messager, des plasmides ADN, des vecteurs viraux non réplicatifs et des vaccins inactivés. Ces plateformes sont illustrées à la figure 18 (**Fig.18**). Bien que les vaccins à base d'ARN, d'ADN et de vecteur viral non réplicatif n'aient pas été développés ni homologués pour une utilisation humaine dans le passé, ces trois plateformes

offrent un avantage dans une situation de pandémie. Elles peuvent être fabriquées rapidement en laboratoire et étant basées sur la séquence génétique du virus, elles permettent un processus de développement accéléré en cas de pandémie et une possibilité rapide d'adaptation devant l'apparition de mutants échappant aux vaccins initialement développés[51].

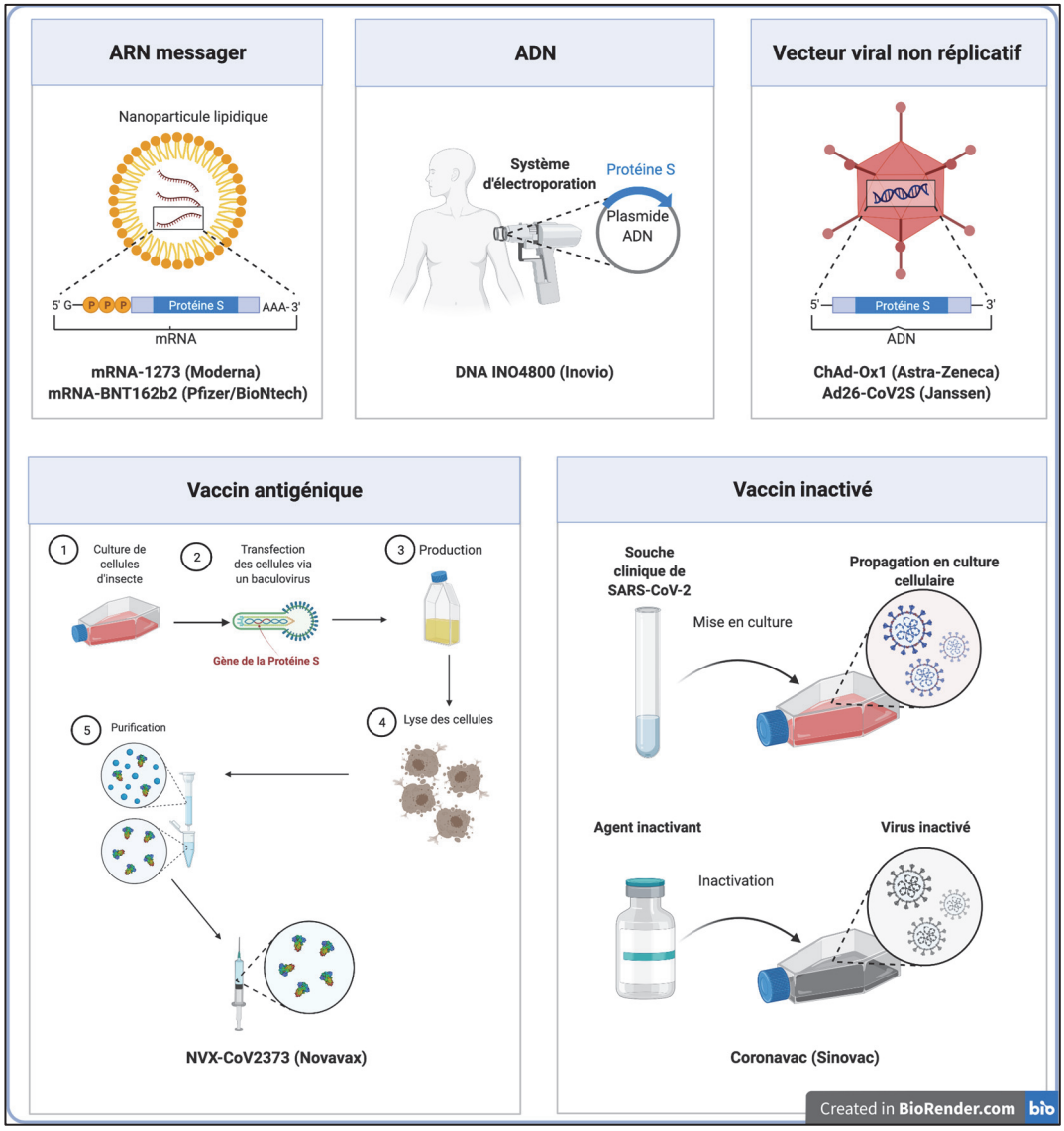


Figure 18 : Représentation des différentes plateformes vaccinales existantes

i - Vaccins à ARN messager

Cette stratégie consiste à injecter un ARNm comprenant l'ORF de l'antigène cible portant une coiffe en 5' et terminée en 3' par une queue polyadénylée. La production de vaccins à base d'acide nucléique est généralement plus rapide et moins chère que les vaccins à sous-unités protéiques et, par conséquent, plusieurs candidats vaccins contre le SRAS-CoV-2 à base d'ARNm ont été développés. Pour les deux vaccins disponibles en France, l'ARNm utilisé code pour la protéine spike, verrouillée dans la conformation de préfusion, pour imiter plus

fidèlement le virus intact avec lequel les anticorps neutralisants générés doivent interagir[52]. Un obstacle important au développement d'un vaccin à ARNm est la propension de l'ARNm à se dégrader. Diverses stratégies ont été développées pour résoudre ces problèmes, notamment l'élimination de l'ARN double brin et l'inclusion de l'ARNm dans des nanoparticules lipidiques. Ces nanoparticules lipidiques ont l'avantage d'être des adjuvants, augmentant les réponses cellulaire B et T[53]. Les études de phases II/III conduites chez l'homme, portant sur respectivement 43'448 et 30'420 participants, montrent une efficacité vaccinale de 94,8% à J_7 après la seconde dose pour l'ARNm BNT162b2 (Cominraty,Pfizer/BioNtech)[54], et de 94,1% à J_{14} après la seconde dose pour l'ARNm 1273 (Spikevax, Moderna)[55] (**Fig.19**). Les effets indésirables principaux associés à la vaccination étaient des douleurs légères à modérées au point d'injection, céphalée, fièvre et frisson.

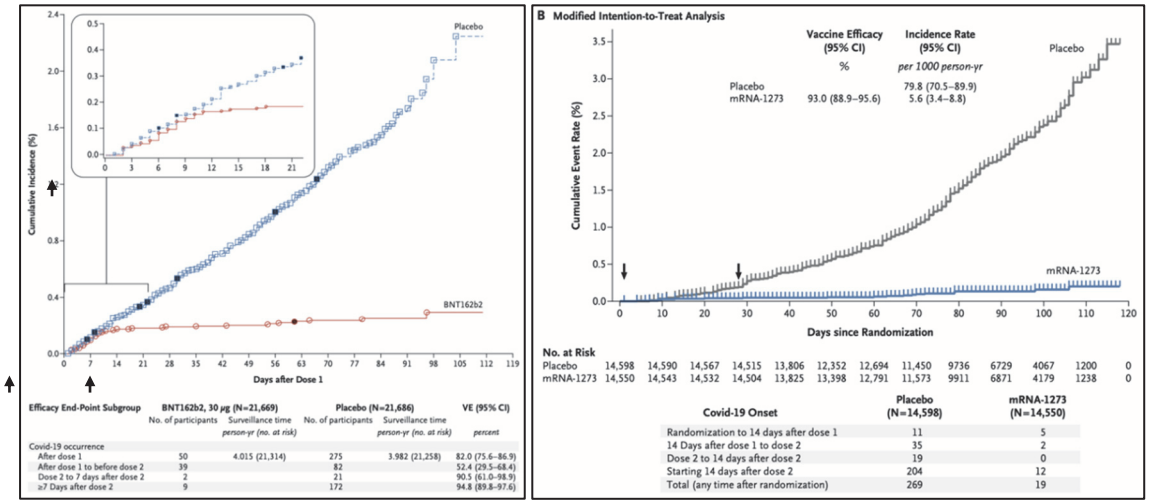


Figure 19: Efficacité des vaccins Cominraty et Spikevax d'après les réf. 54-55

ii - Vaccins à vecteur ADN

Les premières études utilisant des vecteurs à ADN afin d'exprimer des protéines directement *in vivo* datent des années 1990[56]. Les avantages des vaccins à ADN sont leur facilité de fabrication, leur stockage et leur sécurité. La fabrication d'ADN plasmidique est rapide et pour le stockage, l'ADN plasmidique, contrairement à l'ADN chromosomique, se renature facilement et rapidement dans de nombreuses conditions sans perte d'activité biologique.

Grâce à ces avantages, les vaccins à ADN peuvent être développés et déployés rapidement. Cependant, les vaccins à ADN présentent également des inconvénients potentiels : l'activation d'oncogènes en raison de l'incorporation de plasmides dans le génome de l'hôte[57] et la formation d'anticorps anti-ADN, risquant de déclencher des réponses auto-immunes. De plus, en raison de la stabilité accrue des vecteur ADN, le vaccin stimule sur de longues périodes (jusqu'à deux

mois post-injection[56]) la réponse immunitaire humorale et une inflammation chronique ou une tolérance immunologique à l'antigène protéique produit peuvent survenir.

En réponse à la pandémie de COVID-19, différentes études ont été menées sur des vaccins à ADN :

- Études précliniques sur rongeurs :
    - Smith *et al.*[58] ont montré la présence d'anticorps neutralisants dans les sérums et les poumons à J7 de la vaccination par INO-4800 chez la souris et le cochon d'Inde.
- Études précliniques sur primate non humain :
    - Deux études chez des macaques montrent qu'une vaccination par ADN provoque l'apparition d'anticorps neutralisants, associée à une réponse immunitaire cellulaire, et qu'une fois challengés par le virus, les animaux vaccinés ont une charge virale au niveau pulmonaire fortement réduite par rapport aux animaux témoins[59,60].
- Études de phase I chez l'homme.
    - Une seule étude est à ce jour disponible[61]. Elle a évalué l'efficacité et la tolérance du vaccin INO-4800 chez 40 volontaires sains.
        - A la semaine 6 post injection, 95% des sujets avaient séroconverti en ELISA (Ac de liaison) et en séroneutralisation (Ac neutralisants).
        - A la semaine 8, 86% des sujets présentaient une réponse immunitaire cellulaire : production d'INFγ en ELIspot et d'INFα et INFγ par les Lymphocytes T_{CD8}^{+} en cytométrie en flux.

Le candidat vaccin INO-4800 est en cours d'évaluation en phase II et III ainsi que d'autres candidats, mais aucune de ces études n'est encore disponible à ce jour. Parmi les autres vaccins en développement, utilisant une plateforme ADN, on peut également citer :

- BacTLRspike (symvio), un vaccin à ADN plasmidique codant pour la protéine spike du SARS-CoV-2 véhiculé par Bifidobacterium *longum* administré par voie orale.
- GLS-5310 (GeneOne Life Science, Inc.) Vaccin à ADN plasmidique codant pour la protéine Spike et un antigène du SARS-CoV-2.
- Covigenix VAX-001 (Entos Pharmaceuticals Inc.) : Vaccin à ADN plasmidique codant pour la protéine de la nucléocapside.

iii - Vaccins à vecteur viral non réplicatif

Cette technologie est basée sur l'utilisation d'un virus vecteur génétiquement modifié comme moyen de faire synthétiser par les cellules un antigène d'intérêt. La modification du virus vecteur a donc deux objectifs : d'une part insérer dans son génome la séquence génique de la protéine d'intérêt et d'autre part à supprimer certaines parties du génome viral afin de le rendre incapable de se répliquer et de provoquer une infection.

Dans le cadre de la $COVID_{19}$, les vecteurs viraux utilisés sont des adénovirus (AdV) car ils présentent de nombreux avantages[62] :

- Ils peuvent infecter un large éventail de cellules en division actives ou quiescentes.
- L'expression transgénique avec des vecteurs AdV est généralement robuste et peut être encore améliorée en pilotant l'expression génique avec de puissants promoteurs hétérologues.
- La synthèse des vecteurs AdV est simple et ils peuvent être facilement développés à grande échelle en culture cellulaire.
- Étant donné que les vecteurs AdV sont défectueux pour la réplication, il n'y a pas de risque de transmission horizontale.
- Le génome du vecteur ne s'intègre pas dans le chromosome de l'hôte et reste majoritairement épichromosomique, rendant ainsi leur utilisation sûre sans risque de mutagenèse insertionnelle.
- Les vecteurs AdV induisent une forte immunité lorsqu'ils sont administrés par voie parentérale ou muqueuse en lien avec leur nature virale qui leurs donne une capacité d'adjuvant.

L'un des plus gros inconvénients lors de l'utilisation d'un vaccin à vecteur adénovirus est que la plupart des patients ont une immunité préexistante contre plusieurs souches d'adénovirus, qui circulent en tant qu'agents d'infections ciblant majoritairement les voies respiratoires supérieures, ou qu'ils développent une immunité peu de temps après l'administration de la première dose de vaccin. Pour pallier ce problème, les adénovirus utilisés appartiennent à des génotypes rares ou ne sont pas des adénovirus humains (adénovirus simiens). En France deux vaccins ont atteint les études de phases II/III et ont obtenu une AMM :

- Le vaccin VAXZEVRIA (Astra Zeneca-University of Oxford) est basé sur un adénovirus de chimpanzé recombinant déficient en réplication (ChAdOx1) qui contient la séquence de la protéine spike associée à la séquence leader de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).

- L'efficacité vaccinale globale estimée à partir des essais de phase III[63] à J_{14} après la seconde dose de vaccin était de 70,4%.(**Fig.20**)
- Les études cliniques ne rapportent que de très rares effets indésirables sévères associés à la vaccination, ainsi que des effets indésirables d'intensité faible à modérée (asthénie, fièvre, céphalée, douleurs musculaires).

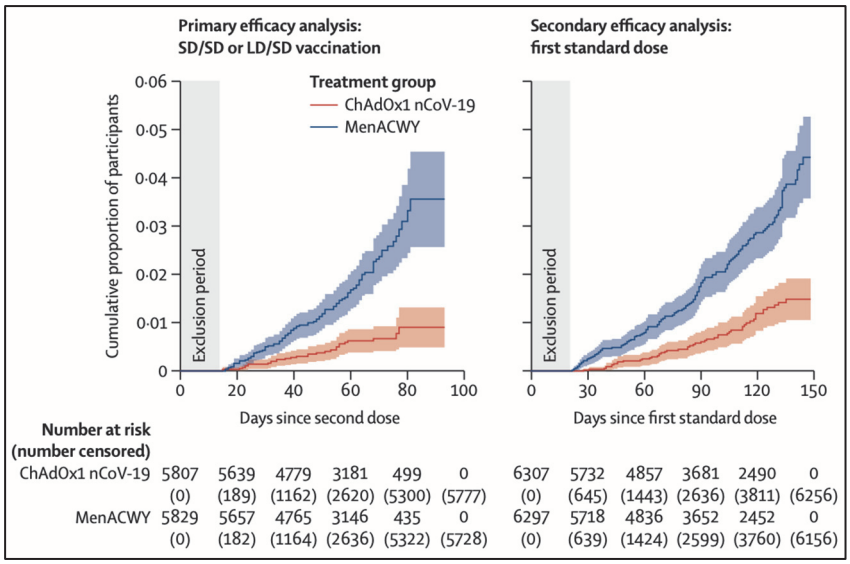


Figure 20 : Efficacité du Vaccin Vaxzevria d'après le Ref.63

- Le vaccin Janssen COVID-19 (Janssen) est basé sur un adénovirus humain recombinant déficient en réplication (HadV-26) qui code pour la protéine spike du SARS-CoV-2
  - L'efficacité vaccinale estimée à partir des essais de phase III[64] à J_{14} post-injection est de 66,9% pour les infections modérées à sévère et de 85,5% sur les infections sévères à critiques après J_{28}. (**Fig.21**)

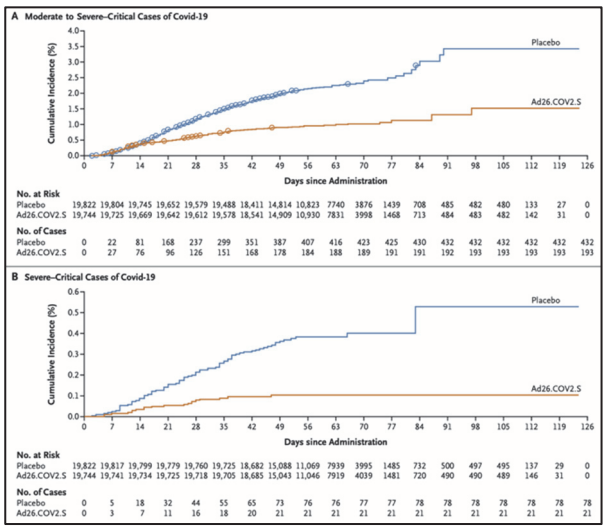


Figure 21: Efficacité du vaccin COVID-19 VACCINE JANSSEN d'après la Ref. 64

Parmi les vaccins à vecteur viral non réplicatif, on peut également citer :

- Le Vaccin GamCOVID-Vac/SPNUTIK V (Gamaleya Research Institute- Health Ministry of the Russian Federation), développé en Russie, et autorisé dans plus d'une cinquantaine de pays ne comprenant pas la France à ce jour.
    - Il présente la particularité d'être basé sur deux vecteurs adénoviraux de génotypes différents, un HAdV-26 pour la première dose et un HAdV-5 pour la deuxième, évitant ainsi que l'immunité anti-vecteur liée à la première injection ne vienne amoindrir l'efficacité de la dose de rappel.
    - L'efficacité globale estimée par l'étude de phase III[65] était de 91,6% et ne montrait pas de problème de tolérance. **(Fig.22)**
    - Le vaccin est toujours en cours d'évaluation par l'EMA (European Medicines Agency) pour une éventuelle autorisation au sein de l'Union Européenne.

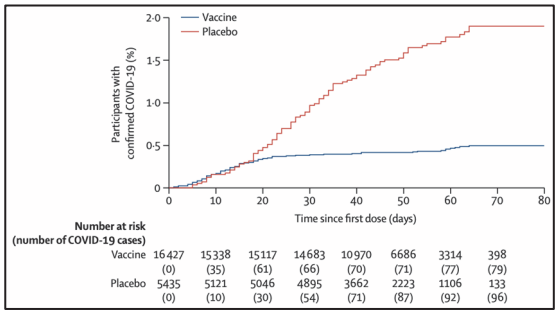


Figure 22 : Efficacité du vaccin Spoutnik V d'après la Réf.65

Bien que les essais cliniques de phase III n'aient pas mis en évidence d'effets indésirables graves, lors de l'administration de ces vaccins en population générale, on relève des signalements de plusieurs cas d'événements thrombotiques atypiques associés à des thrombocytopénies après vaccination avec VAXZEVRIA, et quelques mois plus tard également avec le vaccin Janssen[66]. Le caractère très atypique de ces thromboses et de ces troubles de la coagulation, leur tableau clinique commun et le délai de survenue homogène ont conduit le comité de suivi de la vaccination, piloté par l'ANSM en collaboration avec les centres régionaux de pharmacovigilance (CRPV) à confirmer la survenue, très rare, de ce risque thrombotique chez les personnes vaccinées par le vaccin Vaxzevria (AstraZeneca). L'hypothèse la plus vraisemblable, retenue par le comité scientifique temporaire (CST) « Vaccins COVID-19 et thromboses rares atypiques » est une réaction auto-immune liée à la présence d'anticorps dirigés contre une protéine des plaquettes : le facteur plaquettaire 4 (FP4). Les experts du CST considèrent que la balance bénéfice/risque individuelle absolue des vaccins à plateforme adénovirale reste positive en accord avec les conclusions européennes émises par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA).[67]

iv - Vaccins à base d'antigènes

Cette plateforme, qui utilise des protéines synthétiques, est à l'interface entre les techniques basées sur les acides nucléiques et les vaccins à virus entiers inactivés. Les peptides étant instables *in vivo* et en général incapables à eux seuls d'induire une réponse immunitaire robuste, ils sont généralement adsorbés sur des adjuvants spécifiques structurés pour augmenter leur internalisation par les cellules présentatrices d'antigène de l'hôte. Dans le cadre de la $COVID_{19}$, les candidats vaccins contiennent la protéine spike recombinante obtenue en culture cellulaire.

- Le vaccin à base d'antigène dont le développement est le plus avancé à ce jour est le vaccin $NVX\text{-}CoV_{2373}$ (Novavax) :
  - Il est basé sur l'utilisation d'une protéine spike recombinante produite par transfection de cellules de papillons (Cellules Sf9 de *Podoptera frugiperda*) par un baculovirus contenant le gène de la spike. Une fois lysées, les cellules libèrent la protéine spike qui est ensuite purifiée, adsorbée sous forme de trimère à des nanoparticules et additionnée d'un adjuvant MATRIX-M™[68].
  - Les études précliniques sur macaques montrent une séroconversion après vaccination. Après challenge des animaux vaccinés, les quantités et la persistance de l'ARN viral au niveau nasal et pulmonaire étaient fortement diminuées par rapport au groupe contrôle ainsi que les lésions histologiques pulmonaires[68]
  - Les études de phase I/II, ne montraient pas de problème de tolérance à J_{35}, et le vaccin a entraîné des réponses immunitaires supérieures à celles observées chez les patients convalescents. L'adjuvant Matrix-M1 permettait d'induire des réponses immunitaires de type Th1.
  - L'efficacité vaccinale globale estimée à partir des essais de phase III[69] (**Fig.23**) à J_7 après la seconde dose de vaccin était de 96,4%, sans mettre en évidence d'effets indésirables notoires.

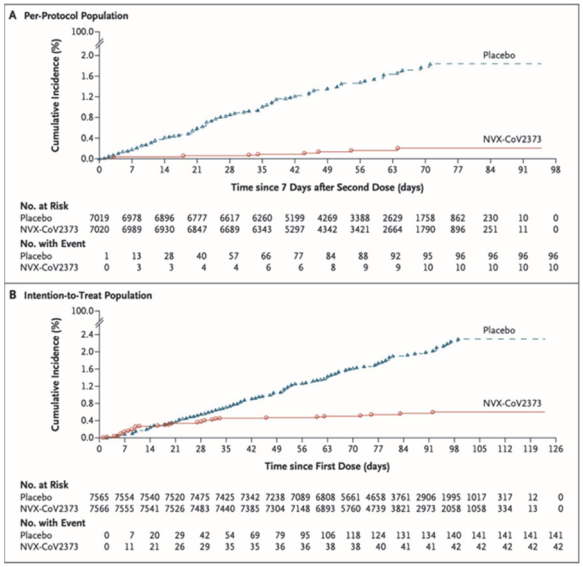


Figure 23 : Efficacité vaccinale du vaccin Novavax, d'après la Réf.69

De nombreux autres vaccins sont en cours de développement parmi lesquels on peut citer :

- ZF2001 (Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical) : Ce Vaccin formé de deux sous-unités RBD de la protéine spike fusionnées et adjuvées par hydroxyde d'aluminium est actuellement en phase III, après avoir montré une bonne sécurité et l'induction d'une réponse immunitaire satisfaisante lors des études de phase I/II[70].
- Vidprevtyn : C'est un vaccin développé par Sanofi en collaboration avec GSK, basé sur le même principe que Novavax mais avec un adjuvant mis au point par GSK. Les résultats des études de phase I/II communiqués par Sanofi[71] montreraient que le vaccin déclenche des réponses en anticorps neutralisants et une réponse immunitaire après une dose unique chez les patients précédemment infectés, mettant en évidence une possible utilisation en tant que rappel vaccinal. Les essais de phase III ont débuté en mai 2021.

v - Vaccins à base de virus atténué ou inactivé.

L'utilisation d'agents pathogènes après atténuation ou inactivation est la stratégie vaccinale la plus ancienne. Bien que ce type de vaccination représente la grande majorité des vaccins historiquement efficaces, leur long temps de production les a désavantagés dans la pandémie actuelle de COVID-19. La plupart des candidats vaccins de cette catégorie sont des vaccins à base de virus inactivés. Il existe de nombreuses approches différentes pour fabriquer ces vaccins : les radiations, la chaleur ou les produits chimiques qui inactivent l'agent pathogène d'intérêt. Des produits chimiques comme le formaldéhyde ou la β-propiolactone sont largement utilisés à cet effet. Ces agents détruisent la capacité du virus à se reproduire, mais maintiennent la structure antigénique normale du virus, ce qui déclenche la réponse immunitaire[72]. Les vaccins inactivés stimulent les cellules T auxiliaires via la voie CMH-II (Complexe majeur d'histocompatibilité), ce qui entraîne l'activation des réponses immunitaires humorales. Mais ces vaccins ne stimulent généralement pas de manière significative les cellules T cytotoxiques via la voie du CMH-I et manquent donc d'une réponse immunitaire cellulaire robuste[73]. Les vaccins inactivés sont faciles à entretenir en culture et leur stockage ne nécessite généralement pas de réfrigération, ce qui les rend plus adaptés pour les pays en développement.

- Le vaccin Coronavac (Sinovac Research and Development Co., Ltd) est un vaccin viral entier, inactivé par β-propiolactone et adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium.
    - Les études de phases I/II[74] montrent une bonne tolérance et la capacité du vaccin à induire des anticorps neutralisants à J_{14} après la seconde dose, même chez des patients âgés de plus de 60 ans[75]
    - Bien que déjà autorisé dans 37 pays (Asie, Amérique du sud, et quelques pays d'Europe comme la Bosnie, l'Ukraine et la Turquie), aucune étude de phase III n'a encore été publiée mais les données rassemblées par l'OMS montrent une efficacité vaccinale globale entre 50-84%, et une protection entre 85 et 100% contre les hospitalisations[76], mais ces données devront être confirmées lors de la publication d'études revues par des pairs.
- D'autres vaccins inactivés sont en cours d'étude de phase II ou III parmi lesquels :
    - BBV152 (Bharat biotech) : un vaccin inactivé adjuvé par une imidazoquinoléine agoniste des Toll Like Receptor 7 et 9 adsorbé sur hydroxyde d'aluminium. Le BBV152 est conservé entre 2°C et 8°C ce qui présente un avantage logistique majeur. Lors des essais cliniques, trois mois après la deuxième dose, malgré une baisse attendue des titres d'anticorps

neutralisants, le vaccin BBV152 a montré qu'il pouvait conférer une immunité humorale durable et une immunité à médiation cellulaire[77]

- BBIBP-CorV (Beijing Institute of Biological Products-Sinopharm-China National Biotec Group Co) Lors des études de phase I/II, le vaccin s'est montré sûr et bien toléré à toutes les doses testées dans les deux groupes d'âge. Des réponses humorales ont été induites chez tous les receveurs du vaccin à J42[78].

vi - Vaccins et émergence des variants

Les stratégies vaccinales étant basées pour la quasi-totalité d'entre elles sur une immunisation à l'encontre de la protéine spike, les variants ont, dès leur apparition, incité la communauté scientifique à étudier l'effet de ces mutations sur l'efficacité vaccinale.

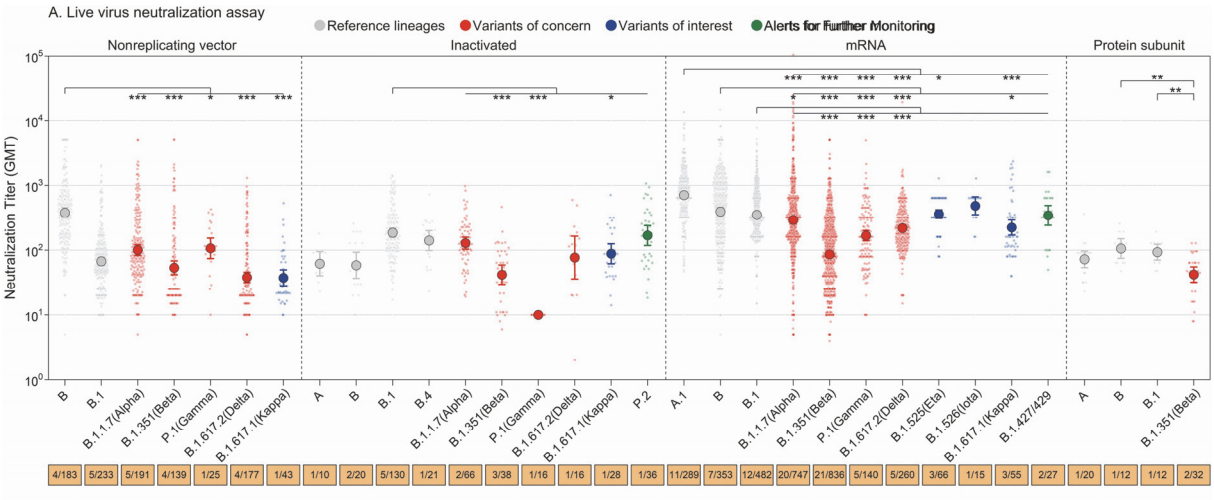


Figure 24 : Taux d'anticorps neutralisants contre les variants du SRAS-CoV-2 chez des personnes non infectées après l'administration de différentes plateformes vaccinales, d'après la Réf. 79

La **figure 24**, issue de la méta-analyse de Xinhua Chen *et al.*[79] illustre les différences de taux d'anticorps neutralisants issus de plasma de patients vaccinés à l'encontre des différents VOC et VOI. On constate que le variant β (B.1.351) aboutit à des titres neutralisants plus faibles pour l'ensemble des plateformes vaccinales, tandis que le variant α (B.1.1.7) a un impact plus modéré. Il ressort également de cette étude que les vaccins à plateformes ARNm semblent produire les taux d'anticorps neutralisants les plus importants et qu'ils semblent moins affectés par les variants que les autres plateformes. Des études cliniques viennent conforter ces données : le **Tableau 1,** issu de la review de Kaiming Tao *et al.* présente l'efficacité vaccinale dans la prévention des infections symptomatiques pour les principaux VOC. Les variants β et γ sont ceux ayant l'impact le plus marqué sur l'efficacité vaccinale et les vaccins à ARNm

démontrent également une robustesse supérieure face aux variants mais leur efficacité est néanmoins affectée[45].

Variant	Pfizer/BioNTech BNT162b	AstraZeneca AZD1222[a]	Novavax NVX-2373	Janssen AD26.CoV2[b]	Sinovac CoronaVac[c]
Pre-variant	95% (trial)[56,59]	70% (trial)[59,248]	96% (trial)[59,212]	72% (trial)[59,225]	51% (trial)[59]
Alpha	90% (TNCC)[211]	70% (trial)[213]	86% (trial)[212]	–	–
	92% (TNCC)[233]	66% (TNCC)[232]			
	93% (TNCC)[232]	81% (TNCC)[233]			
	97% (cohort)[210]				
Beta	75% (TNCC)[211]	10% (trial)[224]	51% (trial)[216]	64% (trial)[225]	–
Gamma	–	–	–	–	42% (TNCC)[249]
Delta	83% (TNCC)[233]	60% (TNCC)[232]	–	–	–
	88% (TNCC)[232]	61% (TNCC)[233]			

Tableau 1 : Efficacité vaccinale en prévention des infections symptomatiques pour les principaux VOC, d'après la Ref 45

Grâce à la grande plasticité des nouvelles plateformes vaccinales, des vaccins de seconde génération utilisant les protéines spike de ces VOC, sont à l'étude pour contrer ces mutations et les changements antigéniques qui en découlent. On peut citer l'ARNm 1273-351, développé par le laboratoire Moderna (développeur de Spikevax® : ARNm-1273), basé sur la séquence du variant β (B.1.351) ainsi qu'un mélange équimolaire d'ARNm 1273 et d'ARNm 1273-351 appelé ARNm 1273-211. Ces deux produits se sont montrés efficaces lors des essais précliniques en modèle murin[80] et sont entrés en étude de phase I[81].

3 - Stratégies immunomodulatrices

Dès le début de la pandémie, les premières séries de cas rapportées dans la littérature ont montré que l'infection à SARS-CoV-2 entraînait chez certain patients une inflammation excessive et que certains marqueurs de l'inflammation, dont la CRP (protéine C-réactive) et l'interleukine 6 (IL_6), étaient des marqueurs prédictifs de décès[82] suggérant que la mortalité pourrait être due à une hyper-inflammation d'origine virale. C'est donc sur cette base que l'utilisation de stratégies immunomodulatrices a été envisagée afin de diminuer la réponse inflammatoire excessive.

i - Corticostéroïdes

Les corticostéroïdes utilisés en thérapeutique sont des analogues du cortisol caractérisés par une structure androstane à 17 carbones qui provient du métabolisme du cholestérol (**Fig.25**). Pour exercer un effet, la molécule de stéroïde diffuse à travers les membranes cellulaires et se lie aux récepteurs des glucocorticoïdes. Le complexe récepteur-glucocorticoïde est capable de se déplacer dans le noyau cellulaire, où il se dimérise et se lie aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes. Cette liaison aboutit à l'inhibition des facteurs de transcription qui contrôlent la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires, comme la phospholipase A2, la cyclooxygénase-2, la NO-synthase inductible et des cytokines pro-inflammatoires[83]. Les corticostéroïdes représentent des thérapies importantes pour de nombreuses affections aiguës et maladies chroniques en raison de leurs larges effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs.

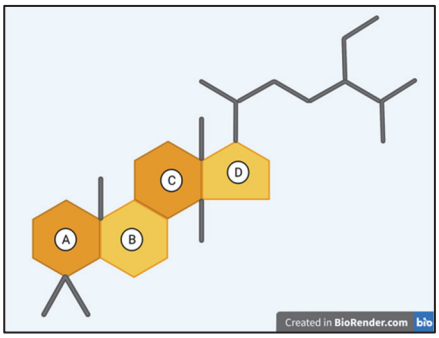


Figure 25 : Squelette de base d'un corticostéroïde

En date du 2 septembre 2020, l'OMS a publié des recommandations concernant l'usage des corticoïdes suite à la réalisation d'une méta-analyse suggérant un bénéfice sur la mortalité. Il recommande l'usage des corticoïdes par voie systémique (dexaméthasone, hydrocortisone) pour le traitement des patients ayant une COVID-19 sévère et critique[84], devant une baisse de mortalité rapportée de 20% chez ces patients[85]. En février 2021, les résultats de l'étude RECOVERY sont publiés et confirment la diminution de mortalité chez les patients nécessitant une oxygénation ou une ventilation mécanique à la dose de 6 mg/J durant 10 jours par rapport aux groupes recevant les soins standard (**Fig.26**). Cette amélioration n'était pas retrouvée chez les patients ne nécessitant pas d'assistance respiratoire[86]. Les corticoïdes sont les premiers médicaments à avoir eu une AMM dans la prise en charge de la COVID$_{19}$.

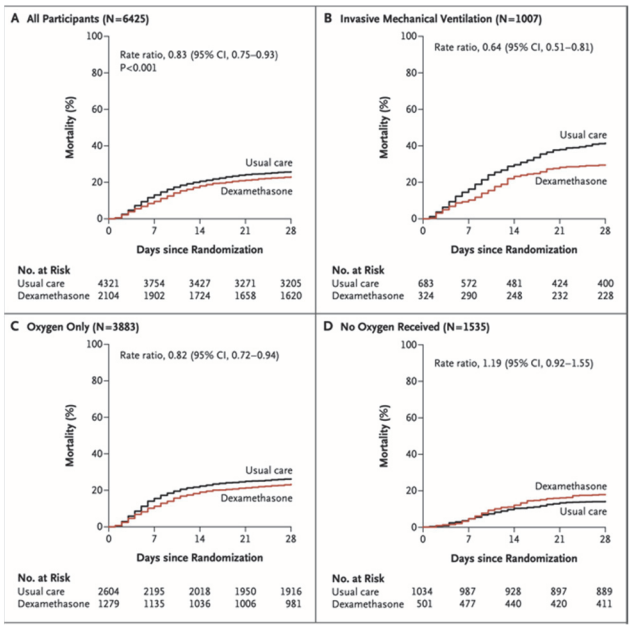


Figure 26 : Mortalité à 28 jours chez les patients en fonction de leur statut respiratoire, d'après la Réf.86

ii - Autres stratégies immunomodulatrices

- L'interleukine-6 (IL_6) est libérée en réponse à l'infection et stimule les voies inflammatoires dans le cadre de la réponse de phase aiguë. Le tocilizumab et le sarilumab sont des anticorps monoclonaux (AcM) qui inhibent à la fois les récepteurs membranaires et solubles de l'IL_6. Le 6 juillet 2021, l'OMS a mis à jour ses lignes directrices relatives au traitement des patients afin d'y inclure les antagonistes de l'IL_6[87], après la parution d'une méta-analyse prospective et d'une méta-analyse en réseau dynamique lancées par l'OMS tenant compte des données de plus de 10 000 patients participant à 27 essais cliniques[88].Ces études montraient une réduction de mortalité de 13% et du risque de nécessiter une ventilation mécanique de 28% comparé aux soins standard.
- L'interleukine 1 (IL_1) est également une des cytokines principales de l'inflammation. L'anakinra est un antagoniste du récepteur de type I à l'IL_1 (IL_1R_I), qui neutralise l'activité biologique de l'IL1α et $IL_{1\beta}$ n'a pas réussi quant à lui à montrer une efficacité[89].
- Les immunoglobulines polyvalentes sont largement utilisées dans les maladies auto-immunes et inflammatoires pour leurs capacités à bloquer des récepteurs Fc (FcR), à inhiber l'activation du complément, à moduler les réseaux cytokiniques, à apporter des anticorps anti-idiotypiques et moduler l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B[90]. Elles sont en cours d'évaluation dans différents essais de phase III[91].

4 - Stratégies antivirales

i - Neutralisation

Cette stratégie consiste à interférer avec la première étape du cycle infectieux du virus en bloquant l'interaction entre la protéine spike et son récepteur cellulaire, en apportant des anticorps neutralisants exogènes. Ces anticorps peuvent être polyclonaux, issus du plasma de convalescents, ou monoclonaux obtenus par génie génétique.

a) Plasma de convalescents

L'utilisation de plasma de patients convalescents (PC) est une thérapeutique ancienne en médecine humaine. Le premier prix Nobel de médecine décerné en 1901 à Emil Adolf von Behring pour son travail précurseur sur les sérums en particulier contre la diphtérie a posé les bases de la sérothérapie. Depuis, la CPT (Convalescent Plasma Therapy) a été utilisée dans le traitement de nombreuses maladies virales émergentes : grippe espagnole, West-Nile, MERS-

CoV, Ebola, Sars-CoV-1, car elle est en général la première thérapeutique disponible lors d'épidémies ou de pandémies[92]. L'utilisation de PC permet de disposer rapidement d'un traitement le temps que des vaccins et des traitements spécifiques soient évalués. Les premières série de cas rapportées semblaient montrer une efficacité, mais ces essais étaient limités par leurs effectifs restreints[92]. Des études à plus large échelle ne montraient aucune différence significative dans l'état clinique ou la mortalité globale entre les patients traités par PC et ceux ayant reçu le placebo[93–95]. De part leur nature même de produits biologiques, les PC sont variables d'un lot à l'autre, notamment en terme de taux d'anticorps anti-SARS-CoV-2, une étude a d'ailleurs mis en évidence une association inverse entre la mortalité et le taux d'anticorps présents dans les PC injectés aux patients[96]. Bien que la CPT soit bien tolérée par les receveurs, les effets secondaires les plus fréquents sont des effets liés à la transfusion (frissons, fièvre, éruptions cutanées, réactions allergiques, surcharge circulatoire, hémolyse). D'autres problèmes inhérents à l'utilisation de produits dérivés du sang incluent une pénurie de donneurs de plasma, le risque de contamination croisée et les problèmes d'hétérogénéité de titre d'un lot à l'autre[97].

b) Anticorps monoclonaux

Les AcM sont des anticorps synthétisés par une même lignée de lymphocytes B et reconnaissant le même épitope d'un antigène.

1. Isolement et production

Leur identification se fait en isolant, chez un patient guéri, les lymphocytes B mémoires. Ces lymphocytes contiennent dans leur génome les gènes codant pour les domaines variables des chaînes lourdes (H pour Heavy) et légères (L pour Light) : V_H et V_L. Ces domaines sont ceux impliqués dans la spécificité de l'anticorps car ce sont eux qui interagissent avec les épitopes de l'agent pathogène. Les cellules mononucléées du sang circulant sont triées par cytométrie en flux et les lymphocytes B sont individualisés et soumis individuellement à une PCR visant à amplifier les gènes V_H et V_L. Une fois amplifiés, ces gènes sont clonés dans des plasmides contenant les autres gènes nécessaires à la synthèse d'un anticorps complet (domaines constants des chaînes L et H : C_L et C_H). Ces plasmides sont utilisés pour transformer des bactéries, dont chaque colonie va produire des anticorps mono-spécifiques, qui seront ensuite criblés vis-à-vis d'antigènes du SARS-CoV-2 afin d'identifier des anticorps à potentiel thérapeutique. (**Fig.27**)

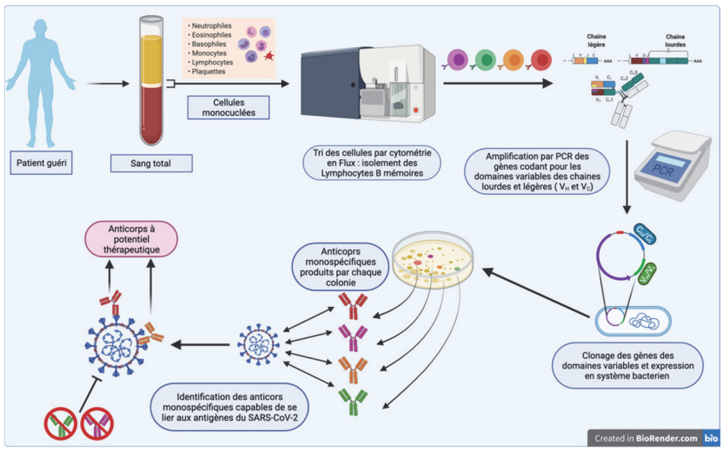


Figure 27 : Stratégie générale d'identification et d'isolement d'anticorps monoclonaux à potentiel thérapeutique.

Leur production se fait ensuite par la technique des hybridomes (**Fig.28**), c'est-à-dire en fusionnant un lymphocyte B produisant un anticorps d'intérêt avec une cellule de myélome (cellule de cancer et donc immortelle) capable d'être maintenu en culture indéfiniment. Après des étapes de sélection (élimination des cellules non fusionnées), on obtient une lignée d'hybridomes immortelles produisant une immunoglobuline monoclonale en grande quantité.

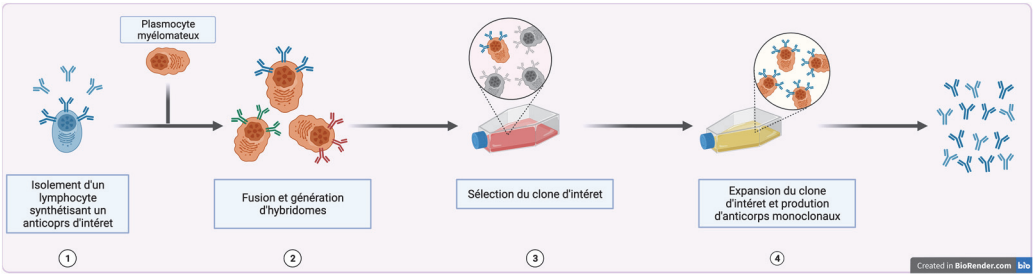


Figure 28 : Stratégie générale de production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes.

2. Anticorps disponibles

Plus d'une dizaine d'AcM sont en cours d'évaluation. Le **tableau 2** ci-dessous, issu d'une revue de Tuccori *et al.* liste les principaux candidats en cours d'évaluation à la date du 10 novembre 2020[98]. Tous ces anticorps ont pour cible la protéine spike et plus précisément le domaine RDB impliqué dans l'interaction entre la protéine spike et l'ACE2. Leur utilisation se fait en général en bithérapie, avec deux anticorps n'entrant pas en compétition et ciblant différentes parties du RBD, car il a été montré que les monothérapies, plus spécialement chez des patients immunodéprimés, étaient à risque de faire émerger des variants d'échappement[99]. La fenêtre de temps où ces anticorps peuvent être utilisés est déterminée par leur action au niveau du cycle viral : comme ils inhibent la première étape du cycle viral, c'est à dire l'entrée du virus dans la cellule hôte, leur efficacité maximale se situe dans la phase précoce de la maladie, avant ou rapidement après l'apparition des symptômes, en priorité chez des patients non immunisés ou immunodéprimés.

Tableau 2 : Principaux anticorps monoclonaux en cours d'évaluation, d'après la Réf.102

Table 2. mAb-based therapeutics for COVID-19 in clinical trials.

Drug code	Trial ID (Status)	Estimated starting and primary completion dates	Sponsor	Country
REGN-COV2 (REGN10933 + REGN10987)	NCT04425629 (Phase 2/3)	Jun 2020-Dec 2020	Regeneron/NIAID/University of Oxford	USA/UK
	NCT04426695 (Phase 2/3)	Jun 2020-Jan 2021		
	NCT04452318 (Phase 3)	Jul2020-Jun 2021		
	NCT04381936 (Phase 3)			
LY3819253 (LY-CoV555)	NCT04411628 (Phase 1)	May 2020-Aug 2020	AbCellera/Eli Lilly/NIH	Canada/USA
	NCT04427501 (Phase 2)	Jun 2020-Sep 2020		
	NCT04497987 (Phase 3)	Aug 2020-Mar 2021		
	NCT04501978 (Phase 3)	Aug 2020-Jul 2021		
	NCT04518410 (Phase 2/3)	Aug 2020- Nov 2020		
VIR-7831, VIR-7832	NCT04545060 (phase2/3)	Aug 2020- Jan 2021	Vir biotechnology/GSK	USA/UK
DXP-593	NCT04532294; (Phase 1)	Aug 2020-Oct 2020	Beigene/Singlomics Biopharmaceuticals/ Peking University etc	China
	NCT04551898 (Phase 2 pending)	Oct 2020-Feb 2021		
JS016	NCT04441918 (Phase 1)	Jun 2020-Dec 2020	Junshi Biosciences/Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences/Eli Lilly	China/USA
TY027	NCT04429529 (Phase 1)	Jun 2020-Oct 2020	Tychan	Singapore
CT-P59	NCT04525079 (Phase 1)	Jul 2020-Nov 2020	Celltrion	South Korea
	NCT04593641 (Phase 1)	Sep 2020-Dec 2020		
	NCT04602000 (Phase 2/3)	Sep2020-Dec2020		
BRII-196	NCT04479631 (Phase 1)	Jul 2020-Mar 2021	Brii Bio/TSB Therapeutics/Tsinghua University	China/USA
BRII-198	NCT04479644 (Phase 1)	Jul 2020-Mar 2021	Brii Bio/TSB Therapeutics/Tsinghua University	China/USA
SCTA01	NCT04483375 (Phase 1)	Jul 2020-Nov 2020	Sinocelltech Ltd/Chinese Academy of Sciences	China
AZD7442 (AZD8895 + AZD1061)	NCT04507256 (Phase 1) (Phase 3 pending)	Jul 2020-Sep 2021	AstraZeneca/Vanderbilt University Medical Center/ DARPA/BARDA	UK/USA
MW33	NCT04533048 (Phase 1)	Jul2020-Dec 2020	Mabwell (Shanghai) Bioscience Co., Ltd.	China
STI-1499/COVI-SHIELD	NCT04454398 (Phase 1)	Sep 2020-Feb 2021	Sorrento/Mount Sinai Health System	USA
STI-2020	NCT04584697 (Phase 1/2 pending)	Dec 2020-Apr 2021	Sorrento/Mount Sinai Health System	USA
HLX70	NCT04561076 (Phase 1)	Dec 2020-Sep 2021	Hengenix Biotech Inc	USA
HFB30132A	NCT04590430 (Phase 1)	Oct 2020-Jul 2021	HiFiBiO Therapeutics/ABL bio	USA
ADM03820	NCT04592549 (Phase 1 pending)	Nov 2020-Aug 2021	Ology Bioservices/Enabling Biotechnologies	USA
Last updated November 10, 2020				

Parmi ces anticorps deux associations sont utilisables en France :

- Bamlanivimab (BAM) + Etesevimab (ETE), développée par Eli Lilly.
    - Les résultats de l'étude de phase III BLAZE-1 montrent que cette association, utilisée chez des patients ambulatoires à haut risque de formes graves, conduisait à une incidence plus faible d'hospitalisations et de décès que le placebo et accélérait la baisse de la charge virale du SRAS-CoV-2[100].
- Casirivimab (CAS) + Imdevimab (IMD), développée par Regeneron Pharmaceuticals en partenariat avec le laboratoire Roche.
    - Les résultats issus de l'essai britannique RECOVERY publié en pré-print en juin 2021 montraient une réduction de mortalité de 20% chez les patients séronégatifs au moment de l'inclusion[101].
    - Les résultats de l'essai de phase III évaluant leur utilisation en prophylaxie , publiés par le laboratoire Roche en avril 2021, montraient une réduction du risque d'infection symptomatique de 83%, et chez les patients ayant développé une infection symptomatique, une réduction de la charge virale, de la durée des symptômes et du risque d'évoluer vers une forme grave[102].

Les dernières recommandations françaises (datant de février 2021) stipulent que l'utilisation de ces associations est possible en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) chez les patients à risque de formes graves ou en cours de grossesse, le plus précocement possible après un test positif et évaluation du rapport bénéfice/risque[103].

A noter que d'autres anticorps monoclonaux sont en développement, parmi ceux non encore autorisés en France on peut notamment citer :

- Sotrovimab (SOT, Vir-7801) : Dérivé d'un anticorps isolé d'un patient convalescent du SARS-CoV en 2003, il se lie à un épitope hautement conservé de la protéine spike partagé avec le SARS-CoV-2, ce qui serait en faveur d'une plus grande robustesse face aux variants[98].
- Tixagevimab (TIX, AZD8895) et Cilgavimab (CIL,AZD1061) : Dérivés d'anticorps isolés de patients convalescents, ils ont été modifiés afin d'avoir une demi-vie prolongée et se fixent tout deux au RBD de la spike de manière non compétitive. Après des essais précliniques concluants (rongeur et primate non humain), ils sont désormais en étude de phase III, en traitement prophylactique et curatif contre la $COVID_{19}$[104].
- Regdanvimab (REG,CT-P59) : Dérivé d'un anticorps isolé d'un patient convalescent du SARS-CoV-2, il se lie au RBD de la protéine spike. L'orientation de la liaison entre le REG et le RBD est différente de celle des autres AcM[98].

3. Anticorps et variants

Comme pour les vaccins, l'émergence des variants a également soulevé de nombreuses questions quant à l'efficacité des AcM vis de ces nouvelles souches. La communauté scientifique a donc de la même manière étudié l'impact des mutations de la protéine spike sur la capacité de neutralisation des AcM sur ces nouveaux lignages. La review de Kaiming Tao *et al.* dont est issu le **tableau 3**, montre clairement la capacité d'échappement de certains variants à différents AcM, notamment les variants β et γ, qui ne sont pas neutralisés par 3 des 4 AcM disponibles en France. De plus, en utilisant des virus modifiés, portant une mutation unique, des études ont également permis d'identifier les mutations conférant isolément une résistance, permettant de prédire, à partir de la séquence d'un variant, son statut de résistance vis-à-vis de différents AcM (L452R et BAM/ K417N et ETE). Toutes ces données sont nécessaires au bon usage de ces médicaments, pour savoir comment les associer, sur quels variants les utiliser, et donc mettre en place une stratégie d'utilisation qui maximise leur efficacité et minimise le risque de faire émerger des variants d'échappement.

Variant	BAM	ETE	BAM + ETE	CAS	IMD	CAS + IMD	SOT	REG	TIX	CIL
Alpha (B.1.1.7)	1_{12}	3.6_{9}	1.3_{3}	1_{14}	0.8_{15}	1_{8}	2.7_{12}[a]	1.4	1.5_{5}	0.7_{5}
Beta (B.1.351)	$>100_{9}$	$>100_{7}$	$>100_{4}$	59_{11}	0.8_{12}	1.2_{8}	1_{9}	27_{2}	4.9_{4}	0.7_{4}
Gamma (P.1)	$>100_{2}$	59_{2}	>100	$>100_{6}$	0.6_{6}	1_{4}	1_{6}	–	6.2_{2}	0.5_{2}
Delta (B.1.617.2)	$>100_{2}$	0.7_{2}	–	0.8_{2}	0.8_{2}	1	–	–	0.5	2.9
Kappa (B.1.617.1)	$>100_{2}$	0.6_{2}	5	4.6_{2}	1.3_{2}	1_{2}	0.7	–	0.7	5.1
Epsilon (B.1.427/9)	$>100_{2}$	3.3_{2}	7.7	1.3	2.1	1	0.8_{2}	14	–	–
N501Y	1_{3}	2.9_{7}	1	1_{9}	0.8_{9}	1_{3}	1.6_{5}[a]	–	1.1_{3}	1_{3}
E484K	$>100_{4}$	2.7_{6}	17	13_{12}	1_{12}	1.6_{6}	0.6_{5}	–	6.4_{4}	1.5_{4}
K417N	0.2_{2}	$>100_{5}$	1	8.9_{7}	0.9_{6}	0.8	0.6_{4}	–	0.3_{3}	0.6_{3}
L452R	$>100_{2}$	0.9_{4}	7.4	1.2_{4}	2_{4}	1.2_{3}	0.6	–	–	–
T478K	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
N439K	1.3	0.4_{3}	–	0.8_{4}	28_{5}	1.7	0.9_{3}	–	–	–
Y453F	1.8	1.4_{3}	–	74_{6}	1.6_{6}	3.5	1.1	–	–	–
F490S	$>100_{2}$	1.1_{2}	1	1_{2}	1.4_{2}	1	0.8_{2}	–	–	–
S494P	86_{2}	0.6_{2}	1	4.5_{3}	0.9_{2}	1.1	2_{2}	–	–	–

Tableau 3 : Facteur de réduction des taux de neutralisation de différents AcM envers différents variants ou différentes mutations d'après la Réf 45

ii - Molécules antivirales

L'utilisation de molécules antivirales visant à bloquer ou à interférer avec un moment précis du cycle cellulaire est une stratégie récente dans l'histoire de la lutte contre les maladies virales. Même si plus d'une centaine de molécules antivirales ont été développées depuis le premier antiviral l'idoxuridine en 1962[105], celles-ci ne ciblent que 9 espèces virales différentes, et sont pour la grande majorité destinées à lutter contre le VIH, les hépatites virales et les virus de la famille des *Herpesviridae*. Certaines molécules en développement ou commercialisées dans le traitement d'autres viroses ont néanmoins été étudiées quant à leur capacité à inhiber la réplication du SARS-CoV-2. Elles peuvent être classées en 3 catégories : les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de la RdRp.

a) Inhibiteurs d'entrée

Ces molécules agissent au niveau de la première étape du cycle viral en bloquant l'entrée ou la libération du virus (ou de son ARN) dans le cytoplasme.

1. Umifénovir

L'Umifénovir (Arbidol®) est la seule molécule de cette classe à avoir été étudiée. C'est un antiviral large spectre utilisé comme inhibiteur de fusion dans le traitement de la grippe en Chine et en Russie. Son action comme inhibiteur d'entrée a été démontrée *in vitro*[106], mais aucune étude publiée à ce jour ne supporte son utilisation en pratique clinique[107].

b) Inhibiteurs de protéases

Les protéases du SARS-CoV-2 (PL-pro ou 3CL-pro) jouent un rôle important dans le cycle viral car elles sont à l'origine du clivage des pp1A/pp1AB et de la libération des 16 nsp. En raison de la conservation importante des sites de clivage et de la structure des protéases, elles sont une cible intéressante dans la stratégie antivirale, d'autant plus qu'aucun analogue de ces protéines n'est connu chez l'Homme[108], suggérant que des inhibiteurs sélectifs de ces protéines ne devraient pas être à l'origine d'effets pharmacodynamiques indésirables.

1. Association Lopinavir/Ritonavir

L'association Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®), employée dans le traitement du VIH, a été utilisée au début de l'épidémie en se basant sur son utilisation empirique lors des l'épidémie de SARS et de MERS, en voulant mettre à profit leur activité inhibitrice de protéases malgré l'absence d'analogie entre la protéase du VIH et celle des *Coronaviridae*. Même si une certaine activité a été retrouvée *in vitro*[109], les résultats de l'essai SOLIDARITY ne montraient aucun effet de son usage chez les patients hospitalisés[110].

2. Inhibiteurs sélectifs de 3CLpro

D'autres inhibiteurs (**Fig.29**) sont en cours d'évaluation sur des bases pharmacologiques plus solides :

- PF07304814 : Cet inhibiteur de la 3CLpro est une prodrogue d'une molécule (PF-00834231) développée il y a plus de 15 ans contre le SARS-CoV-1. Ce dérivé phosphaté a montré une activité inhibitrice *in vitro* ainsi qu'une activité *in vivo* lors d'essais précliniques[111]. Malgré une faible solubilité, et donc, l'obligation d'une administration parentérale, le laboratoire Pfizer qui le développe a entrepris une étude de phase Ib/II, terminée en juin 2021 dont les résultats ne sont pas encore disponibles[112].

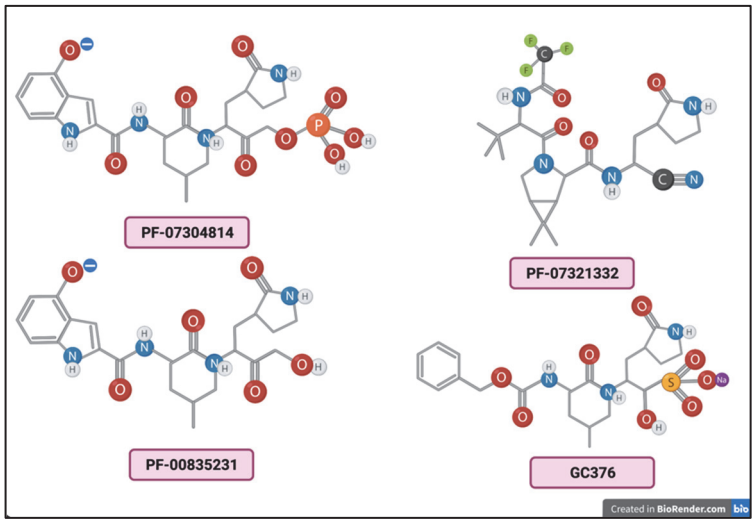


Figure 29 : Structure des inhibiteurs de 3CL-PRO les plus avancés

- PF-07321332 : Un autre inhibiteur de protéases également développé par Pfizer mais administrable par voie orale, est lui aussi avancé dans son développement. Les résultats des études *in vitro*, précliniques et de phase I (first in man) ont été publiés (en préprint) le 31/07/2021 : ils montrent une activité *in vitro* à l'encontre du SARS-CoV-2 et une réduction de la charge virale et des lésions histologiques *in vivo* dans un modèle murin[113]. Cette molécule est également entrée en essais de phase II, en association avec le Ritonavir, utilisé pour son activité de booster pharmacologique[114].
- GC376 : Cette molécule a été développée initialement comme médicament vétérinaire par le laboratoire Anivive, pour le traitement du coronavirus félin (F-CoV, genre α-coronavirus) à l'origine de la péritonite infectieuse féline (PIF). Elle possède une activité, au moins *in vitro*, sur 3 familles de virus différents : les *Coronaviridae* (H-CoV, F-CoV) les *Picornaviridae* (entérovirus, rhinovirus, virus de l'hépatite A) et les *Caliciviridae* (norovirus) qui possèdent tous des protéases de type 3CLpro[115]. Le GC376 a montré une capacité à bloquer la réplication du SARS-CoV-2 *in vitro*[116], et également une efficacité

in vivo, dans un modèle murin, montrant une amélioration de la survie dans ce modèle létal, une diminution de la charge virale et des lésions tissulaires[117,118]. Le laboratoire Anivive a soumis le GC376 à la FDA (Food and Drug Administration) afin de pouvoir envisager des essais chez l'homme.

c) Inhibiteurs de RdRp

Ces molécules ont la capacité d'interférer avec le cycle viral en inhibant la réplication de son matériel génétique. Elles sont également issues du repositionnement de molécules développées initialement pour lutter contre d'autres virus (Ebolavirus, SARS-CoV-1, MERS-CoV). Elles sont pour la quasi-totalité d'entre elles des analogues de nucléotides (**Fig.30**), et ont, par conséquent, un large spectre d'action.

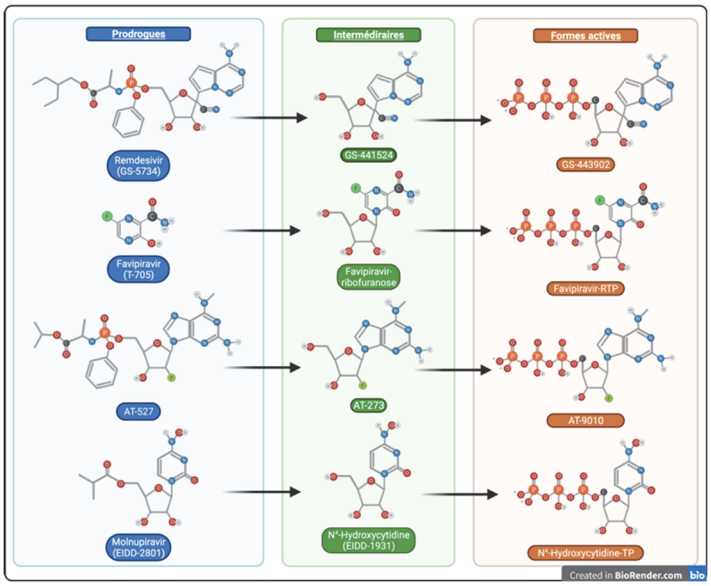


Figure 30 : Inhibiteurs de RdRp les plus étudiés.

1. Remdesivir

Le Remdesivir (GS-5734) est une molécule développée par le laboratoire Gilead science. Les premiers travaux sur cette molécules datent de 2015, lorsqu'elle montre une activité sur le virus Ebola, puis par la suite sur de nombreux autres virus à ARN (VRS, virus Junin, virus de Lassa, MERS-CoV)[119].C'est une prodrogue du GS-443902 (forme active triphosphorylé) qui est un analogue de l'adénosine. A la suite de l'apparition du SARS-CoV-2, des études ont montré une efficacité du Remdesivir *in vitro*[120], mais également *in vivo*, sur divers modèles de rongeurs et de primates non humains[121]. Suite à une première étude très préliminaire (pas de groupe contrôle) rapportant des résultats encourageants[122], la FDA puis l'EMA ont délivré une ATU au VEKLURY®. D'autres essais ayant des effectifs plus élevés ont été conduits, tel qu'ACTT-1 qui montrait une réduction du temps de guérison chez les patients traités mais pas d'incidence sur la mortalité[123], résultats confirmés par l'essai SOLIDARITY[110].

Dans les suites l'OMS s'est déclaré contre l'usage du Remdesivir dans le cadre de la $COVID_{19}$, l'essai DISCOVERY a annoncé stopper le bras Remdesivir et finalement l'ANSM a retiré l'ATU du Remdesivir en octobre 2020. Plusieurs dizaines d'études sont encore en cours pour l'évaluer, seul ou en association avec d'autres antiviraux.

2. AT-527

L'AT-527 est un inhibiteur de RdRp développé initialement dans le cadre du traitement de l'hépatite C avec une activité pangénotypique. Il présente l'avantage d'avoir déjà été utilisé chez l'homme avec un profil pharmacocinétique satisfaisant sans mise en évidence d'effets indésirables particuliers[124]. L'AT-527 a montré une activité inhibitrice sur le SARS-CoV-2 *in vitro,* mais aussi *ex vivo* sur un modèle d'épithélium de voie aérienne humaine[125] (HAE : human airway epithelial cells). Il n'existe pas encore à ce jour d'études publiées évaluant l'activité *in vivo* de l'AT-527, mais des études de phases II et III sont en cours pour évaluer son efficacité dans le cadre du traitement de la $COVID_{19}$, chez des patients ambulatoires[126] mais aussi hospitalisés[127].

3. β-D-N4-Hydroxycytidine et sa prodrogue le molnupiravir

La β-D-N^4-hydroxycytidine (EIDD-1931) a été découverte au début des années 1970 en montrant une capacité à induire une mutagénèse chez des bacteries[128]. Dans les années 2000, des études mettent en évidence son activité antivirale, tout d'abord sur les *Flaviviridae*[129], puis sur certains membres des *Coronaviridae* , (HCoV-NL63[130],SARS-CoV-1[131]) et sur de nombreux autres virus à ARN (Grippe, VRS[132], Norovirus[133], Encéphalite Équine Vénézuélienne[134], Entérovirus[135], Chikungunya[136], Ebolavirus[137]). Mais cette molécule, ayant un profil pharmacocinétique défavorable notamment à cause d'une faible biodisponibilité par voie orale, elle a par la suite été modifiée par ajout d'un groupement isopropyl donnant l'EIDD-2801, ou molnupiravir[138,139]. L'EIDD-2801, et plus particulièrement sa forme active, l'EIDD-1931, agit en introduisant des mutations lors de la réplication du virus, aboutissant à la mutagénèse létale (Cf. III-3). De plus son action n'est pas impactée par la présence d'une activité 3'-5' exonucléase lors de l'utilisation sur les *Coronaviridae*[140]. Concernant le SARS-CoV-2, en plus d'avoir montré une activité *in vitro* et *ex-vivo,* le molnupiravir a démontré une activité antivirale dans un modèle hamster d'infection par le SARS-COV-2[141].Les essais cliniques de phases I[142] et II[143] ont été terminés en février 2021, et les essais de phases III sont toujours en cours.

d) Autres molécules

Cette partie s'intéresse aux molécules repositionnées n'appartenant pas aux antiviraux et exclut donc les molécules présentées précédemment.

Dès le début de l'épidémie, devant l'absence d'antiviraux disponibles et l'urgence sanitaire, la communauté scientifique s'est tournée vers le repositionnement de molécules déjà commercialisées afin de court-circuiter le long processus de développement des médicaments. Les premières études de criblages sur des banques de molécules précédemment autorisées ont rapidement permis de mettre en évidences des molécules ayant une activité in vitro sur le SARS-CoV-2[144,145]. Les molécules suivantes ont toutes démontrées une activité *in vitro* sur le SARS-CoV-2 :

- Azithromycine[144] : antibiotique de la classe des macrolides.
- Camostat[30] : commercialisé au Japon pour le traitement des pancréatites chroniques
- Chlorpromazine[144] : neuroleptique indiqué dans le traitement des états psychotiques
- Hydroxychloroquine[144] : immunomodulateur indiqué dans le traitement de plusieurs maladies auto-immunes.
- Imatinib[146] : inhibiteur de tyrosine-kinase indiqué dans le traitement d'hémopathies malignes.
- Ivermectine[147] : antiparasitaire indiqué dans le traitement des filarioses et de la gale.
- Mirtazapine[144] : antagoniste α2 présynaptique d'action centrale indiqué dans le traitement des épisodes dépressifs majeurs.
- Nitazoxanide[148] : disponible en ATU nominative en France pour le traitement de diverses parasitoses
- Oméprazole[144] : inhibiteur de la pompe à protons indiqué dans le traitement et la prévention des ulcères gastroduodénaux.
- Ondansétron[144] : antagoniste des récepteurs $5HT_3$ indiqué dans la prévention et le traitement des nausées et vomissements aigus induits par les chimiothérapies.
- Teicoplanine[149] : antibiotique de la classe des glycopeptides.

La figure ci-dessous (**Fig.31**), d'après Valle *et al.*[150] expose les principales molécules identifiées par ce moyen et leur mécanisme d'action supposé ou démontré.

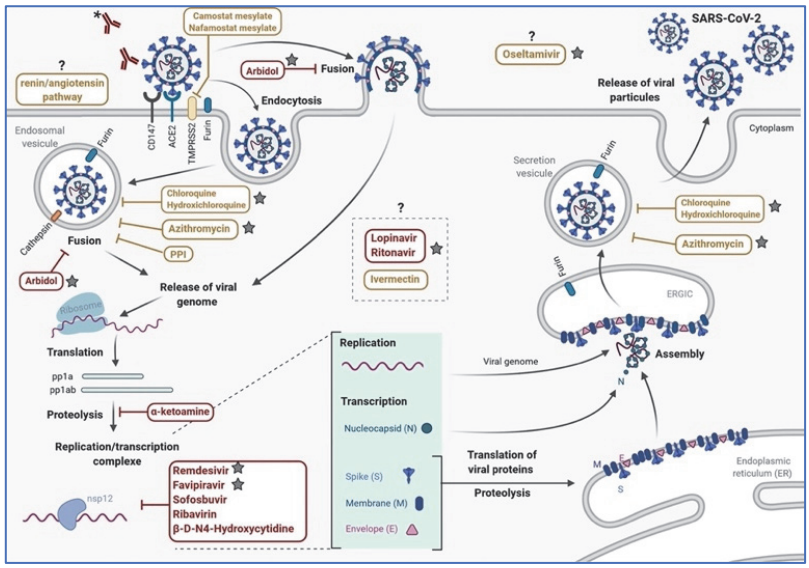


Figure 31 : Cycle du SRAS-CoV-2 et mécanismes d'action potentiels des thérapies actuellement évaluées, d'après la Réf.150

L'efficacité *in vitro* de ces molécules, démontrée en général sur une, voire deux lignées cellulaires, est malheureusement rarement synonyme d'efficacité *in vivo,* et la plupart des molécules identifiées par screening ont été décevantes lors d'investigation plus poussées. Cela s'explique par le fait que les mécanismes d'actions supposés ou démontrés de ces molécules sur le cycle viral, peuvent être mis en défaut *in vitro*, par exemple sur d'autres lignées cellulaires, *ex vivo* comme sur des épithéliums reconstitués ou *in vivo,* dans des modèles animaux ou dans des essais de phases I par des différents facteurs :

- Existence de mécanismes moléculaires alternatifs
- Absence de la cible dans les cellules hôtes.
- Impossibilité pharmacocinétique d'obtenir une concentration efficace au niveau du site d'action (biodisponibilité, diffusion tissulaire, enzymes de dégradation)

Récemment, un travail d'une équipe américaine a mis en évidence que la plupart des molécules ayant montré une activité *in vitro*, sont des molécules cationiques amphiphiles (chloroquine, hydroxychloroquine, chlorpromazine…). Cette propriété leurs confère la capacité d'induire dans les cellules un phénomène appelé phospholipidose, qui perturbe les membranes lipidiques intracellulaires, troublant ainsi le cycle viral. La phospholipidose influe sur la réplication du virus *in vitro* mais ce phénomène n'a pas été retrouvé *in vivo* aux doses utilisées, et les molécules n'ont pas montré d'efficacité sur la réplication virale dans un modèle murin[151]. Ceci montre l'importance de l'évaluation préclinique des molécules ayant précédemment montré une activité antivirale *in vitro*. Ces découvertes mettent donc en avant l'importance d'une stratégie robuste d'évaluation de l'efficacité des antiviraux, basée non seulement sur le screening *in vitro*,

mais raffinée par la suite en utilisant tous les moyens disponibles (lignées cellulaires alternatives pertinentes, expérimentations *ex-vivo* sur épithéliums reconstitués), et enfin confortée par la réalisation d'expérimentations animales, avec des critères de jugement objectifs (réduction de la charge virale, réduction de l'infectivité, amélioration de l'état clinique) avant d'engager la réalisation d'essais chez l'être humain, coûteuse et longue.

II - GENERALITES SUR LE FAVIPIRAVIR

A- Introduction

Le Favipiravir (ou T-705) est un antiviral développé initialement pour son action contre le virus de la grippe. Il est commercialisé au Japon sous le nom de marque Avigan® et a par la suite montré une activité antivirale sur de nombreux autres virus à ARN[152] d'où l'intérêt porté à cette molécule dans la recherche de traitements ciblant les pathologies émergentes virales.

B- Structure

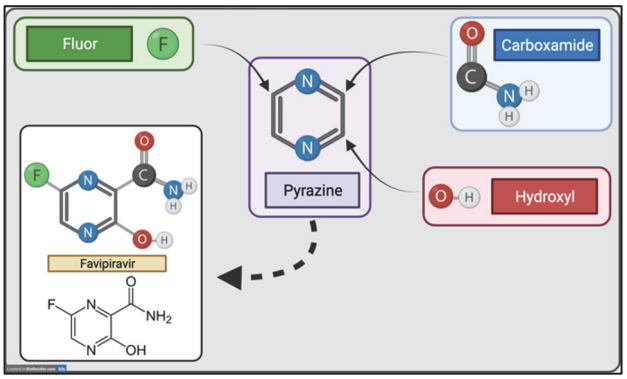


Figure 32 : Structure du favipiravir

C'est une molécule dérivée de la pyrazine, substituée en C1 par un groupement carboxamide, une fonction hydroxyle en C2 et un atome de fluor en C5 : 5-Fluoro-2-oxo-1H-pyrazine-3-carboxamide. **(Fig.32)**

La liaison carboxamide est libre, et sa rotation permet au Favipiravir d'être un analogue à la fois de l'adénine et de la guanine, le classant donc dans les analogues des bases puriques. **(Fig.33)**

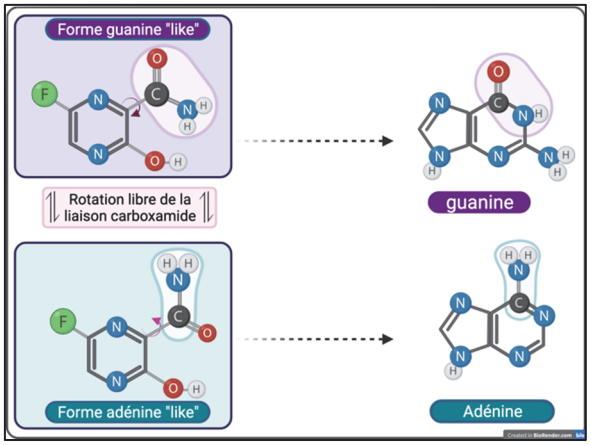


Figure 33 : Isomérie de rotation de la liaison carboxamide

C- Métabolisme intracellulaire et mécanisme d'action

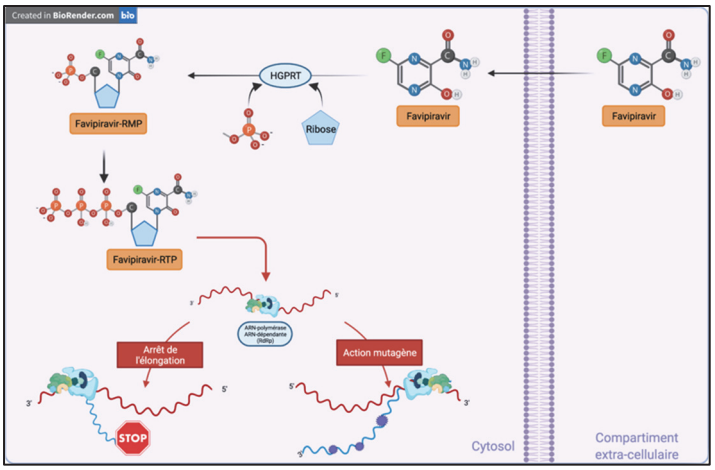


Figure 34 : Métabolisme et mécanisme d'action du favipiravir

Le Favipiravir est une prodrogue, qui doit, pour être actif, subir un métabolisme intracellulaire en favipiravir-ribose-5'monophosphate (F-RMP) par l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT)[153], puis en favipiravir-ribose-5'triphosphate (F-RTP) sous l'action de kinases cellulaires[154].**(Fig.34)**

Le mécanisme d'action a principalement été étudié sur le virus de la grippe, virus pour lequel il a été développé à l'origine. Une fois sous forme active (F-RTP), le favipiravir agit comme un analogue nucléosidique, plus précisément comme un analogue des bases puriques. Il est ensuite incorporé à l'ARN naissant, à la place d'une adénosine ou d'une guanosine. Une fois incorporé à l'ARN il peut avoir deux actions sur la réplication virale.

- Une action terminateur de chaîne : cette action ne semble pas être le principal mécanisme à l'origine de son activité car elle est en réalité assez rare. Elle se produit lors de deux incorporations successives de favipiravir dans l'ARN naissant[155].
- Une action mutagène : à la suite de l'incorporation d'une seule molécule de favipiravir dans la séquence, la réplication peut continuer et se terminer sans action délétère. En revanche, lorsque ce brin sera à son tour répliqué, le favipiravir pourra introduire dans la séquence une erreur de type transition[156](G→A ;C→U ;U→C ;A→G)(**Fig.35**). L'accumulation des mutations est à l'origine d'une mutagénèse létale.

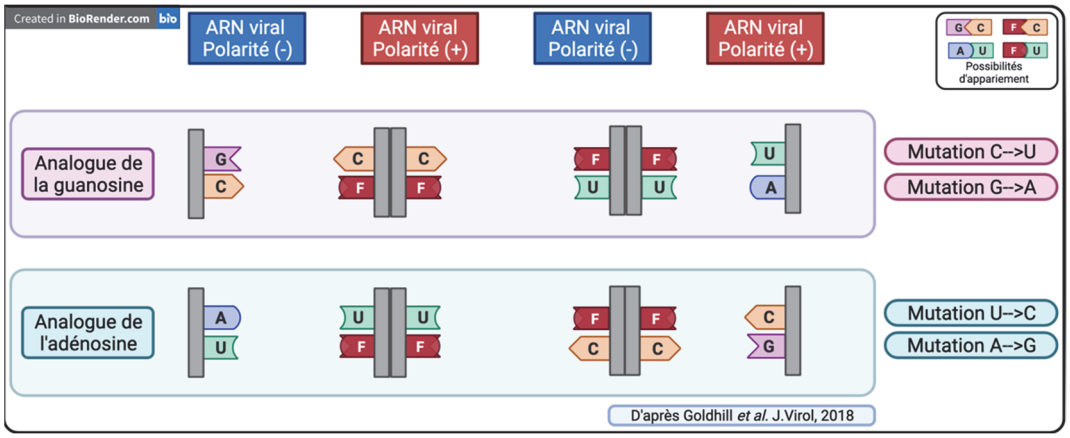


Figure 35 : Représentation schématique des mutations induites par le favipiravir lors de la synthèse des brins positifs et négatifs d'ARN, d'après la Réf.156

Les virus à ARN se répliquent sous forme de distributions complexes de génomes variants non identiques mais étroitement apparentés, appelés quasi-espèces virales. Lorsque le taux d'erreur au cours de la réplication du génome dépasse une valeur seuil, l'information génétique ne peut pas être conservée et le système entre en erreur catastrophe. Le dépassement de ce seuil d'erreur entraîne l'extinction du virus : c'est la mutagénèse létale[157], conduisant à une perte d'infectivité du virus et *in fine* à une incapacité à se répliquer.

Il est à noter que le favipiravir n'exerce aucune activité sur les ADN polymérases humaines α, β et γ pour des concentrations jusqu'à 1000 µM, et une légère activité sur l'ARN polymérase II pour des concentrations supérieures 905 µM[158], limitant le risque d'apparition d'effets pharmacologiques non souhaités et donc d'effets indésirables.

D- Spectre

Bien qu'il ait été développé et approuvé initialement pour le traitement de la grippe, des études ont, par la suite, mis en évidence une activité sur un nombre important de virus à ARN, révélant un large spectre d'action antivirale.

1 - In vitro

Le favipiravir possède une activité *in vitr*o sur de nombreux virus à ARN. Dans une review de 2017, Furuta *et al.*[158] ont répertorié une activité *in vitro* du favipiravir (**Tableau 4**) sur 10 familles de virus à ARN avec des EC_{50} variant de 0.01 à 53 µg/mL :

- Virus à polarité positive :
  - *Orthmyxoviridae* (virus de la grippe)
  - Des familles comprenant des virus de fièvres hémorragique virales
    - ✓ *Bunyaviridae* (Rift valley fever, Crimean-Congo haemorrhagic fever)
    - ✓ *Arenaviridae* (Lassa virus)
    - ✓ *Filoviridae* (genre *Ebolavirus*)
  - *Rhabdoviridae* : virus de la rage
  - *Paramyxoviridae* : virus respiratoire syncytial et métapneumovirus
  - *Coronaviridae*
- Virus polarité négative
  - Des familles comprenant des arbovirus
    - ✓ *Flaviviridae* (virus West-Nile, fièvre jaune, virus Zika)
    - ✓ *Togaviridae* (Chikungunya, Mayarovirus)
  - *Picornaviridae* (Genre *Enterovirus* : Entérovirus, polio)
  - *Caliciviridae* (Norovirus)

De récentes études ont testé la capacité inhibitrice du favipiravir sur le SARS-CoV-2 et ont montré une EC_{50} allant de 10 à 78µg/mL[19,148,159].

Tableau 4 : Activité in vitro du favipiravir, d'après la Réf.158

Table 1. *In vitro* anti-viral activities of favipiravir

Group	Family	Virus	EC_{50} (µg/mL)	Reference
RNA (−) strand	Orthomyxoviridae	Influenza A (seasonal)	0.01–0.94	Furuta, Y. *et al.* 2002[21] Sleeman, K. *et al.* 2010[22]
		Influenza A (H5N1)	0.2–1.9	Sidwell, R.W. *et al.* 2007[25] Sleeman, K. *et al.* 2010[22]
		Influenza A (H1N1)pdm09	0.13–3.53	Sleeman, K. *et al.* 2010[22]
		Influenza A (H7N9)	1.4	Watanabe, T. *et al.* 2013[61]
		Influenza B	0.04–0.8	Furuta, Y. *et al.* 2002[21] Sleeman, K. *et al.* 2010[22]
		Influenza C	0.03–0.06	Furuta, Y. *et al.* 2002[21]
	Bunyaviridae	La Crosse	5	Gowen, B.B. *et al.* 2007[29]
		Punta Toro	8.6–30	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34]
		Rift Valley fever	4.2–5.0	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34]
		Sandfly fever	4.7–18	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34]
		Dobrava	15	Buys, K.K. *et al.* 2011[35]
		Maporal	10	Buys, K.K. *et al.* 2011[35]
		Crimean-Congo hemorrhagic fever	1.1	Oestereich, L. *et al.* 2014[36]
		Prospect Hill	10	Buys, K.K. *et al.* 2011[35]
		Severe fever thrombocytopenia syndrome	0.71–1.3	Tani, H. *et al.* 2016[41]
	Arenaviridae	Junin	0.8–3.0	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34] Mendenhall, M. *et al.* 2011[31]
		Pichinde	0.9–3.9	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34]
		Tacaribe	0.9–4.1	Gowen, B.B. *et al.* 2007, 2010[29,34]
		Guanarito	2.4	Mendenhall, M. *et al.* 2011[31]
		Machupo	2.2	Mendenhall, M. *et al.* 2011[31]
		Lassa	1.7–11.1 (EC_{90})	Safronetz, D. *et al.* 2015[32] Oestereich, L. *et al.* 2016[33]
	Filoviridae	Ebola	10.5	Oestereich, L. *et al.* 2014[53] Smither, S.J. *et al.* 2014[54]
	Rhabdoviridae	Rabies	5.1–7.0	Yamada, K. *et al.* 2016[58]
	Paramyxoviridae	Human metapneumovirus	1.3–6.3 (EC_{90})	Jochmans, D. *et al.* 2016[60]
		Respiratory syncytial virus	41	Furuta, Y. *et al.* 2002[21]
RNA (+) strand	Flaviviridae	West Nile	53	Morrey, J.D. *et al.* 2008[44]
		Yellow fever	42	Julander, J.G. *et al.* 2009[43]
		Zika virus	3.5–3.8	Zmurko J. *et al.* 2016[45]
	Togaviridae	Western equine encephalitis	1.2, 49 (EC_{90})	Delang, L. *et al.* 2014[47] Julander, J.G. *et al.* 2009[46]
		Venezuelan equine encephalitis	1.7	Delang, L. *et al.* 2014[47]
		Eastern equine encephalitis	2.8	Delang, L. *et al.* 2014[47]
		Barmah forest	2.8	Delang, L. *et al.* 2014[47]
		Ross river	0.5	Delang, L. *et al.* 2014[47]
		Mayaro	2.5	Delang, L. et.al. 2014[47]
		Chikungunya	0.3–9.4	Delang, L. *et al.* 2014[47]
	Picornaviridae	Polio	4.8	Furuta, Y. *et al.* 2002[21]
		Rhino	23	Furuta, Y. *et al.* 2002[21]
		Enterovirus 71	23	Wang, Y. *et al.* 2016[50]
	Caliciviridae	Noro	19–39	Rocha-pereira, J. *et al.* 2012[51]

2 - In vivo

Des études *in vivo* confirment l'activité antivirale retrouvée *in vitro* sur 8 des 10 familles. Le **tableau 5** reprend les différentes études publiées évaluant le favipiravir *in vivo.* Ces études mettent en évidence une activité *in vivo* aussi bien sur des paramètres purement virologiques : diminution/suppression de la charge virale, baisse de l'infectivité, que sur des paramètres très concrets comme une diminution voire une disparition de la mortalité secondaire à l'infection. Elles portent pour la plupart sur des modèles de petits rongeurs (souris, hamsters, cochon d'Inde et rats), mais également sur des modèles de primates non humains, pour des virus ayant un taux de létalité élevé comme les *Filoviridae*[160] (EBOV, MARV), les *Bunyaviridae*[161] (CCHFV) ou les *Arenaviridae*[162] (LASV). Avant 2019, il n'existait pas d'études évaluant le favipiravir *in vivo* sur les coronavirus, à ce jour (12/06/2020) il n'existe que deux articles publiés évaluant l'activité du favipiravir dans un modèle animal[163,164].

Tableau 5 : Activité in vivo du favipiravir

Group	Family	Virus	Animal	Results	Reference
RNA (-) Strand	*Filoviridae*	Ebolavirus Marburg virus	Macaques	-Increased time-to-death, reductions in viremia in EboV survival significantly improved for MARV infected NHPs	Bixler *et al.* 2017[165]
				-Delays time to death in EBOV infected macaques and increases survivorship in MARV infected macaques T-705 reduces viremia in EBOV and MARV infected macaques -T-705 treatment is associated with increased diversity in EBOV viral populations due to the increase of minority variants	Espy *et al.* 2019[160]
		Ebola virus	Mice	-Full protection in mice	Bixler *et al.* 2017[166]
	Bunyaviridae	Punta Toro phlebovirus	Mice	-Complete protection against a highly lethal PTV challenge dose	Gowen *et al.* 2007[167]
		Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus	Mice	-Oral administration of T-705 completely protected mice from lethal infection reduced viral load in blood and tissues	Tani *et al.* 2015[168]
		Crimean-Congo haemorrhagic Fever	Mice	-Animals treated with T-705 survived, showed no signs of disease, and had no virus in blood and organs	Oestereich *et al.* 2014[169]
			Macaques	-Suppressed viremia and viral shedding when treatment was initiated 24 h post-infection	Hawman *et al.* 2020[161]
		Rift valley fever	Rats	-92% survival with no significant weight loss or fever	Caroline *et al.* 2014[170]
	Paramyxoviridae	Nipah virus	Syrian hamster	-Full protection of animals challenged with a lethal dose of Nipah virus	Dawes *et al.* 2018[171]
		Human metapneumovirus	Syrian hamster	-Decreased infectious virus titers in samples from treated animals	Jochmans *et al.* 2016[172]
	Orthomyxoviridae	Influenza A virus	Mice	-Completely prevented the death of mice survival rates of mice were significantly higher when mice were treated with favipiravir than in mice treated with oseltamivir	Takahashi *et al.* 2003[173]
		Influenza virus B/Memphis/20/96 oseltamivir-resistant variant B/Memphis/20/96(R152K)	Mice	-Protected mice from lethal challenge significantly decreased viral loads in mice infected significantly reduced lung lesions in mice -The emergence of resistant mutants was not observed	Fang *et al.* 2020[174]
		Bourbon virus	Mice	-As a prophylaxis or as post-exposure therapy three days after infection prevented BRBV-STL-induced mortality in mice.	Bricker *et al.* 2019[175]
	Arenaviridae	Argentinian mamarenavirus (Junín virus)	Guinea pig	-78% survival -Undetectable levels of serum and tissue viral titers and prevented the prominent thrombocytopenia and leucopenia observed in placebo-treated animals	Gowen *et al.* 2013[176]
		Pinchindé virus	Guinea pig	-Highly effective, animals recovered fully from PICV induced disease even when therapy was initiated one week after virus challenge when animals were already significantly ill.	Mendenhall *et al.* 2011[177]
		Lassa mamarenavirus	Macaques	-All favipiravir-treated animals survived LASV challenge No infectious LASV isolated from blood or post-mortem tissue samples from animals in the favipiravir group.	Rosenke *et al.* 2018[162]
	Rhabdoviridae	Rabies	Mice	-T-705 treatment delayed the onset of clinical signs reduced the number of mice that developed clinical signs	Banyard *et al.* 2017[178]
				-Early treatment at 300mg/kg (1 h after inoculation): suppressed viral replication at the inoculation site and the replication in the CNS. Delay treatment (up to 2 days after inoculation) at higher doses (600 or 900 mg/kg/day) suppress viral replication in the CNS	Yamada *et al.* 2019[179]
RNA (+) Strand	*Flaviviridae*	Usutu virus	Mice	-Treatment of mice with favipiravir significantly reduced viral load in blood and tissues and significantly delayed virus-induced disease	Seguera Gurerrero et *al.* 2018[180]
		Yellow fever virus	Syrian hamster	-Significant improvements in survival and disease parameters	Julander *et al.* 2009[181]
	Caliciviridae	Murine norovirus	Mice	-Increased mutation and reduced infectivity -Lower or in some cases undetectable levels of infectious virus in faeces and tissues.	Arias et *al.* 2014[182]

E- Études cliniques

1 - Sur les virus grippaux

Il existe de nombreuses études cliniques portant sur le Favipiravir avec des posologies variables pour le traitement des infections aiguës et non compliquées par les virus grippaux car c'est initialement dans cette indication qu'il a été développé. Des essais de phases II et III aux USA ont montré une accélération de la clairance virale et de l'amélioration clinique chez les patients traités par favipiravir comparées à ceux traité par placebo[183,184]. Il a aussi été montré, en étudiant la sensibilité de souches cliniques au favipiravir, avant et après traitement, que le ce dernier ne provoquait pas l'émergence de souche résistante[185].

2 - Sur le virus Ebola

Entre décembre 2013 et mars 2016, 28 616 cas confirmés, probables et suspects de maladie à virus Ebola ont été notifiés en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone, dont 11 310 décès[186]. Cette épidémie a donné lieu à plusieurs essais thérapeutiques impliquant le favipiravir

- Série de cas rétrospective de Bai *et al. :* 39 patients traités Vs. 85 contrôles[187]
  - Survie globale améliorée par rapport au groupe contrôle (56% vs 35%)
  - Amélioration de la survie (47 jours Vs 29 jours)
  - Diminution de la charge virale d'un facteur 100 chez 53% Vs. 16% des patients
- Essai JIKI de Sissoko *et al*. sur 111 patients (un seul bras, non randomisé)[188]
  - Bonne tolérance au favipiravir
  - Réduction de la charge virale chez les survivants
  - Réduction de la mortalité chez les patients avec une charge virale faible (<20Ct)
  - Pas de signaux de toxicité
- Étude rétrospective de Kerber *et al.* sur 163 patients[189]
  - Taux de létalité plus bas chez les patients traités (43% Vs. 58%)
  - Amélioration de la survie

Ces études, bien que comportant des limites (petits effectifs, absence de groupe contrôle), tendent à montrer que le favipiravir améliore la survie et diminue la charge virale chez les patients.

F- Pharmacocinétique

Le favipiravir a l'intérêt de pouvoir être administré par voie orale avec une bonne biodisponibilité (>95%). Sa pharmacocinétique est complexe et non linéaire, temps et dose dépendante. Il est à la fois substrat et inhibiteur de l'aldéhyde oxydase (AO), ce qui nécessite l'administration d'une dose de charge en début de traitement. Après une dose orale de favipiravir, la concentration plasmatique atteint son maximum (C_{max}) en 2 heures et décroît rapidement avec une demi-vie de 2 à 5 heures[190]. La liaison aux protéines plasmatiques est de 54%[191]. Des études précliniques de distribution réalisées chez le singe montre une diffusion tissulaire importante , avec notamment un ratio plasma/poumon (organe cible dans le traitement des infections par des virus à tropisme pulmonaire) à 0,5 à $T_{30minutes}$[192]. Il est métabolisé au niveau hépatique, principalement par l'AO, et de manière marginale par la xanthine oxydase (XO), pour donner un métabolite hydroxylé inactif le T705-M, par la suite excrété par voie urinaire.

G- Tolérance et effets indésirables

A la posologie utilisée pour le traitement de la grippe (dose de charge de 1600mg/12h les premières 24h, puis 600mg/12h les jours suivants), les principaux effets indésirables rapportés sont des diarrhées légères à modérées, une élévation des taux d'acide urique et des transaminases et une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles[190]. Les études précliniques ont également mis en évidence des propriétés tératogènes, contre-indiquant ainsi son usage chez les femmes enceintes ou en âge de procréer en absence de contraception efficace[192]. En 2020, V. Pilkington *et al.* ont conduit une revue de la littérature concernant les effets indésirables du favipiravir concluant à un profil de sécurité favorable, en insistant néanmoins sur les risques d'hyperuricémie et d'allongement de l'intervalle QT[193]. Enfin, une étude récente de R.J. Kaur *et al* répertoriant les événements indésirables médicamenteux signalés dans la base de données de pharmacovigilance de l'OMS lors de l'utilisation du favipiravir dans le cadre de la $COVID_{19}$, ne montrait pas d'effets indésirables spécifiques à cette indication, concordant avec ceux précédemment rapportés : élévation des enzymes hépatiques, nausées et vomissements et tachycardie, incitant à monitorer ces paramètres chez les patients traités par favipiravir[194].

III - MATERIELS ET METHODES

A- Modèle animal et infection

Les expériences in vivo ont été approuvées par le comité d'éthique local (C2EA—14) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS#23975) et réalisées conformément aux directives nationales françaises et la législation européenne concernant l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques. Toutes les expériences ont été menées dans le laboratoire BSL 3.

Cette étape a été réalisée par l'équipe chargée de l'expérimentation animale de l'unité

Le hamster doré (Mesocricetus auratus) est un bon modèle pour l'étude du SARS-CoV-2 *in vivo*, en effet, même si l'infection n'est pas létale, après une infection par voie intranasale, le virus se réplique activement au niveau des voies respiratoires.

Pour cette étude, 3 groupes de 4 hamsters ont été utilisés. Le traitement a été initié le jour de l'infection (thérapie antivirale préemptive) et s'est terminé à 2 jours post-infection (dpi). Tous les animaux ont été infectés à J_0 par voie intranasale avec une dose de 10^6 $TCID_{50}$ de SARS-CoV-2 et ont été traités par voie intrapéritonéale 3 fois par jour jusqu'à J_2

- Soit avec une solution saline (NaCl 0,9%)
- Soit avec du favipiravir (25 ou 50 mg/mL)
    - Pour des doses journalières de 37,5 et 75mg/J.

A J_3 post infection, les animaux ont été sacrifiés, pour chaque animal, un lobe pulmonaire à été récupéré, broyé et centrifugé afin d'obtenir 12 homogénats de poumon clarifiés sur lesquels les essais ont été conduits. **(Fig.36)**

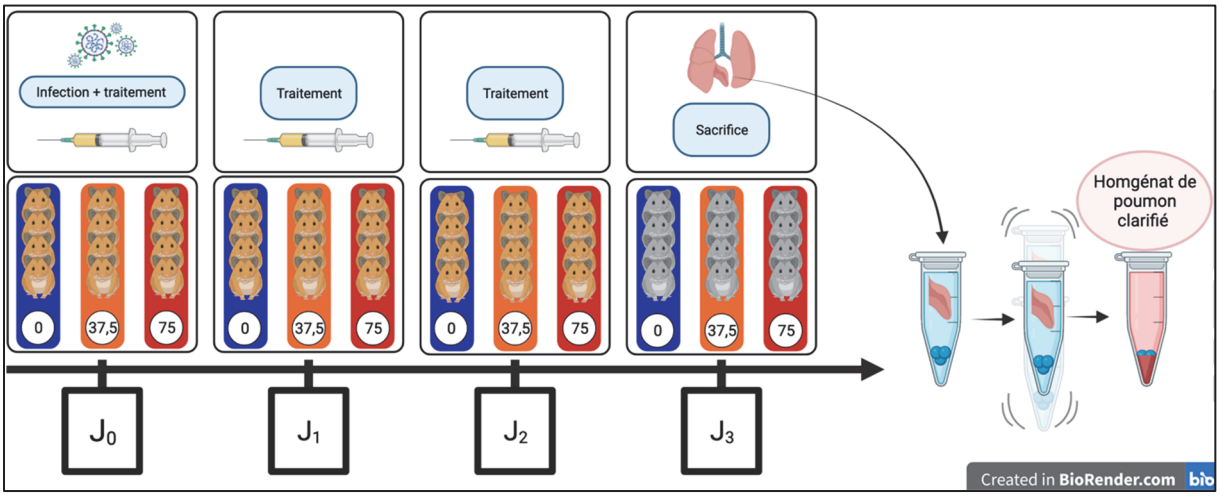


Figure 36 : Représentation de la chronologie de l'expérimentation

B- Charge virale et infectivité

Cette étape a été réalisée par l'équipe chargée de l'expérimentation animale de l'unité.

Pour déterminer l'effet du traitement par favipiravir sur la réplication, les homogénats de poumon ont été analysés par deux techniques (**Fig.37**) :

- La RT-qPCR qui mesure la quantité totale d'ARN viral dans l'échantillon.
- La détermination de la $TCID_{50}$ qui mesure la quantité de particules infectieuses.

1 - RT-qPCR

Les échantillons, après surcharge en bactériophage MS2, ont été extraits en automate Qiacube (Qiagen). Les extraits ainsi obtenus ont par la suite été utilisés pour les réactions de PCR :

-Une RT-PCR quantitative dirigée contre le gène de la RdRp du Sars-Cov-2 permettant d'obtenir la quantité de copies de génome viral dans chaque échantillon.

-Une PCR quantitative dirigée contre le gène de la γ-actine du hamster syrien, permettant d'obtenir le nombre de copies de γ-actine dans chaque échantillon, servant à normaliser les autres paramètres entre les différents échantillons.

-Une RT-PCR dirigée contre le bactériophage MS2 permettant de garantir la validité de l'extraction d'ARN[195]

2 - TCID50

Pour déterminer les titres infectieux, des plaques de culture 96 puits contenant des cellules VeroE6 confluentes ont été inoculées avec 150 µL par puits de dilutions en série de chaque échantillon (dilutions au quart). Les plaques ont été incubées en étuve. A $_{J4,}$ chaque plaque a été analysée pour détecter l'absence ou la présence d'effets cytopathogène (ECP) dans chaque puits. Les titres infectieux ont été estimés à l'aide de la méthode décrite par Reed & Muench[196].

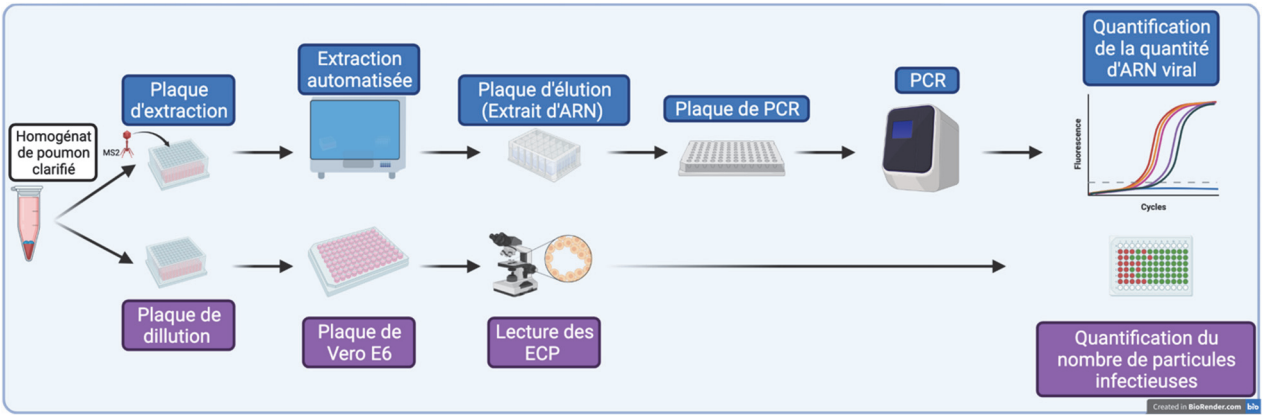


Figure 37 : Représentation du Protocol expérimental pour la quantification virale (Charge virale et titre infectieux)

3 - Résultats

Lorsque l'analyse de la réplication du virus dans les homogénats clarifiés pulmonaires était basée sur les titres infectieux (mesurés en $TCID_{50}$), une relation inverse était observée entre les titres infectieux et la dose de favipiravir. Les titres infectieux moyens pour les groupes d'animaux traités avec 75 mg / jour TID étaient significativement inférieurs à ceux observés avec les groupes non traités ($p \leq 0,0001$). Lorsque l'analyse de la réplication du virus dans les homogénats clarifiés pulmonaires était basée sur la quantité d'ARN viral (mesurés par qRT-PCR), des différences significatives avec le groupe d'animaux non traités ont été observées uniquement avec la dose la plus élevée de Favipiravir (p=0,0036). L'étude de l'infectivité des particules virales (c'est-à-dire le rapport du nombre de particules infectieuses sur la quantité d'ARN viral) montrait une diminution de l'infectivité dans tous les groupes traités (**Fig.38**). Ces différences étaient toujours significatives avec la dose la plus élevée de favipiravir (p =0,0105).

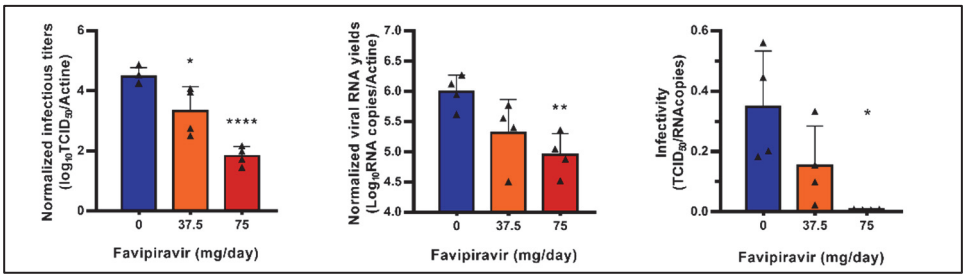


Figure 38 : Données relatives au titre infectieux, la quantité d'ARN et l'infectivité.

C- Mise au point d'une technique d'amplification du génome

Afin d'étudier l'effet du Favipiravir sur le génome du SARS-CoV-2, il était nécessaire de pouvoir amplifier l'intégralité du génome avant l'adressage à la plateforme de NGS. En effet, la quantité d'ARN disponible issue des prélèvements sur les animaux est grandement inférieure à celle que l'on peut obtenir à partir de surnageants de culture virale. Il aurait été envisageable de cultiver le virus sur cellules afin d'obtenir un surnageant enrichi en ARN mais, cela aurait eu trois inconvénients. D'une part, la mise en culture et les passages répétés sur cellules sont accompagnés d'une évolution naturelle du génome viral, les mutations observées n'auraient pas pu être imputées à l'action du Favipiravir. D'autre part la réduction de l'infectivité mise en évidence par une diminution dose dépendante de la $TCID_{50}$, aurait pu poser des difficultés pour la mise en culture des prélèvements. Enfin, s'affranchir de l'étape de mise en culture permet d'améliorer la rapidité de rendu de résultats. Une amplification en deux temps grâce à une transcription inverse suivie par une PCR (Two-step RT-PCR) et une RT-PCR en un temps (One-step RT-PCR) ont donc été testées.

1 - Extraction

200 µL d'homogénat clarifié de poumon ou de surnageant de culture cellulaire (stock de virus) ont été inactivés avec un volume de 200µL de tampon de lyse VXL (Qiagen) et l'ARN viral a été extrait à l'aide d'un robot EZ1 Advanced XL avec le kit EZ1 mini virus 2.0 (tous deux de Qiagen). L'élution était réalisée dans 60µL. (**Fig.39**)

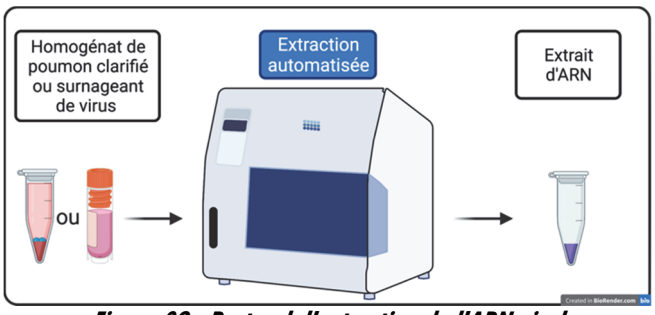


Figure 39 : Protocol d'extraction de l'ARN viral

2 - Conception des amorces

Nous avons conçu des amorces chevauchantes d'environ 2500 paires de base (**Fig.40**) qui permettaient une amplification du génome complet en effectuant 13 réactions de PCR. Les températures de fusion (Tm) des amorces étant proches les unes des autres (**Tableau 6**), cela permet de réaliser les 13 réactions avec le même programme de PCR.

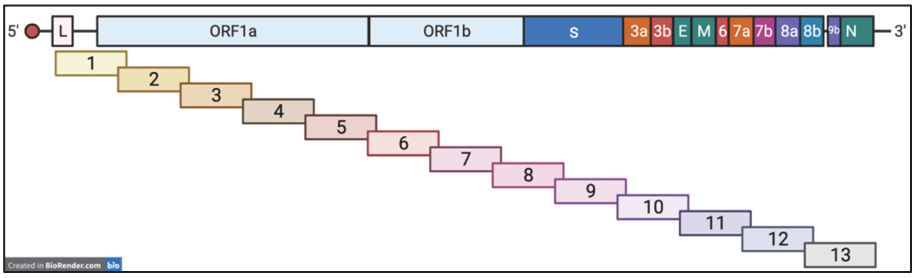


Figure 40 : Répartition des amorces le long du génome du SARS-CoV-2

Tableau 6 : Amorces utilisées pour l'amplification du génome du SARS-CoV-2

Name	Primer Sequence	Start	End	Tm	GC%
1Forward	ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT	31	54	60.69	41.67
1Reverse	TTTCGAGCAACATAAGCCCGTT	2621	2642	61.13	45.45
2Forward	AACAACCTACTAGTGAAGCTGTTGA	2565	25989	60.16	40.00
2Reverse	TTGACATGTCCACAACTTGCGT	5006	5027	61.26	45.45
3Forward	CTTCTTTCTTTGAGAGAAGTGAGGACT	4940	4966	60.69	40.74
3Reverse	TGCCAAAAACCACTCTGCAACT	7234	7255	61.47	45.45
4Forward	GTGGTTTAGATTCTTTAGACACCTATCCT	7143	7171	60.59	37.93
4Reverse	AGGTGTGAACATAACCATCCACTG	9644	9667	60.81	45.83
5Forward	ACTCATTCTTACCTGGTGTTTATTCTGT	9558	9585	60.69	35.71
5Reverse	CTGGACACATTGAGCCCACAAT	11923	11944	61.14	50.00
6Forward	TGCACATCAGTAGTCTTACTCTCAGT	11864	11889	61.25	42.31
6Reverse	TGTGACTCTGCAGTTAAAGCCC	14186	14207	60.81	50.00
7Forward	AGACGGTGACATGGTACCACAT	13758	13779	61.41	50.00
7Reverse	ACACGTTGTATGTTTGCGAGCA	15354	15375	61.63	45.45
8Forward	TGATTGTTACGATGGTGGCTGT	14880	14901	60.29	45.45
8Reverse	GTGCAGGTAATTGAGCAGGGTC	17437	17458	61.52	54.55
9Forward	TGATTTGAGTGTTGTCAATGCCAG	17382	17405	60.26	41.67
9Reverse	ATTAGCAGCAATGTCCACACCC	19845	19886	61.21	50.00
10Forward	AATGTAGCATTTGAGCTTTGGGC	19774	19796	60.37	43.48
10Reverse	ACCAGCTGTCCAACCTGAAGAA	22324	22345	61.82	50.00
11Forward	ACATCACTAGGTTTCAAACTTTACTTGC	22263	22290	60.68	35.71
11Reverse	ATGAGGTGCTGACTGAGGGAAG	24715	24736	61.74	54.55
12Forward	GTCAGAGTGTGTACTTGGACAATCA	24649	24673	60.74	44.00
12Reverse	ACTGCTACTGGAATGGTCTGTGT	27142	27164	61.58	47.83
13Forward	GGTGACTCAGGTTTTGCTGCAT	27087	27108	61.65	50.00
13Reverse	CGTAAACGGAAAAGCGAAAACGT	29571	59593	61.08	43.48

3 - One-step RT-PCR

Les premiers essais ont été réalisés en utilisant le kit de RT-PCR One-Step SuperScript™ III avec ADN polymérase Platinum™ Taq (ThermoFisher). L'amplification était réalisée dans un volume final de 25µL, avec 12.5µL de mix du kit, 1.5µL d'amorces (10µM). L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : 30 min à 55 °C, puis 45 cycles de 15 s à 95 °C, 30 sec à 51°C et 3 min à 68 °C. La PCR permettait une amplification des 13 fragments sur des échantillons jusqu'à 22-23Ct en RT-qPCR, au-delà, certains fragments n'étaient pas ou peu amplifiés (**Fig.41**). Les échantillons obtenus *in vivo* pouvant contenir moins d'ARN, il fallait donc un protocole permettant d'amplifier des prélèvements plus tardifs en RT-qPCR.

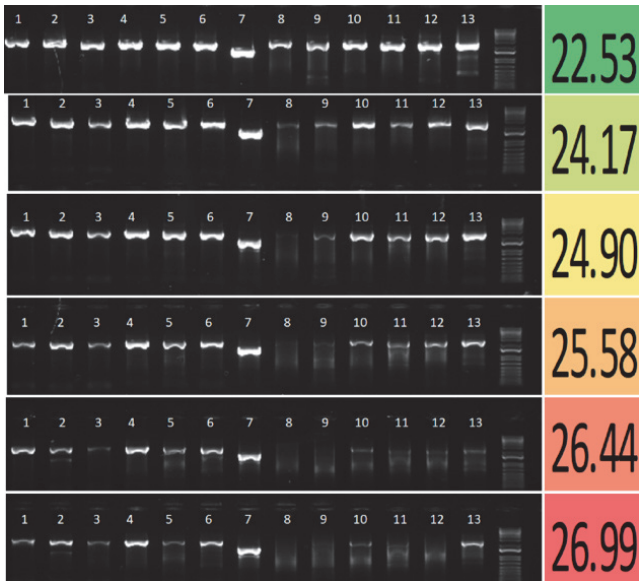


Figure 41 : Résultats de l'électrophorèse sur gel lors des tests pour déterminer la sensibilité de la méthode en utilisant des échantillons contenant de moins en moins d'ARN. Les valeurs à droite représentent le cycle seuil (Ct) de la qRT-PCR correspondante s'échelonnant de 23-27 Ct)

4 - Two-step RT-PCR

De l'ADN complémentaire a été généré dans un volume final de 40 µl en utilisant 14 µl d'extrait d'acide nucléique, 2µL d'amorces aléatoires (oligodésoxyribonucléotides courts de séquence aléatoire [d(N)6] qui s'hybrident sur des sites complémentaires aléatoires l'ARN cible, pour servir d'amorces à la synthèse d'ADN) et du kit ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis (New England Biolabs). L'ADN complémentaire ainsi obtenu était utilisé pour générer les 13 amplicons grâce à la polymérase haute-fidélité Q5 (New England Biolabs). Les Mix pour PCR (volume final 25 µL) contenaient 2,5 µL d'ADNc, 2 µL d'amorces (10 µM) et 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2X Master Mix. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : 30 s à 98 ° C, puis 45 cycles de 15 s à 98 ° C et 5 min à 65 ° C. Cette méthode permettait d'amplifier des prélèvements ayant des Ct plus tardifs.

Ces deux méthodes étaient complémentaires : une méthode rapide pour les prélèvements à Ct bas (SSIII) et une méthode plus sensible (Q5) pour les Ct plus élevés, mais nécessitant des étapes supplémentaires.

5 - Électrophorèse sur Gel et purification

La taille de chaque produit de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel (**Fig.42**) et pour chaque échantillon, un pool équimolaire de tous les amplicons a été préparé puis purifié à l'aide du kit Monarch PCR & DNA Cleanup (New England Biolabs)

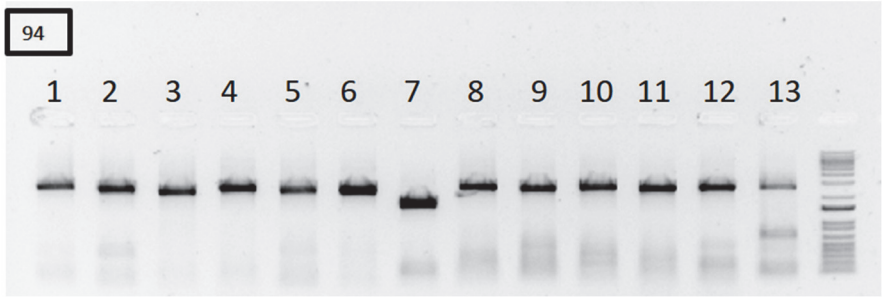


Figure 42 : Exemple d'électrophorèse sur gel pour l'un des homogénats pulmonaires

6 - NGS

Cette étape a été réalisée par la plateforme NGS de l'unité

Après la quantification de l'ADN en utilisant le kit Qubit dsDNA HS et le fluoromètre Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific), les amplicons ont été fragmentés par sonication en fragments d'environ 200 pb de long. Les bibliothèques ont été construites en ajoutant un code à barres, pour l'identification des échantillons, et des amorces à l'aide du système AB Library Builder (ThermoFisher Scientific). Pour regrouper équimolairement les échantillons à code-barres, une étape de quantification par PCR en temps réel à l'aide du kit de quantification Ion Library TaqMan (ThermoFisher Scientific) a été effectuée. Ensuite, la PCR en émulsion à partir des pools et le chargement sur la puce 530 ont été réalisés en utilisant l'automate Ion Chef (ThermoFisher Scientific). Le séquençage a été effectué en utilisant la technologie S5 Ion torrent v5.12 (ThermoFisher Scientific). Une séquence consensus a été obtenue après ajustement des reads (les reads avec un score de qualité <0,99 et une longueur <100pb ont été supprimés et les 30 premiers et 30 derniers nucléotides ont été supprimés des reads). Le mappage des reads sur une référence a été effectué à l'aide du logiciel CLC genomics workbench v.20 (Qiagen). Un contig *de novo* a également été produit pour garantir que la séquence consensus n'était pas affectée par la séquence de référence.

7 - Analyse des données du NGS

La recherche de sous populations virales, ainsi que le classement des mutations en synonyme ou non synonyme ont été réalisés grâce à une pipeline bio-informatique développée par le laboratoire. La fréquence de mutation pour chaque position a été calculée comme le nombre de lecture avec une mutation par rapport à la référence divisée par le nombre total de lectures sur ce site. Seules les substitutions avec une fréquence d'au moins 1% ont été prises en compte pour l'analyse. Les fréquences pour chaque paramètre pour un échantillon ont été calculées comme le rapport entre le nombre de ce type de mutation divisé par le nombre total de mutations retrouvées dans l'échantillon.

IV - Résultats et Discussion

A- Échantillons analysés

Les analyses ont été réalisées sur les homogénats clarifiés de poumon des 12 animaux issus des trois groupes : non traité, traité à 37,5 mg/J ou traité à 75 mg/J. Le surnageant de culture de SARS-Cov-2 ayant été utilisé pour infecter les animaux a également été analysé de la même manière afin de servir de séquence de référence aux séquences obtenues chez les animaux.

B- Séquences consensus

Les séquences consensus ont été obtenues pour les 13 échantillons, on ne notait pas de mutations majoritaires par rapport à la séquence du stock de virus. L'amplification préalable au séquençage a permis d'obtenir une profondeur moyenne de 25'426 ± 7176. **(Fig.43)**

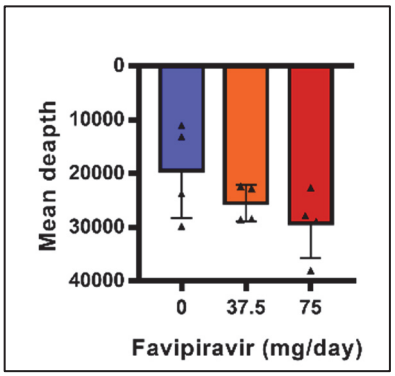


Figure 43 : Profondeur moyenne du séquençage pour chaque échantillon.

C- Nombre total de mutations

Sur les 697 mutations retrouvées (**Fig.44**), 27 étaient déjà présentes dans le stock de virus et n'ont donc pas été prises en compte pour le reste des analyses. En effet, ces mutations étant présentes avant le début de l'expérimentation, elles ne reflétaient ni l'action du Favipiravir, ni l'adaptation du virus au modèle animal. La grande majorité des mutations retrouvées (97.3% ; n= 652) avaient une fréquence inférieure à 10%.

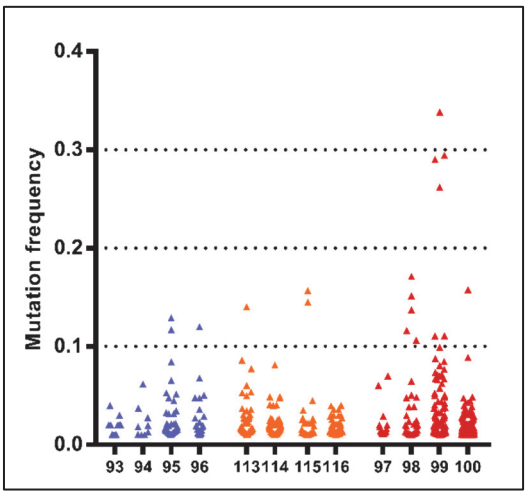


Figure 44 : Diversité génétique virale dans les homogénats clarifiés pulmonaires. Chaque triangle représente une mutation (seules les substitutions avec une fréquence ≥ 1% ont été considérées)

En étudiant la répartition des mutations (**Fig.45**) sur l'ensemble du génome, il ne semblait pas y avoir de localisation préférentielle, mais plutôt une répartition aléatoire.

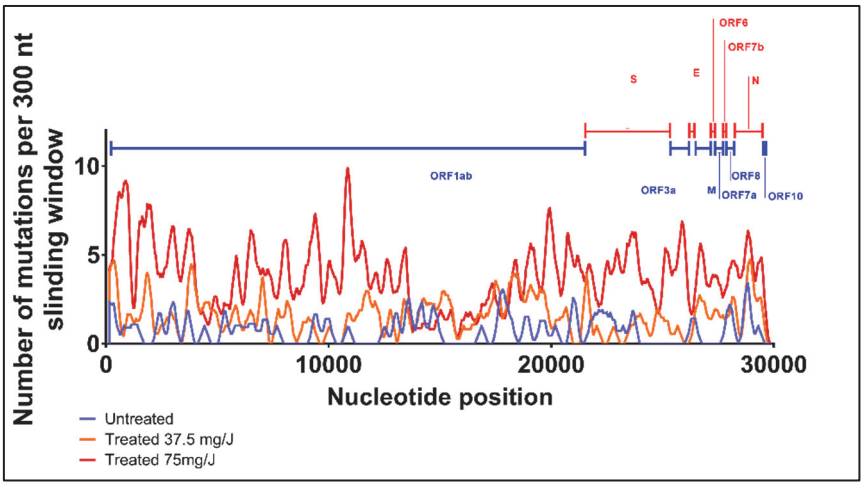


Figure 45 : Modèle de distribution des mutations sur l'ensemble du génome viral. Les positions des mutations variables sont représentées en utilisant des fenêtres glissantes de 300 nucléotides

Pour affiner cette analyse, en comparant la fréquence des mutations dans chaque ORF, et la part du génome totale occupée par ces mêmes ORF (**Fig.46**), on met en évidence une corrélation quasi parfaite entre les deux (R^2=0,99, p<0,0001), tendant à montrer que les mutations apparaissent de manière aléatoire sur l'ensemble du génome et que les ORF les plus longs sont ceux où s'accumule le plus de mutations.

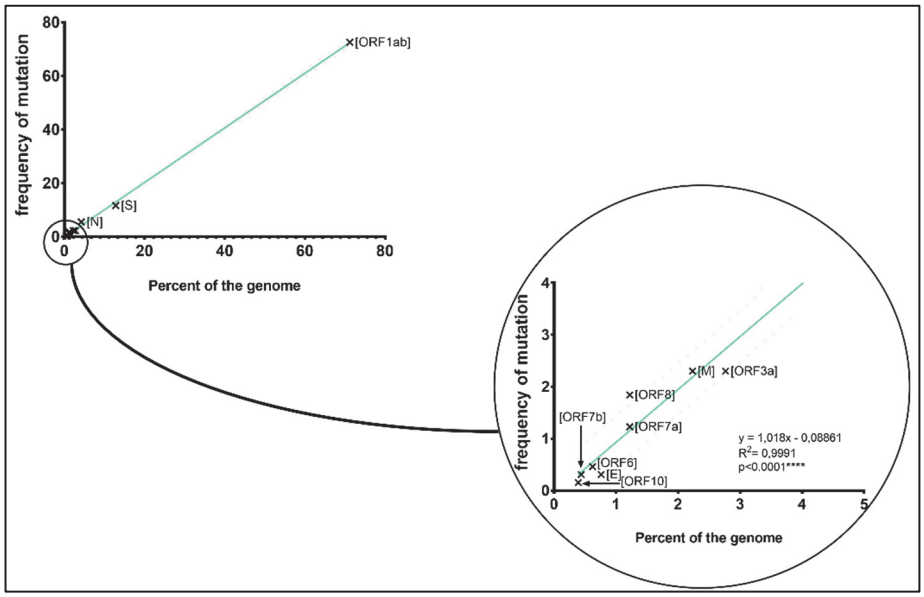


Figure 46 : Répartition des mutations dans les différents ORFs par rapport au pourcentage du génome complet occupé par ces ORFs.

L'analyse des données montrait une relation entre le nombre de mutations par échantillon (**Fig.47**) et la dose journalière de Favipiravir. Le nombre de mutations chez les groupes traités par 37.5 et 75 mg/J était augmenté d'un facteur 2 et 4.7 respectivement. La différence n'était significative qu'avec le groupe traité à 37.5mg/J (p=0.029).

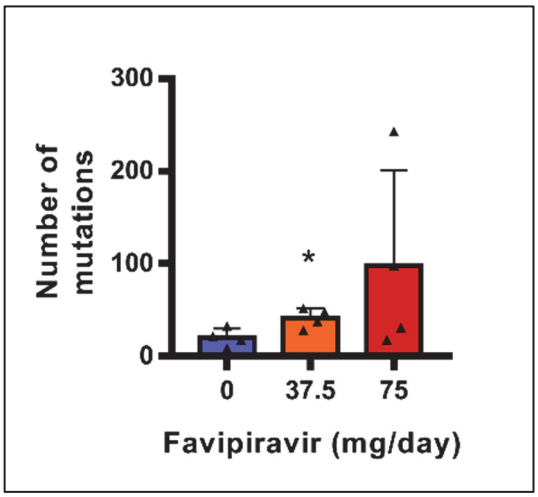


Figure 47 : Nombre moyen de mutation pour chaque groupe d'échantillon

D- Caractéristiques des mutations

L'analyse des types de mutations mettait en évidence que l'augmentation du nombre de mutations était liée à une augmentation du nombre de mutations G→A et C→U d'une manière qui semble dose dépendante. (**Fig.48**)

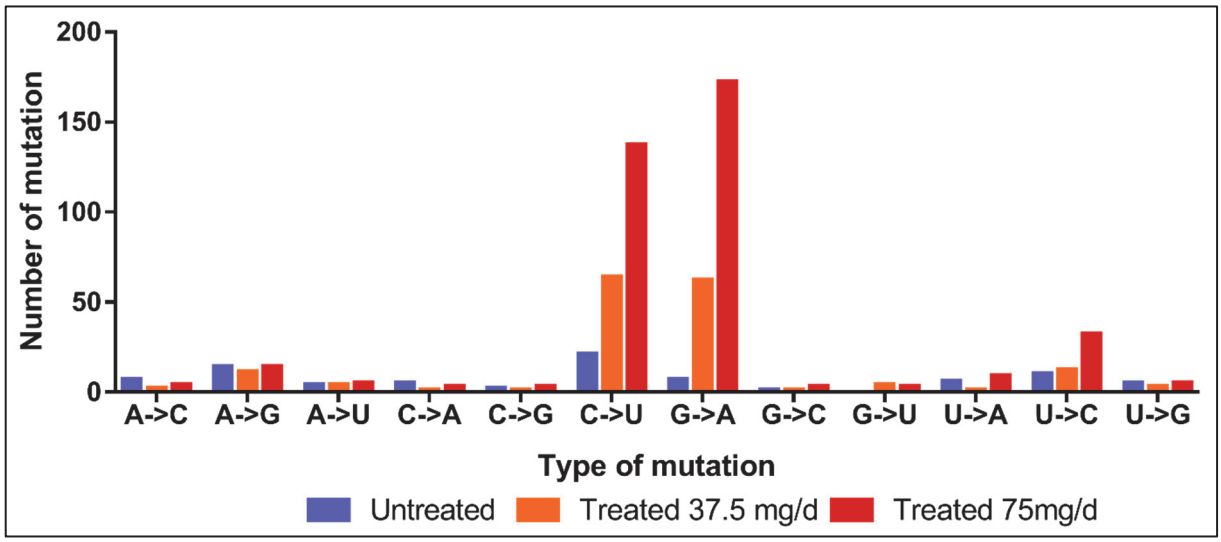


Figure 48 : Répartition des mutations selon leur type

La conséquence de l'augmentation de ce type de mutations dans les groupes traités est une augmentation des mutations de types transition, en valeur absolue et en fréquence. En parallèle on observait une diminution de la fréquence des transversions. On notait également une augmentation en fréquence et en valeur absolue des mutations non synonymes, significative en valeur absolu pour le groupe 37.5mg/J et en fréquence pour le groupe 75mg/J (p=0.013 et 0.009 respectivement). L'élévation de la fréquence des mutations G→A était significative pour les deux groupes traités (p=0.009 et 0.002 respectivement) (**Fig.49**)

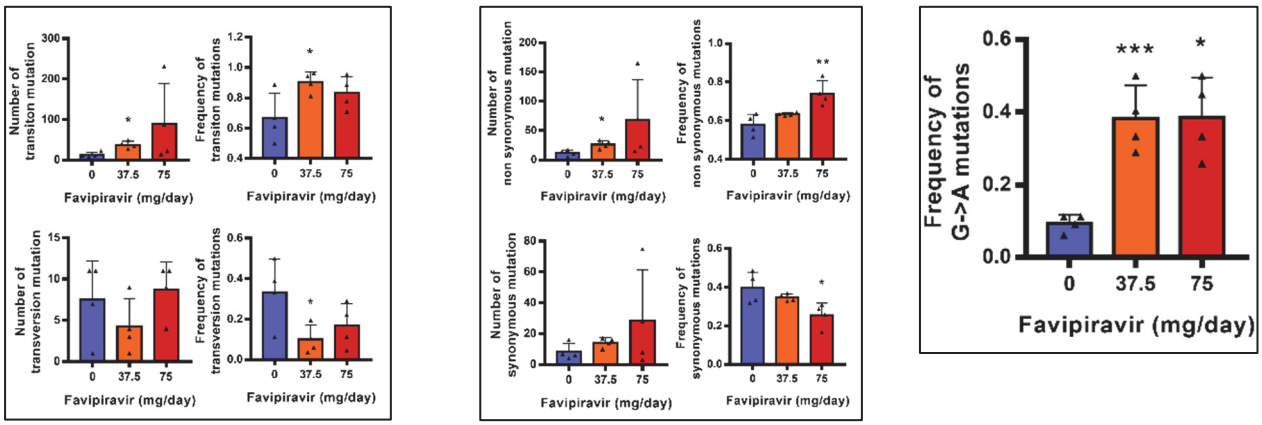


Figure 49 : Caractéristique des mutations.
Pour chaque échantillon la fréquence a été calculé comme le nombre de ce type de mutation divisé par le nombre de mutations totales dans l'échantillon. *, **, *** : représente une différence significative entre la moyenne du groupe et la moyenne du groupe non traité

E- Lien entre mutation et infectivité

Nous avons étudié si l'efficacité observée chez les animaux traités était liée aux caractéristiques des mutations observées. L'analyse de l'association entre l'infectivité du virus, (**Fig.50**) exprimée en Log_{10} de la $TCID_{50}$ par mL d'homogénat clarifié de poumon, et la fréquence des mutations non synonymes, synonymes et des transitions G→A était significative ($p<0.036$).

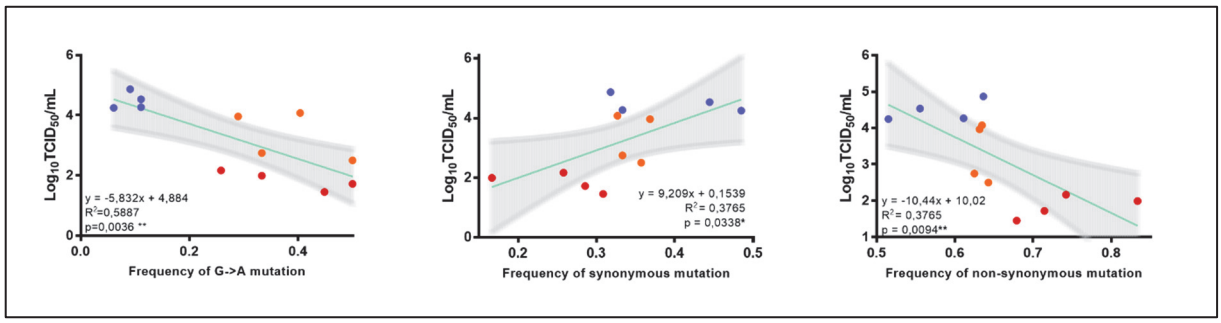


Figure 50 : Association entre la TCID50 et la fréquence de certains types de mutations

F- Évolution parallèle

Une analyse des mutations partagées à la recherche d'arguments en faveur d'une évolution parallèle a ensuite été conduite (**Fig.51**). 32 mutations étaient retrouvées chez au moins 2 animaux différents. Elles se situaient en majorité dans la région de l'ORF1ab (n=26 ;81%). On retrouvait 1, 3 et 5 mutations partagées au sein des groupes différents groupes (non traités, traités avec 37.5 mg/J ou 75 mg/J de favipiravir respectivement). 11 (7+4) mutations étaient retrouvées à la fois dans le groupe des hamsters non traités et dans l'un des groupes de hamsters traités. Enfin 2 mutations étaient retrouvées au moins une fois dans chacun des groupes.

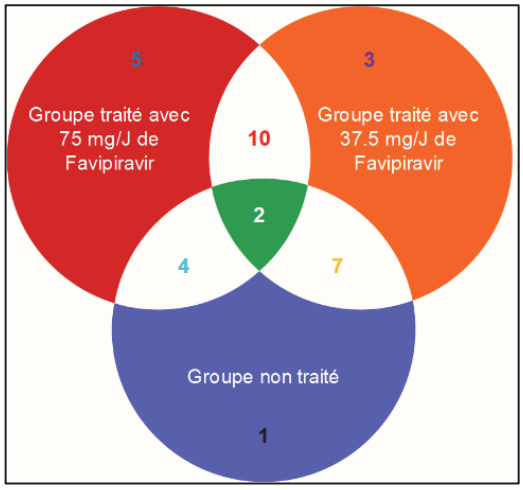


Figure 51 : Diagramme de Venn des mutations partagées entre les différents groupes de hamsters

18 (5+10+3) mutations étaient retrouvées au sein des groupes traités, mais n'étaient pas retrouvées dans le groupe des hamsters contrôle. 55% d'entre elles (n=10) étaient retrouvées au moins une fois dans les deux groupes traités. Ces mutations étaient à 90% (n=9/10) localisées dans l'ORF1ab (**Tableau 7**), et dans les régions codant pour les protéines non structurales nsp2 (n=1 ;10%), nsp3 (n=4 ;40%), nsp4 (n=1 ;10%), nsp5 (n=1 ;10%), nsp6 (n=2 ;20%), et nsp14 (n=2 ;20%).

Tableau 7 : Caractéristiques des mutations partagées entre les différents groupes de hamsters

- Shared within the group treated with 75 mg/day
- Shared within the group treated with 37.5 mg/day
- Shared within treated groups
- Shared within the untreated group
- Present in all groups
- Shared between untreated and treated with 37.5mg/day groups
- Shared between untreated and treated with 75 mg/day groups

Nucleotide position on the reference genome NC_045512	Region	Nucleotide change	Amino-acid change	Synonymous/Non-synonymous	Transition/transversion	Animal ID: Untreated 93	94	95	96	Treated 37.5mg/day 113	114	115	116	Treated 75 mg/day 97	98	99	100	Amino Acid mutation	Sub-localisation, if relevant	Additional information
373	[ORF1ab]	G->A	E->E	Synonymous	Transition												X	-	-	-
391	[ORF1ab]	A->G	A->A	Synonymous	Transition	X		X	X		X	X	X					-	-	-
1886	[ORF1ab]	G->A	A->T	Non-synonymous	Transition					X	X					X		A541T	nsp2	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
3053	[ORF1ab]	G->A	D->N	Non-synonymous	Transition			X	X								X	-	-	-
3743	[ORF1ab]	C->U	H->Y	Non-synonymous	Transition							X				X		H1150Y	nsp3, macro domain	Original in SARS-CoV-2 (nr DB), variable residue in other CoV
3990	[ORF1ab]	C->U	T->I	Non-synonymous	Transition					X							X	T1242I	nsp3, SARS Unique Domain (SUD)	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
4456	[ORF1ab]	C->U	A->A	Synonymous	Transition			X	X	X								-	-	-
5347	[ORF1ab]	U->C	A->A	Synonymous	Transition			X	X								X	-	-	-
5398	[ORF1ab]	U->A	C->STOP	Non-synonymous	Transversion			X		X								-	nsp3, Papain like protease (PLP)	-
5693	[ORF1ab]	C->U	P->S	Non-synonymous	Transition					X						X		P1810S	nsp3, Papain like protease (PLP)	Original in SARS-CoV-2 (nr DB), exists also at Q at this position in SARS-CoV-2
6706	[ORF1ab]	C->A	N->K	Non-synonymous	Transversion			X							X			-	-	-
7083	[ORF1ab]	C->U	S->F	Non-synonymous	Transition					X					X			S2273F	nsp3, Inter transmembrane domains	Substitution present in SARS-CoV-2 from Human sample (QJE38821.1)
7086	[ORF1ab]	C->U	T->I	Non-synonymous	Transition			X			X	X						-	-	-
8152	[ORF1ab]	C->U	V->V	Synonymous	Transition						X					X		-	-	-
9443	[ORF1ab]	C->U	L->F	Non-synonymous	Transition						X					X	X	L3606F	nsp4	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
10070	[ORF1ab]	A->G	M->V	Non-synonymous	Transition			X		X								-	-	-
10738	[ORF1ab]	U->A	N->K	Non-synonymous	Transversion										X		X	N3491K	nsp5 3CLpro	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
10912	[ORF1ab]	A->C	L->F	Non-synonymous	Transversion			X										-	-	-
11273	[ORF1ab]	G->A	V->I	Non-synonymous	Transition					X						X		V3670I	nsp6	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
11652	[ORF1ab]	U->A	L->H	Non-synonymous	Transversion			X		X						X	X	L3736H	nsp6	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
14230	[ORF1ab]	G->A	L->L	Synonymous	Transition			X		X					X		X	-	-	-
18086	[ORF1ab]	C->U	T->I	Non-synonymous	Transition				X									-	-	-
18753	[ORF1ab]	U->C	N->N	Synonymous	Transition							X	X					-	-	-
19189	[ORF1ab]	G->A	S->N	Non-synonymous	Transition							X				X		S6232N	nsp14 ExoN, N7 Mtase domain	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
19238	[ORF1ab]	G->A	R->K	Non-synonymous	Transition									X			X	R6325K	nsp14 ExoN, N7 Mtase domain	Original in SARS-CoV-2 (nr DB) R is conserved in all the analysed sequences of CoV (Ref Seq DB)
19757	[ORF1ab]	A->U	K->I	Non-synonymous	Transversion			X		X					X			-	-	-
25955	[ORF3a]	G->A	G->D	Non-synonymous	Transition											X	X	G138D	-	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
26507	-	A->G	-	Non-coding	Transition						X							-	-	-
26710	[M]	C->U	A->V	Non-synonymous	Transition					X	X	X						A63V	-	Original in SARS-CoV-2 (nr DB)
27920	[ORF8]	C->U	I->I	Synonymous	Transition					X	X	X						-	-	-
28868	[N]	C->U	P->S	Non-synonymous	Transition						X				X			P199S	Linker, phosphorylation region	Original in SARS-CoV-2 (nr DB), can be T is several sequences (nr DB)
29333	[N]	A->C	N->H	Non-synonymous	Transversion				X								X	-	-	-

G- Discussion

La méthode d'amplification mise au point présente l'intérêt de pouvoir amplifier le génome complet du SARS-CoV-2, en s'affranchissant d'une étape d'enrichissement par culture cellulaire. Elle permet d'obtenir une amplification du génome complet du virus à partir de prélèvements biologiques (prélèvements de patients, d'animaux ou surnageants de cultures) sur une gamme de matrice assez large (succès jusqu'à 30 Ct), pour un temps de réaction, après extraction, allant de 3h20 (one-step RT-PCR) à 4h20 (two-step-RT-PCR). Les produits obtenus une fois purifiés peuvent être adressés directement à la plateforme de NGS pour séquençage avec la garantie d'obtenir une profondeur de séquençage élevée et une couverture de 100%.

Des études antérieures portant sur le mécanisme d'induction de biais mutationnel par le Favipiravir, montrent qu'il entraine, sur le virus de la grippe, une inhibition de l'extension du brin d'ARN et induit une accumulation importante de mutations dans le génome viral[197,198]. Des travaux plus récents, montrent qu'*in vitro*, l'action du Favipiravir sur le SARS-CoV-2 est similaire, via une action de terminateur de chaîne, un ralentissement de la synthèse d'ARN et l'induction d'une mutagénèse létale[199].

L'analyse génomique que nous avons réalisée confirme l'effet mutagène du Favipiravir *in vivo*, montrant une augmentation du nombre de mutations dans les groupes traités, même si cette différence n'est significative que pour le groupe traité à 37.5mg/J, en raison du petit effectif des groupes (n=4) et de l'écart-type important (explicable par la nature dynamique des sous-populations virales). La répartition des mutations par rapport à la fraction représentée par les différentes ORF (**Fig.45**) est également un argument en faveur d'une mutagénèse induite par le Favipiravir étant donné le caractère aléatoire de la répartition des mutations.

L'apparition majoritaire de mutations de type G→A et C→U est également un témoignage de l'action du Favipiravir *in vivo*, en effet sa capacité à se comporter comme un analogue de la guanine et à engendrer ce type de transitions a déjà été montrée *in vitro* et *in vivo* sur d'autres virus à ARN (virus de la grippe[156], West-Nile virus[200], Ebolavirus[201]), mais également *in vitro* sur le SARS-CoV-2[199].

Parallèlement, nous avons mis en évidence une diminution de l'infectivité du virus, liée à une diminution de viabilité de l'ARN viral. Des effets similaires ont déjà été retrouvés, *in vitro* et *in vivo*, sur d'autres virus à ARN[197,200–202]. Nous avons également observé une association inverse entre l'infectivité de l'homogénat de poumon et le nombre de mutations non-synonymes. Étant donné que des mutations non-synonymes aléatoires sont plus délétères que des mutations synonymes[203], cela suggère que les mutations se répartissaient aléatoirement sur

les trois positions d'un codon, et qu'aucun mécanisme compensatoire n'a été mis en place par le virus pour éliminer ces mutations délétères. Enfin, l'association inverse entre le titre infectieux de l'homogénat de poumon et la fréquence des mutations G→A suggère que l'augmentation de la fréquence de ces mutations au-delà d'un seuil critique provoque une mutagénèse létale.

Notre étude mettait également en évidence des événements d'évolutions parallèles, notamment au sein des groupes traités par Favipiravir. Parmi ces événements, deux mutations étaient localisées dans la région codant pour la nsp14, une protéine non structurale impliquée dans l'activité corrective de la RdRp[204]. Cette mutation se situe au niveau du domaine N7 méthyl-transférase, impliqué dans le capping de l'ARN viral, c'est-à-dire la formation de la coiffe en 5' de l'ARN (7-methyl-guanosine). Chez les *Nidovirales*, la coiffe a un rôle dans l'initiation de la traduction, dans la protection des ARN contre les dégradations par les ribonucléases cellulaires et l'échappement à la réponse immunitaire innée de la cellule hôte[205].

Cette mutation ne semble donc pas être un phénomène de sélection de résistance au Favipiravir puisqu'elle n'implique pas des régions codant pour des protéines impliquées dans le mécanisme d'action du Favipiravir, comme la nsp12 (RdRp), ou la région impliquée dans l'activité exonucléasique de la nsp14. Une sélection en culture cellulaire en présence de Favipiravir serait nécessaire pour mettre en évidence l'existence de mutations de résistance, comme cela a pu être déjà réalisé sur le virus de la grippe[206,207].

Il est également à noter que les données issues de l'article associé à ce travail montrent que des signes de toxicité apparaissent dans ce modèle, en lien avec l'utilisation de fortes doses et l'accumulation de la molécule causée par sa capacité à auto-inhiber son métabolisme, interrogeant sur sa potentielle utilisation chez l'homme à des doses efficaces. En revanche, étant donné qu'il diminue l'infectivité du virus au niveau pulmonaire, cela rend son usage d'autant plus intéressant dans le cadre du traitement ou de la prévention d'une maladie comme la $COVID_{19}$ où la contamination se fait principalement par voie aérienne[208].

Des études cliniques ont depuis lors évalué le favipiravir chez l'homme dans le cadre de la $COVID_{19}$, mais ces études sont encore peu nombreuses, réalisées sur des effectifs faibles et sur des formes légères à modérées, mais semble néanmoins montrer une tendance à la diminution de durée d'hospitalisation[209], une diminution de la durée des symptômes[210] et du besoin de ventilation mécanique ou de respiration extracorporelle[211]. Une étude a également évalué le favipiravir chez des patients de réanimation, elle montre que les concentrations plasmatiques chez ces patients sont bien inférieures à celles habituellement observées chez les volontaires sains en lien avec les modifications pharmacocinétiques décrites dans cette population

particulière (augmentation du volume de distribution, augmentation de la clairance, diminution de l'absorption gastro-intestinale par les co-médications) incitant à optimiser les posologies chez les patients de réanimation[212].

Enfin, une stratégie intéressante mais n'ayant pas encore été évaluée dans le cadre de la COVID19 et du favipiravir est son usage en association à d'autres antiviraux, basée sur la recherche d'une synergie permettant une diminution des doses administrées de chaque composé, des effets secondaires tout en améliorant les effets thérapeutiques, réduisant ainsi la probabilité de sélection de mutants résistants aux médicaments. La recherche de combinaisons antivirales synergiques est particulièrement importante pour les virus très variables dont l'adaptabilité est guidée par la dynamique des quasi-espèces comme cela a pu être étudié en associant le favipiravir à la ribavirine dans le cadre du VHC[213] ou bien avec le baloxavir dans le cadre du virus de la grippe[214].

Pour conclure, cette étude permet de mettre en évidence une action du Favipiravir sur le SARS-CoV-2 *in vivo*, montrant qu'il entraîne une accumulation dose dépendante de mutations, dont le mécanisme est lié à sa capacité à se comporter comme un analogue nucléosidique. Des études restent encore à mener afin de déterminer les posologies optimales, ou bien des associations synergiques afin d'obtenir des concentrations efficaces en absence de toxicité, associées à une activité antivirale maximum.

Bibliographie

1. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727–733 (2020).
2. Whuhan municipal health commission. http://web.archive.org/web/20200430030406/http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989 Commission de santé municipale de Wuhan sur la situation actuelle de la pneumonie dans notre ville. (2019).
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **5**, 536–544 (2020).
4. Dong, E., Du, H. & Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases* **20**, 533–534 (2020).
5. Stadler, K. *et al.* SARS — beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **1**, 209–218 (2003).
6. Memish, Z. A., Perlman, S., Kerkhove, M. D. V. & Zumla, A. Middle East respiratory syndrome. **395**, 16 (2020).
7. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **5**, 536–544 (2020).
8. Barcena, M. *et al.* Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 582–587 (2009).
9. Kim, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**, 914-921.e10 (2020).
10. Souza, P. F. N. *et al.* The human pandemic coronaviruses on the show: The spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. *International Journal of Biological Macromolecules* **179**, 1–19 (2021).
11. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 11727–11734 (2020).
12. Nieva, J. L., Madan, V. & Carrasco, L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol* **10**, 563–574 (2012).
13. Schoeman, D. & Fielding, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J* **16**, 69 (2019).
14. Neuman, B. W. & Buchmeier, M. J. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. in *Advances in Virus Research* vol. 96 1–27 (Elsevier, 2016).
15. Hartenian, E. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 12910–12934 (2020).
16. Kelly, J. A. *et al.* Structural and functional conservation of the programmed −1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of Biological Chemistry* **295**, 10741–10748 (2020).
17. Thoms, M. *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* **369**, 1249–1255 (2020).
18. Hagemeijer, M. C. *et al.* Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural proteins 3 and 4. *Virology* **458–459**, 125–135 (2014).
19. Shannon, A. *et al.* Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nat Commun* **11**, 4682 (2020).
20. Shu, T. *et al.* SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses NTPase and RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited by Bismuth Salts. *Virol. Sin.* **35**, 321–329 (2020).

21. Tahir, M. H. Coronavirus genomic nsp14-ExoN, structure, role, mechanism, and potential application as a drug target. 18 (2021).
22. Deng, X. *et al.* Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E4251–E4260 (2017).
23. Kim, Y. *et al.* Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. *Protein Science* **29**, 1596–1605 (2020).
24. Lin, S. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10/nsp16 2′-O-methylase and its implication on antiviral drug design. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 131 (2020).
25. Davidson, A. D. *et al.* Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein. *Genome Med* **12**, 68 (2020).
26. Kim, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**, 914-921.e10 (2020).
27. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155–170 (2021).
28. Xu, H. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* **12**, 8 (2020).
29. Mohan, J. & Wollert, T. Membrane remodeling by SARS-CoV-2 – double-enveloped viral replication. 10 (2021).
30. Hoffmann, M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 19 doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052.
31. Atri, D. *et al.* COVID-19 for the Cardiologist. *JACC: Basic to Translational Science* **5**, 518–536 (2020).
32. World Health Organisation. Novel Coronavirus (2019-nCoV)-Situation Report– 22 https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2. (2020).
33. Gao, Z. *et al.* A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **54**, 12–16 (2021).
34. Passarelli, P. C., Lopez, M. A., Mastandrea Bonaviri, G. N., Garcia-Godoy, F. & D'Addona, A. Taste and smell as chemosensory dysfunctions in COVID-19 infection. *Am J Dent* **33**, 135–137 (2020).
35. Health topic coronavirus symptoms. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3.
36. Nikolich-Zugich, J. *et al.* SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *GeroScience* **42**, 505–514 (2020).
37. Cevik, M., Bamford, C. G. G. & Ho, A. COVID-19 pandemic—a focused review for clinicians. *Clinical Microbiology and Infection* S1198743X20302317 (2020) doi:10.1016/j.cmi.2020.04.023.
38. Kutti-Sridharan, G., Vegunta, R., Vegunta, R., Mohan, B. P. & Rokkam, V. R. P. SARS-CoV2 in Different Body Fluids, Risks of Transmission, and Preventing COVID-19: A Comprehensive Evidence-Based Review. *Int J Prev Med* **11**, 97 (2020).
39. Tolksdorf, K., Buda, S., Schuler, E., Wieler, L. H. & Haas, W. Influenza-associated pneumonia as reference to assess seriousness of coronavirus disease (COVID-19). *Eurosurveillance* **25**, (2020).
40. W. Michael Brode. The State of Inpatient COVID-19 Care – A Brief Evidence-Based Review of Everything We Have Learned in the Past 9 Months. *The Hospital Leader, the official blog of the Society of Hospital Medicine (SHM)* https://blog.hospitalmedicine.org/the-state-of-inpatient-covid-19-care-a-brief-evidence-based-review-of-everything-we-

have-learned-in-the-past-9-months/.
41. Zhou, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062 (2020).
42. O'Driscoll, M. *et al.* Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature* **590**, 140–145 (2021).
43. Gao, Y. *et al.* Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* **76**, 428–455 (2021).
44. Lu, X. *et al.* SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med* **382**, 1663–1665 (2020).
45. Tao, K. *et al.* The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet* (2021) doi:10.1038/s41576-021-00408-x.
46. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812-827.e19 (2020).
47. CMMID COVID-19 Working Group *et al.* Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature* **593**, 270–274 (2021).
48. Tegally, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438–443 (2021).
49. Faria, N. R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **372**, 815–821 (2021).
50. Sundararaj Stanleyraj, J. *et al.* Treating COVID-19: are we missing out the window of opportunity? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **76**, 283–285 (2021).
51. Conforti, A. *et al.* Are Genetic Vaccines the Right Weapon against COVID-19? *Molecular Therapy* **28**, 1555–1556 (2020).
52. Walsh, E. E. *et al.* Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med* **383**, 2439–2450 (2020).
53. Hassett, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **15**, 1–11 (2019).
54. Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* **383**, 2603–2615 (2020).
55. Baden, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* **384**, 403–416 (2021).
56. Wolff, J. A. *et al.* Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* **247**, 1465–1468 (1990).
57. Wang, Z. *et al.* Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* **11**, 711–721 (2004).
58. Smith, T. R. F. *et al.* Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat Commun* **11**, 2601 (2020).
59. Gooch, K. E. *et al.* One or two dose regimen of the SARS-CoV-2 synthetic DNA vaccine INO-4800 protects against respiratory tract disease burden in nonhuman primate challenge model. *Vaccine* S0264410X21008070 (2021) doi:10.1016/j.vaccine.2021.06.057.
60. Yu, J. *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science* **369**, 806–811 (2020).
61. Tebas, P. *et al.* Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine* **31**, 100689 (2021).
62. Bangari, D. S. & Mittal, S. K. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* **24**, 849–862 (2006).
63. Voysey, M. *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil,

South Africa, and the UK. *The Lancet* **397**, 99–111 (2021).
64. Sadoff, J. *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 2187–2201 (2021).
65. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet* **397**, 671–681 (2021).
66. See, I. *et al.* US Case Reports of Cerebral Venous Sinus Thrombosis With Thrombocytopenia After Ad26.COV2.S Vaccination, March 2 to April 21, 2021. *JAMA* **325**, 2448 (2021).
67. Joseph EMMERICH - Médecine Vasculaire - Cardiologie Hôtel Dieu - Conseiller médical ANSM Christian GACHET – Établissement français du sang Grand Est *et al. Synthèse du Comité scientifique temporaire « Vaccins Covid et thromboses rares atypiques »*. 3 (2021).
68. Guebre-Xabier, M. *et al.* NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge. *Vaccine* **38**, 7892–7896 (2020).
69. Heath, P. T. *et al.* Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* NEJMoa2107659 (2021) doi:10.1056/NEJMoa2107659.
70. Yang, S. *et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD protein vaccine against COVID-19 in adults: pooled analysis of two randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials*. http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.12.20.20248602 (2020) doi:10.1101/2020.12.20.20248602.
71. Sanofi. Sanofi and GSK COVID-19 vaccine candidate demonstrates strong immune responses across all adult age groups in Phase 2 trial. (2021).
72. Stauffer, F., El-Bacha, T. & Da Poian, A. Advances in the Development of Inactivated Virus Vaccines. *PRI* **1**, 291–296 (2006).
73. Mullbacher, A., Pardo, J. & Furuya, Y. SARS-CoV-2 Vaccines: Inactivation by Gamma Irradiation for T and B Cell Immunity. *Pathogens* **9**, 928 (2020).
74. Zhang, Y. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases* **21**, 181–192 (2021).
75. Wu, Z. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases* **21**, 803–812 (2021).
76. WHO. Evidence Assessment: Sinovac/CoronaVac COVID-19 vaccine. (2021).
77. Ella, R. *et al. Safety and immunogenicity clinical trial of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152 (a phase 2, double-blind, randomised controlled trial) and the persistence of immune responses from a phase 1 follow-up report*. http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.12.21.20248643 (2020) doi:10.1101/2020.12.21.20248643.
78. Xia, S. *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases* **21**, 39–51 (2021).
79. Chen, X. *et al.* Neutralizing Antibodies Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants Induced by Natural Infection or Vaccination: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Clinical Infectious Diseases* ciab646 (2021) doi:10.1093/cid/ciab646.
80. Wu, K. *et al. Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice*. http://biorxiv.org/lookup/doi /10.1101/2021.04.13.439482 (2021) doi: 10.1101/2021.04.13.439482.

81. Safety and Immunogenicity Study of a SARS-CoV-2 (COVID-19) Variant Vaccine (mRNA-1273.351) in Naïve and Previously Vaccinated Adults. *clinicaltrials.gov* https://www.clinicaltrials.gov (2021).
82. Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L. & Song, J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* **46**, 846–848 (2020).
83. Williams, D. M. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care* **63**, 655–670 (2018).
84. Health Care Readiness, WHO Headquarters (HQ). *Corticosteroids for COVID-19*. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Corticosteroids-2020.1.
85. Ledford, H. Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. *Nature* **582**, 469–469 (2020).
86. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 693–704 (2021).
87. WHO. WHO recommends life-saving interleukin-6 receptor blockers for COVID-19 and urges producers to join efforts to rapidly increase access. (2021).
88. The WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group *et al.* Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA* (2021) doi:10.1001/jama.2021.11330.
89. The REMAP-CAP Investigators & Derde, L. P. G. *Effectiveness of Tocilizumab, Sarilumab, and Anakinra for critically ill patients with COVID-19 The REMAP-CAP COVID-19 Immune Modulation Therapy Domain Randomized Clinical Trial*. http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.18.21259133 (2021) doi:10.1101/2021.06.18.21259133.
90. Kazatchkine, M., Mouthon, L. & Kaveri, S. V. [Immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins]. *Ann Med Interne (Paris)* **151 Suppl 1**, 1S13-18 (2000).
91. Mazeraud, A. *et al.* Effect of early treatment with polyvalent immunoglobulin on acute respiratory distress syndrome associated with SARS-CoV-2 infections (ICAR trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **22**, 170 (2021).
92. Brown, B. L. & McCullough, J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfusion and Apheresis Science* **59**, 102790 (2020).
93. Agarwal, A. *et al.* Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial). *BMJ* m3939 (2020) doi:10.1136/bmj.m3939.
94. Simonovich, V. A. *et al.* A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med* **384**, 619–629 (2021).
95. Abani, O. *et al.* Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. *The Lancet* **397**, 2049–2059 (2021).
96. Joyner, M. J. *et al.* Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 1015–1027 (2021).
97. Baral, P. K., Yin, J. & James, M. N. G. Treatment and prevention strategies for the COVID 19 pandemic: A review of immunotherapeutic approaches for neutralizing SARS-CoV-2. *International Journal of Biological Macromolecules* **186**, 490–500 (2021).
98. Tuccori, M. *et al.* Anti-SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies: clinical pipeline. *mAbs* **12**, 1854149 (2020).

99. Jensen, B. *et al.* Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany. *The Lancet Regional Health - Europe* **8**, 100164 (2021).
100. Dougan, M. *et al.* Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med* NEJMoa2102685 (2021) doi:10.1056/NEJMoa2102685.
101. RECOVERY Collaborative Group *et al. Casirivimab and imdevimab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial*. http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.15.21258542 (2021) doi:10.1101/2021.06.15.21258542.
102. Ltd, F. H.-L. R. Phase III prevention trial showed subcutaneous administration of investigational antibody cocktail casirivimab and imdevimab reduced risk of symptomatic COVID-19 infections by 81%. 9.
103. Haut Conseil de la Santé Publique. Avis relatif à l'actualisation des recommandations thérapeutiques pour la prise en charge du Covid-19 (tocilizumab et anticorps monoclonaux). (2021).
104. Dong, J. *et al.* Genetic and structural basis for SARS-CoV-2 variant neutralization by a two-antibody cocktail. *Nat Microbiol* **6**, 1233–1244 (2021).
105. De Clercq, E. & Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 695–747 (2016).
106. Wang, X. *et al.* The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov* **6**, 28 (2020).
107. Huang, D. *et al.* Efficacy and safety of umifenovir for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* **93**, 481–490 (2021).
108. Anand, K. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science* **300**, 1763–1767 (2003).
109. Choy, K.-T. *et al.* Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Research* **178**, 104786 (2020).
110. WHO Solidarity Trial Consortium. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med* **384**, 497–511 (2021).
111. Boras, B. *et al. Discovery of a Novel Inhibitor of Coronavirus 3CL Protease for the Potential Treatment of COVID-19*. http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.12.293498 (2020) doi:10.1101/2020. 09.12.293498.
112. First-In-Human Study To Evaluate Safety, Tolerability, And Pharmacokinetics Following Single Ascending And Multiple Ascending Doses of PF-07304814 In Hospitalized Participants With COVID-19 : NCT04535167. *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04535167.
113. Owen, D. R. *et al. An Oral SARS-CoV-2 M ^{pro} Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19*. http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.07.28.21261232 (2021) doi:10.1101/2021.07.28.21261232.
114. A Study of PF-07321332/Ritonavir in Nonhospitalized High Risk Adult Participants With COVID-19 : NCT04960202. *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04960202?term=07321332&phase=1&draw=2&rank=1.
115. Kim, Y. *et al.* Broad-Spectrum Antivirals against 3C or 3C-Like Proteases of Picornaviruses, Noroviruses, and Coronaviruses. *Journal of Virology* **86**, 11754–11762 (2012).
116. Vuong, W. *et al.* Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun* **11**, 4282 (2020).
117. Cáceres, C. J. *et al.* Efficacy of GC-376 against SARS-CoV-2 virus infection in the K18 hACE2 transgenic mouse model. *Sci Rep* **11**, 9609 (2021).
118. Dampalla, C. S. *et al.* Postinfection treatment with a protease inhibitor increases survival

of mice with a fatal SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**, e2101555118 (2021).
119. Warren, T. K. *et al.* Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature* **531**, 381–5 (2016).
120. Gordon, C. J. *et al.* Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 6785–6797 (2020).
121. Jorgensen, S. C. J., Kebriaei, R. & Dresser, L. D. Remdesivir: Review of Pharmacology, Pre-clinical Data, and Emerging Clinical Experience for COVID-19. *Pharmacotherapy* **40**, 659–671 (2020).
122. Grein, J. *et al.* Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* **382**, 2327–2336 (2020).
123. Beigel, J. H. *et al.* Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N Engl J Med* **383**, 1813–1826 (2020).
124. Berliba, E. *et al.* Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AT-527, a Novel Purine Nucleotide Prodrug, in Hepatitis C Virus-Infected Subjects with or without Cirrhosis. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, (2019).
125. Good, S. S. *et al.* AT-527, a Double Prodrug of a Guanosine Nucleotide Analog, Is a Potent Inhibitor of SARS-CoV-2 *In Vitro* and a Promising Oral Antiviral for Treatment of COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, (2021).
126. Atea Pharmaceuticals, Inc. & Hoffmann-La Roche. Study to Evaluate the Effects of RO7496998 (AT-527) in Non-Hospitalized Adult and Adolescent Participants With Mild or Moderate COVID-19 (NCT04889040). *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04889040?term=Roche+and+AT527&draw=2&rank=2 (2021).
127. Atea Pharmaceuticals, Inc. & Hoffmann-La Roche. Safety and Efficacy of AT-527 in Subjects With Moderate Coronavirus Disease (NCT04396106). *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04396106?term=AT-527&draw=2 (2020).
128. Popowska, E. & Janion, C. N4-hydroxycytidine — A new mutagen of a base analogue type. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **56**, 459–466 (1974).
129. Stuyver, L. J. *et al.* Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 244–254 (2003).
130. Pyrc, K. *et al.* Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2000–2008 (2006).
131. Barnard, D. L. *et al.* Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARSCoV) by calpain inhibitors and beta-D-N4-hydroxycytidine. *Antivir Chem Chemother* **15**, 15–22 (2004).
132. Yoon, J.-J. *et al.* Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, e00766-18 (2018).
133. Costantini, V. P. *et al.* Antiviral activity of nucleoside analogues against norovirus. *Antivir Ther* **17**, 981–991 (2012).
134. Painter, G. R. *et al.* The prophylactic and therapeutic activity of a broadly active ribonucleoside analog in a murine model of intranasal venezuelan equine encephalitis virus infection. *Antiviral Res* **171**, 104597 (2019).
135. Kozlovskaya, L. I. *et al.* Selective Inhibition of Enterovirus A Species Members' Reproduction by Furano[2, 3-d]pyrimidine Nucleosides Revealed by Antiviral Activity Profiling against (+)ssRNA Viruses. *ChemistrySelect* **3**, 2321–2325 (2018).
136. Ehteshami, M. *et al.* Characterization of β-d-N4-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of

Chikungunya Virus. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e02395-16 (2017).
137. Reynard, O. *et al.* Identification of a New Ribonucleoside Inhibitor of Ebola Virus Replication. *Viruses* **7**, 6233–6240 (2015).
138. Toots, M. *et al.* Characterization of orally efficacious influenza drug with high resistance barrier in ferrets and human airway epithelia. *Sci Transl Med* **11**, eaax5866 (2019).
139. Toots, M. *et al.* Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model. *Transl Res* **218**, 16–28 (2020).
140. Agostini, M. L. *et al.* Small-Molecule Antiviral β-D- N^4 -Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *J Virol* **93**, e01348-19, /jvi/93/24/JVI.01348-19.atom (2019).
141. Abdelnabi, R. *et al.* Molnupiravir inhibits the replication of the emerging SARS-CoV-2 variants of concern (VoCs) in a hamster infection model. *J Infect Dis* jiab361 (2021) doi:10.1093/infdis/jiab361.
142. Ridgeback Biotherapeutics, LP. COVID-19 First In Human Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of EIDD-2801 in Healthy Volunteers. *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04392219?term=molnupiravir&draw=2&rank=5 (2021).
143. Ridgeback Biotherapeutics, LP. A Safety, Tolerability and Efficacy of Molnupiravir (EIDD-2801) to Eliminate Infectious Virus Detection in Persons With COVID-19. *clinicaltrials.gov* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405570?term=molnupiravir&draw=2&rank=6 (2021).
144. Touret, F. *et al.* In vitro screening of a FDA approved chemical library reveals potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication. *Sci Rep* **10**, 13093 (2020).
145. Riva, L. *et al.* Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature* **586**, 113–119 (2020).
146. Touret, F. *et al.* Preclinical evaluation of Imatinib does not support its use as an antiviral drug against SARS-CoV-2. *Antiviral Res* **193**, 105137 (2021).
147. Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A. & Wagstaff, K. M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* **178**, 104787 (2020).
148. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* **30**, 269–271 (2020).
149. Zhang, J. *et al. Teicoplanin potently blocks the cell entry of 2019-nCoV*. http://biorxiv.org /lookup/doi/10.1101/2020.02.05.935387 (2020) doi:10.1101/2020.02.05.935387.
150. Valle, C. *et al.* Drugs against SARS-CoV -2: What do we know about their mode of action? *Rev Med Virol* **30**, 1–10 (2020).
151. Tummino, T. A. *et al.* Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2. *Science* eabi4708 (2021) doi:10.1126/science.abi4708.
152. Shiraki, K. & Daikoku, T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacology & Therapeutics* **209**, 107512 (2020).
153. Naesens, L. *et al.* Role of Human Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase in Activation of the Antiviral Agent T-705 (Favipiravir). *Mol Pharmacol* **84**, 615–629 (2013).
154. Furuta, Y. *et al.* Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus. *AAC* **49**, 981–986 (2005).
155. Jin, Z., Smith, L. K., Rajwanshi, V. K., Kim, B. & Deval, J. The Ambiguous Base-Pairing and High Substrate Efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5′-Triphosphate towards Influenza A Virus Polymerase. *PLoS ONE* **8**, e68347 (2013).

156. Goldhill, D. H. *et al.* Determining the Mutation Bias of Favipiravir in Influenza Virus Using Next-Generation Sequencing. *J Virol* **93**, e01217-18, /jvi/93/2/JVI.01217-18.atom (2018).
157. Perales, C. & Domingo, E. Antiviral Strategies Based on Lethal Mutagenesis and Error Threshold. in *Quasispecies: From Theory to Experimental Systems* (eds. Domingo, E. & Schuster, P.) vol. 392 323–339 (Springer International Publishing, 2015).
158. Furuta, Y., Komeno, T. & Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **93**, 449–463 (2017).
159. Jeon, S. *et al.* Identification of antiviral drug candidates against SARS-CoV-2 from FDA-approved drugs. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00819-20, aac;AAC.00819-20v1 (2020) doi:10.1128/AAC.00819-20.
160. Espy, N. *et al.* T-705 induces lethal mutagenesis in Ebola and Marburg populations in macaques. *Antiviral Research* **170**, 104529 (2019).
161. Hawman, D. W. *et al.* Efficacy of favipiravir (T-705) against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in cynomolgus macaques. *Antiviral Research* **181**, 104858 (2020).
162. Rosenke, K. *et al.* Use of Favipiravir to Treat Lassa Virus Infection in Macaques. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1696–1699 (2018).
163. Driouich, J.-S. *et al.* Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun* **12**, 1735 (2021).
164. Kaptein, S. J. F. *et al.* Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2−infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 26955–26965 (2020).
165. Bixler, S. L. *et al.* Efficacy of favipiravir (T-705) in nonhuman primates infected with Ebola virus or Marburg virus. *Antiviral Research* **151**, 97–104 (2018).
166. Bixler, S. L. *et al.* Intracellular conversion and in vivo dose response of favipiravir (T-705) in rodents infected with Ebola virus. *Antiviral Research* **151**, 50–54 (2018).
167. Gowen, B. B. *et al.* In Vitro and In Vivo Activities of T-705 against Arenavirus and Bunyavirus Infections. *AAC* **51**, 3168–3176 (2007).
168. Tani, H. *et al.* Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere* **1**, sph0047, e00061-15 (2016).
169. Oestereich, L. *et al.* Evaluation of Antiviral Efficacy of Ribavirin, Arbidol, and T-705 (Favipiravir) in a Mouse Model for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2804 (2014).
170. Caroline, A. L. *et al.* Broad Spectrum Antiviral Activity of Favipiravir (T-705): Protection from Highly Lethal Inhalational Rift Valley Fever. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2790 (2014).
171. Dawes, B. E. *et al.* Favipiravir (T-705) protects against Nipah virus infection in the hamster model. *Sci Rep* **8**, 7604 (2018).
172. Jochmans, D. *et al.* Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against a Broad Range of Paramyxoviruses *In Vitro* and against Human Metapneumovirus in Hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4620–4629 (2016).
173. Takahashi, K. *et al. In Vitro* and *in Vivo* Activities of T-705 and Oseltamivir against Influenza Virus. *Antivir Chem Chemother* **14**, 235–241 (2003).
174. Fang, Q.-Q. *et al.* Effectiveness of favipiravir (T-705) against wild-type and oseltamivir-resistant influenza B virus in mice. *Virology* **545**, 1–9 (2020).
175. Bricker, T. L. *et al.* Therapeutic efficacy of favipiravir against Bourbon virus in mice. *PLoS Pathog* **15**, e1007790 (2019).
176. Gowen, B. B. *et al.* Favipiravir (T-705) Inhibits Junín Virus Infection and Reduces

Mortality in a Guinea Pig Model of Argentine Hemorrhagic Fever. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2614 (2013).
177. Mendenhall, M. *et al.* Effective Oral Favipiravir (T-705) Therapy Initiated after the Onset of Clinical Disease in a Model of Arenavirus Hemorrhagic Fever. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1342 (2011).
178. Banyard, A. C. *et al.* Re-evaluating the effect of Favipiravir treatment on rabies virus infection. *Vaccine* **37**, 4686–4693 (2019).
179. Yamada, K. *et al.* Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus using in vivo imaging analysis. *Antiviral Research* **172**, 104641 (2019).
180. Segura Guerrero, N. A., Sharma, S., Neyts, J. & Kaptein, S. J. F. Favipiravir inhibits in vitro Usutu virus replication and delays disease progression in an infection model in mice. *Antiviral Research* **160**, 137–142 (2018).
181. Julander, J. G., Shafer, K., Smee, D. F., Morrey, J. D. & Furuta, Y. Activity of T-705 in a Hamster Model of Yellow Fever Virus Infection in Comparison with That of a Chemically Related Compound, T-1106. *AAC* **53**, 202–209 (2009).
182. Arias, A., Thorne, L. & Goodfellow, I. Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo. *eLife* **3**, e03679 (2014).
183. McKimm-Breschkin, J. L. & Fry, A. M. Meeting report: 4th ISIRV antiviral group conference: Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses. *Antiviral Research* **129**, 21–38 (2016).
184. McKimm-Breschkin, J. L. *et al.* Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Research* **149**, 118–142 (2018).
185. Takashita, E. *et al.* Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. *Antiviral Research* **132**, 170–177 (2016).
186. Leone, S. Objectif 2 : Prévenir/Les survivants. 2.
187. Bai, C.-Q. *et al.* Clinical and Virological Characteristics of Ebola Virus Disease Patients Treated With Favipiravir (T-705)—Sierra Leone, 2014. *Clin Infect Dis.* **63**, 1288–1294 (2016).
188. Sissoko, D. *et al.* Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med* **13**, e1001967 (2016).
189. Kerber, R. *et al.* Laboratory Findings, Compassionate Use of Favipiravir, and Outcome in Patients With Ebola Virus Disease, Guinea, 2015—A Retrospective Observational Study. *The Journal of Infectious Diseases* **220**, 195–202 (2019).
190. Madelain, V. *et al.* Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet* **55**, 907–923 (2016).
191. Mentré, F. *et al.* Dose regimen of favipiravir for Ebola virus disease. *The Lancet Infectious Diseases* **15**, 150–151 (2015).
192. Toyama pharmaceutical Co. Toyama Chemicals. Summary of product characteristics of Avigan (unpublished reference).
193. Pilkington, V., Pepperrell, T. & Hill, A. A review of the safety of favipiravir – a potential treatment in the COVID-19 pandemic? *Journal of Virus Eradication* **6**, 45–51 (2020).
194. Kaur, R. J. *et al.* Favipiravir Use in COVID-19: Analysis of Suspected Adverse Drug Events Reported in the WHO Database. *IDR* **Volume 13**, 4427–4438 (2020).
195. Ninove, L. *et al.* RNA and DNA Bacteriophages as Molecular Diagnosis Controls in Clinical Virology: A Comprehensive Study of More than 45,000 Routine PCR Tests. *PLoS ONE* **6**, e16142 (2011).
196. Reed, L. J. & Muench, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT

ENDPOINTS12. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493–497 (1938).
197. Baranovich, T. *et al.* T-705 (Favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses In Vitro. *Journal of Virology* **87**, 3741–3751 (2013).
198. Sangawa, H. *et al.* Mechanism of Action of T-705 Ribosyl Triphosphate against Influenza Virus RNA Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5202–5208 (2013).
199. Shannon, A. *et al. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase*. http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.15.098731 (2020) doi:10. 1101/2020.05.15.098731.
200. Escribano-Romero, E., Jiménez de Oya, N., Domingo, E. & Saiz, J. C. Extinction of West Nile Virus by Favipiravir through Lethal Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e01400-17, e01400-17 (2017).
201. Guedj, J. *et al.* Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques. *PLoS Med* **15**, e1002535 (2018).
202. Arias, A., Thorne, L. & Goodfellow, I. Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo. *eLife* **3**, e03679 (2014).
203. Cuevas, J. M., Domingo-Calap, P. & Sanjuán, R. The Fitness Effects of Synonymous Mutations in DNA and RNA Viruses. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 17–20 (2012).
204. Yoshimoto, F. K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. 19.
205. Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B. & Imbert, I. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Research* **194**, 90–99 (2014).
206. Goldhill, D. H. *et al.* The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 11613–11618 (2018).
207. Goldhill, D. H. *et al.* Favipiravir-resistant influenza A virus shows potential for transmission. *PLoS Pathog* **17**, e1008937 (2021).
208. Morawska, L. & Milton, D. K. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis* **71**, 2311–2313 (2020).
209. Dabbous, H. M. *et al.* Efficacy of favipiravir in COVID-19 treatment: a multi-center randomized study. *Arch Virol* **166**, 949–954 (2021).
210. Doi, Y. *et al.* A Prospective, Randomized, Open-Label Trial of Early versus Late Favipiravir Therapy in Hospitalized Patients with COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, (2020).
211. Udwadia, Z. F. *et al.* Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *International Journal of Infectious Diseases* **103**, 62–71 (2021).
212. Irie, K. *et al.* Pharmacokinetics of Favipiravir in Critically Ill Patients With COVID-19. *Clin Transl Sci* cts.12827 (2020) doi:10.1111/cts.12827.
213. Gallego, I. *et al.* Synergistic Lethal Mutagenesis of Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, (2019).
214. Checkmahomed, L. *et al.* In Vitro Combinations of Baloxavir Acid and Other Inhibitors against Seasonal Influenza A Viruses. *Viruses* **12**, 1139 (2020).

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12