

Mémoire de fin d'études

**Modulation de l'interaction SARS-CoV-2 SpikeRBD/ACE2
par des produits naturels**

Présenté par : **Jason FAUQUET**

En vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Pharmaceutiques.

Promoteur :	Professeur Pierre Duez	UMONS
Travail encadré par	PhD student Julie Carette	UMONS
Jury	Professeur Carmen Burtea	UMONS
	Professeur Fleur Wolff	ULB/UMONS

Remerciements

Je tiens à remercier mon promoteur, le Professeur Pierre Duez, chef du service de Chimie thérapeutique et Pharmacognosie de l'UMons, pour m'avoir accueilli, encadré et apporté sa précieuse aide tout au long de ce travail ; mais également Amandine Nachtergaele ainsi que Claudio Palmieri pour leur grande aide au laboratoire.

Je voudrais remercier Julie Carette pour m'avoir introduit au domaine de la recherche ces 2 dernières années. Julie, sache que c'est une expérience que je n'oublierai jamais, tant elle m'a été sympathique et enrichissante. Tu es géniale, c'est un véritable plaisir d'avoir pu apprendre à tes côtés.

Je remercie l'ensemble des doctorants et mémorants du service pour leur sympathie et leur aide.

Un énorme merci à mes parents et ma copine qui, tant bien que mal, m'ont soutenu ces derniers mois, et plus largement, ces dernières années. Merci de m'avoir aidé à me dépasser et survivre malgré ce parcours du combattant que représente ces études.

Enfin, j'adresse un remerciement tout particulier à Mme. Burtéa et Mme. Wolff pour le temps consacré à la lecture et l'évaluation de mon mémoire.

Résumé :

L'interaction entre les protéines SARS-CoV-2 SpikeRBD et ACE2 est une étape cruciale dans l'infection des cellules hôtes. Sans elle, tout le mécanisme d'entrée du virion est compromis. Le but de cette étude est de moduler cette interaction grâce à l'action de produits naturels prometteurs. Pour ce faire, le Dimensionnement diffusional microfluidique (*Microfluidic Diffusional Sizing*), une nouvelle technique, est employée. Celle-ci nous permettra, dans un premier temps, de mesurer l'interaction régissant le complexe protéique via la mesure de la constante de dissociation (K_d). Et, dans un second temps, de moduler cette interaction à l'aide de divers produits naturels. Cette seconde étape consiste à modifier le rayon hydrodynamique (R_h) du complexe protéique, dont chacune des protéines est présente en quantité équimolaire. A l'issue de cette étude, 5 des 9 produits naturels testés présentent une activité modulatoire : (i) L'extrait méthanolique d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd, (ii) l'ivermectine, (iii) la naringénine, (iv) la quercétine, (v) l'extrait éthanolique de racines de rhubarbe. Ceci nous a permis d'établir des perspectives d'étude de ces derniers ou de substance apparentées.

Abstract :

The interaction between SARS-CoV-2 SpikeRBD and ACE2 proteins is a crucial step in host cell infection. Without it, the entire virion input mechanism is compromised. The aim of this study is to modulate this interaction through the action of promising natural products. To do this, the Microfluidic Diffusional Sizing, a new technique, is used. This will first allow us to measure the interaction governing the protein complex via the measurement of the dissociation constant (K_d). And, in a second step, to modulate this interaction using various natural products. This second step involves modifying the hydrodynamic radius (R_h) of the protein complex, each of which is present in equimolar quantities. At the end of this study, 5 of the 9 natural products tested have modulatory activity: (i) *Chenopodium quinoa* Willd seed envelope methanol extract, (ii) ivermectin, (iii) naringenin, (iv) quercetin, (v) Ethanolic extract of rhubarb roots. This allowed us to establish perspectives for the study of these or related substances.

Table des matières :

REMERCIEMENTS :	2
RESUME :	3
ABSTRACT :	3
TABLE DES MATIERES :	4
TABLE DES FIGURES :	6
TABLE DES ABRÉVIATIONS :	7
1 MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE :	9
1.1 INTRODUCTION DE QUELQUES NOTIONS DE VIROLOGIE ET PHARMACOLOGIE	9
1.2 LE VIRUS : SARS-CoV-2	11
1.2.1 Données virologiques et épidémiologiques du SARS-CoV-2	11
1.2.2 Description du virus	12
1.2.2.1 Structure génomique du SARS-CoV-2 et homologie avec le SARS-CoV	12
1.2.2.2 Détails de la protéine Spike (Protéine S)	13
1.2.3 Description du récepteur : L'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine (ACE2)	15
1.2.3.1 Structure et fonction de l'ACE2	15
1.2.3.2 Rôle de l'ACE2 dans l'orage de cytokine	17
1.2.4 Cycle de vie du virus	18
1.3 INTERACTION SPIKERBD-ACE2	20
1.3.1 Les interactions protéine-protéine	20
1.3.2 La constante de dissociation (K_d), un moyen de quantifier	20
1.3.3 Quelques méthodes classiques de mesure de l'affinité protéine-protéine	22
1.3.3.1 Méthodes requérant la fixation d'un des partenaires sur une surface	22
1.3.3.2 Méthodes ne requérant pas la fixation de l'un des partenaires sur une surface	26
1.3.3.3 Avantages/inconvénients des diverses méthodes	30
1.3.4 Structure du complexe SpikeRBD-ACE2	34
1.3.5 Molécules ayant un potentiel modulateur de l'interaction SpikeRBD-ACE2	35
2 OBJECTIF DU TRAVAIL	45
3 PARTIE EXPERIMENTALE	46
3.1 MATERIEL ET METHODE	46
3.1.1 Réactifs, consommables, machine et logiciels	46
3.1.1.1 Réactif et consommables	46
3.1.1.2 L'appareil de MDS – Fluidity One-W Serum	46
3.1.1.3 Simulateur, logiciels d'analyse, convertisseur et guides	48
3.1.2 Marquage de la protéine SpikeRBD par Alexa Fluor™	48
3.1.3 Développement de la méthode – Elaboration du « protocole général »	50
3.1.3.1 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans du PBS-T ; à 0°C	50
3.1.3.2 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à température ambiante.	51
3.1.4 Extraction méthanolique de la poudre micronisée d'enveloppes de graines de <i>Chenopodium quinoa Willd.</i>	54
3.1.4.1 Modulation de l'interaction par des produits naturels	54
3.2 RESULTATS ET DISCUSSION	63
3.2.1 Développement de la méthode	63
3.2.1.1 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans du PBS-T ; à 0°C	63
3.2.1.2 Quantification de la modulation du R_h par un produit naturel – Développement du protocole avec un flavonoïde, la quercétine	65
3.2.1.3 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à température ambiante	67
3.2.1.4 « Protocole général »	69
3.2.1.5 Analyse statistique des résultats	69

3.2.2	<i>Validation de la méthode</i>	70
3.2.2.1	Sélectivité/spécificité	70
3.2.2.2	Exactitude (justesse).....	71
3.2.2.3	Précision (fidélité).....	72
3.2.2.4	Linéarité.....	74
3.2.2.5	Reproductibilité	75
3.2.3	<i>Application de la méthode</i>	78
3.2.3.1	Comparaison des contrôles et ajustement des résultats	78
3.2.3.2	La quercétine	79
3.2.3.3	La naringénine	80
3.2.3.4	La naringine	80
3.2.3.5	L'ivermectine	81
3.2.3.6	La chloroquine	82
3.2.3.7	L'érythromycine	83
3.2.3.8	Extrait sec éthanolique de rhubarbe (racines)	84
3.2.3.9	Extrait sec méthanolique de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. (enveloppes de graines)	85
3.2.3.10	Extrait sec de <i>Ginkgo biloba</i> L. (feuilles)	87
3.2.3.11	Comparaison de l'efficacité des produits naturels et extraits testés	88
3.2.3.12	Discussion	89
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	91
5	BIBLIOGRAPHIE	92
6	ANNEXES	105
6.1	ANNEXE 1 : DETAILS SUR LA SPIKE ET LES 2 SOUS-DOMAINES DE RBD.....	105
6.2	ANNEXE 2 : L'ACE2.....	107
6.3	ANNEXE 3 : LES SAPONINES DE <i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD.....	109
6.4	ANNEXE 4 : LA STRUCTURE DU VIRION DE SARS-COV-2	110
7	GRILLES D'ÉVALUATION	111

Table des figures :

FIGURE 1 : SCHEMA D'UNE ENDOCYTOSE CLATHRINE MEDIEE	10
FIGURE 2 : LIGNE DU TEMPS REPRESENTANT LES DIFFERENTES DECOUVERTES MAJEURES LIEES AUX CORONAVIRUS	11
FIGURE 3 : STRUCTURES GÉNOMIQUES DE SARS-COV-2 ET SARS-COV.....	13
FIGURE 4 : A) « REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES REGIONS STRUCTURELLES DE LA PROTEINE SPIKE DE SARS-COV-2	14
FIGURE 5 : « STRUCTURE DE L'ACE 2 COMPAREE AVEC L'ACE ET LA COLLECTRINE ».....	16
FIGURE 6 : « ROLE CENTRAL DU SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE DANS L'HOMÉOSTASIE DE LA PRESSION SANGUINE ».....	16
FIGURE 7 : « LA SIGNALISATION IL-6-STAT3 EST UNE CIBLE THERAPEUTIQUE POTENTIELLE POUR LA COVID-19 CAR ELLE EST IMPLIQUEE DANS L'ORAGE DE CYTOKINES ».....	17
FIGURE 8 : CYCLE DE VIE DE SARS-COV-2 DANS LA CELLULE HOTE REPRESENTE EN 12 ETAPES	19
FIGURE 9 : SCHEMATISATION DE L'EXOCYTOSE LYOSOME DESACIDIFIE-DEPENDANTE PRESENTANT LES HYPOTHESES DE DESACIDIFICATION PASSIVE ET ACTIVE	20
FIGURE 10 : COURBE D'AFFINITE SIGMOÏDALE	22
FIGURE 11 : « PLATEFORME BIOSENSEUR DE RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE »	23
FIGURE 12 : LE PRINCIPE DE L'INTERFEROMETRIE EN BIOCOUCHE.....	24
FIGURE 13 : PRINCIPE D'UNE METHODE ELISA.....	25
FIGURE 14 : EXEMPLE D'UNE COURBE DE TITRATION PAR ELISA.....	25
FIGURE 15 : PRINCIPE DE LA TITRATION CALORIMETRIQUE ISOTHERME.....	27
FIGURE 16 : SCHEMA D'UN SYSTEME DE DIMENSIONNEMENT DIFFUSIONNEL MICROFLUIDIQUE (MDS).....	28
FIGURE 17 : « QU'EST-CE QUE LE DIMENSIONNEMENT DIFFUSIONNEL MICROFLUIDIQUE ?.....	28
FIGURE 18 : « CARACTERISTIQUES GENERALES D'UNE COURBE DE SATURATION MESUREE PAR LES SYSTEMES FLUIDITY ONE-W ».....	30
FIGURE 19 : VALEURS INITIALES ET CONTRAINTES UTILISÉES DANS LE LOGICIEL PRISM, GRAPHPAD	30
FIGURE 20 : « STRUCTURE GLOBALE D'UN SARS-COV-2 RBD LIE A L'ACE2 »	34
FIGURE 21 : « INTERFACES SARS-COV-2 RBD-ACE2 ET SARS-COV RBD-ACE2 »	34
FIGURE 22 : A) PHOTOGRAPHIE DU FLUIDITY ONE-W SERUM	46
FIGURE 23 : PHOTOGRAPHIE D'UNE PUCE OU L'EMPLACEMENT DU PIEDESTAL EST INDIQUE	47
FIGURE 24 : REACTION DE CONJUGAISON D'UN ESTER SUCCIMIDYLIQUE AVEC UNE AMINE PRIMAIRE.....	48
FIGURE 25 : COURBE D'AFFINITE SIMULEE. [SPIKERBD] = 5 nM. [ACE2] = 180 pM-750 nM	63
FIGURE 26 : DETERMINATION K_D SPIKERBD (5 nM)/ACE2 – 0°C	64
FIGURE 27 : COURBE D'AFFINITE SIMULEE. [SPIKERBD] = 20 nM. [ACE2] = 180 pM-750 nM	67
FIGURE 28 : DETERMINATION K_D SPIKERBD (20 nM)/ ACE2 – DMSO 1 % v/v – T° AMBIANTE.....	68
FIGURE 29 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + QUERCETINE.....	69
FIGURE 30 : ELECTROPHÉROGRAMMES DES 3 ECHANTILLONS	70
FIGURE 31 : DETERMINATION K_D SPIKERBD (5 nM)/ ACE2 – (1 PUCE = 1 COURBE)	77
FIGURE 32 : ANOVA : CONTRÔLES DES TESTS COMPARÉS AU « CONTRÔLE DE LA MÉTHODE »	78
FIGURE 33 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + NARINGENINE	80
FIGURE 34 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + NARINGINE.....	81
FIGURE 35 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + IVERMECTINE	81
FIGURE 36 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + CHLOROQUINE	82
FIGURE 37 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + ERYTHROMYCINE	83
FIGURE 38 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + EXT. SEC ÉTOH RACINES DE RHUBARBE.....	84
FIGURE 39 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + EXT. SEC MeOH CHENOPODIUM QUINOA WILLD. (ENVELOPPES DE GRAINES)	85
FIGURE 40 : SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + EXT. SEC GINKGO BILOBA L. (FEUILLES)	87
FIGURE 41 : MODULATION SUR LE R_H DU COMPLEXE SPIKERBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) PAR LES DIFFERENTS PRODUITS NATURELS ET EXTRAITS	88
FIGURE 42 : « MECANISME MOLECULAIRE DE LA FUSION VIRUS-CELLULE MEDIEE PAR LA PROTEINE SPIKE (S).....	106
FIGURE 43 : SCHEMA REPRESENTANT LA FORMATION D'UN SYNCYTIUM GRACE A LA PROTEINE S DU SARS-COV-2	107
FIGURE 44 : MALADIE A CORONAVIRUS – COVID-19 – VOIES METABOLIQUES DE REFERENCES	108
FIGURE 45 : LES 3 TOPOLOGIES DE SAPONINES	109
FIGURE 46 : AGLYCONES DETECTEES DANS L'EXTRAIT DE CHENOPODIUM QUINOA WILLD.....	110
FIGURE 47 : STRUCTURE GENERALE D'UN CORONAVIRUS (VIRION).....	110

Table des abréviations :

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine.

ACE2 : Enzyme 2 de conversion de l'angiotensine.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AEC : Cellules alvéolaires épithéliales.

AECII : Cellules alvéolaires de type 2 de l'épithélium pulmonaire.

AF : Alexa Fluor™ 647.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNi : ARN interférant.

AT1 : Récepteur 1 de l'angiotensine II.

AT2 : Récepteur 2 de l'angiotensine II.

BLI : BioLayer interferometry = Interférométrie en biocouche.

COVID-19 : Maladie à coronavirus 2019.

CTD : Domaine C-terminal

Cryo-EM : Microscopie électronique cryogénique.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

EC₅₀ : Concentration efficace médiane.

ELISA : Test d'immuno-absorption enzymatique

ERGIC : Compartiment intermédiaire Reticulum endoplasmique-Golgi.

FDS : Flow diffusional sizing = Dimensionnement diffusionnel dépendant du débit.

HPLC : High performance liquid chromatography = Chromatographie liquide haute performance.

IC₁₀ : Concentration à laquelle 10% des cellules sont mortes.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane.

ITC : Isothermal titration calorimetry = Titration calorimétrique isotherme.

K_d : Constante de dissociation.

L : Ligand.

MDS : Microfluidic diffusional sizing = Dimensionnement diffusionnel microfluidique.

MERS-CoV : Middle East Respiratory Syndrome

NHS Ester : Ester succinimidyle.

NO : Oxyde nitrique.

NTD : Domaine N-terminal

PBS : Phosphate buffer saline = Tampon phosphate salin.

PBS-T : Phosphate buffer saline-Tween 20 = Tampon phosphate salin avec 5 % v/v de Tween 20.

PD : Domaine peptidase.

Protéine S : SARS-CoV-2 Spike = Spike

R : Récepteur.

R² : Coefficient de détermination.

RBD : Receptor binding domaine = Domaine de liaison au récepteur.

RBM : Receptor binding motif = Motif de liaison au récepteur.

RCT : Essai randomisé contrôlé.

R_h : Rayon hydrodynamique.

RTC : Complexe réplication-transcription.

SARS-CoV : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus.

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.

SpikeRBD-ACE2 : Complexe SpikeRBD-ACE2.

SPR : Surface plasmon resonance = Résonance plasmonique de surface.

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone.

TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2.

[x] : Concentration de « x ».

1 Mise au point bibliographique :

1.1 Notions de base de virologie

Avant toutes choses, il est nécessaire de préciser quelques notions utiles à la bonne compréhension de ce manuscrit.

- « Virus » vs « Virion »

Un virus est particule inerte dont le génome constitué est d'un seul type d'acide nucléique, ADN ou ARN. C'est une usine à virions puisqu'il possède toute l'information à sa réplication mais, étant un parasite obligatoire, il nécessite l'utilisation du matériel génétique et de la machinerie enzymatique de la cellule hôte afin de se répliquer. Le terme « virus » correspond à la phase intracellulaire de l'infection. Un virus doit être capable de coder pour des constituants viraux (enzymes, protéines de structure, protéines non-structurales, etc...) non présents à la base dans la cellule hôte. Une partie de ces constituants s'auto-assemblera afin de constituer le virion (Martiny, 2019; Willey et al., 2020).

Un virion est le produit final du développement d'un virus, c'est la particule virale mature. Il est constitué de 2 éléments : (i) le génome viral : ADN ou ARN. (ii) la capsid : protéines de structures. Il n'est capable ni de croissance, ni de reproduction. Seul son matériel génétique lui permet de se reproduire après entrée dans la cellule hôte (stade de virus). Le terme « virion » correspond à la phase extracellulaire, infectieuse. Une analogie souvent employée compare le virus à un homme et le virion à un spermatozoïde (Martiny, 2019; Willey et al., 2020).

- Les différents types d'acides nucléiques

L'acide nucléique peut être de 2 types : ADN ou ARN. Il peut être simple ou double brin (mono/bicaténaire). Concernant les virus simple brin, ils peuvent être en 2 types : (i) De polarité positive (brin sens) ; cela signifie que la séquence génomique est identique à l'ARN messager. (ii) De polarité négative ; la séquence génomique est alors complémentaire à l'ARN messager (Martiny, 2019; Willey et al., 2020).

- « Virus nu » vs « Virus enveloppé »

Un virus est dit « nu » lorsque son virion est constitué uniquement de son génome et de sa capsid, et se libère de la cellule hôte par lyse cellulaire. Un virus est dit « enveloppé » lorsque son virion est constitué de son génome, sa capsid et une membrane composée de lipides/glucides/protéines. Il se libère de la cellule hôte par un bourgeonnement suivi d'une

lyse cellulaire. Cette enveloppe, issue de la membrane plasmique/nucléique de la cellule, rend les virus enveloppés plus fragile que les virus nus, les lipides qu'elle contient étant sensibles aux détergents, à la température et aux changements de pH. L'ensemble génome-capside est appelé « nucléocapside » (Martiny, 2019; Willey et al., 2020).

- « Ectodomaine »

C'est le domaine extracellulaire d'une protéine qui, dans le cas d'un virion, joue un rôle essentiel dans les voies de signalisations car il permet d'initier le contact avec la cellule hôte (Wrapp et al., 2020). Dans le cas de certains virus, cet ectodomaine permet de former des syncytia (pluriel de syncytium : « Masse de cytoplasme limitée par une membrane, comportant plusieurs noyaux, obtenue par fusion de plusieurs cellules ».(Larousse, 2022a)) (Rajah et al., 2022).

- « Endocytose clathrine-médiée »

Ce type d'endocytose a lieu lors d'une endocytose médiée par un récepteur membranaire et est décrit dans la figure suivante :

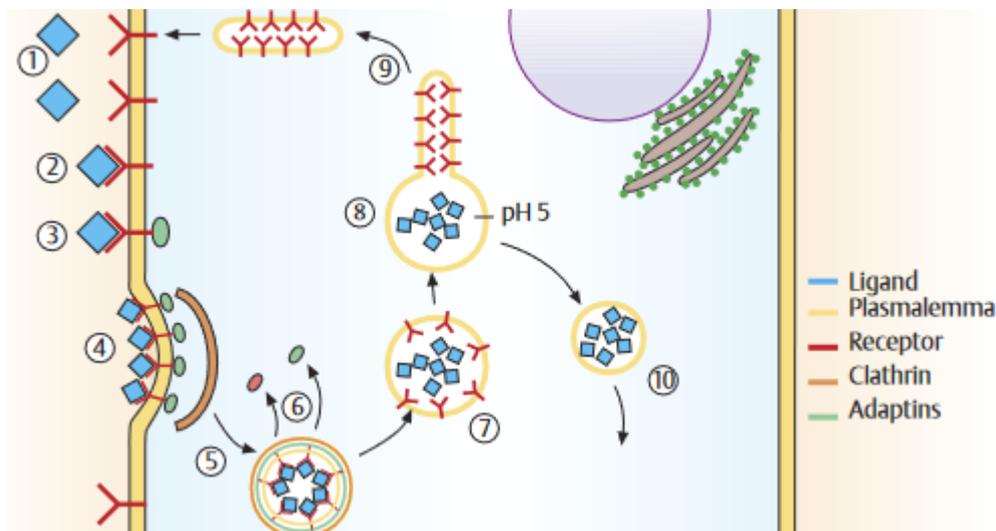


Figure 1 : Schéma d'une endocytose clathrine médiée. D'après (Lüllmann et al., 2005). (1-2) Liaison du ligand au récepteur membranaire. (3) Les domaines intracellulaires de ce dernier sont en contact avec des adaptines. (4) Il y a migration et regroupement des complexes Ligand-récepteur par un processus dépendant de la clathrine. (5) Il y a invagination de la membrane pour former une vésicule. (6) Il y a excrétion de l'adaptine et de la clathrine de la vésicule. (7) Un endosome précoce est ainsi formé. (8) Le pH à l'intérieur de celui-ci va diminuer par augmentation de la concentration de protons. Il y a alors dissociation des complexes Ligand-Récepteur et évacuation de l'endosome d'un bout de membrane porteuse des récepteurs. (9) Celui-ci va ensuite retourner à la surface de la cellule. (10) L'endosome formé va délivrer son contenu aux organites cibles.

1.2 Le virus : SARS-CoV-2

1.2.1 Données virologiques et épidémiologiques du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) est un virus à ARN simple-

Royaume	<i>Riboviria</i>
Ordre	<i>Nidovirales</i>
Sous-ordre	<i>Cornidovirineae</i>
Famille	<i>Coronaviridae</i>
Sous-famille	<i>Orthocoronavirinae</i>
Genre	<i>Betacoronavirus</i>
Sous-genre	<i>Sarbecovirus</i>
Espèce	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARSr-CoV)</i>
Individu	<i>SARS-CoV-2</i>

brin positif enveloppé dont les premiers cas d'infection à l'homme ont été découverts en décembre 2019 dans la ville de Wuhan, en Chine. La maladie causée par ce virus est appelée COVID-19. Il fait partie des coronavirus, un groupe de virus à ARN constituant la sous-famille des *Orthocoronavirinae*. Les coronavirus ont un diamètre compris entre 60 et 140 nm (Kadam et al., 2021).

Tableau 1 : Taxonomie du SARS-CoV-2. D'après (Gorbalenya et al., 2020)

Depuis la découverte, en 1931, du premier coronavirus, plusieurs d'entre eux se sont avérés infecter l'homme (Figure 2). Pourtant, la majorité de ces virus sont connus pour infecter les oiseaux ou encore des espèces mammifères comme le bétail et les animaux de compagnie. Trois des coronavirus ayant l'homme pour hôte ont frappé au cours des 20 dernières années. Premièrement, le SARS-CoV, en 2002, responsable de 8000 cas pour une mortalité de 10 %. Ensuite, le MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome*), en 2012 avec 2500 cas et une mortalité de 36 %. Et enfin le SARS-CoV-2, depuis 2019, qui se propage bien plus vite que les autres (V'kovski et al., 2021). Effectivement, en date du 19 décembre 2021, il était déjà responsable de plus de 270 millions de cas pour un total de 5,3 millions de décès à travers le monde, ce qui représente un taux de mortalité d'environ 2 % (World Health Organization, 2020)

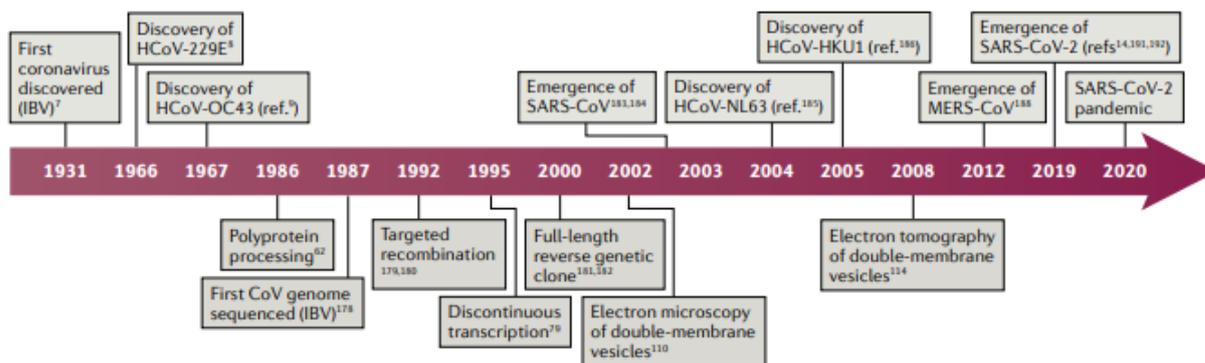


Figure 2 : Ligne du temps représentant les différentes découvertes majeures liées aux Coronavirus. (V'kovski et al., 2021)

La transmission du SARS-CoV-2 se fait principalement par voie respiratoire (Meyerowitz et al., 2021) de deux façons différentes : (i) Par gouttelettes respiratoires ayant une portée allant jusqu'à 1,8 m. (ii) Par aérosol ayant une portée allant jusqu'à 7-8 m (Salian et al., 2021). La proximité des individus augmentant les risques de contamination laisse suggérer que le transport du virus par aérosol est toutefois moins important que celui par gouttelettes (Meyerowitz et al., 2021). La transmission peut avoir lieu dès lors qu'une personne, même en bonne santé, rentre en contact avec une personne infectée ou tout objet que celle-ci a touché (Yesudhas et al., 2021). Il est possible de réduire les risques de contamination en appliquant des gestes barrières comme : le lavage régulier des mains, le port du masque, la ventilation des espaces clos (Meyerowitz et al., 2021), la distance de 2 mètres entre 2 individus, etc... (World Health Organization, 2021). La période d'incubation est, en moyenne de 5 à 6 jours mais peut s'étendre jusqu'à 14 jours (Dhouib et al., 2021; World Health Organization, 2021). En ce qui concerne la période d'infectiosité, période où un individu peut transmettre le virus, des études sur des sujets immunocompétents montrent que celle-ci commencerait 2 à 3 jours avant l'apparition des symptômes avec un pic de contamination la veille. Cette période durerait jusqu'à 8 jours après l'apparition des symptômes, malgré une charge virale¹, encore détectable au niveau du nasopharynx jusqu'au 22^{ème} jour dans les cas légers, voire jusqu'à parfois 2 mois dans les cas graves (Meyerowitz et al., 2021).

1.2.2 Description du virus

1.2.2.1 Structure génomique du SARS-CoV-2 et homologie avec le SARS-CoV

Comme le montre la Figure 3, les structures des génomes de SARS-CoV-2 et SARS-CoV sont relativement similaires, avec 78% d'homologie (Koyama et al., 2020).

¹ Charge virale : Nombre de copies du virus.

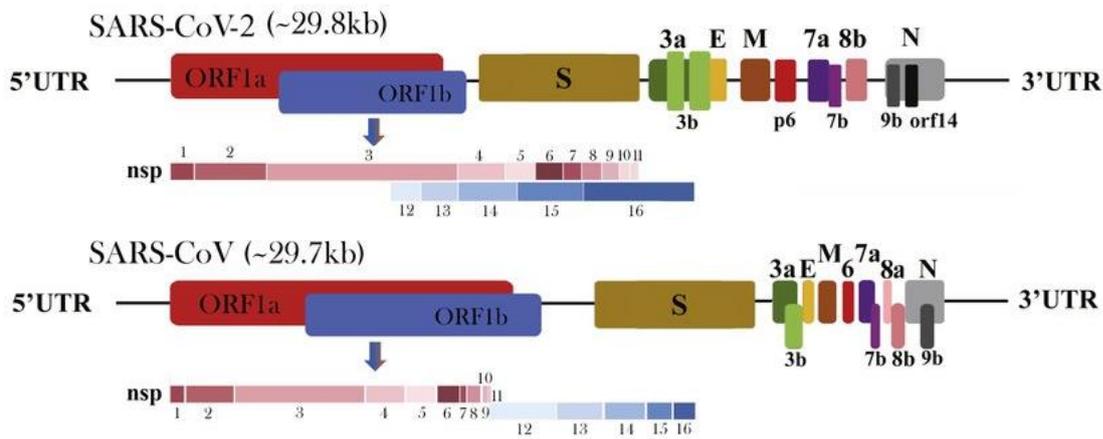


Figure 3 : Structures génomiques de SARS-CoV-2 et SARS-CoV. D'après (Hozhabri et al., 2020). Sens de lecture 5'3'. ORF1a et ORF1b codent pour 2 poly-protéines (pp1a et pp1ab), des répliquases qui seront divisées par 2 cystéines protéases, nsp 3 = Papain-like protéase (PLpro) et nsp 5 (3CLpro, aussi nommée Mpro) (Arya et al., 2021; Kadam et al., 2021), pour donner lieu à 16 protéines non structurales (Nsp 1-16) telles que des protéases, hélicases, etc... impliquées dans la transcription et la réplication du virus. Les terminaisons 3' des génomes de SARS-CoV-2 et SARS-CoV contiennent des protéines accessoires, 3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b, orf14 et 3a,3b, p6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b, respectivement. Enfin, S, E, M, N ; codent respectivement pour la protéine Spike (S), l'enveloppe (E), la membrane (M) et la nucléocapside (N). UTR : Région non traduite. ORF : Cadre de lecture ouvert. (Giovanetti et al., 2021; Hozhabri et al., 2020; Rehman et al., 2021)

1.2.2.2 Détails de la protéine Spike (Protéine S)

La protéine Spike, exprimée à la surface du virion, assure la liaison aux cellules hôtes en interagissant avec le récepteur membranaire, l'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine (ACE2), ce qui permet l'entrée du virus. C'est une glycoprotéine transmembranaire, de 1273 acides aminés (Figure 4a) (Zhang et al., 2021b), homotrimérique, formant des pointes à la surface de la membrane virale ; le virus semble entouré d'une couronne, d'où le terme « CORONA » (couronne en latin) (Yesudhas et al., 2021). La protéine S est segmentée en 3 parties : Une queue cytoplasmique, une région transmembranaire, et un grand ectodomaine. Ce dernier a des sous domaines S1 et S2 qui, respectivement, vont se lier à ACE 2 en agissant comme antigène majeur de surface, et fusionner la membrane virale avec celle de la cellule hôte lors de l'entrée du virus (Kadam et al., 2021).

- Les différents domaines de Spike

La Figure 4a détaille les différents domaines structuraux de la SARS-CoV-2 spike. Il est à noter qu'outre sa fonction dans l'entrée du virion dans la cellule, Spike entre dans la formation de syncytia², ce qui permet au virus de se propager d'une cellule atteinte à une cellule saine adjacente.

² Détails complémentaires en annexe 1.

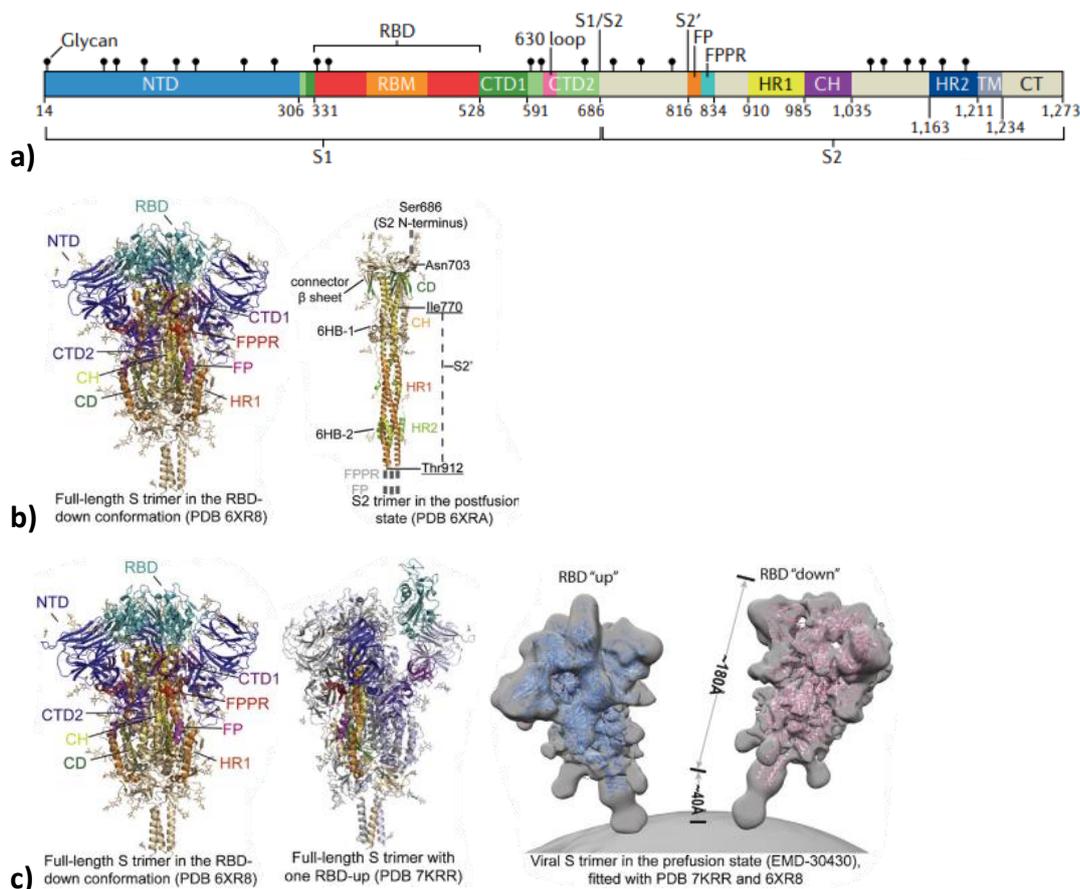


Figure 4 : a) « Représentation schématique des régions structurales de la protéine spike de SARS-CoV-2. Les domaine composant les segments S1 et S2 sont les suivant : Domaine N-terminal (NTD) ; Domaine de liaison au récepteur (RBD) avec son motif de liaison (RBM) ; Domain C-terminal 1 (CTD1) ; Domain C-terminal 2 (CTD2) ; Sites de clivage (S1/S2 et S2') ; Peptide de fusion (FP) ; Région proximale du peptide de fusion (FPPR) ; Répétition d'heptapeptide 1 (HR1) ; Région de l'hélice centrale (CH) ; Domaine connecteur (CD) ; Répétition d'heptapeptide 2 (HR2) ; Domaine transmembranaire (TM) ; Queue cytoplasmique (CT) ; Les glycolisations sont représentées par les symboles en forme de points.» (Jackson et al., 2022). b) A gauche : Trimère dans l'état de pré-fusion (PBD ID : 6XR8). A droite : Trimère dans l'état de post-fusion (PBD ID : 6XRA). c) A gauche : Trimère avec tous ses RBD ayant la conformation « down » (PBD ID : 6XR8). Au centre : Trimer avec un RBD ayant la conformation « up » (PBD ID : 7KRR). A droite : Comparaison entre les deux conformation précitée (PBD ID : 7KRR et 6XR8) (Zhang et al., 2021b).

La microscopie cryo-électronique (cryo-EM) a permis de différencier des conformations de pré-fusion et de post-fusion pour le trimère de la protéine S (Figure 4b).

Le domaine N-terminal (NTD) pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance des glycosylations durant l'initiation de l'attachement, mais aussi dans la reconnaissance du récepteur et dans les transitions entre les différentes conformations de Spike (Rajah et al., 2022). Les domaines C-terminaux de S1 (CTD1 et 2) pourraient, quant à eux, jouer un rôle dans le réarrangement structural lors de la fusion en modulant NTD, S2 et le domaine de liaison au récepteur (RBD) (Zhang et al., 2021b).

- Le domaine de liaison au récepteur (RBD)³

Le RBD contient 2 sous-domaines dont le motif de liaison au récepteur (RBM) qui permet tous les points de contact avec ACE 2 (Jackson et al., 2022). Dans l'état de pré-fusion (Figure 4b et Figure 4c), un RBD est présent au sommet de chaque monomère de la protéine S, et donc le trimère présente 3 RBD disposés de façon adjacente. Il est à noter que 22 N-glycosylations sont présentes sur chaque monomère (Ke et al., 2020; Zhang et al., 2021b). Chacun des RBD peut présenter 2 conformations distinctes (Figure 4c) : (i) « *Up* ». (ii) « *Down* ». Dans la conformation « *Down* », ils sont posés à plat et empêchent l'accès au site de liaison. Dans la conformation « *Up* », un ou plusieurs RBD se lèvent et permettent l'exposition du site de liaison (Ke et al., 2020). Lorsqu'un des RBD, en position « *Up* » se lie au récepteur (ACE2), les 2 autres se lèvent et se lient également à celui-ci (Rajah et al., 2022).

1.2.3 Description du récepteur : L'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine (ACE2)

1.2.3.1 Structure et fonction de l'ACE2⁴

L'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine, un vasoconstricteur endogène, est une glycoprotéine transmembranaire à activité monocarboxypeptidase de type I constituée de 805 acides aminés (Figure 5) (Wiese et al., 2021). C'est le récepteur membranaire de la SARS-CoV-2 Spike. ACE2 est exprimée dans de nombreux tissus, mais de manière plus importante dans les reins, le cœur, les cellules alvéolaires de l'épithélium pulmonaire, les testicules et le tractus gastrointestinal (Wiese et al., 2021) ; 83 % des cellules exprimant ACE2 sont des cellules alvéolaires de type 2 de l'épithélium pulmonaire (AECII) (Zhang et al., 2020, p. 2)

ACE2 est structurée en 2 parties (Figure 5) : (i) La première moitié, du côté N-terminal, à activité métallopeptidase (cofacteur = zinc), contient un motif de liaison homologue à celui de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). (ii) La seconde moitié, du côté C-terminal, partage une certaine homologie avec la collectrine, une protéine transmembranaire rénale régulant les protéines de transport d'acides aminés (Jackson et al., 2022) et ayant un rôle dans le transport vésiculaire et les fusions membranaire (Wiese et al., 2021)).

³ Détails complémentaires en annexe 1.

⁴ Détails complémentaires en annexe 2.

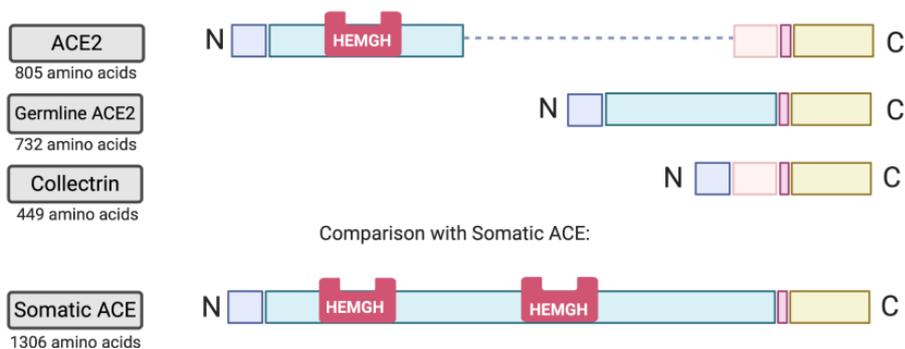


Figure 5 : « Structure de l'ACE 2 comparée avec l'ACE et la Collectrine. HEMGH illustre les motifs de liaison au zinc – Le site actif de la protéine. » (Wiese et al., 2021).

ACE2 participe, physiologiquement, au système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) (Figure 6) (Wiese et al., 2021). Il y a 2 voies possibles dans ce système. Dans la première, la voie « protectrice », l'angiotensine (1-7) va se lier aux récepteurs AT2 et MAS du SRAA en induisant divers effets protecteurs, dont la synthèse de NO, ainsi que des effets antifibrotiques et anti-inflammatoires. Dans la seconde voie, la « voie classique », c'est l'inverse, l'Angiotensine II se lie sur le récepteur AT1 pour conduire à des effet vasoconstricteur et pro-inflammatoire. En situation physiologique, ces 2 voies sont en équilibre (Wiese et al., 2021).

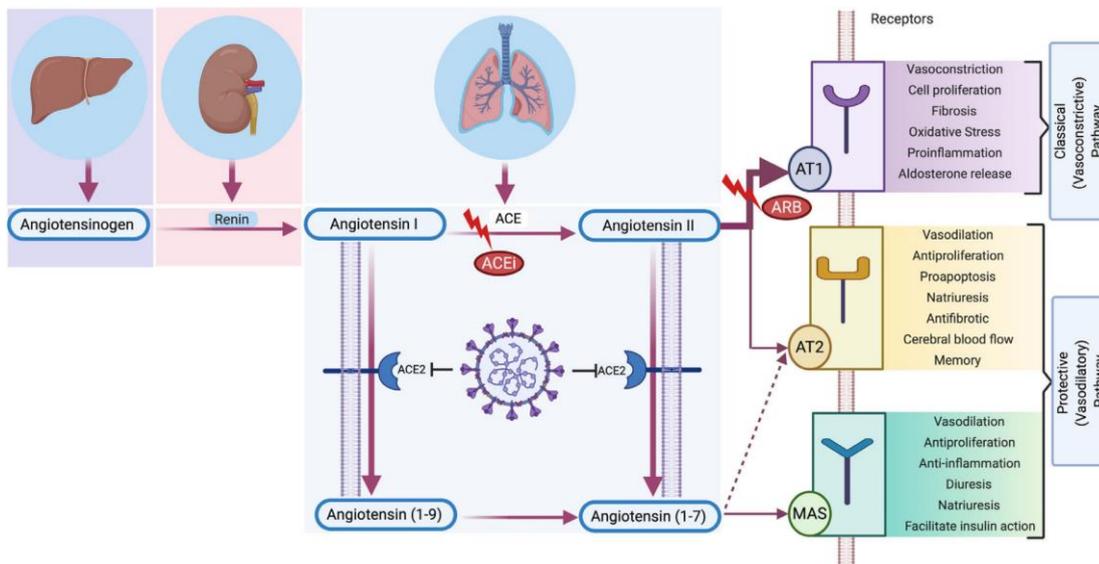


Figure 6 : « Rôle central du système rénine-angiotensine dans l'homéostasie de la pression sanguine. Le système en cascade implique de nombreuses enzymes et récepteurs. L'angiotensinogène produit par le foie est converti en angiotensine I (Ang I) par la rénine sécrétée par les reins. ACE2 est important dans la conversion de Ang I en angiotensine (1-9) et de l'angiotensine II (Ang II) en angiotensine (1-7). Ang II et angiotensine (1-7) exercent leurs actions en se liant aux récepteurs AT1, AT2 et MAS. ACEi, inhibiteur d'ACE ; AT1, angiotensine 1 ; AT2, angiotensine 2 ; ARB, inhibiteurs du récepteur à l'angiotensine 2. » (Wiese et al., 2021).

1.2.3.2 Rôle de l'ACE2 dans l'orage de cytokine⁵

À la suite de l'interaction SARS-CoV-2 Spike-ACE2, le rôle de l'ACE 2 dans le SRAA est entravé car l'enzyme ne peut plus accueillir son substrat naturel, ce qui contribue à la sévérité de la maladie en brisant l'équilibre physiologique en faveur de la « voie classique » du SRAA. Ce déséquilibre amène à la suractivation de la voie de signalisation du NF-κB dans la signalisation IL-6-STAT3 (Figure 7), ce qui permet d'expliquer l'orage cytokinique observé chez de nombreux patients infectés par le SARS-CoV-2 (Hojoyo et al., 2020; Kanehisa Laboratories, 2021).

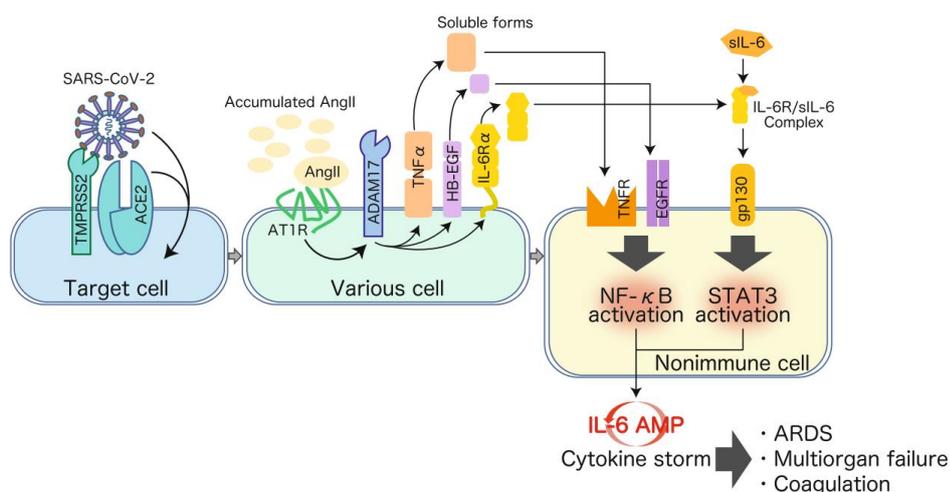


Figure 7 : « La signalisation IL-6-STAT3 est une cible thérapeutique potentielle pour la COVID-19 car elle est impliquée dans l'orage de cytokines. Lors de l'infection, les récepteurs toll-like sont activés par reconnaissance des profils moléculaires du virus. Cette activation induit la production, entre autres d'IL-6 par les macrophages (Kanehisa Laboratories, 2021), suivie de l'activation de la voie du NF-κB dans les cellules immunitaires et non-immunitaires, ce qui provoque une réponse inflammatoire. D'autre part, l'accumulation de Ang II due à l'activité réduite d'ACE 2 induit, via AT1R, l'activation de ADAM 10 et 17, ce qui résulte en la production de TNF-α, sIL-6α, et EGF qui initient les voies de signalisation TNFR-NF-κB, IL-6R-STAT3, et EGF-NF-κB. Par conséquent, les cascades inflammatoires concomitantes de NF-κB et STAT3 augmentent encore l'activité NF-κB et établissent un circuit inflammatoire. L'amplificateur IL-6 (IL-6 AMP) décrit une boucle de rétroaction positive inflammatoire, dans les cellules non immunitaires. L'orage de cytokines causée et l'hyperactivation inflammatoire peuvent causer des symptômes mortels, tels qu'un syndrome de détresse respiratoire aigüe, une grave pneumonie, une insuffisance multiviscérale, une coagulation excessive. » (Hojoyo et al., 2020).

⁵ Détails complémentaires en annexe 2.

1.2.4 Cycle de vie du virus

Comme nous le montre la Figure 8, le cycle de vie du SARS-CoV-2 peut être décomposé en 12 étapes. Nous ne détaillerons ici que l'entrée du virus, les étapes 1 et 2.

L'éctodomaine de la protéine Spike se lie avec le domaine peptidase (PD) de l'ACE 2 ; Spike est alors activée par clivage par des protéases en S2' et en S1/S2 (Figure 4). Le virus peut entrer dans la cellule par 2 voies :

- 2a) Par fusion directe entre son enveloppe et la membrane cellulaire : Des clivages en S1/S2 et S2' sont essentiels à l'initiation du processus de fusion membranaire (Jackson et al., 2022). Ainsi cette voie est majoritairement empruntée par les virions ayant subi un clivage en S1/S2 dans la cellule productrice par la furine⁶, une endoprotéase de la famille des proprotéine convertases (String consortium, 2022; Tang et al., 2021). Toutefois, la TMPRSS2 est elle-même capable de réaliser celui-ci, s'il n'a pas eu lieu (van Breemen et al., 2022). Dans les deux cas, la TMPRSS2 clivera ensuite en S2' permettant ainsi la fusion directe.
- 2b) Par endocytose clathrine-médiée (Jackson et al., 2022) : Spike est alors clivée en S2' par des cathepsines, des cystéine protéases endosomales, (V'kovski et al., 2021; Yesudhas et al., 2021), essentiellement la cathepsine L (Jackson et al., 2022) ; et en S1/S2 par la furine (Rajah et al., 2022; Salian et al., 2021). Dans cette voie, les cathepsines substituent alors TMPRSS2 (Salian et al., 2021). Cette voie est majoritairement empruntée par les virions n'ayant pas subi de clivage par la furine en S1/S2 dans la cellule hôte productrice (Tang et al., 2021).

⁶ Normalement, lors de la maturation dans le compartiment intermédiaire (Réticulum endoplasmique-Golgi ERGIC) de la cellule productrice du virion, Spike subit un clivage en S1/S2 à un site polybasique (Arg-Arg-Ala-Arg) par la furine. Malgré ce clivage S1 et S2 restent cependant associés de façon non-covalente (Jackson et al., 2022).

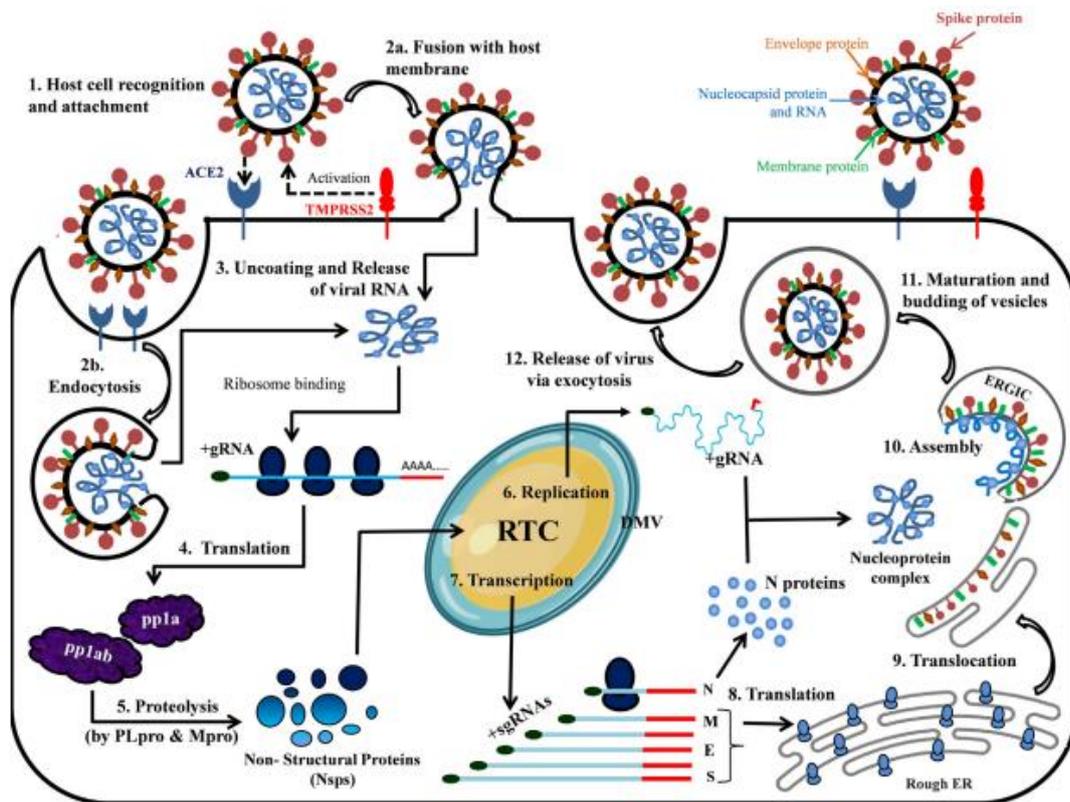


Figure 8 : Cycle de vie de SARS-CoV-2 dans la cellule hôte représenté en 12 étapes. D'après (Arya et al., 2021). 1) Fixation de la Spike à l'ACE2 et clivage ; 2a) Entrée du virion par fusion directe ; 2b) Entrée du virus par endocytose clathrine-médiée ; 3) Déballage et libération dans le cytoplasme de l'ARN (+) génomique (+gRNA) ; 4) Traduction par les ribosomes de l'hôte et expression des polyprotéines pp1a et pp1b ; 5) Protéolyse des polyprotéines en 16 nsp, dont 15 (nsp 2-16) qui formeront le complexe de réplication et transcription (RTC), après assemblage avec d'autres facteurs. Les nsp 12-16 portent l'activité enzymatique, tandis que les nsp 2-11 jouent un rôle de soutien du RTC. Ensuite, le brin d'ARN (+) est répliqué en un brin d'ARN (-). Ce dernier est ensuite utilisé de 2 façons : (i) Pour être répliqué en brin d'ARN (+) génomique, prêt à l'assemblage d'un nouveau virion (+gRNA).(6) ,ou (ii) pour la transcription d'ARN messager sous génomique (+sgRNAs). (7). 8) Traduction de ces derniers en protéines structurales (S,N,E,M) et accessoires. Tandis que S, M, et E, vont dans le réticulum endoplasmique (ER). N va former le complexe de la nucléoprotéine en s'assemblant avec le +gRNA ; 9-11) Translocation des protéine structurales dans un compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC) et assemblage avec le complexe de la nucléoprotéine pour former le virion. Celui-ci va alors mûrir et bourgeonner sous la forme d'une vésicule ; 12) Cette vésicule passe à travers la membrane cellulaire et le virion est libéré. Il peut alors infecter d'autres cellules (Arya et al., 2021).

Bien que ce modèle du cycle de vie (Figure 8) semble majoritairement accepté, il existe une hypothèse selon laquelle les étapes 9 à 12 pourraient se dérouler autrement. Il se pourrait en effet que, une fois le virion assemblé, son exocytose puisse être dépendante de lysosomes désacidifiés (Figure 9) (Rajah et al., 2022; X. Wang et al., 2021). Or, une fois désacidifiés, les lysosomes ne peuvent plus effectuer leurs tâches correctement, ne pouvant plus procéder au traitement de diverses protéases et à la présentation d'antigène sur les cellules présentatrices, le système immunitaire en est affecté (X. Wang et al., 2021). Certains pensent que cette désacidification pourrait être causée par un mécanisme de la cellule hôte afin de faire sortir les virions pour soulager la pression virale. D'autres pensent qu'elle serait due à l'action de protéines virales (X. Wang et al., 2021).

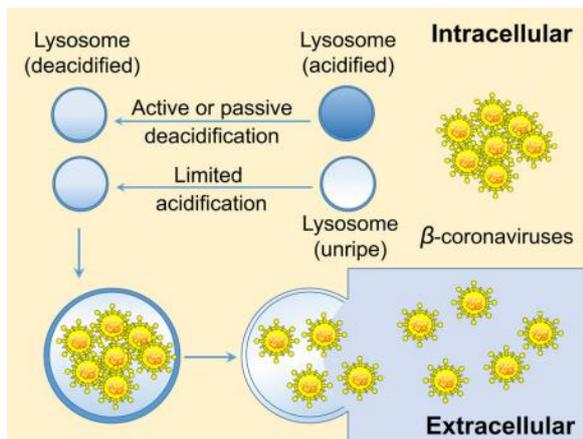


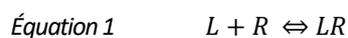
Figure 9 : Schématisation de l'exocytose lysosome désacidifié-dépendante présentant les hypothèses de désacidification passive et active. (X. Wang et al., 2021).

1.3 Interaction SpikeRBD-ACE2

1.3.1 Les interactions protéine-protéine

Les protéines, dans leurs rôles de ligands et messagers se retrouvent dans diverses voies de signalisation, médiée par des interactions spécifiques. L'interaction, la liaison, entre 2 protéines est un phénomène dépendant notamment de la concentration des deux partenaires (Hunter and Cochran, 2016).

L'interaction entre 2 protéines peut être décrite par l'Équation 1 :



Où L représente le ligand ; R, le récepteur ; LR le complexe entre le ligand et le récepteur. (Hunter and Cochran, 2016).

1.3.2 La constante de dissociation (K_d), un moyen de quantifier

Afin d'évaluer les propriétés de liaison entre un ligand et son récepteur, la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) est employée (Ma et al., 2018). Celle-ci détermine le niveau d'affinité entre les deux intervenants. Une réaction de liaison consiste en un équilibre dynamique entre les états lié et non liés. Deux constantes de vitesses, k_{on} et k_{off} , respectivement exprimées en $M^{-1}s^{-1}$ et s^{-1} , permettent de décrire la réaction. L'équilibre réactionnel est atteint lorsque [L], [R] et [LR] sont stables et que, par conséquent, les taux d'associations et de dissociations (respectivement, $k_{on}[L][R]$ et $k_{off}[LR]$) sont égaux :



Un réarrangement de l'Équation 2 permet d'obtenir la constante d'association à l'équilibre (K_a) (exprimée en M^{-1}) décrite dans l'Équation 3:

$$\text{Équation 3} \quad \frac{[LR]}{[L][R]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = K_a$$

Cela dit, généralement, les réactions de liaison sont exprimées en termes de réaction de dissociation plutôt que d'association. Le K_d (exprimé en M), qui n'est autre que l'inverse du K_a (Équation 4) sera donc communément utilisé (Hunter and Cochran, 2016).

$$\text{Équation 4} \quad \frac{1}{K_a} = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d$$

Plus le K_d est petit, plus l'affinité entre le ligand et le récepteur est grande.

L'Équation 4 peut également s'écrire comme ceci :

$$\text{Équation 5} \quad \frac{1}{K_a} = \frac{[L_f][R_f]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d$$

Où f indique l'état libre du récepteur et du ligand. A partir de là, introduire $[R]_t$, qui est la concentration totale des récepteurs liés (LR) ou non (R_f) (Équation 6) donne alors l'Équation 7:

$$\text{Équation 6} \quad [R]_t = [LR] + [R_f]$$

$$\text{Équation 7} \quad \frac{([R]_t - [LR]) * [L_f]}{[LR]} = K_d$$

L'Équation 8 introduit Y , le taux de saturation des récepteurs :

$$\text{Équation 8} \quad Y = \frac{[LR]}{[R]_t}$$

Ce taux est dépendant de $[L_f]$, ce qui donne donc l'Équation 9 :

$$\text{Équation 9} \quad \frac{[LR]}{[R]_t} = Y = \frac{[L_f]}{[L_f] + K_d}$$

De cette équation ressort une relation hyperbolique. Une courbe d'affinité sigmoïdale (Figure 10) permet ainsi de représenter l'interaction ligand-récepteur où les points représentent $[LR]$ comme une fonction de $[L_f]$. Le K_d peut ainsi être dérivé de cette courbe comme étant $[L_f]$ à la moitié du taux de saturation des récepteurs (Eble, 2018).

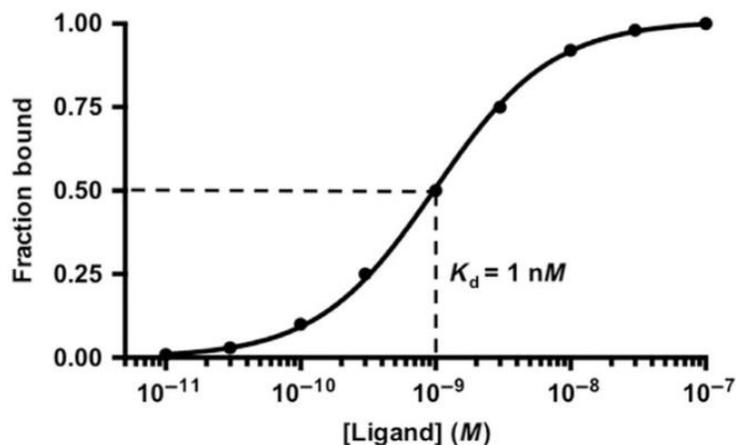


Figure 10 : Courbe d'affinité sigmoïdale. Fraction liée en fonction de la concentration en ligand. Le K_d étant la concentration en ligand lorsque le taux de saturation des récepteurs est de 50%. D'après (Hunter and Cochran, 2016).

1.3.3 Quelques méthodes classiques de mesure de l'affinité protéine-protéine

Différentes techniques permettent de mesurer l'affinité entre un ligand et son récepteur et de déterminer ainsi leur K_d . Ce manuscrit abordera d'abord quelques techniques largement utilisées à travers la littérature, souvent basées sur la fixation de l'un des 2 partenaires sur une surface. Ensuite, il abordera d'autres techniques, plus récentes, ne nécessitant pas cette fixation. D'autres méthodes comme l'*Oblique-incidence reflectivity difference* (OI-RD) (Liu et al., 2015), la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Teilum et al., 2017), la spectrométrie de masse (MS) (Hopper and Robinson, 2014), le dichroïsme circulaire (CD) (Siligardi et al., 2014), l'électrophorèse capillaire d'affinité (Lewis et al., 2004), la thermophorèse microscopique (MST) (Gudim et al., 2017), etc... peuvent également être appliquées mais elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit car elles sont relativement peu fréquentes.

1.3.3.1 Méthodes requérant la fixation d'un des partenaires sur une surface

- La résonance plasmonique de surface (SPR)

« En physique, le plasma décrit un état de la matière constitué de particules chargées (d'ions et d'électrons). » (Techno-Science, 2022). « Les plasmons de surface sont des oscillations quantifiées de plasma, ils existent à l'interface entre un milieu métallique, le plus souvent un métal noble, et un milieu diélectrique. » (Caucheteur, 2014).

Un système SPR (Figure 11a) est composé d'un ligand, immobilisé sur une surface matricielle composée de dextran, et pouvant interagir avec l'analyte d'intérêt. Cette matrice repose sur une couche d'or reposant elle-même sur une surface en verre, un prisme. Un faisceau lumineux incident est envoyé selon un angle critique sur la surface en or, ce qui va générer

des plasmons de surface. A travers une cellule d'analyse, un flux de tampon va transporter les analytes vers le ligand afin qu'ils interagissent avec ce dernier. Lors de cette interaction, l'indice de réfraction proche de la surface va être modifié, ce qui se répercute sur la valeur de l'angle critique, dont la mesure reflète donc la modification de concentration massique en analyte proche de la surface. Lorsque l'analyte interagit avec le ligand, cela modifie également la résonance des plasmons de surface. Un sensorgramme, graphique représentant la variation des unités de résonance (RU) au fil du temps, permet de représenter le phénomène (Kumar, 2017). Aucun marquage de l'analyte n'est requis avec cette méthode. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 11b, un sensorgramme est composé de différentes phases importantes permettant de déterminer le K_d (Wong, 2020).

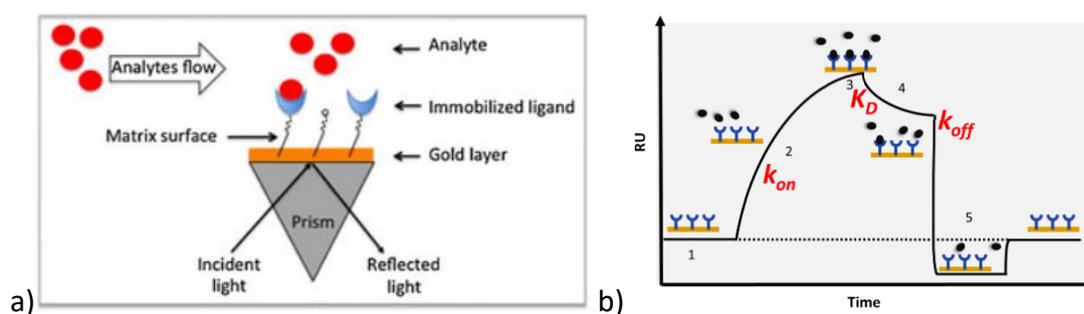


Figure 11 : « Plateforme biosenseur de résonance plasmonique de surface. a) Système biosenseur SPR ». D'après (Kumar, 2017). b) Un sensorgramme typique. Les constantes on/off (k_{on}/k_{off}) peuvent être déterminées à partir des différentes parties d'un sensorgramme et la constante de dissociation (K_d) peut être déterminée par le rapport k_{off}/k_{on} . 1) Ligne de base, 2) Association, 3) Etat d'équilibre, 4) Dissociation, 5) Régénération. RU représente les unités de résonance (Wong, 2020).

- L'interférométrie en biocouche (BLI)

La BLI quantifie les interactions analyte-ligand en mesurant les variations dans les schémas d'interférence d'une lumière blanche réfléchi par 2 surfaces, en mesurant donc le décalage de longueur d'onde au cours du temps nécessaire pour que la lumière blanche puisse se refléter sur la 2ème surface malgré un allongement du trajet optique, qui est ici dû à un épaissement d'une biocouche (Figure 12 a et b). Dans les faits, le ligand est d'abord attaché sur une biocouche présente à l'extrémité d'une fibre optique. La lumière blanche traversant cette fibre pour se refléter sur la biocouche. Cela va créer un certain schéma d'interférence capté par un photodétecteur, ce qui va constituer la ligne de base de la mesure. La fibre va ensuite être plongée dans un tampon où l'analyte est présent. Plus l'analyte se liera au ligand, plus l'épaisseur de la biocouche augmentera et plus le schéma d'interférence sera modifié, et donc plus grand sera le décalage de longueur d'onde. Les Figure 12a et b, nous aident à visualiser le phénomène. La Figure 12c nous montre les phases d'association et de dissociation

permettant respectivement d'obtenir le k_{on} et le k_{off} . Le K_d peut ensuite être déterminé (Wilson et al., 2010).

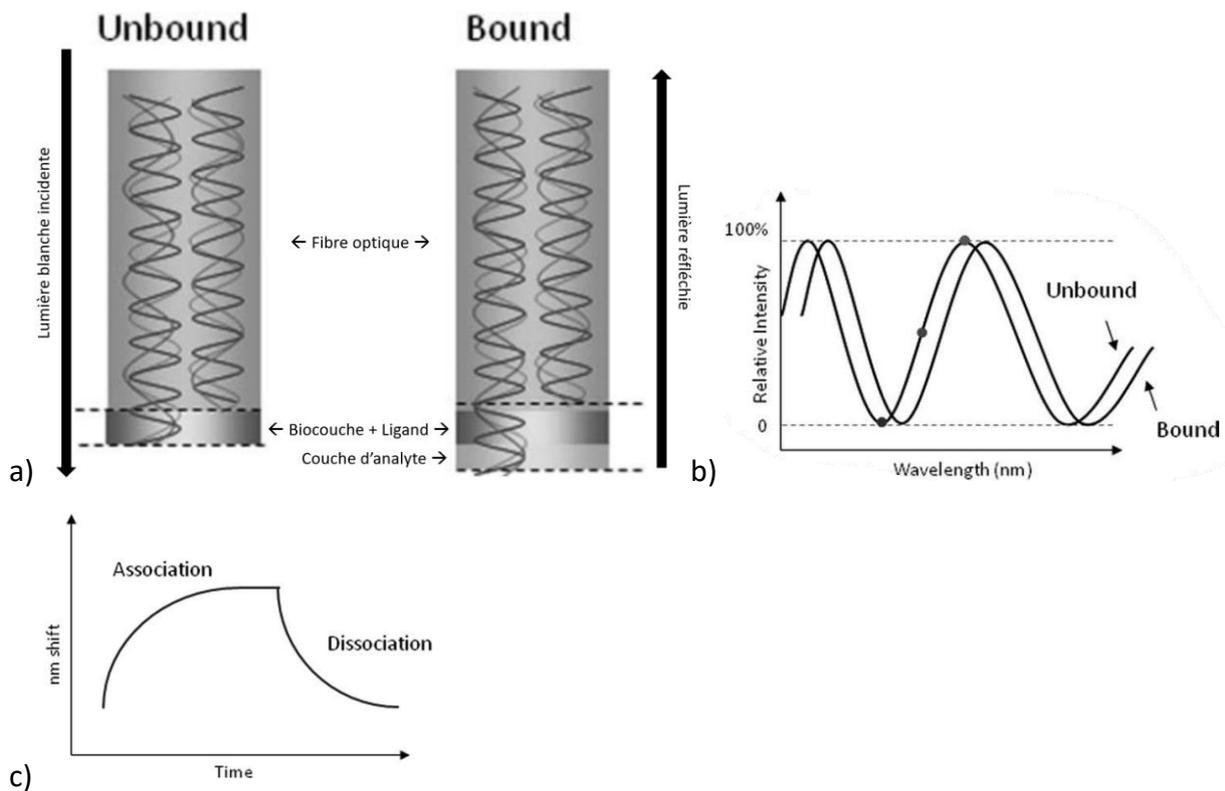


Figure 12 : Le principe de l'interférométrie en biocouche. D'après (Wilson et al., 2010). a) A gauche, fibre optique avec le ligand attaché sur la biocouche. A droite, fibre optique avec le ligand attaché à la biocouche et l'analyte lié au ligand. b) Graphique de l'intensité relative du signal par rapport à la longueur d'onde. Celui-ci indiquant un décalage de longueur d'onde entre l'état « non lié » où l'analyte n'a pas encore interagi avec le ligand ; et l'état « lié » où l'analyte a interagi avec le ligand. c) Graphique du décalage de longueur d'onde en fonction du temps. La phase d'association se passe quand l'analyte est mis en présence du ligand attaché à la biocouche de la fibre optique, et la phase de dissociation se déroule lorsque la fibre optique est ensuite placée dans un tampon où l'analyte n'est pas présent.

- La titration par immuno-absorption enzymatique (Titration ELISA)

Ce système est composé d'un récepteur étant adsorbé par des interactions hydrophobes sur une plaque 96 puits, et d'un ligand en solution. La concentration du récepteur est constante, tandis que celle du ligand varie. La fraction liée du ligand au récepteur possède des propriétés biophysiques différentes de la fraction non-liée et est quantifiable par des méthodes spectrales ou une détection antigénique.

Pour ce faire, après liaison au récepteur, la fraction non-liée du ligand est enlevée par rinçage. Afin de prévenir toute dissociation du complexe lors des futures opérations, du glutaraldéhyde est alors employé pour fixer de manière définitive le ligand au récepteur. Un rinçage va ensuite être réalisé avec un tampon TRIS afin d'inactiver les fonctions aldéhydes pouvant réagir avec les anticorps employés ci-après. Un anticorps lié à une enzyme vient donc prendre en sandwich le ligand (Figure 13), et un substrat est ajouté afin d'obtenir un produit de réaction

coloré détectable en spectrophotométrie. Cela donne une densité optique (OD), signal S qui est fonction de la concentration totale de ligand ajouté au départ (L_t) (Eble, 2018).

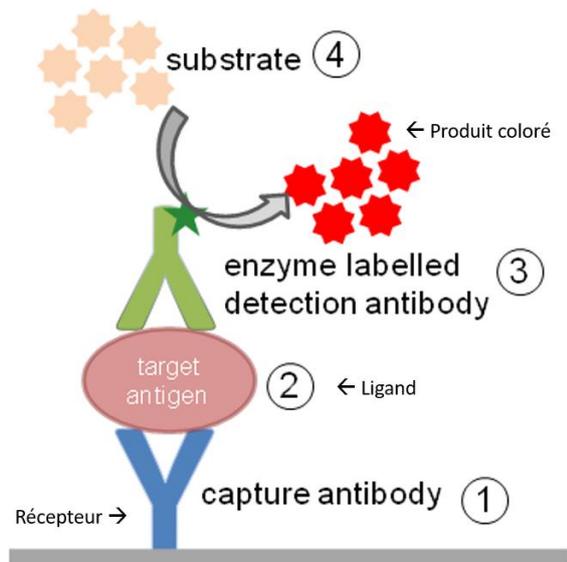


Figure 13 : Principe d'une méthode ELISA. D'après (Horlock, 2022)

Lors de la mise en graphique de la DO en fonction de la concentration en ligand, une sigmoïde est obtenue (Figure 14).

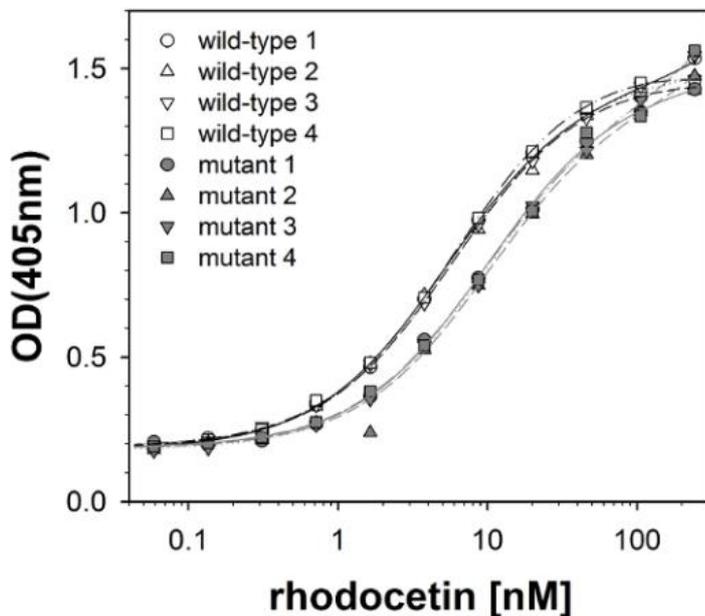


Figure 14 : Exemple d'une courbe de titration par ELISA. Densité optique à 405 nm en fonction de la concentration en rhodocétine. L'intégrine- α 2A est employées comme récepteurs sous 8 formes différentes. D'après (Eble, 2018)

Celle-ci décrit la saturation du récepteur par le ligand. Le K_d est calculable par application de la méthode des moindres carrés à l'Équation 10. Les contraintes suivantes sont utilisées : $K_d > 0$; $R > 0$ (Eble, 2018).

$$\text{Équation 10 } S(L_t) = (S_{max} - S_{min}) * \frac{(K_d + R_t + L_t) - \sqrt{(K_d + R_t + L_t)^2 - 4 * R_t * L_t}}{2 * R_t} + S_{min} + B * L_t$$

Où S représente le signal S ; L_t , la concentration totale en ligand de départ ; R_t , la concentration totale en récepteur ; K_d , la constante de dissociation ; B, la pente.

1.3.3.2 Méthodes ne requérant pas la fixation de l'un des partenaires sur une surface

- La titration calorimétrique isotherme (ITC)

Un système ITC (Figure 15) est composé de 2 cellules, une cellule de référence contenant un tampon et une cellule d'échantillonnage contenant un tampon et les récepteurs (biomolécules). Elles sont entourées d'une enveloppe adiabatique (« *imperméable à la chaleur* » (Larousse, 2022b)). Les ligands sont alors injectés dans la cellule d'échantillonnage. En fonction du ligand et du récepteur, leur liaison est décrite par un phénomène endothermique ou exothermique, ce qui induit donc une différence de température ($\Delta T \neq 0$) entre les 2 cellules. Cette différence va être compensée par le système qui va apporter de l'énergie à l'une des 2 cellules grâce à un système de chauffage. L'ITC va donc quantifier l'interaction ligand-récepteur en mesurant l'énergie requise ($\mu\text{cal/sec}$) pour maintenir l'absence de différence de température ($\Delta T = 0$) entre les 2 cellules. Les ligands vont être injectés par vagues au cours du temps. Les récepteurs vont donc être de plus en plus saturés et il y aura de moins en moins d'interaction au fil du temps et des vagues d'injection de ligand. Par conséquent, les changements de température seront eux aussi de moins en moins importants.

Nous pouvons voir que le graphique a l'allure d'une sigmoïde. Après avoir intégré l'aire de tous les pics, il est possible de calculer la pente de la ligne interceptant la phase exponentielle de la courbe isotherme. Cette pente correspond au K_a , transformé en K_d par l'Équation 4 (Saponaro, 2018).

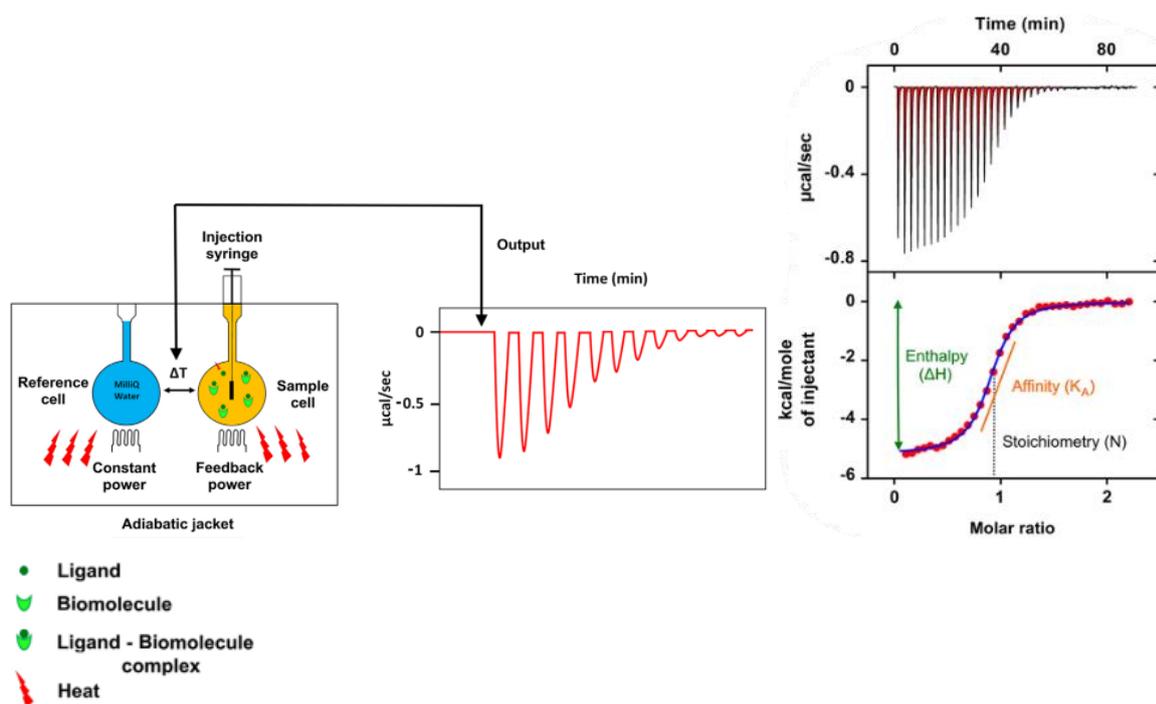


Figure 15 : Principe de la titration calorimétrique isotherme. D'après (Saponaro, 2018).

- Dimensionnement diffusif microfluidique (MDS)
 - Principe de la méthode

La MDS est une méthode quantitative fluorimétrique *in solution*, permettant d'apprécier l'affinité entre un ligand et son récepteur. Comme la Figure 16 l'indique, le système est composé d'une chambre de diffusion où des conditions de flux laminaire règnent. Deux flux traversent cette chambre : (i) Un flux principal dans lequel se trouve un récepteur marqué par une molécule fluorescente. Ce récepteur est en concentration constante et peut, lors de la préparation d'échantillon, être complexé avec une concentration variable de son ligand. (ii) Un flux auxiliaire, composé d'un tampon. Tout au long de la chambre de diffusion, le récepteur marqué, complexé ou non avec son ligand, va migrer du flux principal vers le flux auxiliaire par diffusion. Plus petit sera le récepteur (ou le complexe ligand-récepteur), plus la diffusion sera importante (Figure 17). Une fois arrivé au bout de la chambre de diffusion les deux flux vont être divisés vers deux autres petites chambres (« *diffused chamber* » et « *undiffused chamber* ») où l'intensité de la fluorescence du récepteur marqué va être mesurée. Le rapport de ces intensités va permettre de calculer le rayon hydrodynamique (R_h).

Une version commercialisée de la MDS, le Fluidity One-W Serum (par Fluidic Analytics), utilise en effet le rapport (R) décrit dans l'Équation 11 qu'il va ensuite convertir, grâce à une fonction propriétaire, en un coefficient de diffusion. Ce dernier va ensuite être converti à son tour en une valeur brute du R_h grâce à l'Équation 12. Enfin, une correction de dimensionnement

dépendant du débit (FDS) est appliquée à cette valeur. Cette correction est nécessaire car l'échantillon n'est pas réparti uniformément dans la chambre de détection et la fluorescence mesurée est ainsi affectée par le débit. La valeur finale du R_h est ensuite affichée.

$$\text{Équation 11} \quad R = \frac{\text{Intensité de la fluorescence}_{\text{diffused chamber}} \left(\frac{V}{A}\right)}{\text{Intensité de la fluorescence}_{\text{undiffused chamber}} \left(\frac{V}{A}\right)}$$

Où R est le rapport des signaux d'intensité de fluorescence ; l'intensité de la fluorescence étant exprimée comme suit : $\frac{\text{signal au détecteur (en Volt)}}{\text{courant de la source lumineuse (en Ampère)}}$.

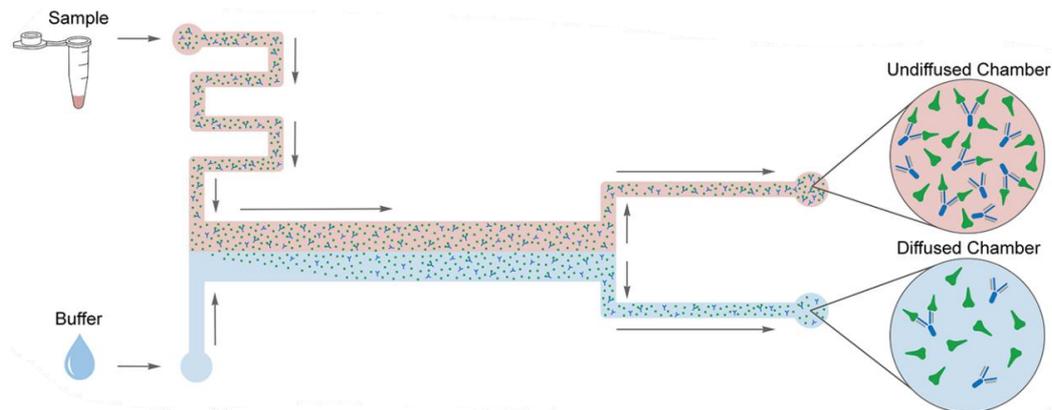


Figure 16 : Schéma d'un système de dimensionnement diffusionnel microfluidique (MDS). Les flèches indiquent le sens du flux. D'après (Fiedler et al., 2021).

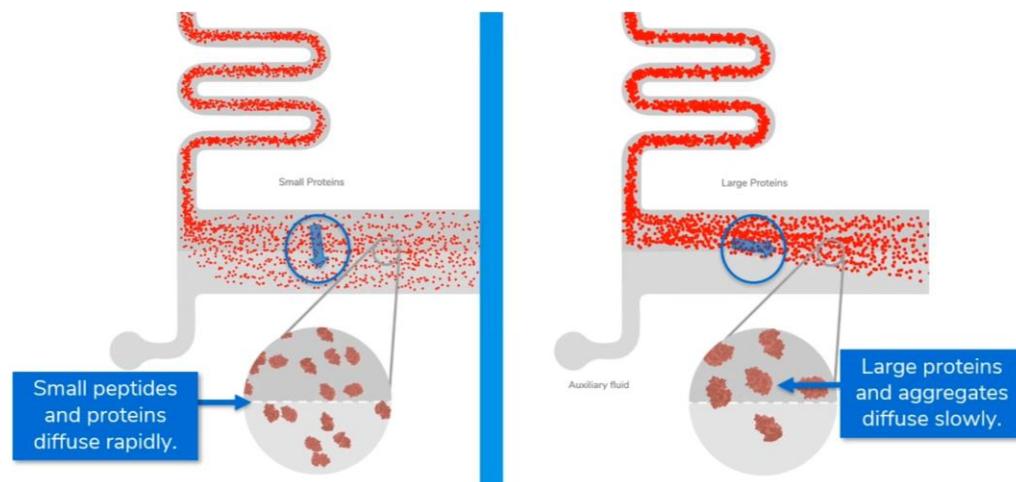


Figure 17 : « Qu'est-ce que le dimensionnement diffusionnel microfluidique ? » D'après (Fluidic Analytics, 2019a).

- Le rayon hydrodynamique (R_h)

Le rayon hydrodynamique n'est autre que le rayon de l'équation de Stokes-Einstein, paramètre utilisé pour calculer le coefficient de diffusion (D) dans un liquide (Équation 12). Le rayon de Stokes d'une protéine est décrit comme étant la taille d'une particule solide sphérique ayant la même vitesse de diffusion que la protéine. Pour les protéines, c'est majoritairement le poids moléculaire qui détermine le R_h mais la forme de la protéine joue

également un rôle important. En effet, si l'on compare la vitesse de diffusion de deux protéines de même poids moléculaire, la première étant correctement repliée, l'autre faiblement, c'est la première qui diffusera le plus rapidement et aura donc un R_h plus petit (Fluidic Analytics, 2021a). Il y a une forte corrélation entre le poids moléculaire d'une protéine et son R_h lorsque la conformation de celle-ci est globulaire. Une structure allongée ou déstructurée avec le même poids moléculaire se traduira par un R_h plus élevé. L'utilisation d'une courbe de calibration basé sur différents standards protéiques de conformation globulaire ayant un poids moléculaire différent est donc une bonne solution pour permettre la conversion du poids moléculaire en R_h et vis-versa. Les micropuces utilisées dans le Fluidity One-W Serum utilisent ce principe (Fluidic Analytics, 2021b).

$$\text{Équation 12} \quad D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Où D est le coefficient de diffusion (m^2/s) ; k est la constante de Boltzmann ; T , la température (K) ; η la viscosité du milieu ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) ; f , le coefficient fractionnel pour une sphère solide dans un milieu visqueux ; R_h , le rayon hydrodynamique (m) (Fluidic Analytics, 2021a).

- Le calcul du K_d

Au cours d'une analyse de l'affinité ligand-récepteur par MDS, le récepteur a une concentration constante et le ligand une concentration variable. En effet, comme nous l'indique la Figure 18, différents échantillons vont être préparés où le ligand sera décliné en une large gamme de concentrations. Les R_h des différents échantillons vont être mesurés. En couvrant une gamme suffisamment large en concentrations de ligand, nous obtenons une courbe, une sigmoïde, décrivant en réalité la saturation du récepteur par le ligand. $R_{h,\text{unbound}}$ correspondant à 0% de liaison et $R_{h,\text{complex}}$ à 100% de liaison.

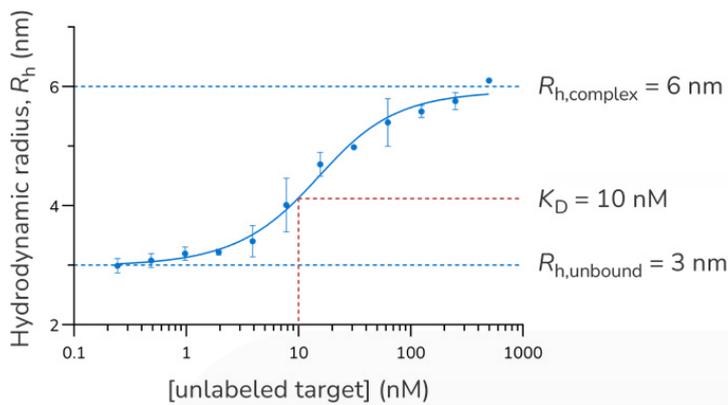


Figure 18 : « Caractéristiques générales d'une courbe de saturation mesurée par les systèmes Fluidity One-W ». D'après (Fluidic Analytics, 2021c). Le $R_{h,unbound} = 3$ nm représente le récepteur marqué seul. Le $R_{h,complex} = 6$ nm représente le complexe ligand-récepteur à saturation. [unlabeled target] représente la concentration du ligand. $K_d = 10$ nM peut être estimé graphiquement car il correspond au point d'inflexion de la courbe.

Une fois la courbe de saturation obtenue, il est possible de calculer le K_d en appliquant un ajustement non linéaire par la méthode des moindres carrés à l'Équation 13 sur le logiciel Prism, GraphPad :

$$\text{Équation 13} \quad y = R_{h,free} + (R_{h,complex} - R_{h,free}) * \frac{(x+n*P+K_d) - \sqrt{(x+n*P+K_d)^2 - 4*n*P*x}}{2*n*P}$$

Où Y est le R_h à l'équilibre ; $R_{h,free}$, le R_h du récepteur marqué seul ; $R_{h,complex}$, le R_h du complexe ligand-récepteur à saturation ; x, la concentration en ligand ; P, la concentration en récepteur marqué ; n, le nombre de site de liaison (Fiedler et al., 2021).

Les valeurs initiales et les contraintes sont décrites dans la Figure 19.

Initial Values

Parameter Name	Initial Value	Rule
Rh_free	1	*YMIN
Rh_complex	1	*YMAX
n	1	(Initial value, to be fit)
P	1	(Initial value, to be fit)
Kd	1	/(Value of X at YMID)

Fix, constrain or share a parameter

Parameter Name	Constraint Type	Value
Rh_free	Must be greater than	0
Rh_complex	Must be greater than	0
n	Constant equal to	2
P	Constant equal to	100
Kd	Must be greater than	0

Figure 19 : Valeurs initiales et contraintes utilisées dans le logiciel Prism, GraphPad. (Valeurs recommandées par la firme Fluidics Analytics).

1.3.3.3 Avantages/inconvénients des diverses méthodes

Le Tableau 2 reprend les avantages et inconvénients des différentes techniques détaillées ci-dessus.

<u>Méthode</u>	<u>Avantages</u>	<u>Inconvénients</u>	<u>Références</u>
<p>SPR</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Automatisation. -Faible consommation d'échantillon. -K_{on} et K_{off} mesurés simultanément. -Equilibre réactionnel non-nécessaire. -La température est contrôlée. -Marquage d'un des partenaires non requis. 	<ul style="list-style-type: none"> -Immobilisation d'un des partenaires sur une surface. -Ne convient pas aux milieux matriciels. -Incapacité à mesurer des K_{on} ou K_{off} trop faibles. -Incapacité à mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs (avec certains appareils). -Liaisons aspécifiques et adsorption de certains ligands à la surface plutôt qu'une liaison sur leur récepteur. -Mesure de l'avidité (\sum forces de liaison d'affinités multiples de divers ligands envers un récepteur) → Une grande avidité sera souvent confondue avec une grande affinité spécifique. -Nécessité de diluer les protéines dans un tampon. -Ajout d'agents bloquants 	<p>(Fluidic Analytics, 2020; Hunter and Cochran, 2016)</p>

<p>BLI</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Capacité à mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs. -Automatisation. -Equilibre réactionnel non-nécessaire. -Marquage d'un des partenaires non requis. 	<ul style="list-style-type: none"> -Coût des biocapteurs. -Le temps d'analyse. -Immobilisation d'un des partenaires sur une surface. -Mesure de l'avidité (Σ forces de liaison d'affinités multiples de divers ligands envers un récepteur) → Une grande avidité sera souvent confondue avec une grande affinité spécifique. -Ne convient pas aux milieux matriciels. -Nécessité de diluer les protéines dans un tampon. -Consommation importante d'échantillon. -Faible reproductibilité. -Liaisons aspécifiques et adsorption de certains ligands à la surface plutôt qu'une liaison sur leur récepteur. 	<p>(Fluidic Analytics, 2020; Weeramange et al., 2020; Wilson et al., 2010; Yang et al., 2016)</p>
<p>Titration ELISA</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Faible consommation d'échantillon (< 100 μL). -Capacité à mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs. -Automatisation -Marquage d'un des partenaires non requis. -Convient aux milieux matriciels. 	<ul style="list-style-type: none"> -Multiples rinçages. -Non-différenciation de la concentration en ligand et de l'affinité pour le récepteur. -Nécessité de diluer les protéines dans un tampon. -Equilibre réactionnel nécessaire. -Immobilisation d'un des partenaires sur une surface. -Ajout d'agents bloquants -Le temps d'analyse. -La fixation au glutaraldéhyde peut modifier la structure du ligand ou du récepteur → Sensibilité impactée. -Adsorption de certains ligands à la surface plutôt qu'une liaison sur leur récepteur. 	<p>(Eble, 2018; Fluidic Analytics, 2020; Weeramange et al., 2020)</p>

<p>ITC</p>	<p>-<i>In solution</i> → Pas d'immobilisation d'un des partenaires sur une surface.</p> <p>-Plus grande liberté conformationnelle des protéines → Structure proche de celle <i>in vivo</i>.</p> <p>-Automatisation</p> <p>-Capacité à mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs.</p> <p>-Grande sensibilité (~2 pM)</p> <p>-Marquage d'un des partenaires non requis.</p> <p>-Possibilité d'employer des dispersions, cellules ou solution avec un grande densité optique.</p>	<p>-Le temps d'analyse.</p> <p>-Signal proportionnel à l'enthalpie → Les complexes protéiques non-covalents auront un signal plus faible.</p> <p>-Consommation importante d'échantillon.</p> <p>-Mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs n'est pas recommandé → Réduction de la sensibilité.</p> <p>-Les interactions lentes sont négligées.</p>	<p>(2bind, 2022; Baumann et al., 2011; Jyoti, 2020)</p>
<p>MDS</p>	<p>-<i>In solution</i> → Pas d'immobilisation d'un des partenaires sur une surface.</p> <p>-Plus grande liberté conformationnelle des protéines → Structure proche de celle <i>in vivo</i>.</p> <p>-Faible consommation d'échantillon → 60-100 µL pour déterminer le K_d (12-20 injections de 5 µL)</p> <p>-Grande sensibilité (~1 nM)</p> <p>-Convient aux milieux matriciels.</p> <p>-λ employée > 600 nm → Réduction de l'auto-fluorescence du serum d'un facteur 4 en comparaison à 400-500 nm</p> <p>-Pas d'ajout d'agents bloquants.</p> <p>-Dilution des protéines dans un tampon non requise.</p> <p>-Grande spécificité.</p> <p>-Différenciation de la concentration en ligand et de l'affinité pour le récepteur.</p>	<p>-Le temps d'analyse (8-15 min/échantillon)</p> <p>-Marquage d'un des partenaires requis par un fluorophore.</p> <p>-Pas d'automatisation.</p> <p>-Incapacité à mesurer, en parallèle, l'affinité pour différents récepteurs.</p> <p>-Equilibre réactionnel nécessaire.</p> <p>-Cout des consommables.</p> <p>-Température non-constante inter-analyses.</p>	<p>(Fluidic Analytics, 2021d, 2020, 2019b)</p>

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de la SPR, BLI, ELISA, ITC et MDS.

1.3.4 Structure du complexe SpikeRBD-ACE2

La cristallographie à rayons-X a permis d'élucider l'interaction entre le SARS-CoV-2 RBD et l'ACE2 (Figure 20) ; le site de liaison est composé de 2 lobes se situant sur le domaine N-terminal à activité peptidase de l'ACE2. La surface concave externe du RBM permet d'entrer en contact avec l'ACE2 en accueillant la face inférieure du petit lobe de son hélice N-terminale (Lan et al., 2020).

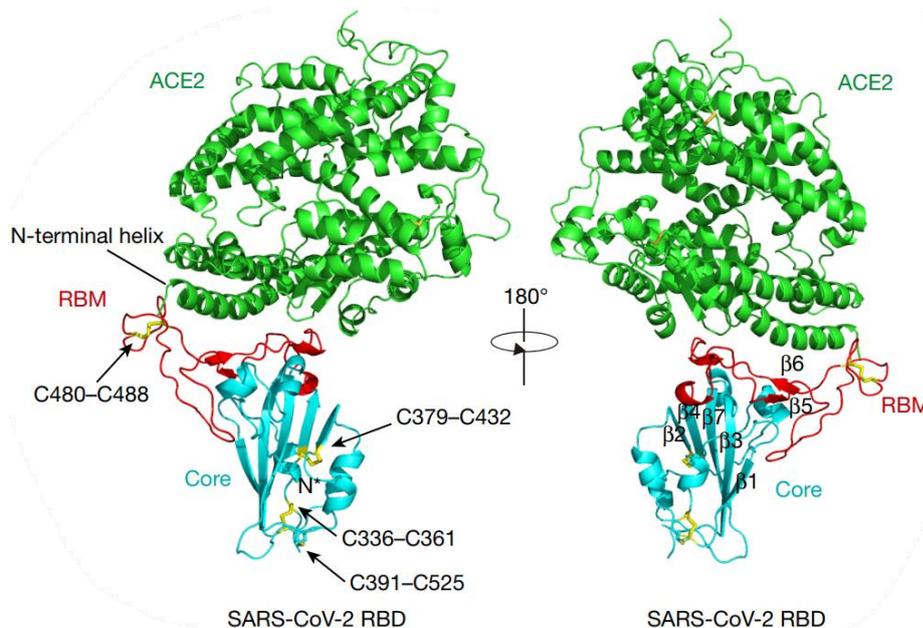


Figure 20 : « Structure globale d'un SARS-CoV-2 RBD lié à l'ACE2. ACE2 est indiqué en vert. Le SARS-CoV-2 RBD est en cyan et le RBM est indiqué en rouge. Les ponts disulfures sont montrés comme des bâtons et indiqués par des flèches. L'hélice N-terminale de l'ACE2 responsable de la liaison est marquée. » (Lan et al., 2020).

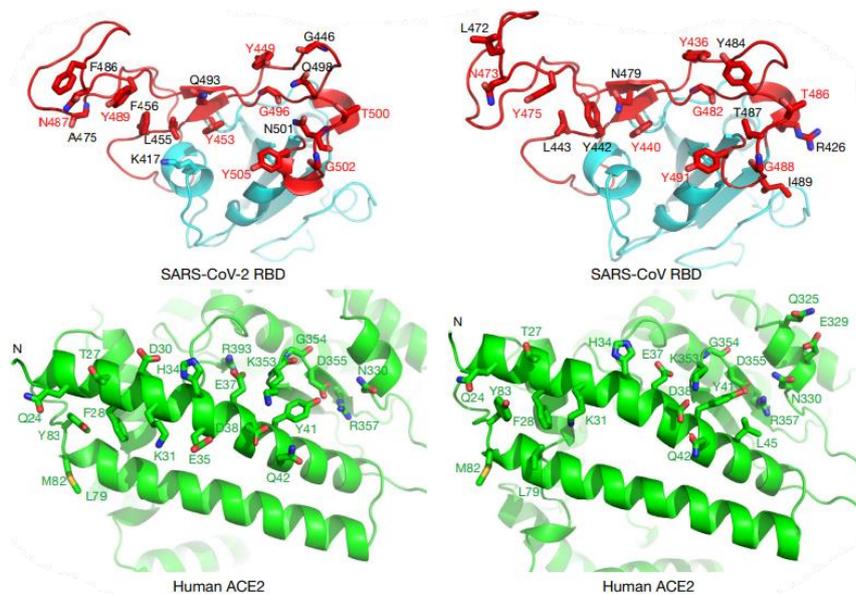


Figure 21 : « Interfaces SARS-CoV-2 RBD-ACE2 et SARS-CoV RBD-ACE2. Les résidus permettant le contact aux interfaces SARS-CoV-2 RBD-ACE2 et SARS-CoV RBD-ACE2 sont modélisés. Les acides aminés en rouge dans les deux RBD sont ceux qui sont impliqués dans la liaison avec l'ACE2. » (Lan et al., 2020).

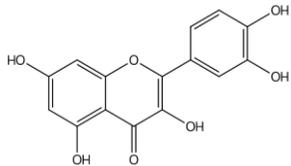
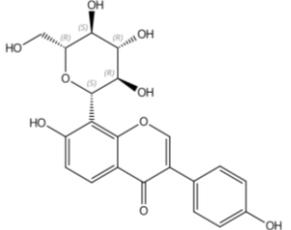
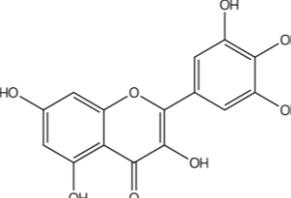
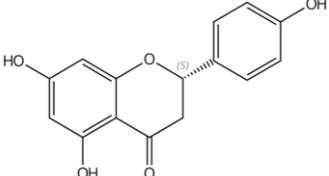
Comme nous l'indique la Figure 21, il est intéressant de noter que les interfaces entre l'ACE2 et les RBD des SARS-CoV et SARS-CoV-2 montrent des similitudes assez importantes. En effet, entre les 2 RBD, parmi les 14 acides aminés impliqués dans la liaison, 8 résidus sont identiques (Tyr449/Tyr436, Tyr453/Tyr440, Asn487/ Asn473, Tyr489/Tyr475, Gly496/Gly482, Thr500/Thr486, Gly502/ Gly488 et Tyr505/Tyr491 de SARS-CoV-2/SARS-CoV, respectivement). Différentes modifications, notamment dans les ponts salins formés, les liaisons hydrogène et autres interactions hydrophiles/hydrophobes amènent le RBD de SARS-CoV-2 à interagir avec une plus grande affinité avec ACE2 que celui du SARS-CoV. Leurs K_d respectifs étant de 4,7 et 31 nM (Tableau 3a). Un rapport récent a cependant déterminé que le K_d pour le complexe SARS-CoV-2 Spike-ACE2 serait de 14,7 nM (Tableau 3b). D'autres études, réalisée sur le SARS-CoV-2 RBD Wild type font état d'un K_d compris entre 5,8 et 133 nM (Tableau 3c) (Barton et al., 2021; Laffeber et al., 2021; Liu et al., 2021; Shang et al., 2020; Supasa et al., 2021; Zhang et al., 2021a).

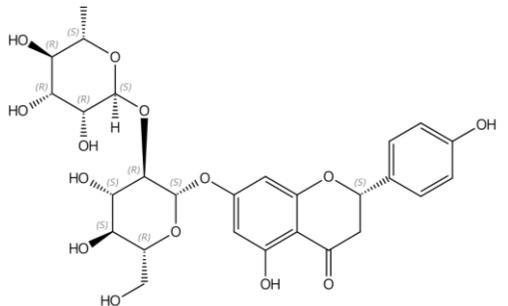
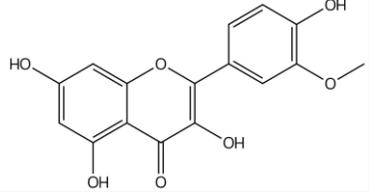
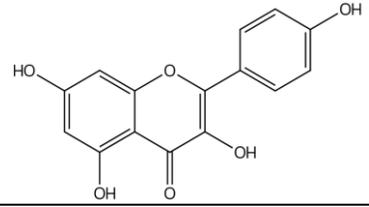
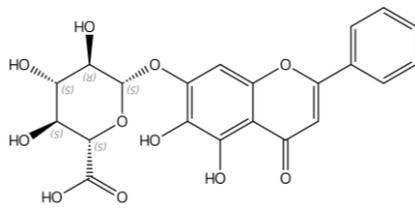
	Ligand-Récepteur	Méthode de détermination du K_d	K_d (nM)	Référence
a	SARS-CoV RBD-ACE2	SPR	31	(Lan et al., 2020)
	SARS-CoV-2 RBD-ACE2	SPR	4,7	
b	SARS-CoV-2 Spike-ACE2	SPR	14,7	(Wrapp et al., 2020)
c	SARS-CoV-2 RBD-ACE2	SPR	63	(Barton et al., 2021)
		SPR	17	(Laffeber et al., 2021)
		SPR	5,8	(Liu et al., 2021)
		SPR	44,2	(Shang et al., 2020)
		BLI	75,1	(Supasa et al., 2021)
	SARS-CoV-2 Spike-ACE2	BLI	133	(Zhang et al., 2021a)

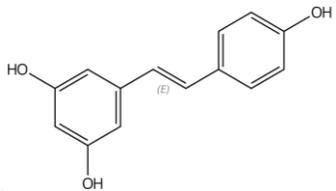
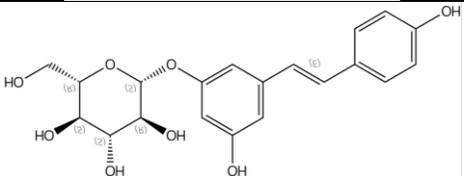
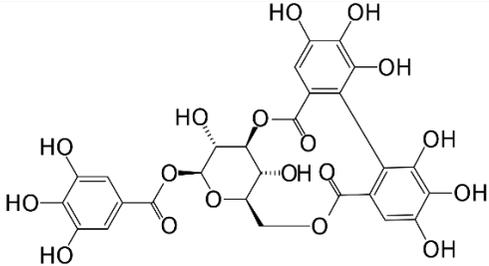
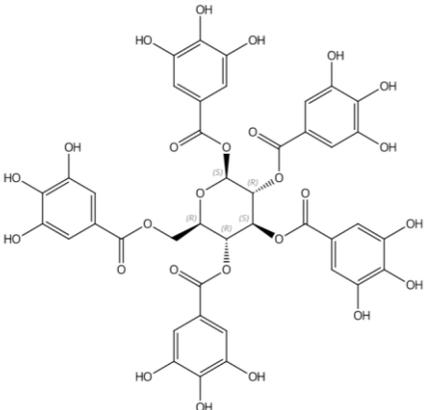
Tableau 3 : K_d obtenu par SPR et BLI lors de l'interaction de SARS-CoV RBD, SARS-CoV-2 RBD ou SARS-CoV-2 Spike avec ACE2.

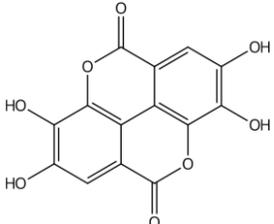
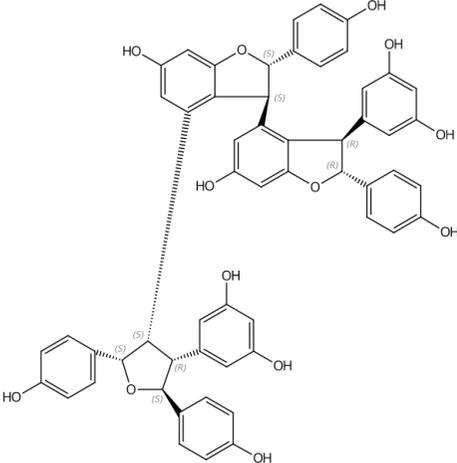
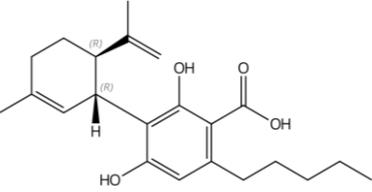
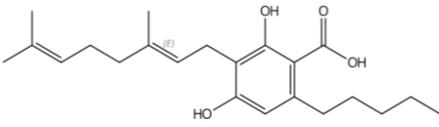
1.3.5 Molécules ayant un potentiel modulateur de l'interaction SpikeRBD-ACE2

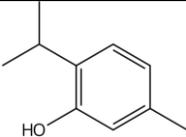
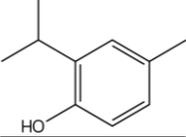
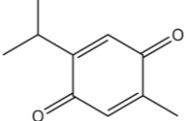
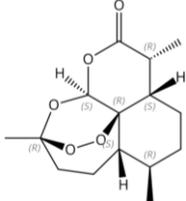
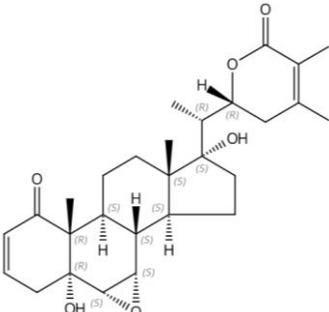
Depuis le début de la pandémie causée par le SARS-CoV-2, de nombreuses molécules ont été testées à travers diverses études afin de moduler l'interaction SpikeRBD-ACE2, dans le but d'empêcher le virus d'entrer dans les cellules pour se répliquer. Nous nous attarderons ici sur les produits naturels étant étudiés dans cette optique. Le Tableau 4 tente de répertorier, de manière exhaustive, les composés naturels et/ou extraits qui présentent un potentiel modulateur prometteur.

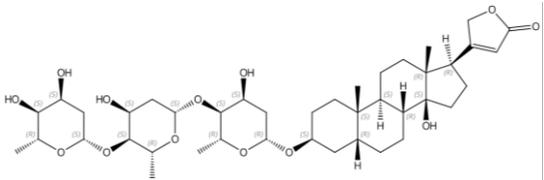
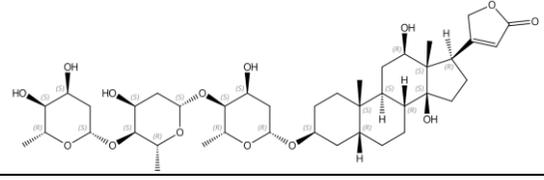
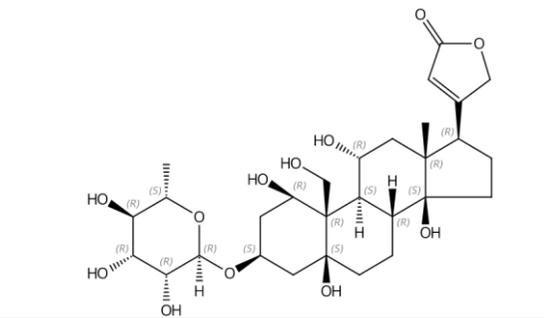
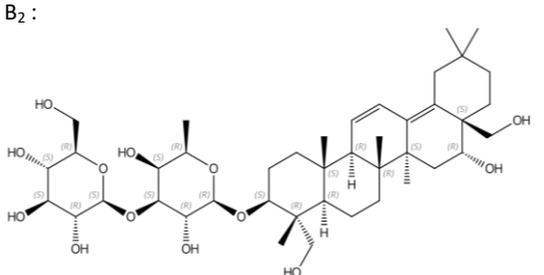
<u>Classe chimique</u>	<u>Molécule / Extrait</u>	<u>Structure</u>	<u>Type de modulation sur SpikeRBD/ACE2</u>	<u>Design de l'étude</u>	<u>Référence(s)</u>
Flavonoïdes	Quercétine (et métabolites)		Pourrait inhiber interaction SpikeRBD-ACE2 Inhibe ACE2 + Réduit l'entrée de pseudovirus exprimant Spike dans des cellules HEK293T exprimant ACE2	<i>In silico</i> <i>In vitro</i>	(Alqathama et al., 2022; Liu et al., 2020; Pan et al., 2020)
	Puerarine		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (SPR)	(Pan et al., 2020)
	Myricétine		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Priyandoko, 2021)
	Naringénine		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2 Inhibe l'entrée du virus dans cellules Vero E6 exprimant ACE2	<i>In silico</i> <i>In vitro</i>	(Clementi et al., 2021; Liu et al., 2022; Tutunchi et al., 2020)

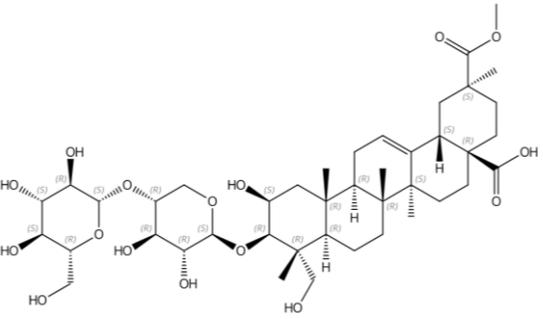
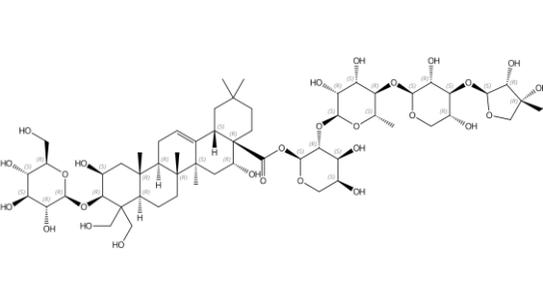
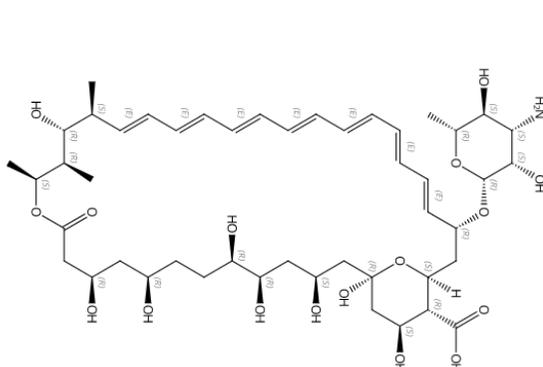
Flavonoïdes	Naringine		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Liu et al., 2022)
	Isorhamnétine		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (SPR)	(Zhan et al., 2021)
	Kaempférol		Pourrait lier ACE2 et inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Lingwan et al., 2020)
	Baicaline		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Shakhsi-Niaei et al., 2021)

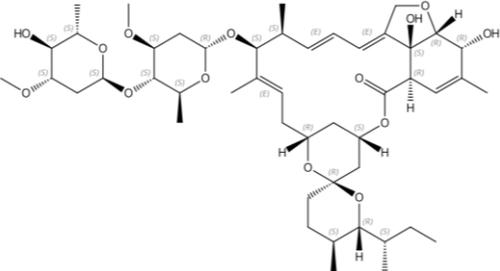
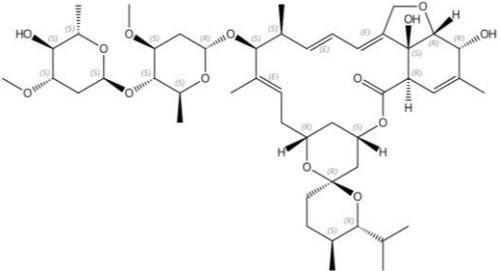
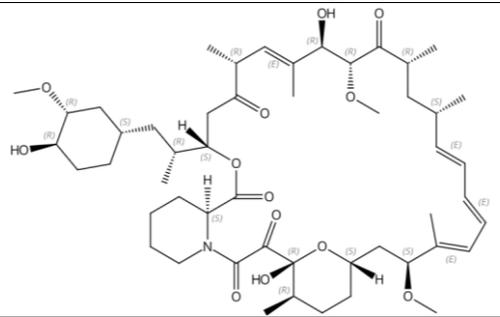
Stilbènes	Resvératrol		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Perrella et al., 2021)
	Polydatine		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Perrella et al., 2021)
Tanins	Corilagine		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (BLI)	(Yang et al., 2021)
	1,2,3,4,6-Pentagalloyl glucose		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (BLI)	(Chen et al., 2021)

Tanins	Acide Ellagique		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(David et al., 2021)
Polyphénols	Kobophénol A		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Gangadevi et al., 2021)
Cannabinoïdes	Acide cannabidiolique (CBDA)		Lie la protéine S et empêche l'entrée du virus	<i>In vitro</i>	(van Breemen et al., 2022)
	Acide cannabigérolique (CBGA)		Lie la protéine S et empêche l'entrée du virus	<i>In vitro</i>	(van Breemen et al., 2022)

Terpénoïdes	Huile essentielle de géranium (<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér.)	/	Réduit l'expression d'ACE à la surface de cellules HT-29 exprimant ACE2	<i>In vitro</i>	(Senthil Kumar et al., 2020)
	Huile essentielle de citron (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Single)	/	Réduit l'expression d'ACE à la surface de cellules HT-29 exprimant ACE2	<i>In vitro</i>	(Senthil Kumar et al., 2020)
	Thymol		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Rolta et al., 2021)
	Isothymol		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Abdelli et al., 2020)
Quinone	Thymoquinone		Lie ACE2 et réduit l'entrée de pseudovirus exprimant Spike dans des cellules HEK293T exprimant ACE2	<i>In vitro</i> (SPR)	(Xu et al., 2021)
Lactones terpéniques	Artémisinine		Pourrait lier ACE2 et inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Badraoui et al., 2022)
Triterpénoïdes	Whithanone		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Balkrishna et al., 2021)

Hétérosides cardiotoniques	Digitoxine		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Caohuy et al., 2021)
	Digoxine		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Caohuy et al., 2021)
	Ouabaïne		Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Caohuy et al., 2021)
Saponines	Saikosaponines	B ₂ : 	Pourrait lier Spike et inhiber l'interaction Spike-ACE2	<i>In silico</i>	(Sinha et al., 2020)

Saponines	Esculentoside A		Lie l'ACE2 et pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Zeng et al., 2021)
	Platycodine D		Inhibe l'entrée de Pseudovirus exprimant Spike dans cellules H1299 exprimant ACE2	<i>In vitro</i>	(Kim et al., 2021)
Polyènes	Amphotéricine B		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Kalhor et al., 2022)

<p>Avermectines</p>	<p>Ivermectine</p>	<p>B_{1a} :</p>  <p>B_{1b} :</p> 	<p>Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2</p> <p>Réduit le nombre de virus dans cellules Vero-hSLAM</p>	<p><i>In silico</i></p> <p><i>In vitro</i></p>	<p>(Kalhor et al., 2022; Lehrer and Rheinstein, 2020; Peña-Silva et al., 2021)</p>
<p>Macrolides</p>	<p>Rapamycine (Sirolimus)</p>		<p>Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2</p>	<p><i>In silico</i></p>	<p>(Kalhor et al., 2022)</p>

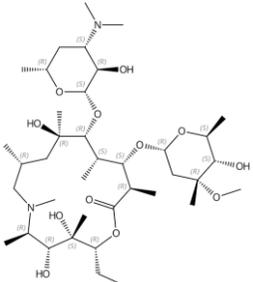
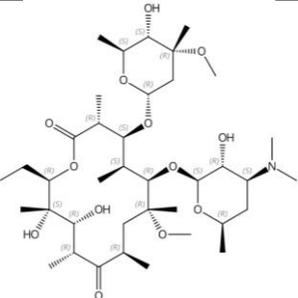
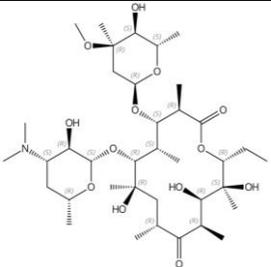
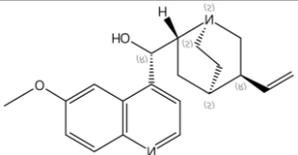
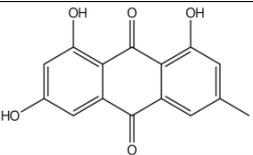
	Azythromycine		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Anwar et al., 2021; Braz et al., 2020)
Macrolides	Clarithromycine		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Anwar et al., 2021)
	Erythromycine		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i>	(Prashantha et al., 2021)
	Alcaloïdes	Quinine		Réduit le taux de réplication de pseudovirus exprimant Spike dans des cellules A549 exprimant ACE2	<i>In vitro</i>
Anthraquinones	Emodine		Pourrait inhiber l'interaction SpikeRBD-ACE2 Inhibe l'interaction SpikeRBD-ACE2	<i>In silico</i> <i>In vitro</i> (Titration ELISA)	(Basu et al., 2020; Chitsike et al., 2021; Du et al., 2021; Rolta et al., 2021)

Tableau 4 : Produits naturels présentant un effet potentiel de modulation sur le complexe SARS-CoV-2 SpikeRBD-ACE2.

2 Objectif du travail

De nombreuses méthodes permettent de quantifier l'interaction protéine-protéine et ainsi de déterminer l'affinité d'un couple ligand-récepteur, par le biais du K_d . De plus, plusieurs produits naturels ont un potentiel prometteur dans la modulation de l'interaction du SARS-CoV-2 avec son récepteur.

Le but de notre étude va être d'utiliser la microfluidic diffusional sizing (MDS) afin de quantifier, dans un premier temps, l'affinité du complexe protéique SARS-CoV-2 SpikeRBD-ACE2 en déterminant le K_d . Dans un second temps, nous essayerons de moduler cette interaction protéique à l'aide de produits naturels prometteurs issus de la littérature. Cette modulation se fera non pas en observant une modification du K_d , mais en modifiant le R_h du complexe protéique dont chacune des protéines sera présente en quantité équimolaire.

L'étude de ces différents produits naturels permettra d'étayer nos connaissances sur ceux-ci et leur potentiel modulateur envers le complexe protéique que nous étudions. Cela permettra également d'établir une liste de composés prometteurs ainsi que des hypothèses et perspectives quant à de futures études permettant d'approfondir les résultats obtenus et de peut-être à l'avenir pouvoir proposer un ou plusieurs de ces produits naturels comme agent thérapeutique dans la prophylaxie de l'infection au SARS-CoV-2.

3 Partie expérimentale

3.1 Matériel et méthode

3.1.1 Réactifs, consommables, machine et logiciels

3.1.1.1 Réactif et consommables

Réactifs et consommables	Provenance
Original strain – His-tagged RBD protein. SARS-CoV-2 Spike RBD-His fusion protein	InvivoGen
Human ACE2 protein. Soluble ACE2-Fc fusion protein	InvivoGen
Antibody Conjugate Purification Kit for 20-50 µg (A33087)	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor™ 647 NHS Ester (Succinimidyl Ester) (A20006)	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxyde anhydre (DMSO anhydre) >= 99,9%	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxyde (DMSO) for UV-spectroscopy, >=99,8% (GC)	Fluka Analytical
Eppendorf LoBind protein	VWR chemicals
Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4 (PBS)	InvivoGen
Méthanol 99% HPLC grade	Chem-lab
Glycérol 99%	Chem-Lab
Tween® 20	Thermo Fisher Scientific
Plaque de 96 puits	VWR chemicals
Puces pour Fluidity One-W (100009) (lots : 505-6, 505-1, 505-5,504-7, 505-3, 507-11, 504-4, 506-2, 506-1, 505-4, 504-8, 505-2, 680-6, 672-2, 685-7, 672-3, 685-6, 680-9)	Fluidic Analytics
Hydrate de quercétine >= 95% (lot : STBB2075L9)	Sigma-Aldrich
Naringénine >= 98% (lot : 359286099)	Carl Roth
Naringine CRS (lot : 1.0 id 004UT0)	EDQM
Ivermectine (lot : LRAC6468)	Sigma-Aldrich
Chloroquine diphosphate >= 98% (lot : BCBP9062V)	Sigma-Aldrich
Erythromycine (lot : 20I09-0792)	Febelcare
Extrait sec de rhubarbe titré (lot : 13D30/V54409)	Conforma
Poudre d'enveloppes de graines de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. Micronisée (0,5 mm) – QS ₂ -CH-Husk	Ecuador
Extrait sec de Ginkgo CRS (lot : 2.0 id 006BU0)	EDQM

Tableau 5 : Tableau des réactifs et des consommables utilisés durant l'étude.

3.1.1.2 L'appareil de MDS – Fluidity One-W Serum

La machine nous permettant d'effectuer de la MDS et ainsi mesurer le R_h des échantillons était la Fluidity One-W Serum (Numéro de série : F1W-051 ; Fluidic Analytics, United kingdom).



Figure 22 : a) Photographie du Fluidity One-W Serum. D'après (Fluidic Analytics, 2021d)

Afin de réaliser ces mesures, nous réalisons un priming quotidien à l'aide d'une puce dédiée afin de nous assurer que les canaux fluidiques de l'appareil soient bien conditionnés. Nous devons ensuite déposer 5 μ L de nos échantillons sur le port d'une « Puce pour Fluidity One-W »⁷ (Référence : 100009 ; Fluidic Analytics, United Kingdom), avant de l'insérer dans la machine.



Figure 23 : Photographie d'une puce où l'emplacement du piedestal est indiqué. D'après (Fluidic Analytics, 2021e)

Lot	Expérimentation
505-6	Vérification de la qualité de la purification (vérification marquage 1) – 19/01/2022 + Etude de reproductibilité
505-1	Développement du protocole avec un flavonoïde, la quercétine.
505-5	Vérification de la qualité de la purification (vérification marquage 2) – 18/02/2022 + La Chloroquine
504-7	Courbe 1 (PBS-T ; 0°C)
505-3	Courbe 2 (PBS-T ; 0°C)
507-11	Courbe 3 (PBS-T ; 0°C)
504-4	Courbe 1 (DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à t° ambiante)
506-2	Courbe 2 (DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à t° ambiante)
506-1	Développement du protocole avec un flavonoïde, la quercétine + « Protocole général »
505-4	« Protocole général » + La Naringénine
504-8	La Naringine
505-2	L'Ivermectine
680-6	La Chloroquine
672-2	L'Erythromycine
685-7	Ext. sec EtOH de rhubarbe (racines)
672-3	Ext. sec MeOH de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. (enveloppes de graines)
685-6	Ext. sec de <i>Ginkgo biloba</i> L. (feuilles)
680-9	Ext. sec de <i>Ginkgo biloba</i> L. (feuilles)

Tableau 6 : Lot de puce utilisé en fonction de l'expérimentation réalisée.

Avant de lancer l'analyse, nous devons sélectionner une gamme de taille en fonction de l'échantillon à analyser. La masse molaire de nos échantillons étant comprise théoriquement entre ~30 kDa et ~160 kDa, nous avons appliqué systématiquement la gamme la plus basse : 0,7-5 nm (1-200 kDa).

⁷ Dans la suite, nous les appellerons « puces ».

3.1.1.3 Simulateur, logiciels d'analyse, convertisseur et guides

Un fichier Excel fourni par Fluidic Analytic⁸ a été utilisé pour simuler et calculer les dilutions de nos protéines. Ceci nous a permis de déterminer, à partir des poids moléculaires, la gamme de concentrations à préparer pour quantifier le K_d du complexe protéique.

Afin d'analyser, nous avons employé Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO (Version 2205 Build 16.0.15225.20028) 32 bits ; Microsoft Corporation, United States of America) et GraphPad Prism 9 (version 9.0.0 (121) ; GraphPad Software, United States of America). Ce dernier a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques décrites au point 3.2.1.5.

Les conversions théoriques entre poids moléculaire et R_h ont été effectuées grâce à un « *Hydrodynamic Radius Converter* » basé sur l'Équation 12, et des courbes de calibration réalisées avec différents standards protéiques de conformation globulaire ou non, ayant des poids moléculaires différents (Fluidic Analytics, 2021f, 2021b).

Pour les étapes de marquage de la protéine SpikeRBD, nous avons suivi les protocoles et guides fournis par Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2020) et les avons adaptés au cadre de notre étude.

Lors de l'entièreté des manipulations nous avons travaillé à l'abri de la lumière afin de protéger les fluorophores de la photodestruction.

3.1.2 Marquage de la protéine SpikeRBD par Alexa Fluor™

Principe : L'ester succinidylique réagit avec les amines primaires des acides aminés de la protéine afin de marquer ces fonctions d'un fluorophore qui est, ici, l'Alexa Fluor® 647.

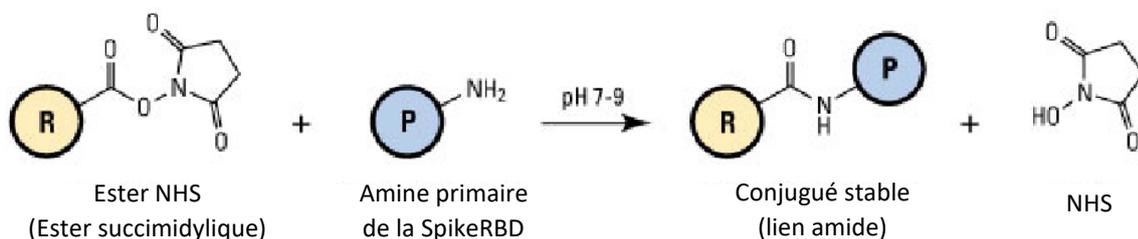


Figure 24 : Réaction de conjugaison d'un ester succinidylique avec une amine primaire. R représente le fluorophore (AF). P représente une molécule présentant une amine primaire (SpikeRBD).

⁸ Dans la suite, nous l'appellerons « simulateur ».

Protocole :

- Une solution de marquage 2,847 mM d'Alexa Fluor™ 647 NHS Ester a été préparée dans du DMSO anhydre. Elle a ensuite été aliquotée et congelée à -20°C.⁹ Une solution 333,33 µg/mL de protéine de fusion SARS-CoV-2 Spike RBD-His¹⁰ a été réalisée dans du PBS (pH = 7,4). A cette solution, un volume de la solution de marquage permettant d'obtenir un rapport AF¹¹:SpikeRBD de 3:1 a été ajouté (Figure 24). Le mélange a ensuite été incubé à 4°C durant une nuit, à l'abri de la lumière.
- Pour purifier les échantillons, nous avons préparé et utilisé les 3 *spin column* de l'*Antibody Conjugate Purification Kit for 20-50 µg*, comme décrit dans le guide (Thermo Fisher Scientific, 2020).
- La qualité de la purification a ensuite été évaluée. La solution de SpikeRBD-AF purifiée a été pesée. 10 µL de celle-ci ont été dilués dans du PBS-T 0,05% afin de réaliser une solution à 50 nM de SpikeRBD-AF. Le R_h a ensuite été déterminé. La masse molaire de SpikeRBD-AF étant ~31 250 Da, le R_h théorique correspond à $2,72 \pm 0,27$ nm. Nous avons réalisé 2 marquages ainsi que leurs vérifications au cours de l'étude, le 19 /01/2022 et le 18/02/2022. Le Tableau 20 reprend les valeurs de R_h et R_h moyen expérimentaux.
- Le reste de la solution de SpikeRBD-AF purifiée a été diluée d'un facteur 10 avec du PBS (pH = 7,4), avant d'ajouter du glycérol 10 % v/v et d'aliquoter pour stocker à -80°C. Les concentrations finales pour les marquages du 19 /01/2022 et du 18/02/2022 étaient respectivement de 507 nM et 898 nM¹².

⁹ Alexa Fluor™ 647.

¹⁰ Dans la suite, nous appellerons cette protéine « SpikeRBD ».

¹¹ Alexa Fluor™ 647 (AF) présente un maximum d'excitation à 650 nm et un maximum d'émission à 670 nm (Thermo Fisher Scientific, 2022).

¹² Dépend du volume récupéré de la *spin column*.

3.1.3 Développement de la méthode – Elaboration du « protocole général »

3.1.3.1 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans du PBS-T ; à 0°C

Protocole :

- Le simulateur a été utilisé pour simuler une courbe d'affinité (Figure 25) permettant de déterminer la gamme de concentration en SpikeRBD et ACE2 à tester pour passer de l'état « non complexé » à l'état « complexé à 100 % ». Les paramètres encodés étaient les suivants : « *Expected KD* » = 15 nM ; « *constant concentration of labelled species in experiment* » = 5 nM ; « *Highest concentration of un-labelled species in experiment* » = 750 nM ; « *how many un-labelled species concentrations are going to be tested* » = 7 ; « *what dilution factor is used* » = 4.
 - Les solutions protéiques ont été préparées.
 - a. Une solution stock 1,5 μM de la protéine ACE2-FC¹³ a été réalisée dans du PBS-T. Dans une plaque de 96 puits, 28,00 μL de cette solution ont été ajoutés au puit A1, le reste de la solution stock étant aliquoté et stocké à -20°C.
 - b. Dans un tube LoBind, une solution de SpikeRBD-AF à 10 nM a été réalisée en diluant un aliquot de Spike-AF à l'aide de PBS (pH = 7,4).
 - Une dilution en série de l'ACE2 a été créée.
 - a. 21 μL de PBS-T sont ajoutés dans les puits B1-H1.
 - b. 7 μL du puit A1 sont transférés dans le puit B1.
 - c. 7 μL du puit B1 sont transférés dans le puit C1.
 - d. Ainsi de suite jusqu'au transfert de 7 μL du puit F1 dans le puit G1.
 - e. 7 μL sont enlevés de G1 et jetés.
 - f. Chaque puit contient alors 21 μL .
- Les concentrations d'ACE2 obtenues sont reprises dans le Tableau 7.

¹³ Dans la suite, nous l'appellerons ACE2.

Echantillons	Volume total dans le puit (μL)	ACE2 (nM)
A1	21,00	1500,00
B1	21,00	375,00
C1	21,00	93,75
D1	21,00	23,44
E1	21,00	5,86
F1	21,00	1,46
G1	21,00	0,37
H1 (Contrôle)	21,00	0

Tableau 7 : Dilution en série de l'ACE2 pour la détermination du K_d (7 [ACE2]) dans le PBS-T ; à 0°C.

- 21 μL de cette solution de SpikeRBD-AF ont été ajoutés dans les puits A1-H1 qui contiennent alors 5 nM de SpikeRBD-AF et 0,180-750 nM d'ACE2. Le contrôle (H1), contient 5 nM de SpikeRBD-AF dans du PBS-T (Tableau 8).

Echantillons	Volume total final dans le puit (μL)	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)
A1	42,00	750,00	5
B1	42,00	187,50	5
C1	42,00	46,88	5
D1	42,00	11,72	5
E1	42,00	2,93	5
F1	42,00	0,73	5
G1	42,00	0,18	5
H1 (Contrôle)	42,00	0	5

Tableau 8 : Tableau récapitulatif pour la détermination du K_d (7 [ACE2]) dans le PBS-T ; à 0°C.

- Les échantillons ont été incubés sur glace durant 1h, à l'abri de la lumière, afin que la réaction de complexation atteigne l'état d'équilibre.
- La mesure de chaque échantillon a été effectuée en 2 réplicata. 3 courbes d'affinité ont été réalisées et leurs K_d respectif ont été déterminé à partir des R_h de (GraphPad ; Équation 13 ; contraintes de la Figure 19).

3.1.3.2 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à température ambiante.

Protocole :

- Le simulateur a été utilisé pour simuler une courbe d'affinité (Figure 25) permettant de déterminer la gamme de concentrations en SpikeRBD et ACE2 à tester pour passer l'état « non complexé » à l'état « complexé à 100% ». Les paramètres encodés étaient les mêmes qu'en 3.1.3.1, excepté « *constant concentration of labelled species in experiment* » = 20 nM car le signal obtenu à 5

nM lors des premiers tests 3.2.1.2 était trop faible. Ensuite nous avons simulé le point équimolaire de 20 nM en SpikeRBD et ACE2, en modifiant « *Highest concentration of un-labelled species in experiment* » = 20 nM. Celui-ci servira de point de départ dans les futurs tests. Son R_h moyen servira, en outre, de « ligne de base » de la méthode pour les tests suivants afin d'évaluer l'effet des composés et extraits testés.

- Les solutions protéiques ont été préparée. Les concentrations finales de DMSO que nous utiliserons seront au maximum de 1% car, au-delà de 1,8% v/v de DMSO, celui-ci peut interférer avec l'intégrité structurelle des protéines (Fluidic Analytics, 2021c).
 - a. Une solution stock 3,0 μ M d'ACE2 a été réalisée dans du PBS-T, aliquotée et congelée -20°C. Des aliquots dilués à 80 nM avec du PBS-T ont été congelés à -20°C. Dans une plaque 96 puits ; 20,00 μ L de cette solution 3,0 μ M d'ACE2 ont été ajoutés dans le puit A1.
 - b. Dans un tube LoBind, une solution de SpikeRBD-AF à 80 nM a été réalisée par dilution d'une aliquote de Spike-AF à l'aide de PBS (pH = 7,4).
 - c. Un mélange DMSO/PBS (2:98, v/v) a été préparé.
- Une dilution en série de l'ACE2 a été créée.
 - a. 15 μ L de PBS-T sont ajouté dans les puits B1-H1.
 - b. 5 μ L du puit A1 sont transféré dans le puit B1.
 - c. 5 μ L du puit B1 sont transféré dans le puit C1.
 - d. Ainsi de suite jusqu'au transfert de 5 μ L du puit F1 dans le puit G1.
 - e. 5 μ L sont enlevé de G1 et jeté.
 - f. Chaque puit contient alors 5 μ L.

→ Les concentrations d'ACE2 obtenues sont reprises dans le Tableau 9.

Echantillons	Volume total dans le puit (μ L)	ACE2 (nM)
A1	15,00	3000,00
B1	15,00	750,00
C1	15,00	187,50
D1	15,00	46,88
E1	15,00	11,72
F1	15,00	2,93
G1	15,00	0,73
H1 (Contrôle)	15,00	0

Tableau 9 : Dilution en série de l'ACE2 pour la détermination du K_d (8 [ACE2]) dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à t° ambiante.

- 15 μL de cette solution de SpikeRBD-AF ont été ajoutés aux puits A1-H1 afin d'obtenir 7 échantillons qui contiennent 40 nM de SpikeRBD-AF et 0,370-1500 nM d'ACE2, ainsi qu'un contrôle contenant 40 nM de SpikeRBD-AF dans du PBS-T (Tableau 10).

Echantillons	Volume total dans le puit (μL)	ACE2 (nM)	SpikeRBD-AF (nM)
A1	30,00	1500,00	40
B1	30,00	375,00	40
C1	30,00	93,75	40
D1	30,00	23,44	40
E1	30,00	5,86	40
F1	30,00	1,46	40
G1	30,00	0,37	40
H1 (Contrôle)	30,00	0	40

Tableau 10 : Tableau intermédiaire pour la détermination du K_d (8 [ACE2]) dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à t° ambiante.

- 30 μL de ce mélange DMSO/PBS (2:98, v/v) ont été ajoutés dans les puits A1-H1.
- Dans le puits A2, nous réalisons le mélange équimolaire de 20 nM en SpikeRBD-AF et ACE2.
 - 15 μL d'une aliquote de cette solution 80 nM d'ACE2, et de cette solution 80 nM de SpikeRBD-AF ont été respectivement mélangés.
 - 30 μL de ce mélange DMSO/PBS (2:98, v/v) ont été ajoutés.

→ Les concentrations finales d'ACE2, de SpikeRBD-AF et DMSO:PBS obtenues sont reprises dans le Tableau 11.

Echantillons	Volume total final dans le puit (μL)	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	DMSO:PBS finale (v/v)
A1	60,00	750,00	20	1:99
B1	60,00	187,50	20	1:99
C1	60,00	46,88	20	1:99
D1	60,00	11,72	20	1:99
E1	60,00	2,93	20	1:99
F1	60,00	0,73	20	1:99
G1	60,00	0,18	20	1:99
H1 (Contrôle)	60,00	0	20	1:99
A2	60,00	20	20	1:99

Tableau 11 : Tableau récapitulatif pour la détermination du K_d (8 [ACE2]) dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à t° ambiante.

- Les échantillons ont été maintenus durant 1h, à l'abri de la lumière, à température ambiante ($\sim 20^\circ\text{C}$) afin que la réaction de complexation atteigne l'état d'équilibre. Incuber à cette température permet de ne pas avoir de précipité comme obtenu lors des premiers tests effectués en 3.2.1.2.

- La mesure de chaque échantillon a été effectuée en 2 réplicata. 2 courbes d'affinité ont été réalisées et leurs K_d respectifs ont été déterminés comme en 3.1.3.1.

3.1.4 Extraction méthanolique de la poudre micronisée d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd.

La poudre micronisée d'enveloppes de graines vient de la variété de quinoa amère (chimborazo). Celle-ci a été obtenue auprès de producteurs de quinoa bio de la province de Chimborazo, en Équateur. Les enveloppes représentent ~20 % m/m, et sont obtenue par battage des graines après la récolte. Les enveloppes des graines amères ont été broyées dans un broyeur de laboratoire (PX-MFC 90 D, Kinematica AG, Suisse) et tamisées pour obtenir une poudre micronisée ($\leq 0,5$ mm). Cette dernière a été stockée à -20 °C pendant un maximum de 24 mois (Taco, 2022).

Protocole (adapté d'après (Taco, 2022)) :

150 mg de poudre micronisée (0,5 mm) d'échantillon, 5 billes en verres (diamètres : 1-1,5 mm) et 3,000 g de méthanol 99 % sont placés dans le mélangeur MM400 (Retsh, Allemagne). L'appareil est réglé sur 30 Hz et fonctionne durant 10 min. Le mélange est ensuite centrifugé durant 40 min (4000g- UniCen MR, Herolab, Allemagne). Le surnageant est recueilli et évaporé à l'aide du rotavapor (IKA RV 10) sous basse pression à 50 °C et 80 rpm. L'extrait sec est solubilisé dans le DMSO (20 mg/ml).

3.1.4.1 Modulation de l'interaction par des produits naturels

Principe : Durant l'expérience, les concentrations en SpikeRBD et ACE2 sont gardées constantes (20 nM). Ces concentrations sont celles du « contrôle ». La concentration du produit naturel ou de l'extrait va quant à elle varier sur une large gamme. Le but est d'identifier et quantifier une éventuelle variation de R_h qui indiquerait qu'il y a une modulation du complexe.

Après optimisation (3.2.1.2), le point équimolaire 20 nM en SpikeRBD et ACE2 présentant un taux de saturation de 43,1 %, a été choisi comme « ligne de base » de la méthode permettant d'évaluer une modulation positive ou négative.

Protocole :

- Dans 2 tubes LoBind, une solution 80 nM et une solution 160 nM de SpikeRBD-AF ont été préparées en diluant deux aliquotes de SpikeRBD-AF avec du PBS (pH =7,4).
- A partir de la solution d'ACE2 à 1,5 µM, 2 dilutions de respectivement 80 et 160 nM ont été réalisées par ajout de PBS-T.
- Une solution mère de produit naturel ($Concentration = 100 * X$; Tableau 12) a été préparée dans du DMSO afin d'éviter tout précipité¹⁴. Dans des tubes LoBind, les dilutions ont été réalisées par ajout de PBS (pH = 7,4). La concentration maximale de DMSO dans ces dilutions est de 2 % v/v.
- Un mélange DMSO/PBS (2:98, v/v) a été préparé.
- Dans une plaque 96 puits, les puits A1-G1 ont été remplis avec : la SpikeRBD-AF 80 nM et 160 nM, l'ACE2 80 nM et 160 nM, et les dilutions du produit naturel ou un mélange DMSO/PBS (2:98, v/v) ; selon les tableaux récapitulatifs suivant :

Produit naturel/extrait	Valeur de X
Quercétine	150 000 nM
Naringénine	50 000 nM
Naringine	50 000 nM
Ivermectine	100 nM
Chloroquine	1 000 000 nM
Erythromycine	50 000 nM
Extrait sec éthanolique de rhubarbe (racines)	100 µg/mL
Extrait sec méthanolique de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. (enveloppes de graines)	200 µg/mL
Extrait sec de <i>Ginkgo biloba</i> L. (feuilles)	200 µg/mL

Tableau 12 : Valeur de X des différents produits naturels/extraits testé. X représente la concentration du produit naturel/extrait dans le mélange du puit A1.

Echantillons	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	Concentration Produit naturel/Extrait	DMSO:PBS final (v/v)
A1	20	20	X	1,5:98,5
B1	20	20	2X/3	1:99
C1	20	20	X/3	< 1:99
D1	20	20	X/15	< 1:99
E1	20	20	X/150	< 1:99
F1	20	20	X/1 500	< 1:99
G1 (contrôle)	20	20	0	1

Tableau 13 : Tableau récapitulatif pour la quercétine. Modulation de l'interaction par des produits naturels.

¹⁴ Cette étape a été optimisée. Détails au point 3.2.1.2.

Echantillons	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	Concentration Produit naturel/Extrait	DMSO:PBS final (v/v)
A1	20	20	X	1:99
B1	20	20	X/2	< 1:99
C1	20	20	X/5	< 1:99
D1	20	20	X/50	< 1:99
E1	20	20	X/500	< 1:99
F1 (contrôle)	20	20	0	1:99

Tableau 14 : Tableau récapitulatif pour la naringénine, la naringine et l'érythromycine. Modulation de l'interaction par des produits naturels.

Echantillons	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	Concentration Produit naturel/Extrait	DMSO:PBS final (v/v)
A1	20	20	X	1:99
B1	20	20	X/2	< 1:99
C1	20	20	X/4	< 1:99
D1	20	20	X/10	< 1:99
E1	20	20	X/100	< 1:99
F1 (contrôle)	20	20	0	1:99

Tableau 15 : Tableau récapitulatif pour l'ivermectine et l'extrait éthanolique de rhubarbe (racines). Modulation de l'interaction par des produits naturels.

Echantillons	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	Concentration Produit naturel/Extrait	DMSO:PBS final (v/v)
A1	20	20	X	1:99
B1	20	20	X/2	< 1:99
C1	20	20	X/4	< 1:99
D1	20	20	X/10	< 1:99
E1	20	20	X/100	< 1:99
F1	20	20	X/1000	< 1:99
G1 (contrôle)	20	20	0	1:99

Tableau 16 : Tableau récapitulatif pour la chloroquine. Modulation de l'interaction par des produits naturels.

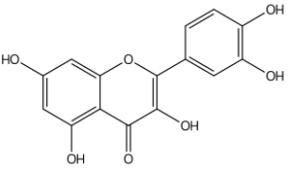
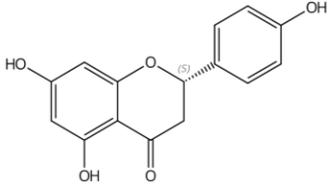
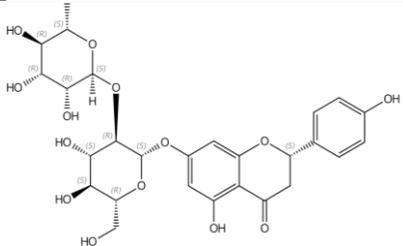
Echantillons	ACE2 finale (nM)	SpikeRBD-AF finale (nM)	Concentration Produit naturel/Extrait	DMSO:PBS final (v/v)
A1	20	20	X	1:99
B1	20	20	X/2	< 1:99
C1	20	20	X/4	< 1:99
D1	20	20	X/20	< 1:99
E1	20	20	X/200	< 1:99
G1 (contrôle)	20	20	0	1:99

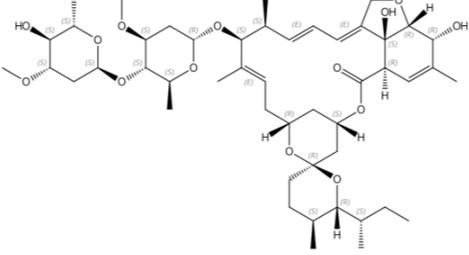
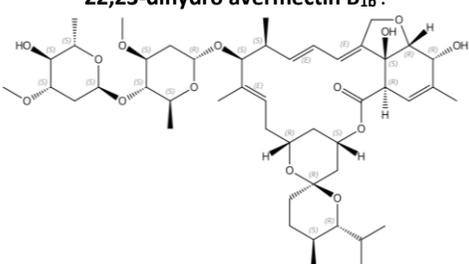
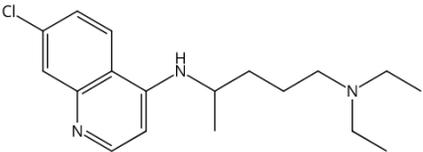
Tableau 17 : Tableau récapitulatif pour l'extrait sec méthanolique de *Chenopodium quinoa* Willd. (enveloppes de graines) et l'extrait de Ginkgo biloba L. (feuilles). Modulation de l'interaction par des produits naturels.

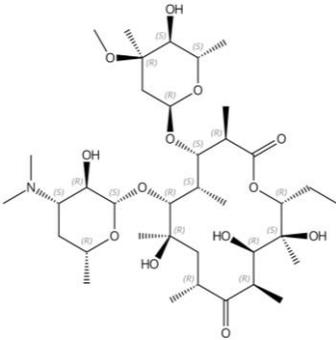
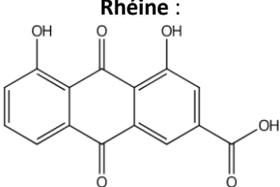
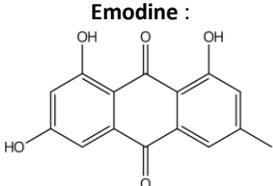
- Les échantillons ont été incubé durant 1h à température ambiante¹⁵, à l'abri de la lumière, afin que la réaction de complexation atteigne l'état d'équilibre et que le produit naturel puisse, éventuellement, moduler cette interaction.
- La mesure du R_h de chaque échantillon a été réalisée en 3 répliques. Les données ont ensuite été analysées sur Excel et GraphPad à l'aide de la démarche décrite au point 3.2.1.5.

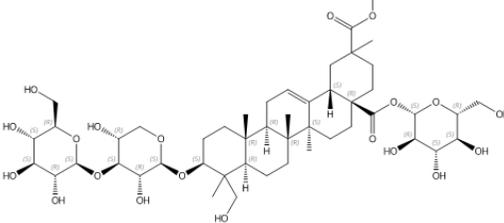
¹⁵ Cette étape a été optimisée. Détails au point 3.2.1.2.

- Dans la mesure du possible, les produits naturels testés (Tableau 18) ont été testé dans des gammes de concentrations proches de celles atteignables en conditions physiologiques. Ceci dans la perspective d'une utilisation future chez l'homme.

<u>Nom / Classe chimiques / Description</u>	<u>Structure</u>	<u>Motivations à choisir ce produit naturel</u>	<u>Choix de la gamme de concentration à tester</u>
<p>Nom : Quercétine. Classe chimique : Flavonoïdes. Description (PubChem, 2022a) : - Bioflavonoïde majeur de l'alimentation. - Activités biologiques : Traitement/prophylaxie de : - Cancers, allergies, maladies cardiovasculaires, rhumatismes, etc... - Masse moléculaire = 302,23 g/mol.</p>		<p><i>In silico</i> (Smith and Smith, 2020) : - Energie de liaison à SpikeRBD-ACE2 : -7,3 kcal/mol.</p> <p><i>In vitro</i> (Alqathama et al., 2022; Pan et al., 2020) : - Inhibition de l'entrée du virus dans cellules Vero E6 : EC₅₀ = 83,4 μM. - K_d par SPR :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Affinité pour ACE2 : 48,3 nM. • Affinité pour SpikeRBD : 22,1 nM. • Affinité pour SpikeRBD-ACE2 : 24,1 nM. 	<p><i>In vitro</i> (Charles et al., 2014; Nachtergaele et al., 2021) : -[Flavonoïdes]_{plasma} ~1 μM. Mais accumulation tissulaire possible. -IC₁₀ : > 30 μM.</p> <p>➔ Gamme de concentration initiale utilisée : 0,1-50 μM.</p>
<p>Nom : Naringénine. Classe chimique : Flavonoïdes. Description (Tutunchi et al., 2020) : - Présent dans <i>Citrus sp</i> : citrons, orange, pamplemousse, etc... - propriétés : antioxydantes, antidiabétiques, et antiinflammatoires. - Masse moléculaire = 272,25 g/mol.</p>		<p><i>In silico</i> (Liu et al., 2022; Tutunchi et al., 2020) : - Energie de liaison à ACE2 : -6,05 kcal/mol. Acides aminés impliqués : Leu-143, Pro-146 et Lys-131.</p> <p><i>In vitro</i> (Clementi et al., 2021) : - Inhibition dose-dépendante de l'entrée du virus dans cellules Vero E6 : EC₅₀ ~31,3 μM.</p>	<p><i>In vivo</i> (Charles et al., 2014; Clementi et al., 2021; Nachtergaele et al., 2021; Rebello et al., 2020) : -[Flavonoïdes]_{plasma} ~1 μM. Mais accumulation tissulaire possible. -IC₁₀ : > 30 μM. -C_{max} = 50 μM (Dose = 600 mg), sans toxicité apparente.</p> <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 0,1-50 μM.</p>
<p>Nom : Naringine. Classe chimique : Flavonoïdes Description (PubChem, 2022b) : - Hétéroside de la naringénine. - Fraction glycosidique : 2-O-(α-L-rhamnopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl - Masse moléculaire = 580,5 g/mol.</p>		<p><i>In silico</i> (Liu et al., 2022) : - Energie de liaison à ACE2 : -6,85 kcal/mol. Acides aminés impliqués : Glu-402, Asn-394, Glu-398, Tyr-515.</p>	<p><i>In vivo</i> (Charles et al., 2014; Nachtergaele et al., 2021) : -[Flavonoïdes]_{plasma} ~1 μM. Mais accumulation tissulaire possible. -IC₁₀ : > 30 μM.</p> <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 0,1-50 μM.</p>

<p>Nom : Ivermectine.</p> <p>Classe chimique : Avermectines (lactones macrocycliques).</p> <p>Description (AFMPS, 2021a; CAS SciFinder[®], 2022; Li et al., 2008; Rosumeck et al., 2018; Vidal, 2022) :</p> <p>-Mélange des dérivés A et B de la 22,23-dihydro avermectine B1 (<i>Streptomyces avermitilis</i>).</p> <p>- Propriétés : Antiparasitaire (vers et scabies), antiinflammatoire (rosacée).</p> <p>-Masse moléculaire = 875,1 g/mol (22,23-dihydro avermectin B_{1a}).</p> <p>-Masse moléculaire = 861,1 g/mol (22,23-dihydro avermectin B_{1b}).</p>	<p style="text-align: center;">22,23-dihydro avermectin B_{1a} :</p>  <p style="text-align: center;">22,23-dihydro avermectin B_{1b} :</p> 	<p><i>In silico</i> (Kalhor et al., 2022; Lehrer and Rheinstein, 2020) :</p> <p>-Energie de liaison à SpikeRBD : -10,87 kcal/mol.</p> <p>Acides aminés impliqués :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Liens hydrogènes : Ser-494, Leu-492, Asn-502, Tyr453, Gln-493. • Poche hydrophobe : Tyr-505, Gln-493, Tyr-449, Asn-501. <p>-Energie de liaison à ACE2 : -18 kcal/mol.</p> <p>Acide aminé impliqué : His-378 (se situe à l'interface SpikeRBD-ACE2).</p> <p><i>In vitro</i> (Peña-Silva et al., 2021):</p> <p>-Réduction 99,98% en 48 h du nombre de virus dans cellules Vero-hSLAM infectées depuis 2h lors de l'incubation avec l'Ivermectine.</p>	<p><i>In vivo</i> (ANSM, 2012; Peña-Silva et al., 2021) :</p> <p>- Dose = 12 mg : [Ivermectine]_{plasma} = 46,6 ± 21,9 ng/mL → 53,25 ± 25,02 nM</p> <p>- Dose max approuvée (FDA) : 200 µg/kg.</p> <p>-Chez le veau, dose = 200 µg/kg : [Ivermectine]_{poumons} : ~100 nM</p> <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 1-100 nM.</p>
<p>Nom : Chloroquine.</p> <p>Classe chimique : Dérivés quinoléiques.</p> <p>Description (Duez, 2020; Jia et al., 2022) :</p> <p>-Dérivé synthétique de la Quinine (<i>Cinchona</i> sp)</p> <p>-Propriétés : Anti-malarique, anti-inflammatoire, immunomodulateur, antiviral <i>in vitro</i> (HIV, influenza A/B).</p> <p>-Masse moléculaire = 319,9 g/mol.</p>		<p><i>In silico</i> (Abdelli et al., 2020) :</p> <p>-Energie de liaison à ACE2 : -6,4530 kcal/mol.</p> <p>-Energie de liaison à SpikeRBD : -4,2 kcal/mol.</p> <p><i>In vitro</i> (Abdelli et al., 2020; Braz et al., 2020; M. Wang et al., 2020; N. Wang et al., 2020) :</p> <p>-Interfère avec glycosylation de ACE2 → Moins bonne fixation du SARS-CoV sur son récepteur.</p> <p>-Inhibition de la réplication virale de ~80% sur cellules Vero E6 prétraitées durant 1h. (10 µM).</p> <p>-Inhibition de la réplication virale si incubation sur cellules Vero E6 infectées depuis 48h :</p> <p>EC = 1,13 µM.</p> <p>-K_d par SPR :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Affinité pour ACE2 : 731 ± 62 nM. <p>-Inhibition de l'entrée de pseudovirus dans cellules exprimant ACE2 de 77 ± 0,1 % (20 µM).</p>	<p><i>In vivo</i> (Daher et al., 2022; Ducharme and Farinotti, 1996; McEvoy, 2008) :</p> <p>-[Chloroquine]_{muscles/cerveau} : ~1 µM.</p> <p>-[Chloroquine]_{tissus oculaires} : ~1 mM.</p> <p>-Dose = 150 mg : C_{max} = ~50 ng/mL (~156 nM).</p> <p>-Dose = 300 mg : C_{max} = 76 ng/mL (~238 nM).</p> <p>-Dose = 500 mg : C_{max} = 150-250 µg/mL (~469-781 nM).</p> <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 1 µM-1 mM → Proche des [Chloroquine]_{tissulaires}.</p>

<p>Nom : Erythromycine. Classe chimique : Macrolides Description (APB, 2010; Sauberan and Bradley, 2018) : - Antibiotique issu de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>. Actif contre Gram positives et coques Gram négatives, contre <i>Propionibacterium acnes</i>. - Masse moléculaire = 733,9 g/mol.</p>		<p>Erythromycine <i>In silico</i> (Prashantha et al., 2021) : - Energie de liaison à SpikeRBD : -9 kcal/mol. Acides aminés impliqués : Arg-408, Tyr-380, Cys-378, Cys-379, Phe-377 et Gln-414. Ce dernier se situe à l'interface SpikeRBD-ACE2.</p> <p>Azithromycine (Tableau 4) (structurellement proche) : <i>In silico</i> (Braz et al., 2020): Energie de liaison :</p> <ul style="list-style-type: none"> -10,5 kcal/mol (ACE2) -7,9 kcal/mol (SpikeRBD) 	<p><i>In vivo</i> (AFMPS, 2020) : - Dose 500-1000 mg (IV) : [Erythromycine]_{sérum} = 10-15 µg/mL (13,63-20,44 µM).</p> <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 0,1-50 µM.</p>
<p>Nom : Extrait sec éthanolique de racines de Rhubarbe. Classe chimique : Dérivés hydroxyanthracéniques (Majoritairement). Description (EMA, 2020; Ho et al., 2007) : - Les racines viennent de <i>Rheum palmatum</i> L. / <i>Rheum officinale</i> Baillon (+ hybrides). - Extrait du test titré à 5,69% m/m de Rhéine. Il contient aussi notamment de l'Emodine. - Masse moléculaire = 284,22 g/mol (Rhéine). - Masse moléculaire = 270,24 g/mol (Emodine).</p>	<p>Rhéine :</p>  <p>Emodine :</p> 	<p>Emodine <i>In silico</i> (Basu et al., 2020; Du et al., 2021; Rolta et al., 2021) : - Energie de liaison :</p> <ul style="list-style-type: none"> -6,19 kcal/mol (interface SARS-CoV-2 Spike-ACE2). -7,26 kcal/mol (ACE2). Acides aminés impliqués : Glu-208, Asp-206 et Gly-98. -8,8 kcal/mol (Spike avec RBD « up »). -6,4 kcal/mol (Spike avec RBD « down »). <p><i>In vitro</i> (Chitsike et al., 2021; Ho et al., 2007) : - Inhibition d'interaction SARS-CoV Spike-ACE2 dose dépendante : IC₅₀ = 200 µM. - Inhibition de l'entrée de pseudovirus exprimant SARS-CoV Spike dans cellules Vero E6 de 94,12 ± 5,90 % (50 µM). - Inhibition d'interaction SARS-CoV-2 SpikeRBD-ACE2 : IC₅₀ = 60 µM.</p>	<p>Emodine <i>In vivo</i> (D. Wang et al., 2021) : - Rat : C_{max} = 348,4 µg/mL (~1,29 mM). - Chien : C_{max} = 0,48 µg/mL (~1,78 µM).</p> <p>Rhéine <i>In vivo</i> (AFMPS, 2016; Hao et al., 2014; D. Wang et al., 2021) : - Rat : C_{max} = 134 µg/mL (~471,47 µM). - Chien : C_{max} = 3,39 µg/mL (~11,93 µM). - Homme :</p> <ul style="list-style-type: none"> Dose = 600 mg : C_{max} = 49,02 ± 17,8 µg/mL (~172,47 ± 62,63 µM). <p>➔ Gamme de concentration utilisée : 1-100 µg/mL.</p>

<p>Nom : Extrait sec méthanolique de coques de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.</p> <p>Classe chimique : Saponines (Majoritairement).</p> <p>Description (Colson, 2020; Taco, 2022) :</p> <p>-Plante considérée comme « super aliment » car grandes valeurs nutritives + cultures très résistantes.</p> <p>-Type de saponines dans extrait = bidesmosides¹⁶ (aglycone avec deux chaînes d'oligosaccharide liées par un lien ester et un lien éther)</p> <p>- Masse moléculaire : 973,11 g/mol (Saponoside B).</p>	<p style="text-align: center;">Saponine B, un bidesmoside de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. :</p> 	<p>Modulation SARS-CoV-2 SpikeRBD-ACE2 pas/peu étudiées mais...</p> <p>Saikosaponines, monodesmosides (<i>Scrophularia sp</i>) (Tableau 4) : <i>In silico</i> (Sinha et al., 2020) : -Energie de liaison à Spike entre : <ul style="list-style-type: none"> -5,638 kcal/mol (Saikosaponine D). -8,299 kcal/mol (Saikosaponine V). </p> <p>Glycyrrhizine, monodesmoside (<i>Glycyrrhizia glabra</i> L.) (Tableau 4) : <i>In silico</i> (Li et al., 2021) : -Energie de liaison : <ul style="list-style-type: none"> -4,1 kcal/mol (ACE2). -7,0 kcal/mol (interface SpikeRBD-ACE2). </p> <p><i>In vitro</i> (Li et al., 2021) : -K_d par SPR : <ul style="list-style-type: none"> Affinité pour Spike : 0,28 nM. </p> <p>Esculentoside A, monodesmoside (<i>Phytolaccacae sp</i>) (Tableau 4) : <i>In silico</i> (Zeng et al., 2021) : -Energie de liaison à SpikeRBD : -13,1 kcal/mol.</p> <p>Platycodine D¹⁷, bidesmoside (<i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A.DC.) (Tableau 4) : <i>In vitro</i> (Kim et al., 2021) : - Inhibition de l'entrée de pseudovirus dans cellules H1299 : IC₅₀ = 0,69 µM.</p> <p>Diverses saponines¹³ : <i>In vitro</i> (Ding et al., 2012) : -Inhibition de l'entrée de H5N1, virus de la grippe aviaire dans cellules A549 : IC₅₀ = 6,00-9,25 µM.</p>	<p>Pharmacocinétique peu étudiée mais...</p> <p><i>In vitro</i> (Dong et al., 2020; Sun et al., 2019) : -Utilisation sur bactéries de l'extrait à 8-2000 µg/mL.</p> <p><i>In vivo</i> (Lin et al., 2021) : -Rat : Dose = 10 g/kg : Aucune mortalité → toxicité aigüe limitée. -Rat : Sur long terme → Diarrhées + Appétit diminué.</p> <p>BTS-1, bidesmoside (<i>Gypsophila oldhamiana</i> Miq.) : <i>In vivo</i> (Luo et al., 2013) : -Rat : Dose = 400 mg/kg : C_{max} = (37,4 ± 5,6) µg/mL.</p> <p>Hederacolchiside A1, monodesmoside (<i>Anemone raddeana</i> Regel.) : <i>In vivo</i> (Zhang et al., 2017) : -Rat : Dose = 179,3 mg/kg : C_{max} = 1069 ± 304,77 nM (959 ± 273,41 ng/mL).</p> <p>→ Gamme de concentration utilisée : 1-200 µg/mL.</p>
---	---	--	---

¹⁶ Détails en annexe 3.

¹⁷ Indiqué ici pour montrer des activités antivirales d'autres saponosides ; mais les pseudovirus et virus testés ne dépendent pas de l'interaction Spike-ACE2.

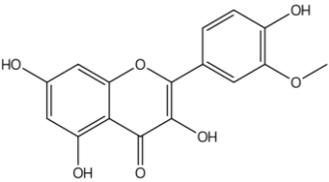
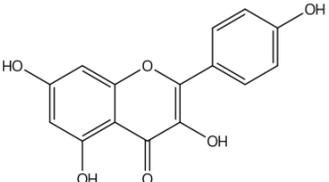
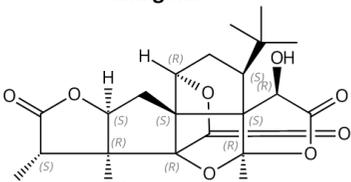
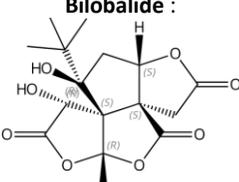
<p>Nom : Extrait sec de feuilles de <i>Ginkgo biloba</i> L.</p> <p>Classe chimique : Flavonoïdes ; Terpénoïdes ; Acide organiques.</p> <p>Description (AFMPS, 2021b; Singh et al., 2019) :</p> <p>-~24% d'hétérosides de flavonoïdes (Isorhamnétine/Kaempférol/Quercétine)</p> <p>-~3,9% de diterpènes trilactonique (Ginkgolide A, B, C et J) + 2,1% de sesquiterpène trilactonique (bilobalide)</p> <p>-~5-10% acides organiques.</p> <p>-Extrait sec déjà commercialisé (EGb 761) – Statut « médicament ».</p> <p>-Amélioration de qualité de vie en cas de démence/troubles cognitifs.</p> <p>-Masse moléculaire = 302,23 g/mol (Quercétine).</p> <p>-Masse moléculaire = 316,26 g/mol (Isorhamnétine).</p> <p>-Masse moléculaire = 286,24 g/mol (Kaempférol).</p> <p>-Masse moléculaire = 408,4 g/mol (Ginkgolide A).</p> <p>-Masse moléculaire = 326,3 g/mol (Bilobalide).</p>	<p>Quercétine : voir ci-dessus</p> <p>Isorhamnétine :</p>  <p>Kaempférol :</p>  <p>Ginkgolide A :</p>  <p>Bilobalide :</p> 	<p>Pas d'études avec extrait mais...</p> <p>Quercétine : Voir ci-dessus.</p> <p>Isorhamnétine <i>In vitro</i> (Zhan et al., 2021) :</p> <p>-K_d par SPR :</p> <ul style="list-style-type: none"> Affinité pour ACE2 : 2,51 ± 0,68 μM <p>Kaempferol <i>In silico</i> (Lingwan et al., 2020) :</p> <p>-Energie de liaison à ACE2 : -8,4 kcal/mol.</p> <p>Pour Ginkgolides et Bilobalide : Aucunes études mais autre lactone terpénique → Artémisinine (<i>Artémisia annua</i> L.) :</p> <p><i>In silico</i> (Badraoui et al., 2022) :</p> <p>-Energie de liaison avec ACE2 : -8,1 kcal/mol.</p> <p>→ Hypothèse = Effet synergique entre les composés ?</p>	<p><i>In vivo</i> (AFMPS, 2021b) :</p> <p>-Rat + chien : toxicité chronique → Uniquement faible toxicité chez chien à dose max (400 mg/kg).</p> <p>-Homme : Dose = 120 mg :</p> <ul style="list-style-type: none"> C_{max} Bilobalide = 0,035 μg/mL. C_{max} Ginkgolide A = 0,033 μg/mL. C_{max} Ginkgolide B = 0,017 μg/mL. <p>→ Gamme de concentration utilisée : 1-200 μg/mL.</p> <p>-Soit :</p> <ul style="list-style-type: none"> [Hétérosides flavonoïdes] = 0,24-48 μg/mL. [Ginkgolide A/B/C/J] = 0,039-7,8 μg/mL. [Bilobalide] = 0,021-4,2 μg/mL. <p>Concentrations relativement élevées mais faible toxicité chronique.</p>
---	---	---	--

Tableau 18 : Ensemble des produits naturels testés durant l'étude.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Développement de la méthode

3.2.1.1 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans du PBS-T ; à 0°C

La courbe d'affinité simulée (Figure 25), nous permet d'évaluer si la gamme de concentrations en ACE2 est suffisamment large pour couvrir les plateaux de pré- et de post-transition, qui sont importants à la détermination du K_d (Fluidic Analytics, 2021g).

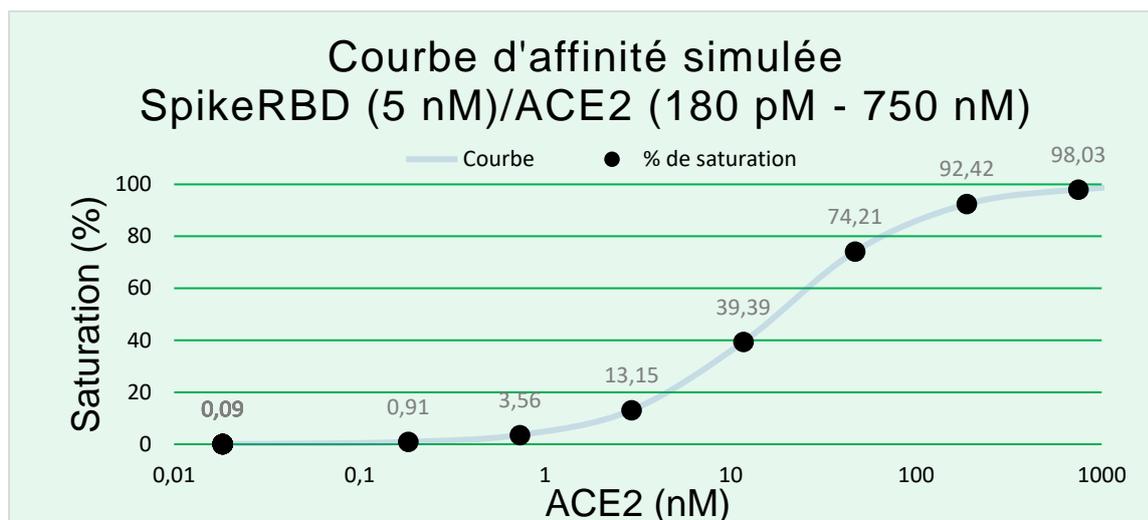


Figure 25 : Courbe d'affinité simulée. [SpikeRBD] = 5 nM. [ACE2] = 180 pM-750 nM. Valeur théorique estimée du K_d = 15 nM.

Au niveau expérimental, les plateaux de pré- et post-transition sont observables (Figure 26), indiquant que nous nous trouvons dans la bonne gamme de concentration. Le K_d mesuré est ici de 19,8 nM avec un IC (95%) = [5,1 nM à 54,3 nM]. La vraie valeur, qui a 95% de chance de se trouver dans cet intervalle, est proche du K_d que de 15 nM que nous avons fixé dans le simulateur et dans la gamme de valeurs décrite dans la littérature (Tableau 19).

Ligand-Récepteur	Méthode de détermination du K_d	K_d (nM)	T° (°C)	Solvant (tampon)	Référence
SARS-CoV-2 RBD-ACE2	SPR	4,7	Inconnue	10 mM HEPES, pH 7,2 ; 150 mM NaCl ; 0,05 % Tween 20	(Lan et al., 2020)
SARS-CoV-2 Spike-ACE2	SPR	14,7	Inconnue	10 mM HEPES, pH 8,0 ; 150 mM NaCl ; 0,05 % Tween 20	(Wrapp et al., 2020)
SARS-CoV-2 RBD-ACE2	SPR	63	37°C	25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 150 mM NaCl ; pH 7,5	(Barton et al., 2021)
	SPR	17	25°C	25 mM HEPES-KOH, pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 10 μM ZnCl ₂	(Laffeber et al., 2021)
	SPR	5,8	Inconnue	10 mM HEPES, pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 3 mM EDTA ; 0,05 % Tween 20	(Liu et al., 2021)
	SPR	44,2	Inconnue	10 mM HEPES, pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 3 mM EDTA ; 0,05 % Tween 20	(Shang et al., 2020)
	BLI	75,1	Inconnue	Inconnu	(Supasa et al., 2021)
SARS-CoV-2 Spike-ACE2	BLI	133	Inconnue	PBS ; 0,02 % Tween ; 1 mg/mL BSA	(Zhang et al., 2021a)

Tableau 19 : Méthodes, K_d , températures et solvants de la littérature pour quantifier l'affinité de SARS-CoV-2-Spike-ACE2.

Le R_h calculé de la protéine SpikeRBD libre était de 2,72 nm avec un IC (95%) = [2,56 nm à 2,87 nm], ce qui est proche de la valeur théorique de 2,72 nm calculée via le convertisseur de Fluidic Analytics pour une protéine repliée de ~30 kDa marquée par l'AF (1,250 kDa). Le R_h calculé du complexe SpikeRBD-ACE2 à saturation était de 4,75 nm avec un IC (95%) = [4,52 nm à 5,13 nm], ce qui est également relativement proche de la valeur théorique de 4,64 nm calculée via le convertisseur de Fluidic Analytics pour un complexe protéique replié et marqué de ~160 kDa.

Détermination K_d SpikeRBD (5 nM)/ACE2 - 0°C

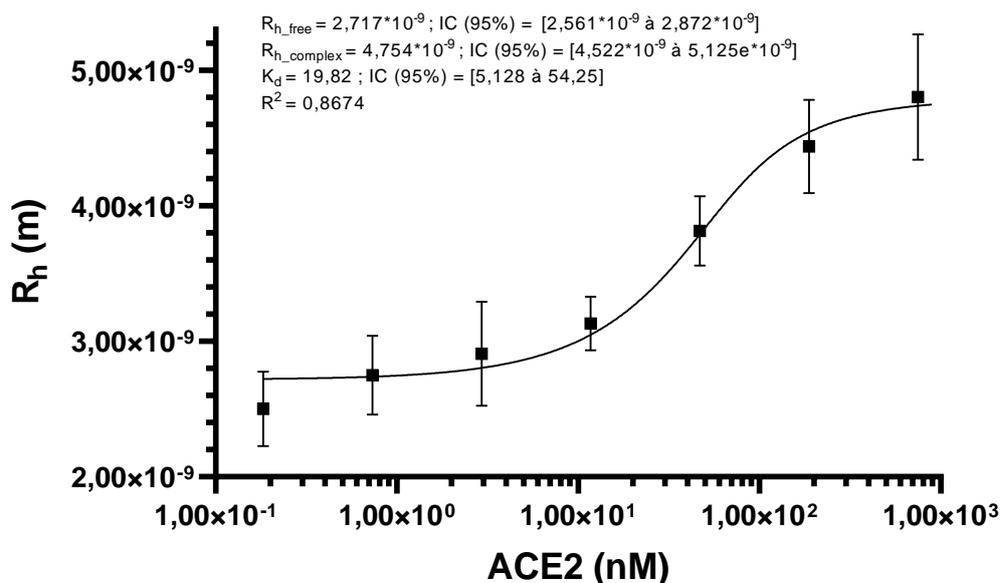


Figure 26 : Détermination K_d SpikeRBD (5 nM)/ACE2 – 0°C. Courbe ajustée à partir de l'ensemble des points. R_h en fonction de la concentration en ACE2. Détermination du K_d et vérification de la gamme de concentration. [ACE2] = 180 pM-750 nM. [SpikeRBD] = 5 nM. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 7*3.

Ces résultats étant proches des valeurs de K_d et de R_h décrites dans la littérature (Tableau 19) et calculées théoriquement par le convertisseur, ces paramètres vont nous servir de base au développement d'une méthode quantitative permettant de mesurer la modulation du complexe SpikeRBD-ACE2 par des produits naturels.

3.2.1.2 Quantification de la modulation du R_h par un produit naturel – Développement du protocole¹⁸ avec un flavonoïde, la quercétine

Sous les recommandations de Fluidic Analytics, nous souhaitons partir d'un taux de saturation du complexe proche de 90% afin d'effectuer un premier test. Nous avons donc sélectionné le point où $[SpikeRBD] = 5 \text{ nM}$ et $[ACE2] = 187,5 \text{ nM}$, ce qui correspond à une saturation théorique de 92,4 %. La quercétine, solubilisée dans l'eau MiliQ, a été testée sur une gamme de concentrations de 0,1-50 μM .

Ce premier test s'est avéré non concluant, un message d'erreur supposant une concentration de l'échantillon trop faible pour calculer les R_h est survenu. Nous avons donc augmenté la concentration en ACE2 et SpikeRBD.

Pour un second test, les concentrations en SpikeRBD et ACE2 ont été respectivement augmentées à 20 nM et 375 nM ; à ces concentrations, la saturation du complexe est théoriquement de 95,9 %.

Malgré l'ajustement des concentrations, aucun résultat n'a pu être obtenu avec le même message d'erreur. Cependant, en inspectant les tubes LoBind contenant les échantillons, nous nous sommes rendu compte que la quercétine avait précipité avec les protéines, au fil du temps, lors de l'incubation. Le fait que la quercétine ait précipité malgré des concentrations inférieures à son seuil de solubilité dans l'eau ($< 0,060 \text{ mg/mL}$ à 16°C , (PubChem, 2022a)) s'explique par le fait que, lors des 2 premiers tests, nous avons incubé nos échantillons 1 h sur de la glace afin de laisser le temps au complexe SpikeRBD-ACE2 de se former, et, au produit naturel, d'éventuellement moduler cette interaction. L'abaissement de la température provoquant une diminution du seuil de solubilité, le précipité est apparu. De plus, le seuil de solubilité dans l'eau étant relativement faible, un changement de solvant nous a semblé judicieux.

¹⁸ Cette étape d'optimisation a permis d'aboutir au « protocole général » (3.2.1.4) décrit en 3.1.4.1.

Lors d'un troisième test, nous avons donc modifié ces 2 paramètres :

- La solution stock de quercétine a été réalisée dans du DMSO, ce qui permet un seuil de solubilité plus élevé, à 68 mg/mL à 25°C (Fisher Scientific, 2022). Les dilutions ont été réalisées par ajout de PBS. La concentration de DMSO maximale dans ces dilutions était de 2 % v/v. Dans le mélange final où les protéines sont présentes, la concentration de DMSO y est au maximum de 1 %, car au-delà de 1,8 % v/v de DMSO, celui-ci peut interférer avec l'intégrité structurelle des protéines (Fluidic Analytics, 2021c). Le DMSO est l'un des solvant organique les plus forts qui permet de solvater de nombreux composé, autant organiques qu'inorganiques ; il présente également l'avantage d'être miscible avec beaucoup de solvant organique mais aussi avec l'eau (Gaylord Chemical Company, 2022). Ce mélange nous semble idéal afin de dissoudre de nombreux produits naturels présentant parfois une faible solubilité dans l'eau.
- L'incubation s'est faite à température ambiante (~20°C) qui correspond à la température d'analyse.

Dans ces conditions, aucun précipité n'a été détecté et ce, même après plusieurs heures d'incubation. Nous avons obtenu un signal pour les différentes concentrations en quercétine que nous avons testées mais aucun effet modulateur de celle-ci n'a été mesuré ; alors que dans l'étude *in vitro* sur laquelle nous nous étions basé pour choisir ce composé, la quercétine présentait une affinité pour l'ACE2 ($K_d = 48,3$ nM), pour Spike ($K_d = 22,1$ nM), et pour le complexe SpikeRBD-ACE2 ($K_d = 24,1$ nM) (Pan et al., 2020).

De ce constat, nous avons établi les deux hypothèses suivantes :

- Soit, la quercétine n'est pas une bonne molécule candidate aux concentrations que nous avons étudiées pour développer cette méthode ; nous pourrions donc augmenter la concentration maximale en ce produit naturel afin de voir si celui-ci présente un effet à concentration supra-physiologique.
- Soit, nous avons choisi un point de départ dans la courbe d'affinité de nos protéines trop élevé (95,95% de liaison). Un pourcentage de liaison trop importante entre SpikeRBD et ACE2 pourrait empêcher la quercétine d'interagir avec eux. L'expérience devrait être reprise avec un point de départ plus bas dans cette courbe d'affinité.

3.2.1.3 Détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans un mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) ; à température ambiante

Avant de continuer, nous avons déterminé le K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans les conditions retenues en 3.2.1.2 (mélange DMSO/PBS à 1% v/v de DMSO, à température ambiante) (Figure 27).

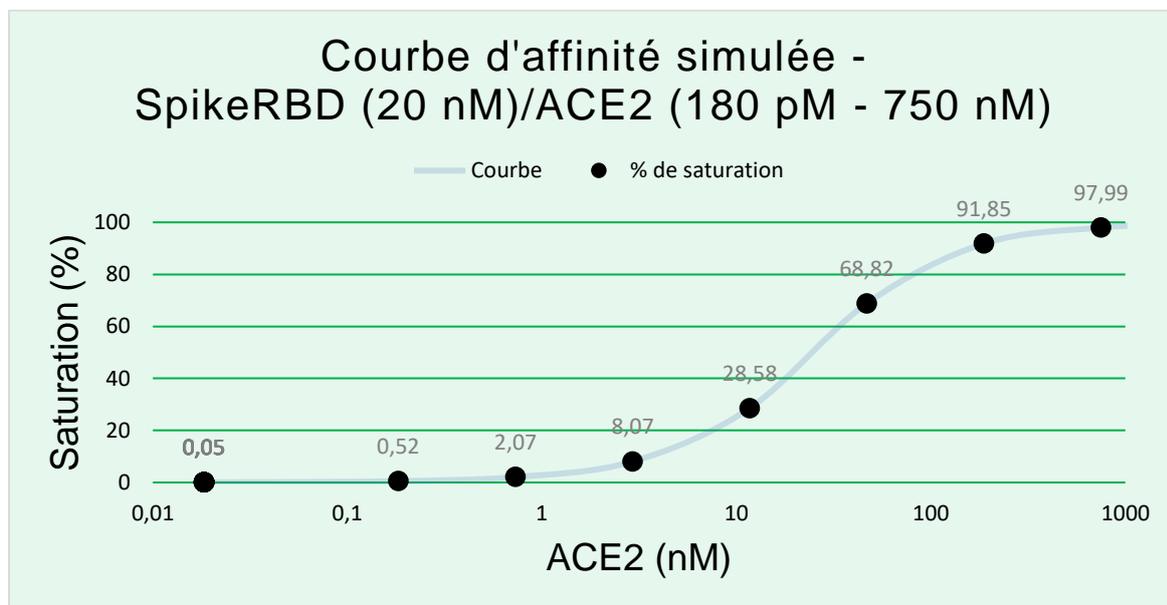


Figure 27 : Courbe d'affinité simulée. [SpikeRBD] = 20 nM. [ACE2] = 180 pM-750 nM. Valeur théorique du K_d = 15 nM.

Lors de cette détermination du K_d , nous considérons le mélange équimolaire de 20 nM en SpikeRBD-AF et ACE2 qui nous permet d'obtenir un point où le taux de saturation de 43,1 %. Celui-ci servira de point de départ dans les futurs tests évaluant l'efficacité des produits naturels. Le R_h moyen de ce point équimolaire servira, en outre, de « ligne de base » de la méthode, pour nos prochains tests afin d'évaluer s'il y a, ou non, un effet significatif des produits naturels testés.

Détermination K_d SpikeRBD (20 nM)/ACE2 DMSO 1 % v/v - t° ambiante

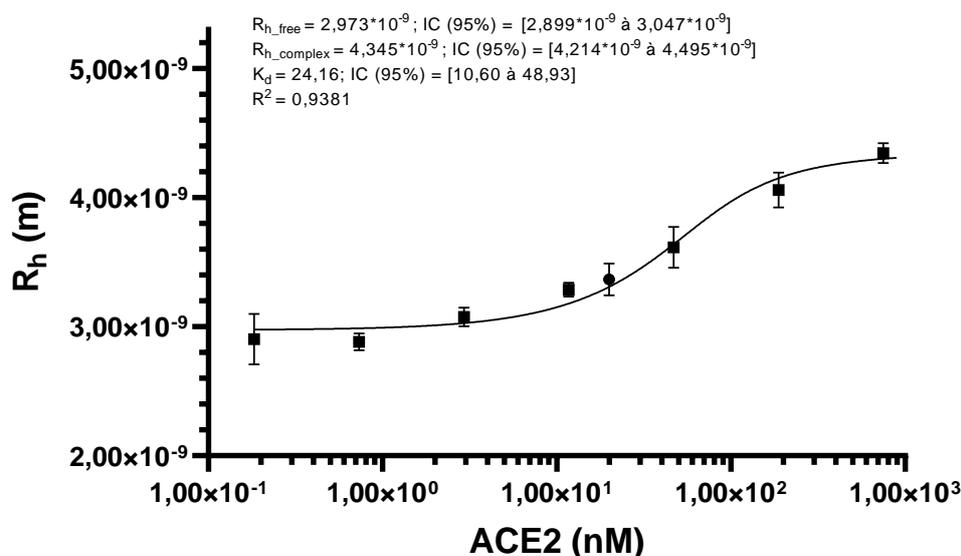


Figure 28 : Détermination K_d SpikeRBD (20 nM)/ ACE2 – DMSO 1 % v/v – t° ambiante. Courbe ajustée à partir de l'ensemble des points. R_h en fonction de la concentration en ACE2. Détermination du K_d et vérification de la gamme de concentration. [ACE2] = 180 pM-750 nM. [SpikeRBD] = 20 nM. Microfluidic Difusional Sizing; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 8*3.

Le R_h moyen du point équimolaire à 20 nM en SpikeRBD et ACE2 est de $3,4 \pm 0,1$ nm. La gamme de concentrations choisie afin de déterminer ce K_d est toujours correcte car les plateaux de pré- et post-transition sont présents. Le K_d calculé de 24,16 nM avec un IC (95%) = [10,60 nM à 48,93 nM], est relativement proche de notre valeur simulée de 15 nM du K_d mesuré à 0°C (3.2.1.1), et est dans la gamme de la littérature (Tableau 19). Le R_h calculé pour la SpikeRBD libre est de 2,97 nm avec un IC (95%) = [2,90 nm à 3,05 nm]. Celui du complexe SpikeRBD-ACE2 à saturation est de 4,35 nm avec un IC (95%) = [4,21 nm à 4,50 nm]. Ces valeurs diffèrent légèrement des valeurs calculées avec le convertisseur de Fluidic Analytics qui étaient respectivement de 2,72 nm (~31,25 kDa) et 4,64 nm (~160 kDa). Cette différence peut s'expliquer par une faible interaction avec le DMSO et le fait que le simulateur ne tienne pas compte de la température. La nécessité d'utiliser le DMSO comme co-solvant, afin d'assurer la bonne solubilisation de nos produits naturels, et de réaliser l'incubation à température ambiante, afin de ne pas abaisser le seuil de solubilité nous a conduit à appliquer ces conditions pour la suite de notre développement de méthode.

3.2.1.4 « Protocole général »

Les concentrations de départ sont donc modifiées à 20 nM en SpikeRBD et ACE2, afin d'obtenir un mélange équimolaire. A ces concentrations, la saturation du complexe est théoriquement de 43,1 %.

La Figure 29 indique que, à une concentration de 150 μM , la quercétine induit une diminution du R_h du complexe SpikeRBD-ACE2. L'étude statistique décrite au point 3.2.1.5 nous a permis de prouver qu'il existe une différence significative entre le R_h moyen de la quercétine à 150 μM et le R_h moyen du « contrôle » du jour ($P < 0,001$).

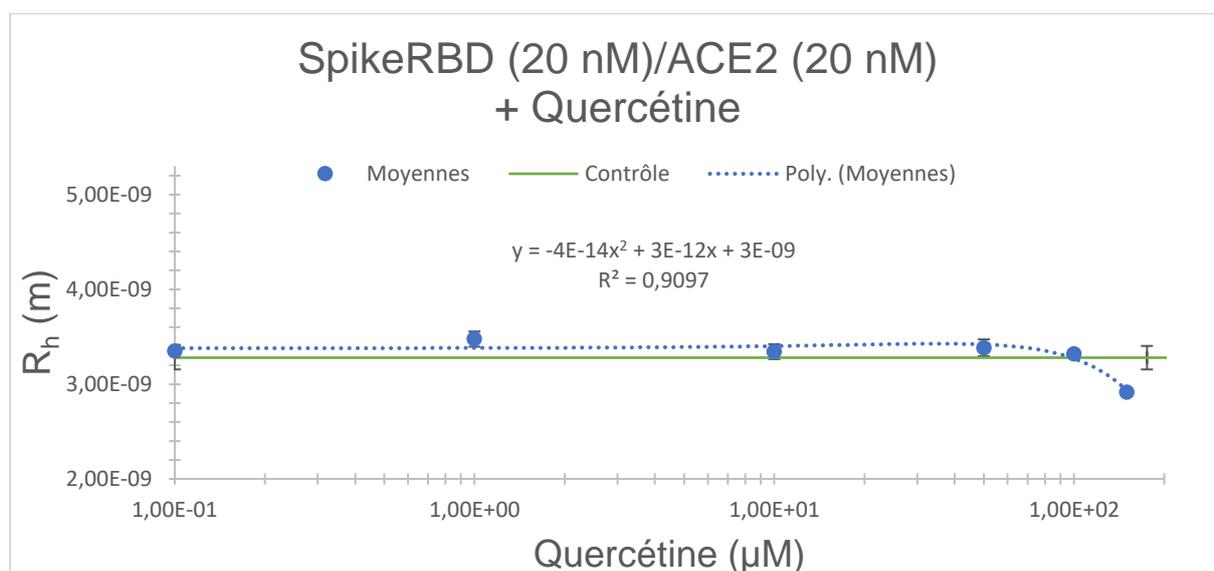


Figure 29 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Quercétine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en quercétine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; $n = 3$.

La méthode que nous avons mise au point, en étudiant un éventuel effet modulateur de la quercétine envers le complexe SpikeRBD-ACE2, nous a permis d'établir un « protocole général » qui sera appliqué dans la suite de notre étude pour l'ensemble des produits naturels testés.

3.2.1.5 Analyse statistique des résultats

Une ANOVA One-way suivie, en post-hoc, d'un test de comparaisons multiples avec une correction de Bonferroni (intervalles de confiance à 95%) permet de comparer les moyennes des valeurs R_h obtenues pour chacune des concentrations du produit naturel testé, avec le « contrôle » qui sera le R_h moyen au point équimolaire en SpikeRBD et ACE2 (20 nM) mesuré lors du test.

3.2.2 Validation de la méthode

3.2.2.1 Sélectivité/spécificité

Définition : « La spécificité est la capacité d'évaluer sans équivoque l'analyte en présence de composants susceptibles d'être présents. En général, il peut s'agir d'impuretés, de produits de dégradation, de matrice, etc. » (EDQM, 2022)

Afin de déterminer si notre méthode est sélective, nous avons réalisé l'analyse de 3 échantillons contenant respectivement : la SpikeRBD marquée à 0,507 μM , l'ACE2 à 750 nM, du PBS-T (Blanc). Chaque analyse a été réalisée en 3 réplicata. Nous avons ensuite comparé les électrophérogrammes issus de chaque analyse.

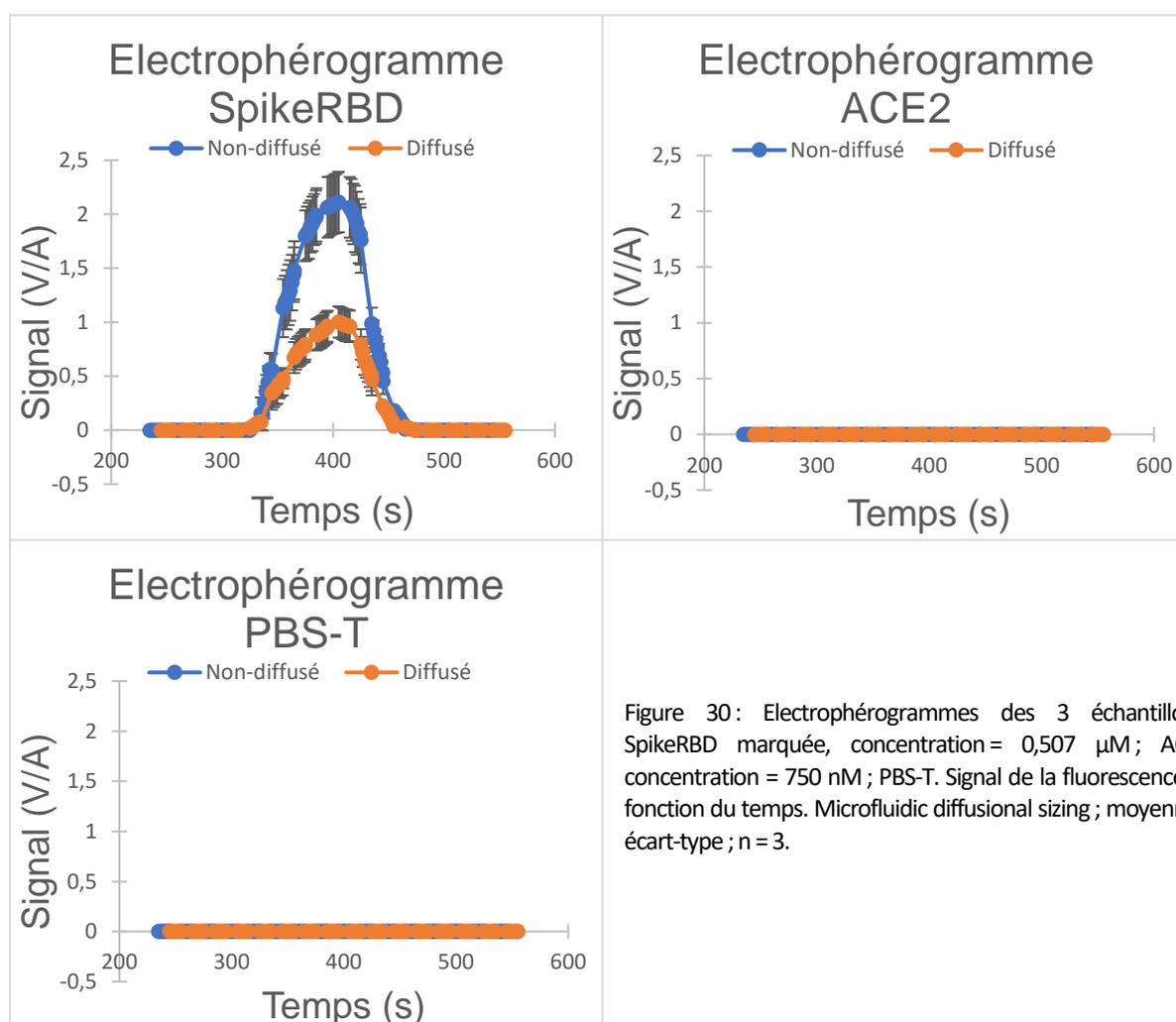


Figure 30: Electrophérogrammes des 3 échantillons : SpikeRBD marquée, concentration = 0,507 μM ; ACE2, concentration = 750 nM; PBS-T. Signal de la fluorescence en fonction du temps. Microfluidic diffusional sizing; moyenne \pm écart-type; n = 3.

Comme nous pouvons le constater en observant les 3 électrophérogrammes fournis lors de l'analyse Figure 30 ; de ces 3 échantillons, seule la SpikeRBD marquée donne un signal permettant la détermination d'un R_h .

Puisqu'une analyse en MDS ne détecte et ne mesure que les molécules (protéines) marquées avec un fluorophore, il est logique de constater que seule la SpikeRBD marquée peut être détectée. De ce fait nous pouvons conclure que notre méthode est sélective.

Aux longueurs d'onde de travail de l'appareillage ($\lambda_{\text{Excitation}}$, 630 nm ; $\lambda_{\text{Emission}}$, 694 nm), il y a une probabilité très faible que des produits naturels fluorescent ou absorbent le rayonnement incident (« *Quenching* »). Ceci sera systématiquement vérifié via le signal V/A.

3.2.2.2 Exactitude (justesse)

Définition : « *L'exactitude d'une procédure d'analyse exprime la proximité d'un accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur vraie conventionnelle, soit comme une valeur de référence acceptée et la valeur trouvée. C'est ce qu'on appelle parfois la justesse.* » (EDQM, 2022)

- Rayon hydrodynamique de SpikeRBD marquée

Afin de déterminer ce paramètre, nous avons calculé la valeur théorique du R_h de SpikeRBD-AF grâce au convertisseur de Fluidic Analytics, en encodant une valeur de poids moléculaire (kDa), et en sélectionnant si la protéine est sous son état « repleyé » ou « déployé ». Ce convertisseur est basé sur l'Équation 12, et des courbes de calibration réalisées avec différents standards protéiques de conformation globulaire ou non, ayant des poids moléculaires différents (Fluidic Analytics, 2021f, 2021b). Dans notre cas nous avons encodé une valeur de 31,25 kDa et sélectionné « repleyé », résultant en un R_h théorique de 2,72 nm. Ce R_h a ensuite été comparé avec les valeurs que nous avons pu mesurer au cours de notre étude (Tableau 20) ; lors des déterminations du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2 dans le PBS-T et dans le mélange DMSO/PBS (1:99, v/v), lors des vérifications de marquage de la protéine SpikeRBD par l'AF, et lors de tests dans différents solvants.

Contexte de la mesure	T° de la puce (°C)	[SpikeRBD marquée] (nM)	R _h (nm)
Vérification marquage 1 - 19/01/2022 (n = 3)	23,1	50	3,03
	22,3	50	2,94
	21,1	50	2,74
Vérification marquage 2 - 18/02/2022 (n = 3)	22,6	50	2,76
	23,3	50	2,93
	21,9	50	2,82
Test R _h dans PBS-T (n = 1)	23,4	20	2,92
Test R _h dans eau MiliQ (n = 1)	22,8	20	3,01
Détermination K _d PBS-T - courbe 1 (n = 1)	23,8	5	2,902
Détermination K _d PBS-T - courbe 2 (n = 1)	23,8	5	2,764
Détermination K _d PBS-T - courbe 3 (n = 1)	26,1	5	2,487
Détermination K _d DMSO 1 % v/v - Courbe 1 (n = 1)	25,2	20	3,063
Détermination K _d DMSO 1 % v/v - Courbe 2 (n = 1)	25,6	20	2,888
Moyenne			2,87
Ecart-type			0,15

Tableau 20 : Détermination du R_h moyen mesuré et de son écart-type. Mesures du R_h de SpikeRBD marquée, lors de différents contextes, à différentes concentrations.

La R_h moyen que nous avons mesuré est de $2,87 \pm 0,15$ nm (Tableau 20), ce qui représente un taux de recouvrement de la valeur théorique de 105,5%.

3.2.2.3 Précision (fidélité)

Définition : « *La précision d'une procédure d'analyse exprime la proximité de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir d'un échantillonnage multiple d'un même échantillon homogène dans les conditions prescrites.* » (EDQM, 2022)

- Rayon hydrodynamique moyen

Nous avons évalué la précision du R_h moyen de la SpikeRBD marquée, mesuré par notre méthode, en déterminant les coefficients de variation.

- SpikeRBD – Variabilité inter-jour

La comparaison inter-jour s'est faite en analysant les R_h moyen obtenus lors des 2 vérifications de marquage de la protéine SpikeRBD, et des déterminations du K_d dans le PBS-T et le mélange DMSO/PBS (1:99, v/v).

Contexte de la mesure	Date	[SpikeRBD marquée] (nM)	R _h moyen (nm)
Vérification marquage 1 - 19/01/2022	19/01/2022	50	2,900
Vérification marquage 2 - 18/02/2022	18/02/2022	50	2,840
Détermination K _d PBS-T - courbe 1	20/01/2022	5	2,902
Détermination K _d PBS-T - courbe 2	21/01/2022	5	2,764
Détermination K _d PBS-T - courbe 3	24/01/2022	5	2,487
Détermination K _d DMSO 1 % v/v - Courbe 1	21/02/2022	20	3,063
Détermination K _d DMSO 1 % v/v - Courbe 2	21/02/2022	20	2,888
Moyenne			2,83
Ecart-type			0,18
Coefficient de variation (%)			6,27

Tableau 21 : R_h moyen de SpikeRBD - Variabilité inter-jour. Détermination du coefficient de variation (%). Contexte de la mesure ; date ; [SpikeRBD marquée] ; [ACE2] ; R_h moyen.

Le Tableau 21 nous indique que la précision inter-jour de notre détermination du R_h moyen de la SpikeRBD marquée présente une variation de 6,27% par rapport à la valeur moyenne qui est de 2,83 ± 0,18 nm.

○ Point de la courbe d'affinité – intra-jour

La comparaison intra-jour s'est faite en analysant les R_h obtenus lors de la réalisation des 2 courbes d'affinité dans le mélange DMSO/PBS (1:99, v/v), courbes réalisées le 21/02/2022. A partir des R_h mesurés pour 3 concentrations en ACE2, nous avons déterminé un coefficient de variation moyen.

[SpikeRBD marquée] (nM)	20	20	20
[ACE2] (nM)	0,183	20	750
R _h 1 (nM) - Courbe 1	3,104882052	3,579996776	4,374446536
R _h 2 (nM) - Courbe 1	3,018668387	3,309337865	4,210010959
R _h 4 (nM) - Courbe 2	2,678628288	3,294057801	4,390579555
R _h 5 (nM) - Courbe 2	2,806865757	3,255495723	4,395624335
Coefficient de variation intra-jour (%)		2,90	
Coefficient de variation total (%)		3,01	

Tableau 22 : R_h point de la courbe d'affinité - Précision intra-jour. Détermination du coefficient de variation moyen (%) et de son écart-type. [SpikeRBD marquée] ; [ACE2] ; Mesure de Rh par point ; Moyenne, écart-type, coefficient de variation des R_h pour chaque point.

Une ANOVA 2-ways a été réalisée afin de déterminer les coefficients de variations. Nous constatons, à l'aide du Tableau 22, que notre détermination du R_h moyen pour chaque point de la courbe présente une variation intra-jour de 2,90 %.

• Constante de dissociation du complexe SpikeRBD-ACE2

Nous avons évalué la précision du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2, mesuré par notre méthode, en déterminant le coefficient de variation inter-jour.

Pour ce faire, nous avons analysé les K_d obtenus lors de la réalisation des courbes d'affinités dans le PBS-T, et dans le mélange DMSO/PBS (1:99, v/v).

Contexte de la mesure	Date	T° de la puce (°C)	[SpikeRBD marquée] (nM)	[ACE2] (nM)	K_d (nM)
Détermination K_d PBS-T - courbe 1	20/01/2022	23,8	5	0,180-750	30,24
Détermination K_d PBS-T - courbe 2	21/01/2022	23,8	5	0,180-750	33,39
Détermination K_d PBS-T - courbe 3	24/01/2022	26,1	5	0,180-750	28,00
Détermination K_d DMSO 1 % v/v – Courbe 1	21/02/2022	25,2	20	0,180-750	45,32
Détermination K_d DMSO 1 % v/v – Courbe 2	21/02/2022	25,6	20	0,180-750	30,00
Moyenne					33,39
Ecart-type					6,94
Coefficient de variation (%)					20,79

Tableau 23 : K_d - Précision inter-jour. Détermination du coefficient de variation (%). Contexte de la mesure ; date ; t° de la puce ; [SpikeRBD marquée] ; [ACE2] ; K_d .

Notre détermination du K_d présente une variabilité inter-jour de 20,79%.

3.2.2.4 Linéarité

Définition : « La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (dans une plage donnée) à obtenir des résultats d'essai qui sont directement proportionnels à la concentration (quantité) d'analyte dans l'échantillon. » (EDQM, 2022)

Les données obtenues lors de la détermination du K_d sont non-linéaires mais d'allure sigmoïdale. En appliquant l'Équation 13 par une régression non-linéaire (méthode des moindres carrés ; contraintes en Figure 19), un coefficient de détermination (R^2) a été calculé.

Contexte de la mesure	[SpikeRBD marquée] (nM)	[ACE2] (nM)	R^2
Détermination K_d PBS-T - courbe 1	5	0,180-750	0,8542
Détermination K_d PBS-T - courbe 2	5	0,180-750	0,9227
Détermination K_d PBS-T - courbe 3	5	0,180-750	0,943
Détermination K_d DMSO 1 % v/v - Courbe 1	20	0,180-750	0,9423
Détermination K_d DMSO 1 % v/v - Courbe 2	20	0,180-750	0,9626
Moyenne			0,925
Ecart-type			0,0420

Tableau 24 : Détermination du R^2 moyen calculé et de son écart-type. Mesures du R^2 lors de chaque détermination du K_d du complexe SpikeRBD-ACE2. [SpikeRBD marquée] ; [ACE2]. $n = 7*3$.

La moyenne des coefficients de détermination (R^2) est de $0,925 \pm 0,042$.

3.2.2.5 Reproductibilité

La machine étant nouvelle au laboratoire, nous avons voulu évaluer la reproductibilité des puces jetable, ainsi que les limites de celles-ci. Pour ce faire nous avons réalisé les 3 tests suivants :

- Une puce par mesure de R_h

Cette reproductibilité a été évaluée en reprenant les données issues des vérifications de la qualité de la purification de SpikeRBD-AF après les marquages :

Contexte de la mesure	T° de la puce (°C)	[SpikeRBD marquée] (nM)	R_h (nm)
Vérification marquage 1 - 19/01/2022 (n = 3)	23,1	50	3,03
	22,3	50	2,94
	21,1	50	2,74
Vérification marquage 2 - 18/02/2022 (n = 3)	22,6	50	2,76
	23,3	50	2,93
	21,9	50	2,82
Moyenne			2,87
Ecart-type			0,11
Coefficient de variation (%)			3,99

Tableau 25 : Une puce par mesure de R_h – Reproductibilité. Vérification de la qualité de la purification de Spike-AF en utilisant 1 puce par mesure de R_h . Moyenne \pm Ecart-type, et coefficient de variation (%). Contexte de la mesure ; t° de la puce ; date ; [SpikeRBD marquée] ; R_h .

Nous constatons que le R_h moyen lors de la vérification de ces marquages est de $2,87 \pm 0,11$ nm, avec une variation de 3,99% par rapport à la moyenne. Ceci montre une bonne reproductibilité.

- Une puce pour mesurer X fois la même concentration

Nous avons réalisé ce test en utilisant une seule puce afin de réaliser 8 mesures d'un échantillon de SpikeRBD marquée à 507 nM. Entre chaque mesure, le reste de l'échantillon précédent était précautionneusement enlevé à l'aide d'une micropipette.

Contexte de la mesure	[SpikeRBD marquée] (nM)	R _h (nm)
Puce 1 - mesure 1	507	3,07
Puce 1 - mesure 2	507	3,05
Puce 1 - mesure 3	507	1,98
Puce 1 - mesure 4	507	3,14
Puce 1 - mesure 5	507	2,80
Puce 1 - mesure 6	507	1,36
Puce 1 - mesure 7	507	2,93
Puce 1 - mesure 8	507	4,41
Moyenne		2,84
Ecart-type		0,89
Coefficient de variation (%)		31,4

Tableau 26 : Une puce pour mesurer x fois la même concentration – Limité de reproductibilité. Mesure du R_h de SpikeRBD marquée 8 fois sur une même puce. Moyenne ± Ecart-type, et coefficient de variation (%). Contexte de la mesure ; date ; [SpikeRBD marquée] ; R_h.

Nous remarquons qu'en utilisant cette technique, le R_h moyen de SpikeRBD-AF est de 2,84 ± 0,89 nm, et un coefficient de variation de 31,4 %. Ceci démontre une faible reproductibilité de la mesure. La présence de bulles d'air dans les canaux microfluidiques lors de l'utilisation répétée d'une même puce n'est pas à exclure. Au vu des résultats, nous recommandons de n'utiliser les puces jetables que pour 1 à 2 mesures maximum d'une même concentration d'un échantillon. Par la suite, nous avons utilisé 1 puce/mesure.

- Utilisation d'une seule puce pour déterminer le K_d

Pour la réalisation de ce test, nous avons injecté tous les échantillons sur une seule puce afin de déterminer le K_d du complexe protéique SpikeRBD-ACE2. Le test a été réalisé comme décrit au point 3.1.3.1. Nous avons effectué les mesures dans l'ordre croissant des concentrations en ACE2. Entre chaque mesure, le reste de l'échantillon précédent était précautionneusement enlevé à l'aide d'une micropipette. Chaque point de la courbe était réalisé en 3 réplicats.

Détermination K_d SpikeRBD (5 nM)/ACE2 (1 puce = 1 courbe)

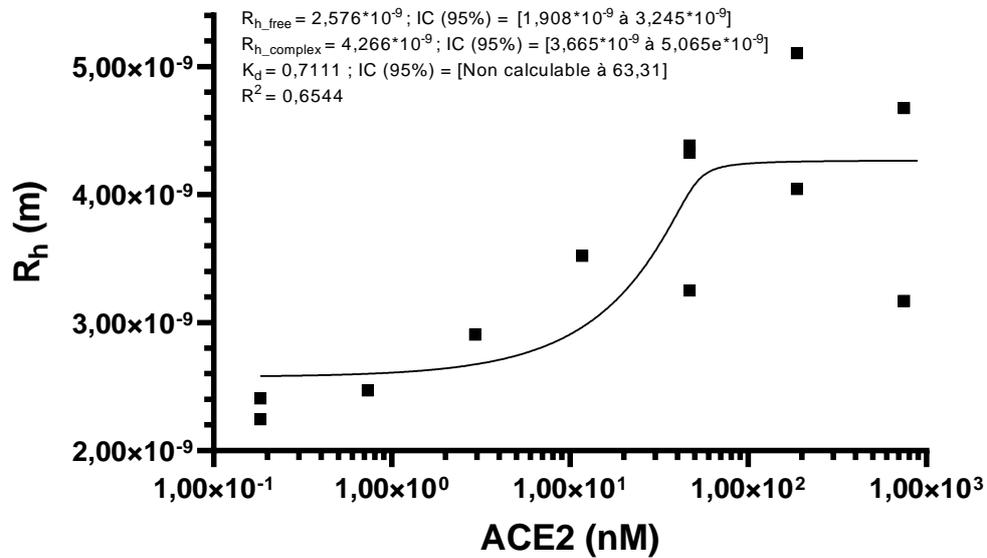


Figure 31 : Détermination K_d SpikeRBD (5 nM)/ ACE2 – (1 puce = 1 courbe). Limite de reproductibilité : Détermination du K_d en utilisant une seule et même puce pour toutes les mesures de R_h . Le solvant était le PBS-T. R_h en fonction de la concentration en ACE2. Détermination du K_d et vérification de la gamme de concentration. [ACE2] = 180 pM-750 nM. [SpikeRBD] = 5 nM. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; $n = 3$ (si possible).

Il est à noter qu'une mesure en 3 réplicata n'a été réalisable que pour un seul point : [ACE2] = 46,9 nM. Pour les autres, une erreur après la mesure s'est affichée, aucune donnée n'a pu donc être récoltée pour ceux-ci.

Il n'est pas fiable de n'utiliser qu'une seule puce pour déterminer le K_d , ce qui rejoint la conclusion du point précédent.

3.2.3 Application de la méthode

3.2.3.1 Comparaison des contrôles et ajustement des résultats

Comme décrit au point 3.2.1.3, le R_h moyen du point équimolaire en SpikeRBD et ACE2 (20 nM) définit lors de la détermination du K_d du complexe dans le mélange DMSO/PBS (1:99, v/v) (3.2.1.3, Figure 28) nous sert de « contrôle de la méthode », à partir duquel nous pouvons déterminer si une molécule induit une différence de R_h significative en interagissant avec le complexe.

Pour chaque molécule que nous testons, nous réalisons un « contrôle » du jour, défini par le R_h moyen du complexe SpikeRBD-ACE2 en concentrations équimolaires (20 nM) mesuré lors du test de cette molécule.

Clairement, la reproductibilité du R_h mesuré de jour en jour n'est pas satisfaisante (Figure 32).

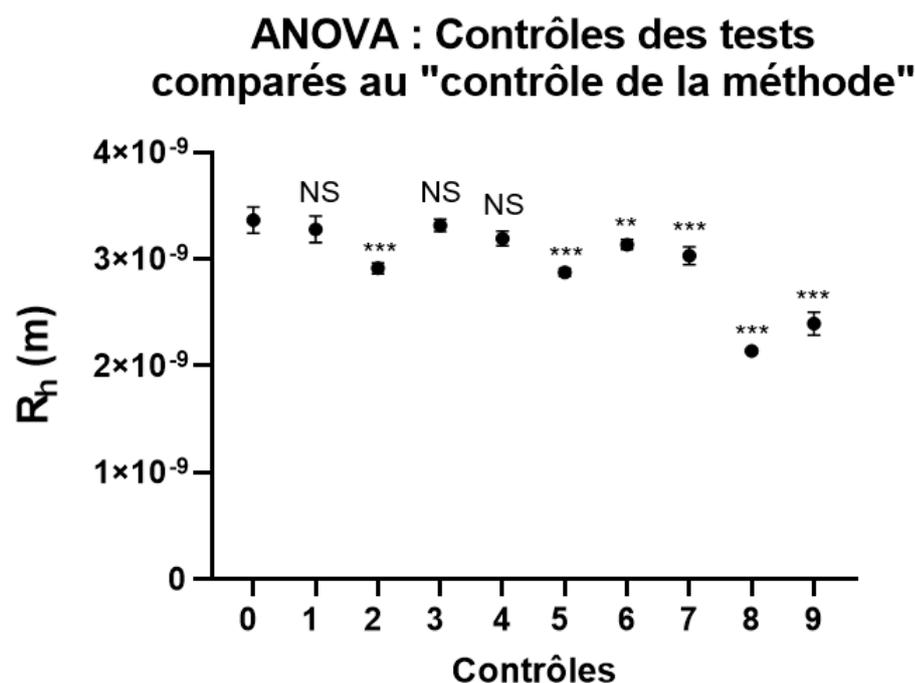


Figure 32 : ANOVA : Contrôles des tests comparés au « contrôle de la méthode ». R_h du point équimolaire (20 nM) en SpikeRBD et ACE2. ANOVA One-way, test post-hoc avec correction de Bonferroni. 0 = Contrôle de la méthode ; 1 = contrôle de la quercétine ; 2 = contrôle de la naringénine ; 3 = contrôle de la naringine ; 4 = contrôle de l'ivermectine ; 5 = contrôle de la chloroquine ; 6 = contrôle de l'érythromycine ; 7 = contrôle de l'extrait sec éthanolique de racine de rhubarbe ; 8 = contrôle de l'extrait sec méthanolique d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd. ; 9 = contrôle de l'extrait sec de feuilles de *Ginkgo biloba* L. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 3. NS > 0,05 ; * < 0,05 ** < 0,01 ; *** < 0,001.

Pour 3 tests sur les 9 qui ont été réalisés au cours de cette étude, cette différence était non significative (quercétine, naringine, ivermectine). Étant donné que le « protocole général » a été appliqué à l'identique pour les différents tests avec les produits naturels (hors concentration en produit naturel), la différence que nous observons peut s'expliquer par 2 facteurs : (i) Les

puces : Les lots de puces étaient différents entre chaque test de molécule différente (Tableau 6). Une variabilité ou dans le design des puces pourrait expliquer cette différence. Un communiqué de Fluidic analytics, en date du 23 mai 2022, indique d'ailleurs un changement de fournisseur. Peut-être ont-ils, eux aussi, constaté cette variabilité. (ii) La température : Nous avons constaté une variabilité dans la température interne de l'appareillage entre les différents jours durant lesquels nous avons effectué les tests, la température oscillait entre 21°C et 28°C. La variabilité de la température ambiante peut expliquer ce phénomène ; nous déplorons le manque d'isolation thermique de la machine et le fait que la température du système ne soit pas réglable afin d'assurer une meilleure reproductibilité. La température est un facteur important qui rentre dans l'équation de Stokes-Einstein (Équation 12), et, par conséquent, influence la valeur du R_h .

3.2.3.2 La quercétine

Comme nous l'avons vu en 3.2.1.4, la quercétine module de façon significative l'interaction SpikeRBD-ACE2 à une concentration de 150 μM en diminuant de $10,81 \pm 0,98 \%$ le R_h du complexe par rapport au contrôle (Figure 41). Or, dans la littérature, une étude *in vitro* réalisée en SPR (Pan et al., 2020), rapporte une activité à de plus faibles concentrations.

Bien que la quercétine ne module l'interaction SpikeRBD-ACE2 qu'à des concentrations supra-physiologiques ($> 100 \mu\text{M}$), le constat de son activité reste intéressant car il permet d'émettre l'hypothèse que d'autres produits naturels, structurellement apparentés, présentent peut-être une activité à des doses physiologiques.

3.2.3.3 La naringénine

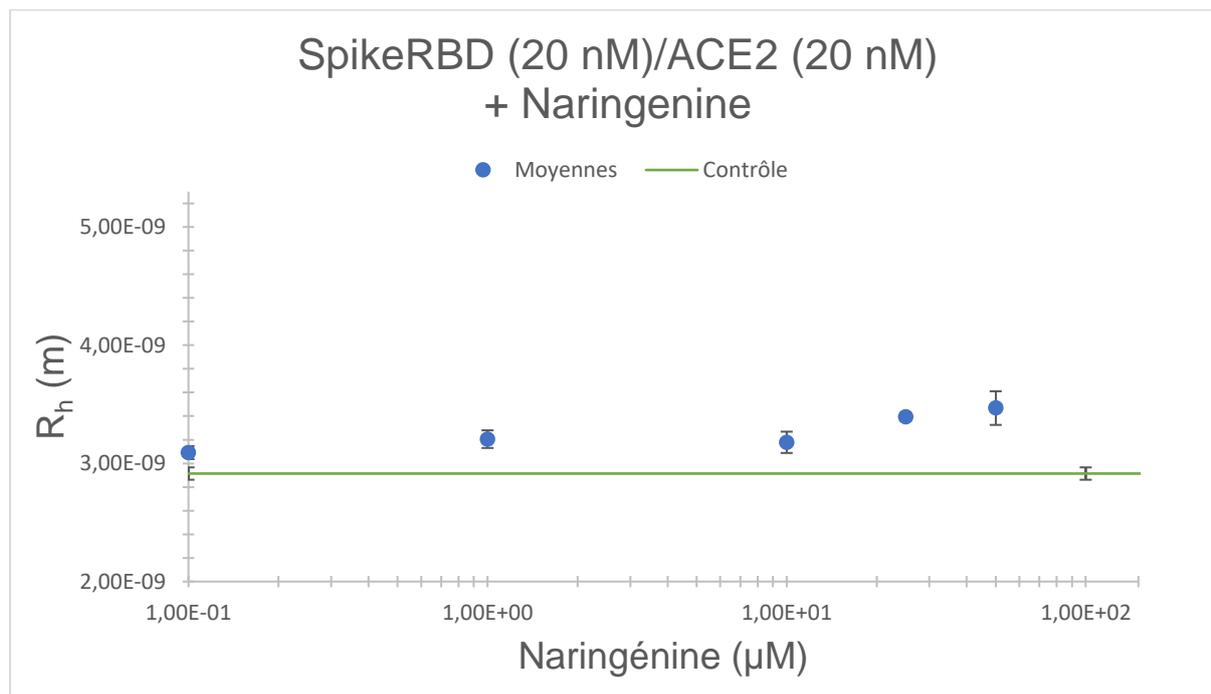


Figure 33 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Naringénine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en naringénine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne ± Ecart-type ; n = 3.

Nos résultats indiquent que la naringénine provoque une augmentation du R_h du complexe protéique. Après avoir effectué l'analyse statistique, nous constatons que la différence de R_h par rapport au contrôle est significative dès la concentration de 1 µM (P < 0,01). Cette différence s'accroît de façon quasi dose dépendante avec un effet maximal à 50 µM (P < 0,001). A 50 µM, la naringénine provoque une augmentation de 16,47 ± 3,64 % de la taille du complexe par rapport au contrôle (Figure 41).

3.2.3.4 La naringine

En nous basant sur les résultats positifs obtenus pour la naringénine, nous avons évalué si son hétéroside, plus polaire et plus encombré, présente une activité différente.

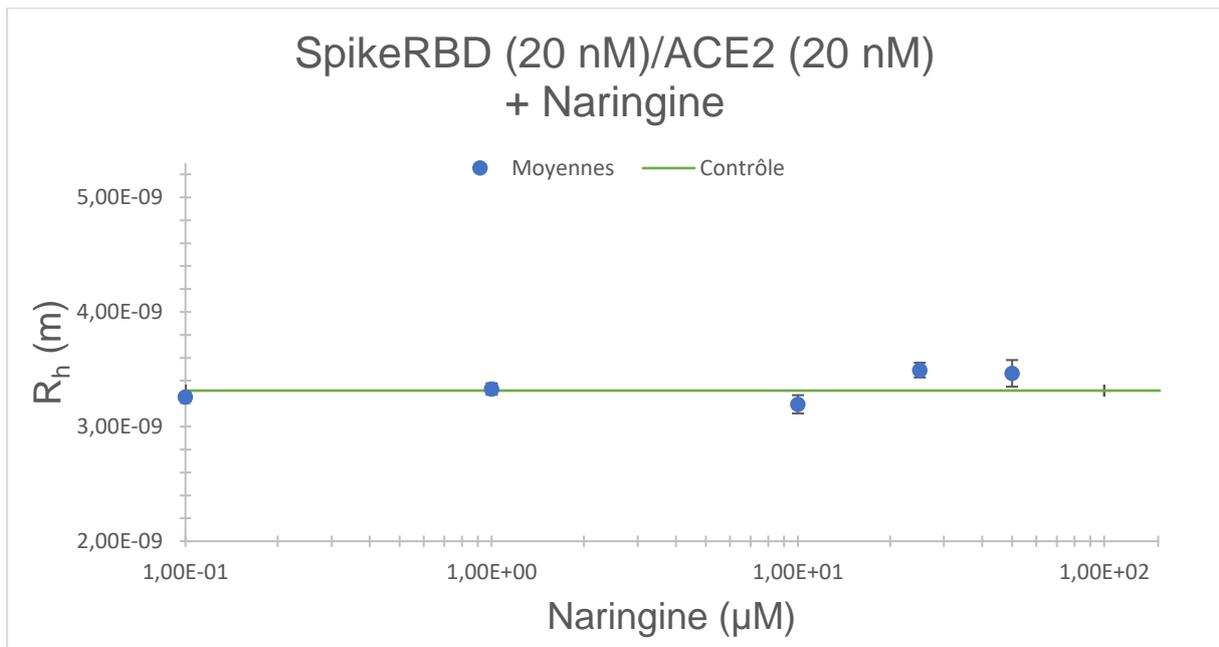


Figure 34 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Naringine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en naringine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne ± Ecart-type ; n = 3.

Nous constatons que la naringine, aux mêmes concentrations que la naringénine, ne présente pas de réel effet en ce qui concerne la modulation du R_h du complexe. En effet, la différence par rapport au contrôle est non significative sur l'ensemble de la plage de concentrations testée (P > 0,05).

3.2.3.5 L'ivermectine

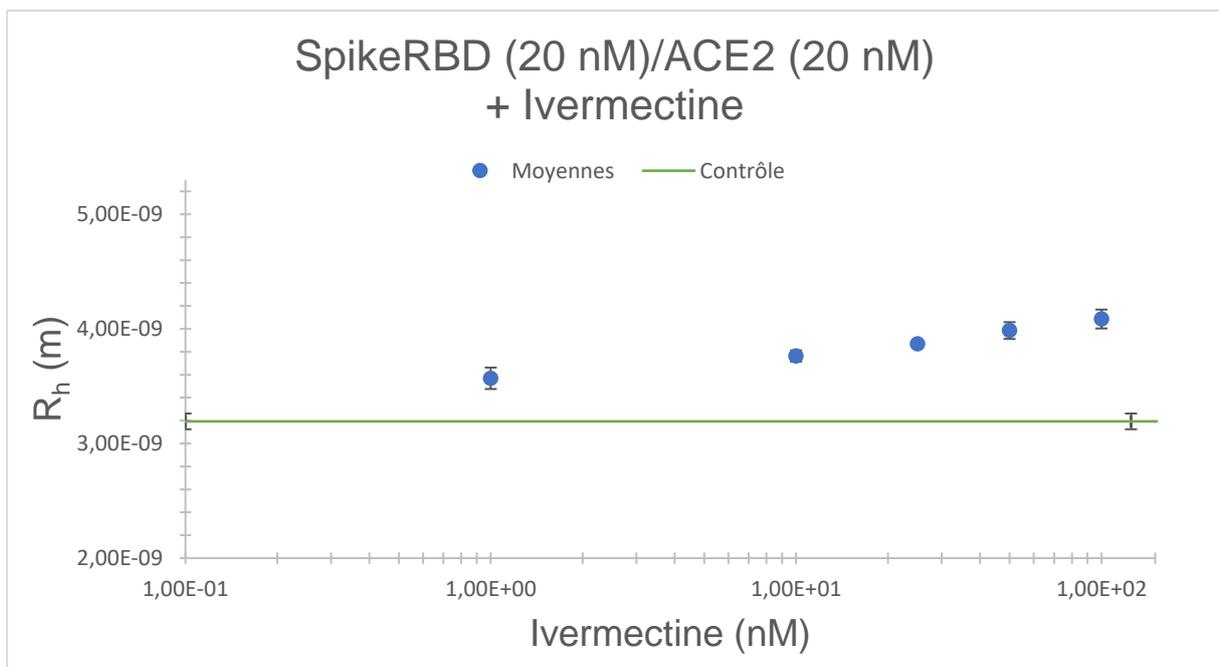


Figure 35 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Ivermectine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en ivermectine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne ± Ecart-type ; n = 3.

L'ivermectine provoque une augmentation du R_h du complexe. Ce phénomène semble être dose dépendant. Après analyse statistique, nous constatons que la différence de R_h est significative sur l'ensemble de la gamme de concentration testée, de 1 nM ($P < 0,001$) à 100 nM ($P < 0,001$). A cette dernière concentration, le R_h du complexe augmente de $26,6 \pm 1,9 \%$ par rapport au contrôle (Figure 41). Ceci nous indique que l'ivermectine pourrait montrer une activité à des concentrations sub-nanomolaires. Il serait donc intéressant de refaire l'expérience à plus faibles concentrations afin de déterminer la concentration minimale provoquant une différence significative du R_h du complexe.

Cette molécule a l'avantage d'être déjà sur le marché, et elle a donc passé toutes les études cliniques nécessaire afin d'être sous le statut « médicament ». Il serait intéressant de poursuivre les études sur ce produit naturel dans le but d'une possible prophylaxie de l'infection.

3.2.3.6 La chloroquine

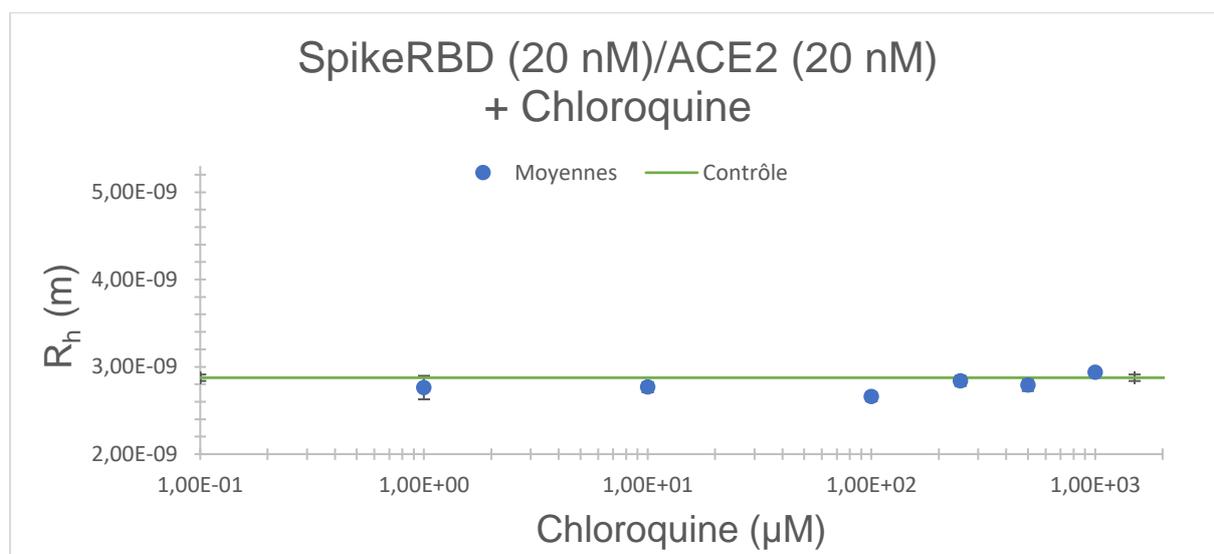


Figure 36 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Chloroquine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en chloroquine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; $n = 3$.

Sur toute la gamme de concentrations testées, la chloroquine ne présente pas d'effet modulateur significatif quant au R_h du complexe protéique SpikeRBD-ACE2 et ce même à la concentration de 1 mM ($P > 0,05$).

3.2.3.7 L'érythromycine

À la suite du constat de l'efficacité d'une molécule macrocyclique comme l'ivermectine, nous posons l'hypothèse que, la taille de la molécule et, par conséquent, son poids moléculaire joue un rôle dans l'interaction avec le complexe protéique. L'hypothèse est ici qu'une grosse molécule, une molécule macrocyclique, provoquerait un encombrement stérique plus important entre les 2 protéines et perturberait plus leur interaction que d'autres molécules, plus petites. Les informations que nous avons recueillies dans la littérature (Braz et al., 2020; Prashantha et al., 2021), nous confortent dans l'idée que des molécules macrocycliques pourraient posséder une activité intéressante. Nous avons ainsi étudié des molécules qui ont un poids moléculaire relativement important et pour lesquelles une affinité envers l'une des 2 protéines du complexe a déjà été montrée.¹⁹

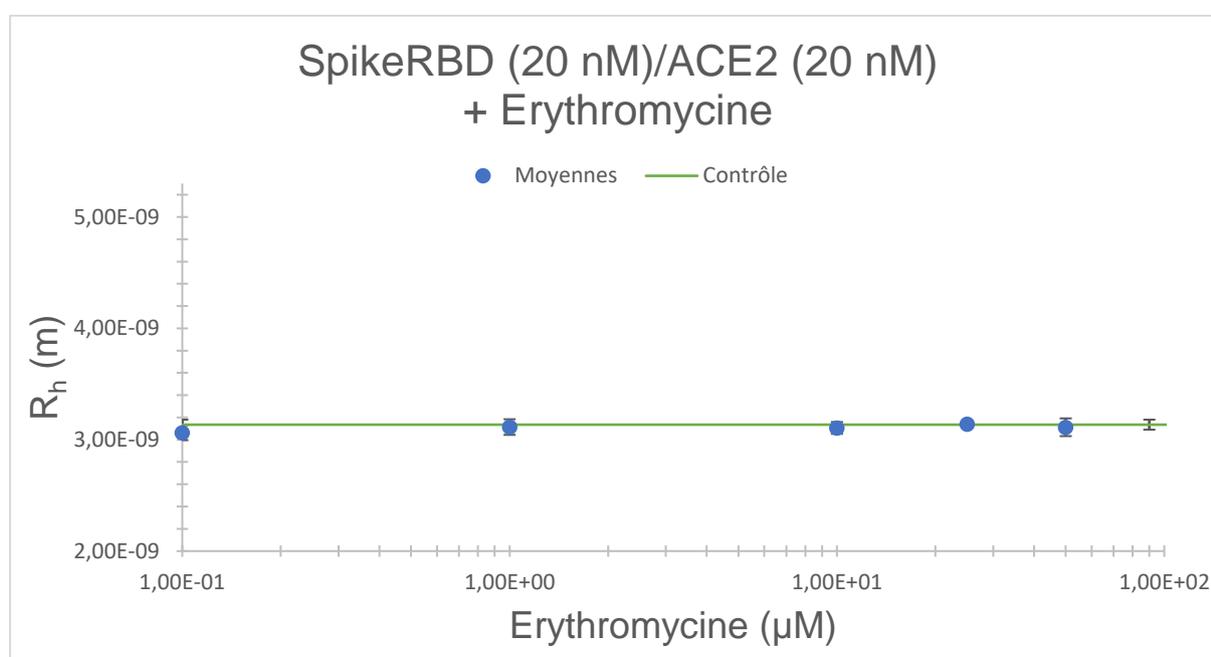


Figure 37 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Erythromycine. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en érythromycine. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 3.

Nos résultats n'indiquent aucunes modifications significatives du R_h du complexe protéique et ce, même à 50 μM d'érythromycine ($P > 0,05$). L'érythromycine ne semble donc pas démontrer une quelconque activité aux concentrations sériques habituelles, et ce malgré une affinité pour la SpikeRBD *in silico*.

¹⁹ Ne disposant pas d'azithromycine, l'expérience a été réalisée avec l'érythromycine à la vue de la parenté structurelle présente entre ces deux molécules.

Il pourrait être intéressant d'étudier l'activité de l'azithromycine. Cette dernière possède une meilleure affinité théorique pour le complexe. De plus, elle présente des sites de liaisons sur les 2 protéines (Tableau 18).

3.2.3.8 Extrait sec éthanolique de rhubarbe (racines)

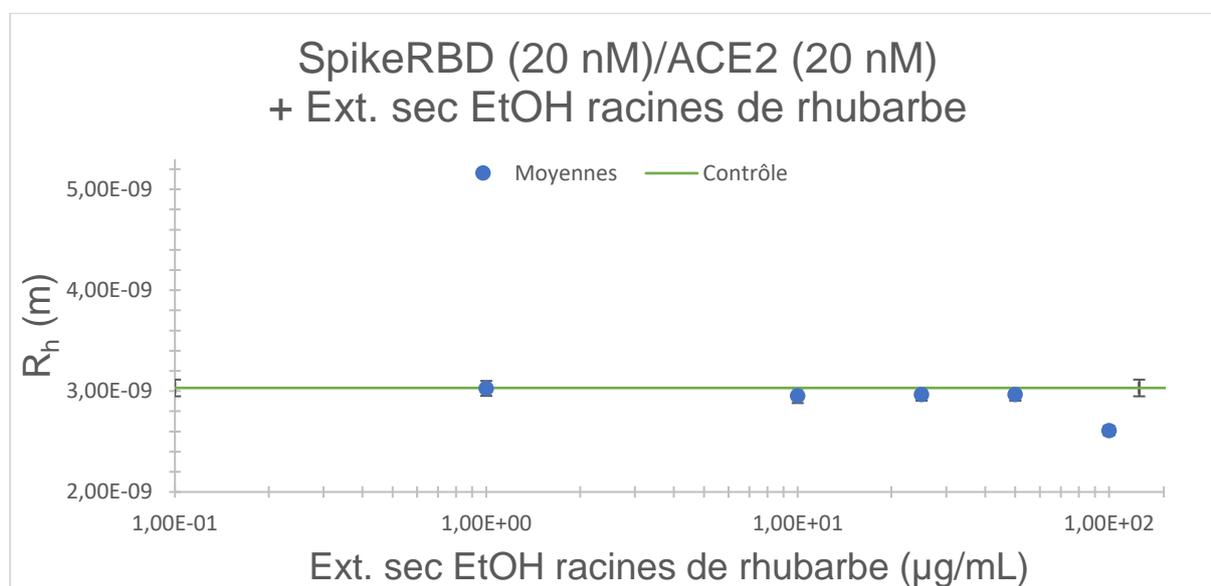


Figure 38 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Ext. Sec EtOH racines de rhubarbe. R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en extrait sec éthanolique de racine de rhubarbe. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 3.

Aux concentrations que nous avons testées, nous n'observons un effet significatif que pour une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$). A cette concentration le R_h du complexe diminue fortement ($-12,59 \pm 1,63 \%$) par rapport au contrôle (Figure 41). Un tel constat est prometteur en se basant sur les C_{max} atteintes après l'administration *per os* de rhéine, qui étaient plus élevées que celle de notre test (Tableau 18). Ceci pourrait signifier que la rhéine, et plus largement les dérivés anthracéniques de l'extrait éthanolique de racines de rhubarbe, sont de bons candidats pour des études cliniques ultérieures.

Nous pourrions, par ailleurs, tester les composés isolés pour évaluer leur efficacité individuelle potentielle sur le complexe protéique. Rappelons cependant que, dans le cas d'un extrait, les phénomènes de synergie et d'antagonisme entre les différents composés ne sont pas à exclure. Il se pourrait donc que ces composés, une fois isolés, donnent des résultats différents de ce qui est mesuré avec l'extrait.

3.2.3.9 Extrait sec méthanolique de *Chenopodium quinoa* Willd. (enveloppes de graines)²⁰

Comme nous l'avons vu, les saponines ont été étudiées dans le cadre de l'infection à H5N1 (le virus de la grippe A, la grippe aviaire). L'entrée de celui-ci dans la cellule se fait suite à l'interaction entre l'hémagglutinine, sa glycoprotéine d'enveloppe virale, et les acides sialiques présents à la surface cellulaire (Ding et al., 2012). Pour le SARS-CoV-2, des études montrent que Spike a la capacité de reconnaître et de lier avec oligosaccharides contenant des acides sialiques (Petitjean et al., 2022). Bien que, l'ACE2 et la Spike soient 2 protéines hautement glycosylées, les acides sialiques présents sur l'ACE2 réduisent son affinité envers la Spike (Allen et al., 2021; Petitjean et al., 2022). Toutefois, d'autres liaisons sont à noter entre Spike et les glycosylations présentes sur ACE2 et, même si elles ne semblent jouer qu'un rôle modeste dans la liaison entre l'ACE2 et la Spike (Allen et al., 2021), il a été démontré *in vitro* qu'une inhibition de l'expression de N-glycanes et O-glycanes sur l'ACE2 permet de réduire l'entrée du virus (Yang et al., 2020).

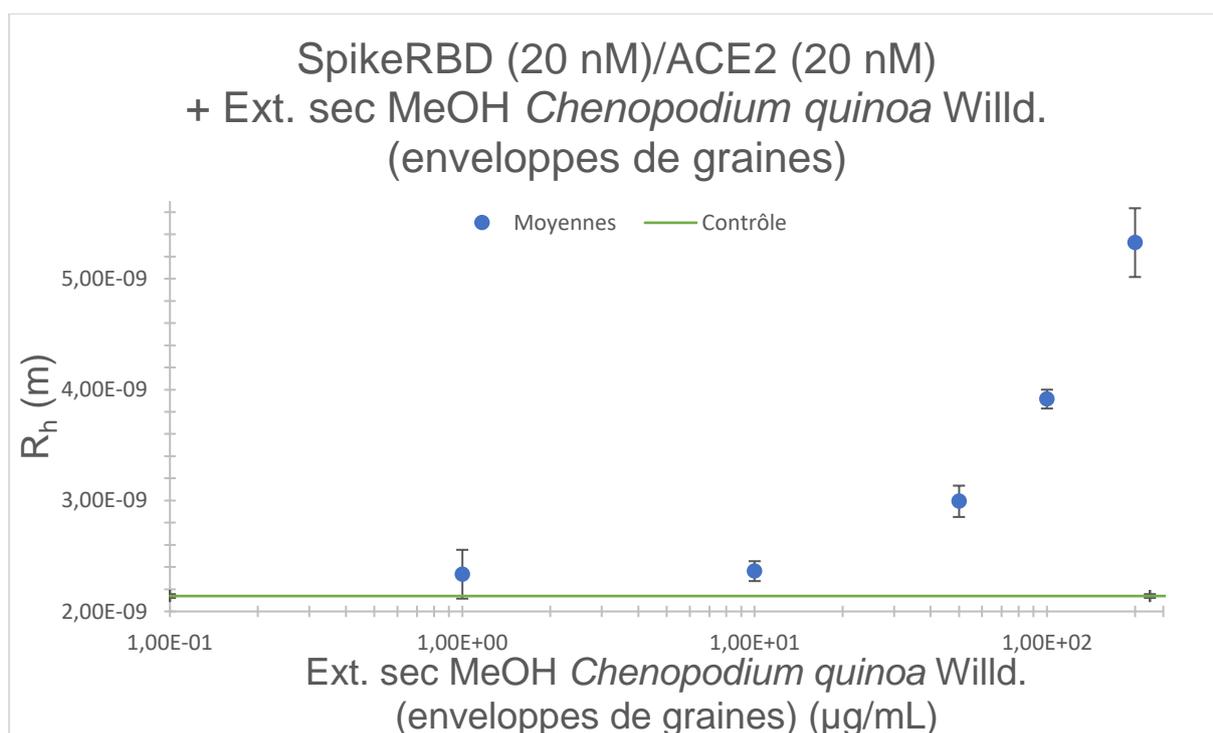


Figure 39 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Ext. sec MeOH *Chenopodium quinoa* Willd. (enveloppes de graines). R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en extrait sec méthanolique d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 3.

Notre extrait présente un effet significatif sur le R_h du complexe protéique et a, à partir d'une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$), concentration-dépendant. Le R_h du complexe se voit

²⁰ Le rendement de notre extraction de la poudre micronisée par le méthanol a été de 15,01 %.

augmenté de $94,70 \pm 4,73$ % à la plus forte concentration testée (Figure 41). Un tel effet est remarquable. Cette augmentation de taille pourrait s'expliquer par une distension du complexe SpikeRBD-ACE2 ou une agrégation des différents composés de notre extraits sur celui-ci.

Les saponines, composés majeurs de l'extrait, pourraient se fixer à l'interface des 2 protéines, modulant leur interaction. Ceci pourrait ainsi empêcher l'entrée du virus. Pour tester cette hypothèse, nous pouvons imaginer une étude mesurant l'inhibition de l'entrée provoquée par les saponines, lors de l'infection de pseudovirus exprimant SpikeRBD dans des cellules exprimant l'ACE2. Concernant le mécanisme modulateur, il pourrait être expliqué par une interaction entre les acides sialiques, présents notamment sur l'ACE2, ou les autres glycosylations de nos protéines, et les chaînes osidiques des bidesmosides de l'extrait. Cette hypothèse nous semble cohérente au vu des études *in vitro* relatives au virus H5N1 (Ding et al., 2012). Les glycosylations présentes sur les protéines intervenant dans leur interaction, il est imaginable que les chaînes de sucres des bidesmosides viennent modifier l'affinité des 2 protéines en interagissant avec celles-ci. Suite à ces interactions sucre-sucres, les N-glycanes et O-glycanes de l'ACE2 pourraient être moins disponibles pour interagir avec le SpikeRBD.

Le fait que les saponines de notre extrait soient des bidesmosides présente un avantage en vue d'éventuelles futures études *in vivo*. Les bidesmosides présentent en effet l'avantage d'être moins toxiques que les monodesmosides, avec une activité hémolytique plus faible. Ils ont en effet une activité membranolytique réduite de par le fait qu'ils s'associent moins que les monodesmosides avec le cholestérol membranaire, et forment donc moins de pores menant à la rupture membranaire (Colson, 2020).

Il est à noter que l'extrait méthanolique que nous utilisons est un extrait brut, non purifié. Bien qu'il soit riche en saponines, il renferme d'autres composés qui pourraient éventuellement expliquer l'effet que nous observons, notamment des composés phénoliques comme des flavonoïdes, dérivés de quercétine et du kaempférol (Lim et al., 2020; Taco, 2022). Une synergie n'est également pas à exclure. Il serait intéressant de réaliser de nouveaux tests avec ces différents types de composés afin d'en établir l'efficacité individuelle envers le complexe protéique. De plus, afin de constater si ces composés se lient à l'interface SpikeRBD-ACE2, une étude cristallographique pourrait être réalisée.

Cet extrait nous semble un excellent candidat dans la recherche de produit naturel permettant d'empêcher l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte.

3.2.3.10 Extrait sec de *Ginkgo biloba* L. (feuilles)

En nous basant sur le fait que certains flavonoïdes ont démontré une activité envers le complexe SpikeRBD-ACE2 durant nos tests, nous avons voulu expérimenter un extrait sec contenant une large palette de flavonoïdes mais également d'autres composés lactoniques. C'est le cas de l'extrait sec de la feuille de *Ginkgo biloba* L.

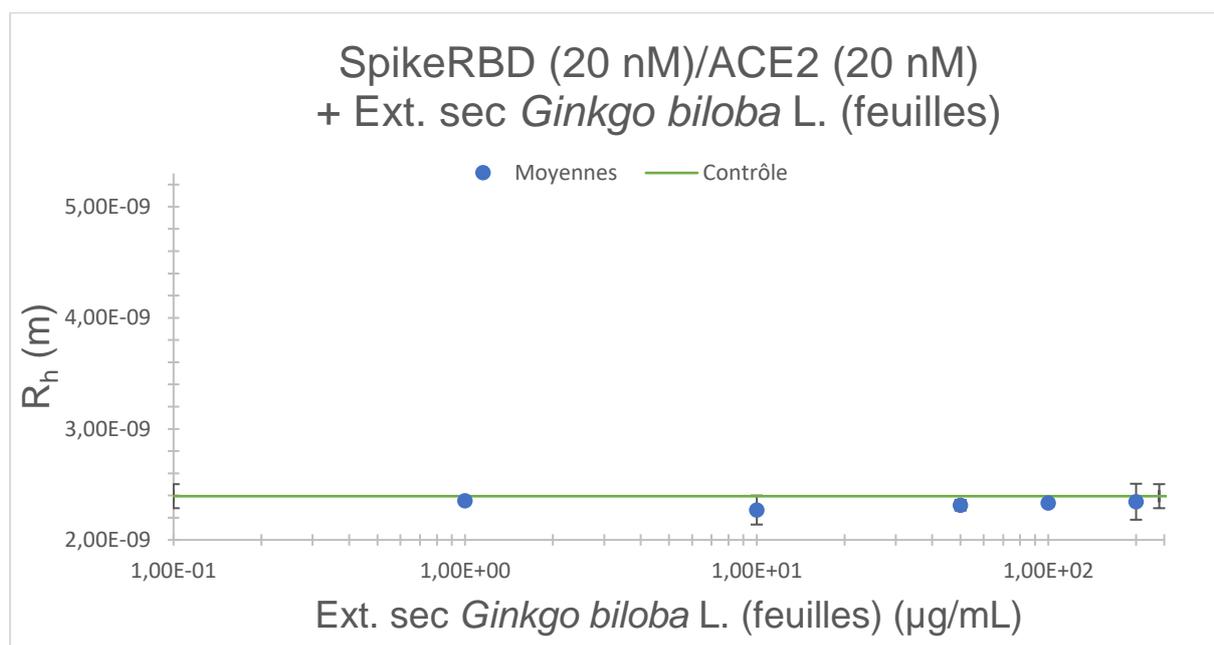


Figure 40 : SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) + Ext. sec *Ginkgo biloba* L. (feuilles). R_h du complexe SpikeRBD-ACE2 en fonction de la concentration en extrait sec de feuilles de *Ginkgo biloba* L. Microfluidic Difusional Sizing ; Moyenne \pm Ecart-type ; n = 3.

L'analyse statistique ne révèle aucune influence significative de l'extrait sur la taille du complexe, et ce même à la concentration la plus élevée que nous avons testée ($P > 0,05$). Aucune activité n'est donc à signaler, même à des concentrations retrouvées habituellement chez l'homme ou supérieures à celles-ci.

Selon une étude en HPLC/SIM-MS, la quercétine serait présente à 1,62% dans l'extrait (Ding et al., 2006). Dans notre étude, La quercétine serait donc présente à des concentrations comprises entre 0,016 $\mu\text{g/mL}$ et 3,24 $\mu\text{g/mL}$, ce qui correspond à 0,053-10,71 μM . Ces concentrations sont inférieures à la concentration pour laquelle notre étude a révélé un effet sur le R_h du complexe (3.2.3.2). Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité de notre extrait.

Aux concentrations circulantes habituellement retrouvées chez l'homme aux doses utilisées, ainsi qu'à des concentrations supérieures, notre étude indique que l'extrait sec de *Ginkgo biloba* L. ne serait pas actif.

3.2.3.11 Comparaison de l'efficacité des produits naturels et extraits testés

Dans le but de calculer l'effet modulateur de chaque molécule sur le R_h complexe, nous avons calculé un pourcentage de variation par rapport au contrôle du jour (Équation 14).

$$\text{Équation 14 } \text{Variation du } R_h (\%) = \frac{(\text{Moyenne } R_h \text{ de la } [\text{produit naturel}]_{\text{max}} - \text{Moyenne } R_h \text{ "contrôle de la méthode"})}{\text{Moyenne } R_h \text{ "contrôle de la méthode"}} * 100$$

La moyenne des R_h pour la SpikeRBD marquée et l'ACE2 à une concentration de 20 nM nous permet d'établir un seuil d'effet maximum lorsque le R_h du complexe varie à la suite de la modulation d'une molécule.

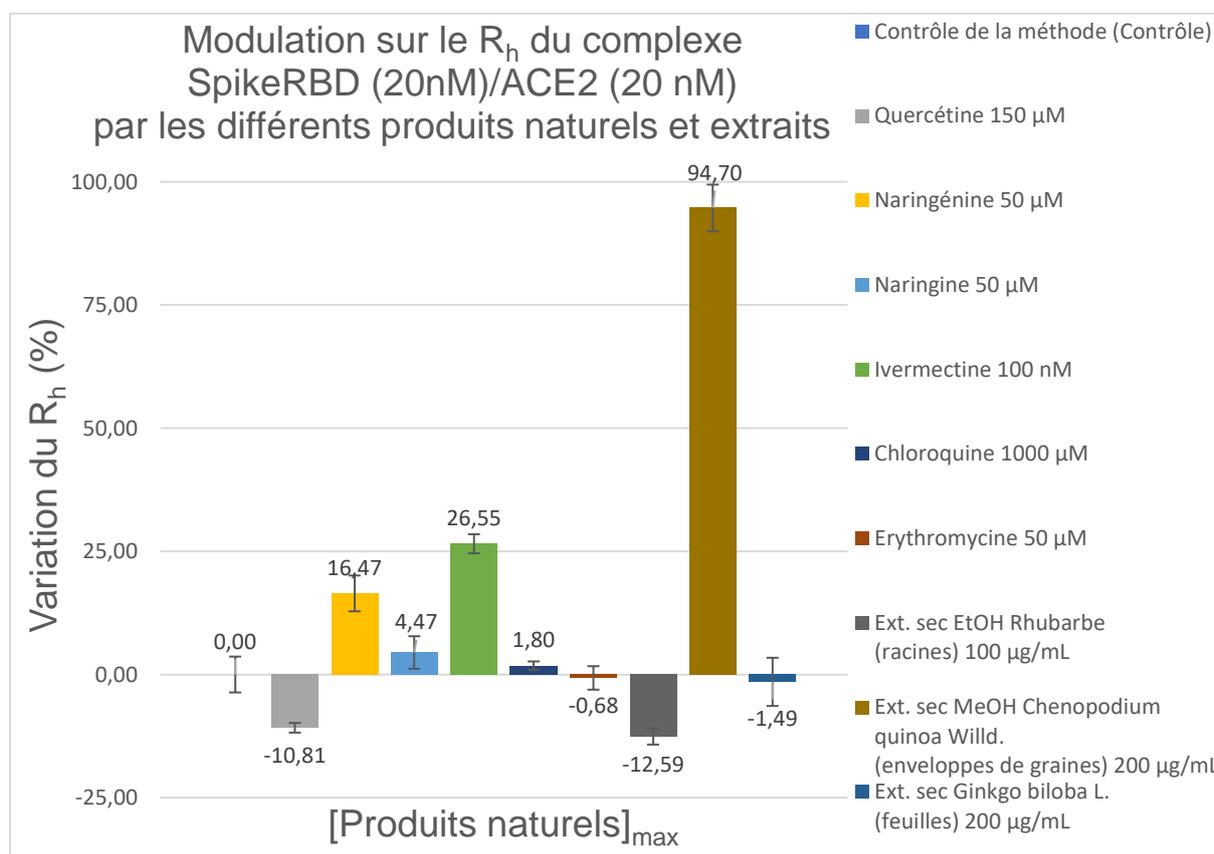


Figure 41 : Modulation sur le R_h du complexe SpikeRBD (20 nM)/ACE2 (20 nM) par les différents produits naturels et extraits. Variation du R_h en fonction de la concentration maximale testée. Microfluidic Difusional Sizing ; Variation du R_h ± Coefficient de variance ; n = 6 pour « contrôle de la méthode », n = 3 pour les produits naturels.

Lorsque la modulation du R_h du complexe protéique est significative, nous observons 2 types d'effet : (i) Une élévation du R_h : Nous pensons que cela est dû à une distension du complexe ou à une agrégation des produits naturels sur le complexe. (ii) Une diminution du R_h : Ceci est

probablement dû à une agrégation du complexe ou à séparation partielle des 2 protéines. Il reste encore à déterminer si ces effets permettent d'inhiber l'entrée du virus.

Les produits naturels faisant s'élever le R_h sont (modulation décroissante) : (i) L'extrait méthanolique sec d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd (+94,7 % à 200 µg/mL), (ii) l'ivermectine (+26,6 % à 100 nM), (iii) la naringénine (+16,5 % à 50 µM).

Les produits naturels faisant diminuer le R_h sont (modulation décroissante) : (i) L'extrait éthanolique sec de racines de rhubarbe (-12,6 % à 100 µg/mL), (ii) la quercétine (-10,8 % à 150 µM).

3.2.3.12 Discussion

Dans la littérature, l'affinité des composés étudiés envers ACE2, SpikeRBD ou SpikeRBD-ACE2 est, majoritairement, mesurée par SPR (Braz et al., 2020; Lingwan et al., 2020; Pan et al., 2020; N. Wang et al., 2020; Zhan et al., 2021). Cette mesure requiert fixation d'un des partenaires du complexes protéiques sur une surface, limitant ainsi la flexibilité conformationnelle de celui-ci. C'est également le cas pour les essais sur cellules où l'ACE2 est fixée dans une membrane plasmique (Chitsike et al., 2021; M. Wang et al., 2020; N. Wang et al., 2020). Dans notre étude, le complexe est « à nu » dans le solvant, ce qui lui confère certainement une flexibilité conformationnelle étendue, modifiant les interactions possibles avec les produits naturels et extraits testés. Ceci réduirait l'affinité des composés envers le complexe, expliquant l'inefficacité de la chloroquine (3.2.3.6), l'érythromycine (3.2.3.7) et l'extrait sec de feuilles de Ginkgo biloba L. (3.2.3.10) aux concentrations testées ; et le besoin d'augmenter les concentrations en quercétine (3.2.3.2) afin d'observer un effet modulateur. Refaire les expériences sur des memtéines²¹ (Overduin and Esmaili, 2019) permettrait d'avoir une meilleure idée de la modulation que présente les produit naturels ou extraits testés envers SpikeRBD-ACE2 *in vivo*, et, par conséquent, de confirmer/infirmer nos observations.

Les mécanismes d'action menant à la modulation, positive ou négative, du R_h par les produits naturels et extraits testés sont inconnus, malgré les hypothèses proposées (3.2.3.11). Réaliser

²¹ « Memtéine » décrit une unité fondamentale composée d'une protéine membranaire (ex : ACE2) fonctionnellement intacte incluse dans un fragment de membrane cellulaire, comme *in vivo*. Ce fragment de membrane est issu d'une lyse causée par des polymères amphipathiques (copolymère acide maléique-styrène) formant un nanodisque soluble dans l'eau (Overduin and Esmaili, 2019). Cette fragmentation permet de ne pas avoir recours à des détergents dégradant l'intégrité membranaire, et donc de ne pas dénaturer la protéine pour conserver les interactions « ligand-récepteur ».

une étude cristallographique permettrait d'élucider ce point, en montrant les sites exacts d'interactions des composés avec SpikeRBD-ACE2 ; et, éventuellement, corroborer les études *in silico* (Tableau 18).

Les résultats de la naringénine (3.2.3.3) et naringine (3.2.3.4) semblent indiquer que les flavonoïdes montrant une potentielle affinité envers le complexe possèderaient une plus faible affinité sous leur forme hétéroside. Les 2 protéines étant fortement glycosylées (Gong et al., 2021; Petitjean et al., 2022; Zhao et al., 2021), nous pensons que, malgré une affinité de l'aglycone pour l'ACE2, les glycosylations présentes sur les protéines pourraient interférer avec les oses de l'hétéroside, réduisant ou empêchant la liaison. Cette hypothèse est consolidée par les résultats obtenus pour l'extrait sec de feuilles de *Ginkgo biloba* L, qui ne présente pas d'effet (3.2.3.10). En effet, les flavonoïdes, présents majoritairement sous leur forme d'hétérosides dans cet extrait, seraient les principaux constituants actifs (Alqathama et al., 2022; Lingwan et al., 2020; Pan et al., 2020; Zhan et al., 2021) ; cependant, selon les études et nos précédents résultats (3.2.3.2,3.2.3.3,3.2.3.4), ce sont leurs aglycones qui démontrent une affinité envers au moins l'une des protéines du complexe. Les 3 principaux hétérosides de flavonoïdes étant des dérivés de quercétine (quercétine-3- β -D-glucoside, quercitrine, Rutine (IARC, 2016)), nous pourrions également imaginer réaliser un test comparatif des 3 hétérosides et de la quercétine, à la concentration de 150 μ M afin de vérifier cette hypothèse.

Concernant l'ivermectine, il faudrait étudier les effets chez l'animal de doses permettant d'atteindre des concentrations pulmonaires comprises dans une gamme s'étendant du sub-nanomolaire à 100 nM en steadystate afin de : (i) observer si de telles concentrations inhibent l'entrée du virus ; (ii) récolter de plus amples informations quant à la toxicité à long terme de cette molécule, pour évaluer dans quelle mesure un usage prophylactique est envisageable. L'ivermectine a été employée lors d'essais cliniques dans le cadre de la prophylaxie de l'infection à SARS-CoV-2. Les résultats de ces études sont non concluants. Certaines études indiquent qu'elle présente un effet ; tandis que d'autres rapportent qu'une telle utilisation ne réduit ni les taux, ni les durées d'hospitalisation en services soins intensifs (Onyeaka et al., 2022). Outre le cadre prophylactique, une essai randomisé contrôlé (RCT), chez des patients infectés, démontre une diminution de la charge virale menant à penser que l'ivermectine réduirait la transmission virale (Biber et al., 2022). De plus amples études sont à nécessaires.

4 Conclusion et perspectives

A l'issue de cette étude, 5 produits naturels et extraits prometteurs modulent le complexe SpikeRBD-ACE2 en augmentant ou en diminuant le R_h lors de l'analyse en MDS. Ceux-ci sont : (i) L'extrait méthanolique sec d'enveloppes de graines de *Chenopodium quinoa* Willd, (ii) l'ivermectine, (iii) l'extrait éthanolique sec de racines de rhubarbe, (iv) la naringénine, (v) la quercétine.

Nous constatons que ces produits naturels sont constitués de 4 familles chimique différentes : Flavonoïdes, hydroxyanthraquinones, lactones macrocycliques et saponines. A l'avenir, il serait intéressant d'approfondir les recherches étudiant l'activité de ces composés envers SpikeRBD-ACE2.

Quatre des 9 produits naturels et extraits testés ne présentent pas d'activité. Cette inactivité pourrait être due à une trop grande liberté conformationnelle de nos protéines, puisqu'elles sont « à nu » dans le solvant.

La prochaine étape serait d'établir des courbes d'affinité complètes avec les produits naturels présentant une activité afin d'observer le déplacement des courbes provoqué par ceux-ci, mais aussi de mesurer à quel point le K_d du complexe est modifié.

Réitérer l'expérience sur des memtéines (Overduin and Esmaili, 2019) permettrait de confirmer/infirmier une activité modulatrice et de préciser à quelles concentrations les composés et extraits sont actifs dans des conditions proches de celles *in vivo*.

Concernant les produits présentant une activité, une étude cristallographique permettrait d'observer les sites de liaisons de ceux-ci sur le complexe protéique. Pour les composés modifiant le R_h , cela permettrait également de voir si ceux-ci modulent réellement l'interaction, en se liant à l'interface des 2 protéines.

Outre les études cristallographiques, les 5 produits naturels et extraits prometteurs devraient être testés au niveau de l'entrée de pseudovirus exprimant la SpikeRBD dans des cellules (ex : A549, H1299, HT-29, HEK293T, etc..) exprimant l'ACE2.

5 Bibliographie

2bind, 2022. ITC • Isothermal Titration Calorimetry • Thermodynamics, Affinity, Stoichiometry. 2bind. URL <https://2bind.com/itc/> (accessed 8.8.22).

Abdelli, I., Hassani, F., Bekkel Brikci, S., Ghalem, S., 2020. In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. J. Biomol. Struct. Dyn. 1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763199>

AFMPS, 2021a. Soolantra 10 mg/g crème - Résumé des caractéristiques du produit.

AFMPS, 2021b. Tavoforce comprimés pelliculés - Résumé des caractéristiques du produit.

AFMPS, 2020. Erythrocin I.V. 1 g, poudre pour solution pour perfusion - Résumé des caractéristiques du produit.

AFMPS, 2016. Grains de vals Senna 16 mg, comprimés enrobés - Résumé des caractéristiques du produit.

Allen, J.D., Watanabe, Y., Chawla, H., Newby, M.L., Crispin, M., 2021. Subtle Influence of ACE2 Glycan Processing on SARS-CoV-2 Recognition. J. Mol. Biol. 433, 166762. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166762>

Alqathama, A.A., Ahmad, R., Alsaedi, R.B., Alghamdi, R.A., Abkar, E.H., Alrehaly, R.H., Abdalla, A.N., 2022. The vital role of animal, marine, and microbial natural products against COVID-19. Pharm. Biol. 60, 509–524. <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2039215>

ANSM, 2012. Stromectol 3mg, comprimé - Résumé de caractéristiques du produit [WWW Document]. URL <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214575.htm> (accessed 6.2.22).

Anwar, F., Altayb, H.N., Al-Abbasi, F.A., Kumar, V., Kamal, M.A., 2021. The Computational Intervention of Macrolide Antibiotics in the Treatment of COVID-19. Curr. Pharm. Des. 27, 1202–1210.

APB, 2010. FTM : Formulaire Thérapeutique Magistral.

Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S.C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G.D., Panicker, L., Kumar, M., 2021. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. J. Mol. Biol. 433, 166725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>

Badraoui, R., Saoudi, M., Hamadou, W.S., Elkahoui, S., Siddiqui, A.J., Alam, J.M., Jamal, A., Adnan, M., Suliemen, A.M.E., Alreshidi, M.M., Yadav, D.K., Naïli, H., Ben-Nasr, H., 2022. Antiviral Effects of Artemisinin and Its Derivatives against SARS-CoV-2 Main Protease: Computational Evidences and Interactions with ACE2 Allelic Variants. Pharm. Basel Switz. 15, 129. <https://doi.org/10.3390/ph15020129>

Balkrishna, A., Pokhrel, S., Singh, H., Joshi, M., Mulay, V.P., Haldar, S., Varshney, A., 2021. Withanone from *Withania somnifera* Attenuates SARS-CoV-2 RBD and Host ACE2 Interactions to Rescue Spike Protein Induced Pathologies in Humanized Zebrafish Model. Drug Des. Devel. Ther. 15, 1111–1133. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S292805>

Barton, M.I., MacGowan, S.A., Kutuzov, M.A., Dushek, O., Barton, G.J., van der Merwe, P.A., 2021. Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics. *eLife* 10, e70658. <https://doi.org/10.7554/eLife.70658>

Basu, A., Sarkar, A., Maulik, U., 2020. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. *Sci. Rep.* 10, 17699. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74715-4>

Baumann, M.J., Murphy, L., Lei, N., Krogh, K.B.R.M., Borch, K., Westh, P., 2011. Advantages of isothermal titration calorimetry for xylanase kinetics in comparison to chemical-reducing-end assays. *Anal. Biochem.* 410, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.001>

Biber, A., Harmelin, G., Lev, D., Ram, L., Shaham, A., Nemet, I., Kliker, L., Erster, O., Mandelboim, M., Schwartz, E., 2022. The effect of ivermectin on the viral load and culture viability in early treatment of nonhospitalized patients with mild COVID-19 – a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Int. J. Infect. Dis.* 122, 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.003>

Braz, H.L.B., Silveira, J.A. de M., Marinho, A.D., de Moraes, M.E.A., Moraes Filho, M.O. de, Monteiro, H.S.A., Jorge, R.J.B., 2020. In silico study of azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine and their potential mechanisms of action against SARS-CoV-2 infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 56, 106119. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106119>

Caohuy, H., Eidelman, O., Chen, T., Liu, S., Yang, Q., Bera, A., Walton, N.I., Wang, T.T., Pollard, H.B., 2021. Common cardiac medications potently inhibit ACE2 binding to the SARS-CoV-2 Spike, and block virus penetration and infectivity in human lung cells. *Sci. Rep.* 11, 22195. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01690-9>

CAS SciFinderⁿ, 2022. 70288-86-7 Substance Detail | CAS SciFinderⁿ [WWW Document]. URL <https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/substance/62ac82b5cc35dd543c8aba14/substanceDetails> (accessed 6.17.22).

Caucheteur, C., 2014. Plasmons de surface : principes physiques et applications. *Tech. Ing. Phys. Chim.* <https://doi.org/10.51257/a-v1-af3565>

Charles, C., Nachtergaeel, A., Ouedraogo, M., Belayew, A., Duez, P., 2014. Effects of chemopreventive natural products on non-homologous end-joining DNA double-strand break repair. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 768, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.014>

Chen, R.H., Yang, L.J., Hamdoun, S., Chung, S.K., Lam, C.W., Zhang, K.X., Guo, X., Xia, C., Law, B.Y.K., Wong, V.K.W., 2021. 1,2,3,4,6-Pentagalloyl Glucose, a RBD-ACE2 Binding Inhibitor to Prevent SARS-CoV-2 Infection. *Front. Pharmacol.* 12.

Chitsike, L., Krstenansky, J., Duerksen-Hughes, P.J., 2021. ACE2 : S1 RBD Interaction-Targeted Peptides and Small Molecules as Potential COVID-19 Therapeutics. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* 2021, e1828792. <https://doi.org/10.1155/2021/1828792>

- Clementi, N., Scagnolari, C., D'Amore, A., Palombi, F., Criscuolo, E., Frasca, F., Pierangeli, A., Mancini, N., Antonelli, G., Clementi, M., Carpaneto, A., Filippini, A., 2021. Naringenin is a powerful inhibitor of SARS-CoV-2 infection in vitro. *Pharmacol. Res.* 163, 105255. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105255>
- Colson, E., 2020. Green waste valorization : tuning the biological properties of horse chestnut and quinoa husk saponins by molecular engineering. UMONS.
- Cui, L., Wang, H., Ji, Y., Yang, J., Xu, S., Huang, X., Wang, Z., Qin, L., Tien, P., Zhou, X., Guo, D., Chen, Y., 2015. The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *J. Virol.* 89, 9029–9043. <https://doi.org/10.1128/JVI.01331-15>
- Daher, A., Pinto, D.P., da Fonseca, L.B., Pereira, H.M., da Silva, D.M.D., da Silva, L. de S.F.V., Esteves, A.L., Soares Medeiros, J.J., Mendonça, J.S., 2022. Pharmacokinetics of chloroquine and primaquine in healthy volunteers. *Malar. J.* 21, 16. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04035-z>
- David, A.B., Diamant, E., Dor, E., Barnea, A., Natan, N., Levin, L., Chapman, S., Mimran, L.C., Epstein, E., Zichel, R., Torgeman, A., 2021. Identification of SARS-CoV-2 Receptor Binding Inhibitors by In Vitro Screening of Drug Libraries. *Molecules* 26, 3213. <https://doi.org/10.3390/molecules26113213>
- Dhouib, W., Maatoug, J., Ayouni, I., Zammit, N., Ghammem, R., Fredj, S.B., Ghannem, H., 2021. The incubation period during the pandemic of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 10, 101. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01648-y>
- Ding, N., Chen, Q., Zhang, W., Ren, S., Guo, Y., Li, Y., 2012. Structure-activity relationships of saponin derivatives: a series of entry inhibitors for highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Eur. J. Med. Chem.* 53, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.022>
- Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R.P., Brenton, A.G., 2006. Quantitative determination of major active components in Ginkgo biloba dietary supplements by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 20, 2753–2760. <https://doi.org/10.1002/rcm.2646>
- Dong, S., Yang, X., Zhao, L., Zhang, F., Hou, Z., Xue, P., 2020. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Ind. Crops Prod.* 149, 112350. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112350>
- Du, H.-X., Zhu, J.-Q., Chen, J., Zhou, H.-F., Yang, J.-H., Wan, H.-T., 2021. Revealing the therapeutic targets and molecular mechanisms of emodin-treated coronavirus disease 2019 via a systematic study of network pharmacology. *Aging* 13, 14571–14589. <https://doi.org/10.18632/aging.203098>
- Ducharme, J., Farinotti, R., 1996. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Chloroquine. *Clin. Pharmacokinet.* 31, 257–274. <https://doi.org/10.2165/00003088-199631040-00003>
- Duez, P., 2020. UMONS, Pharmacognosie II : Phytochimie et étude des médicaments d'origine végétale.

Eble, J.A., 2018. Titration ELISA as a Method to Determine the Dissociation Constant of Receptor Ligand Interaction. *JoVE J. Vis. Exp.* e57334. <https://doi.org/10.3791/57334>

EDQM, 2022. Technical guide for the elaboration of monographs - 8th Edition.

EMA, 2020. Rhubarb root - Summary public.

Fiedler, S., Piziorska, M.A., Denninger, V., Morgunov, A.S., Ilsley, A., Malik, A.Y., Schneider, M.M., Devenish, S.R.A., Meisl, G., Kosmoliaptsis, V., Aguzzi, A., Fiegler, H., Knowles, T.P.J., 2021. Antibody Affinity Governs the Inhibition of SARS-CoV-2 Spike/ACE2 Binding in Patient Serum. *ACS Infect. Dis.* 7, 2362–2369. <https://doi.org/10.1021/acinfecdis.1c00047>

Fisher Scientific, 2022. Quercétine dihydrate, 97 %, Thermo Scientific | Fisher Scientific [WWW Document]. URL <https://www.fishersci.fr/shop/products/quercetin-dihydrate-97-thermo-scientific/11492468> (accessed 8.9.22).

Fluidic Analytics, 2021a. What is hydrodynamic radius (Rh)? [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL <https://www.fluidic.com/resources/what-is-hydrodynamic-radius-rh/> (accessed 4.9.22).

Fluidic Analytics, 2021b. How does hydrodynamic radius correlate with protein molecular weight in KDa? [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL <https://www.fluidic.com/resources/hydrodynamic-radius-and-protein-weight/> (accessed 4.9.22).

Fluidic Analytics, 2021c. User guide - Measuring Protein-Binding Affinities with Fluidity One-W Systems WI-0054v2 [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL https://f.hubspotusercontent10.net/hubfs/3921060/User%20Guides/WI-0054%20v1%20Getting%20Started%20Guide%20binding%20affinity.pdf?__hstc=221691399.5a7fd66a028ef2d1ca25473ef0dd1088.1652904782348.1655734558678.1655747861980.12&__hssc=221691399.4.1655747861980&__hsfp=1681261326 (accessed 4.9.22).

Fluidic Analytics, 2021d. Product Information Sheet - Fluidity One-W Serum (PS-0027v2).

Fluidic Analytics, 2021e. User Manual for Fluidity One-W and Fluidity One-W Serum - Soft version 3.8.7.

Fluidic Analytics, 2021f. Hydrodynamic Radius Converter [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL <https://www.fluidic.com/toolkit/hydrodynamic-radius-converter/> (accessed 5.27.22).

Fluidic Analytics, 2021g. Mesuring protein-binding affinities with the Fluidity One-W Systems (WI-0054V2).

Fluidic Analytics, 2020. Measuring protein interactions in blood – It’s not as trivial as it sounds [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL <https://www.fluidic.com/resources/measuring-protein-interactions-in-blood/> (accessed 6.18.22).

Fluidic Analytics, 2019a. What is Microfluidic Diffusional Sizing (MDS)? [WWW Document]. *Fluid. Anal.* URL <https://www.fluidic.com/resources/what-is-microfluidic-diffusional-sizing/> (accessed 4.9.22).

Fluidic Analytics, 2019b. Q&A with Dr Devenish – common questions about MDS analysis [WWW Document]. Fluid. Anal. URL <https://www.fluidic.com/resources/common-questions-about-mds-analysis/> (accessed 6.18.22).

Gangadevi, S., Badavath, V.N., Thakur, A., Yin, N., De Jonghe, S., Acevedo, O., Jochmans, D., Leysen, P., Wang, K., Neyts, J., Yujie, T., Blum, G., 2021. Kobophenol A Inhibits Binding of Host ACE2 Receptor with Spike RBD Domain of SARS-CoV-2, a Lead Compound for Blocking COVID-19. *J. Phys. Chem. Lett.* 12, 1793–1802. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c03119>

Gaylord Chemical Company, 2022. Solubility Data [WWW Document]. Gaylord Chem. URL <https://www.gaylordchemical.com/products/product-grades/dmsol/solubility-data/> (accessed 5.21.22).

Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., Ciccozzi, M., 2021. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 538, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>

Gong, Y., Qin, S., Dai, L., Tian, Z., 2021. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00809-8>

Gorbalenya, A. e., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, D.G., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, bart I, Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, benjamin W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, leo I. M., Samborskiy, D.V., Sidorov, I.A., Sola, Ziebuhr, J., 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

Große, M., Ruetalo, N., Layer, M., Hu, D., Businger, R., Rheber, S., Setz, C., Rauch, P., Auth, J., Fröba, M., Brysch, E., Schindler, M., Schubert, U., 2021. Quinine Inhibits Infection of Human Cell Lines with SARS-CoV-2. *Viruses* 13, 647. <https://doi.org/10.3390/v13040647>

Gudim, I., Lofstad, M., Hammerstad, M., Hersleth, H.-P., 2017. Measurement of FNR-NrdI Interaction by Microscale Thermophoresis (MST). *Bio-Protoc.* 7, e2223–e2223.

Gupta, P., Birhman, N., 2020. Corona Virus Disease: A Disease Wich Is Yet Not Undisease SARS-COV-2 7, 668–673.

Hao, K., Qi, Q., Wan, P., Zhang, J., Hao, H., Liang, Y., Xie, L., Wang, G., Sun, J., 2014. Prediction of Human Pharmacokinetics from Preclinical Information of Rhein, an Antidiabetic Nephropathy Drug, Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114, 160–167. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12148>

Ho, T.-Y., Wu, S.-L., Chen, J.-C., Li, C.-C., Hsiang, C.-Y., 2007. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.* 74, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.014>

Hojyo, S., Uchida, M., Tanaka, K., Hasebe, R., Tanaka, Y., Murakami, M., Hirano, T., 2020. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm. Regen.* 40, 37. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00146-3>

Hopper, J.T.S., Robinson, C.V., 2014. Mass Spectrometry Quantifies Protein Interactions—From Molecular Chaperones to Membrane Porins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 14002–14015. <https://doi.org/10.1002/anie.201403741>

Horlock, C., 2022. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | British Society for Immunology [WWW Document]. www.immunology.org. URL <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay> (accessed 8.8.22).

Hozhabri, H., Picci Sparascio, F., Sohrabi, H., Mousavifar, L., Roy, R., Scribano, D., De Luca, A., Ambrosi, C., Sarshar, M., 2020. The Global Emergency of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2): An Update of the Current Status and Forecasting. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 5648. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165648>

Hunter, S.A., Cochran, J.R., 2016. Cell-Binding Assays for Determining the Affinity of Protein–Protein Interactions, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 21–44. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.002>

IARC, 2016. Some Drugs and Herbal Products.

Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

Jia, Q., Fu, J., Liang, P., Wang, S., Wang, Y., Zhang, X., Zhou, H., Zhang, L., Lv, Y., Han, S., 2022. Investigating interactions between chloroquine/hydroxychloroquine and their single enantiomers and angiotensin-converting enzyme 2 by a cell membrane chromatography method. *J. Sep. Sci.* 45, 456–467. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100570>

Jyoti, 2020. Isothermal titration calorimetry.

Kadam, S.B., Sukhramani, G.S., Bishnoi, P., Pable, A.A., Barvkar, V.T., 2021. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J. Basic Microbiol.* 61, 180–202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>

Kalhor, H., Sadeghi, S., Abolhasani, H., Kalhor, R., Rahimi, H., 2022. Repurposing of the approved small molecule drugs in order to inhibit SARS-CoV-2 S protein and human ACE2 interaction through virtual screening approaches. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 40, 1299–1315. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1824816>

Kanehisa Laboratories, 2021. Coronavirus disease - COVID-19 [WWW Document]. KEGG Pathw. URL <https://www.genome.jp/pathway/map05171> (accessed 4.14.22).

Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C.J., Cerikan, B., Lu, J.M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H.-G., Scheres, S.H.W., Bartenschlager, R., Briggs, J.A.G., 2020. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 588, 498–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>

Kim, T., Jeon, S., Jang, Y., Gotina, L., Won, J., Ju, Y., Kim, Sunpil, Jang, M., Won, W., Park, M., Pae, A., Han, S., Kim, Seungtaek, Lee, C.J., 2021. Platycodin D, a natural component of *Platycodon grandiflorum*, prevents both lysosome- and TMPRSS2-driven SARS-CoV-2

- infection by hindering membrane fusion. *Exp. Mol. Med.* 53, 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00624-9>
- Koyama, T., Platt, D., Parida, L., 2020. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull. World Health Organ.* 98, 495–504. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.253591>
- Kumar, P.K.R., 2017. Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance. *Rev. Med. Virol.* 27, e1952. <https://doi.org/10.1002/rmv.1952>
- Laffeber, C., de Koning, K., Kanaar, R., Lebbink, J.H.G., 2021. Experimental Evidence for Enhanced Receptor Binding by Rapidly Spreading SARS-CoV-2 Variants. *J. Mol. Biol.* 433, 167058. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167058>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., Wang, X., 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Larousse, É., 2022a. Définitions : syncytium, syncytium - Dictionnaire de français Larousse [WWW Document]. URL <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/syncytium/76149> (accessed 8.6.22).
- Larousse, É., 2022b. Définitions : adiabatique - Dictionnaire de français Larousse [WWW Document]. www.larousse.fr. URL <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/adiabatique/1073> (accessed 4.9.22).
- Lehrer, S., Rheinstein, P.H., 2020. Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2. *In Vivo* 34, 3023–3026.
<https://doi.org/10.21873/invivo.12134>
- Lewis, L.M., Engle, L.J., Pierceall, W.E., Hughes, D.E., Shaw, K.J., 2004. Affinity capillary electrophoresis for the screening of novel antimicrobial targets. *J. Biomol. Screen.* 9, 303–308. <https://doi.org/10.1177/1087057104263439>
- Li, J., Xu, D., Wang, L., Zhang, M., Zhang, G., Li, E., He, S., 2021. Glycyrrhizic Acid Inhibits SARS-CoV-2 Infection by Blocking Spike Protein-Mediated Cell Attachment. *Molecules* 26, 6090. <https://doi.org/10.3390/molecules26206090>
- Li, M., Chen, Z., Lin, X., Zhang, X., Song, Y., Wen, Y., Li, J., 2008. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5359–5363. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.061>
- Lim, J.G., Park, H.-M., Yoon, K.S., 2020. Analysis of saponin composition and comparison of the antioxidant activity of various parts of the quinoa plant (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Sci. Nutr.* 8, 694–702. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1358>
- Lin, B., Qi, X., Fang, L., Zhao, L., Zhang, R., Jing, J., Zhang, S., Yang, X., Hou, Z., Xue, P., 2021. In vivo acute toxicity and mutagenic analysis of crude saponins from *Chenopodium quinoa* Willd husks. *RSC Adv.* 11, 4829–4841. <https://doi.org/10.1039/D0RA10170B>
- Lingwan, M., Shagun, S., Pant, Y., Nanda, R., Masakapalli, S., 2020. Antiviral phytochemicals identified in *Rhododendron arboreum* petals exhibited strong binding to SARS-CoV-2 MPro and Human ACE2 receptor. <https://doi.org/10.20944/preprints202008.0530.v1>

- Liu, H., Zhang, Q., Wei, P., Chen, Z., Aviszus, K., Yang, J., Downing, W., Jiang, C., Liang, B., Reynoso, L., Downey, G.P., Frankel, S.K., Kappler, J., Marrack, P., Zhang, G., 2021. The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Res.* 31, 720–722. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00496-8>
- Liu, S., Zhang, H., Dai, J., Hu, S., Pino, I., Eichinger, D.J., Lyu, H., Zhu, H., 2015. Characterization of monoclonal antibody's binding kinetics using oblique-incidence reflectivity difference approach. *mAbs* 7, 110–119. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.985919>
- Liu, W., Zheng, W., Cheng, L., Li, M., Huang, J., Bao, S., Xu, Q., Ma, Z., 2022. Citrus fruits are rich in flavonoids for immunoregulation and potential targeting ACE2. *Nat. Prod. Bioprospecting* 12, 4. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00325-4>
- Liu, X., Raghuvanshi, R., Ceylan, F.D., Bolling, B.W., 2020. Quercetin and Its Metabolites Inhibit Recombinant Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Activity. *J. Agric. Food Chem.* 68, 13982–13989. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05064>
- Lüllmann, H., Morh, K., Hein, L., Bieger, D., 2005. *Color Atlas of Pharmacology 3rd Edition*.
- Luo, J., Zhou, C., Zhang, W., Kong, L., 2013. Pharmacokinetic study and metabolite identification of the bidesmosidic triterpenoid saponin BTS-1 in rat plasma. *Acta Pharm. Sin.* B 3, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.03.002>
- Ma, W., Yang, L., He, L., 2018. Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant KD of drug-receptor interaction. *J. Pharm. Anal.* 8, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.05.001>
- Martiny, D., 2019. *UMONS, Microbiologie générale et médicale*.
- McEvoy, G.K., 2008. *AHFS Drug information 2008*. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, Md.
- Meyerowitz, E.A., Richterman, A., Gandhi, R.T., Sax, P.E., 2021. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann. Intern. Med.* 174, 69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>
- Nachtergael, A., Lanterbecq, D., Spanoghe, M., Belayew, A., Duez, P., 2021. Effects of Chemopreventive Natural Compounds on the Accuracy of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Translesion Synthesis. *Planta Med.* 87, 868–878. <https://doi.org/10.1055/a-1527-1435>
- Onyeaka, H., Tamasiga, P., Agbara, J.O., Mokgwathi, O.A., Uwishema, O., 2022. The use of Ivermectin for the treatment of COVID-19: Panacea or enigma? *Clin. Epidemiol. Glob. Health* 16. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2022.101074>
- Overduin, M., Esmaili, M., 2019. Memtein: The fundamental unit of membrane-protein structure and function. *Chem. Phys. Lipids* 218, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.11.008>
- Pan, B., Fang, S., Zhang, J., Pan, Y., Liu, H., Wang, Y., Li, M., Liu, L., 2020. Chinese herbal compounds against SARS-CoV-2: Puerarin and quercetin impair the binding of viral S-protein

to ACE2 receptor. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 3518–3527.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.010>

Peña-Silva, R., Duffull, S.B., Steer, A.C., Jaramillo-Rincon, S.X., Gwee, A., Zhu, X., 2021. Pharmacokinetic considerations on the repurposing of ivermectin for treatment of COVID-19. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 87, 1589–1590. <https://doi.org/10.1111/bcp.14476>

Perrella, F., Coppola, F., Petrone, A., Platella, C., Montesarchio, D., Stringaro, A., Ravagnan, G., Fuggetta, M.P., Rega, N., Musumeci, D., 2021. Interference of Polydatin/Resveratrol in the ACE2:Spike Recognition during COVID-19 Infection. A Focus on Their Potential Mechanism of Action through Computational and Biochemical Assays. *Biomolecules* 11, 1048. <https://doi.org/10.3390/biom11071048>

Petitjean, S.J.L., Chen, W., Koehler, M., Jimmidi, R., Yang, J., Mohammed, D., Juniku, B., Stanifer, M.L., Boulant, S., Vincent, S.P., Alsteens, D., 2022. Multivalent 9-O-Acetylated-sialic acid glycoclusters as potent inhibitors for SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 13, 2564. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30313-8>

Prashantha, C.N., Gouthami, K., Lavanya, L., Bhavanam, S., Jakhar, A., Shakthiraju, R.G., Suraj, V., Sahana, K.V., Sujana, H.S., Guruprasad, N.M., Ramachandra, R., 2021. Molecular screening of antimalarial, antiviral, anti-inflammatory and HIV protease inhibitors against spike glycoprotein of coronavirus. *J. Mol. Graph. Model.* 102, 107769. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107769>

Priyandoko, D., 2021. Molecular Docking Study of the Potential Relevance of the Natural Compounds Isoflavone and Myricetin to COVID-19. *Int. J. Bioautomation* 271–282.

PubChem, 2022a. Quercetin [WWW Document]. URL

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343> (accessed 5.21.22).

PubChem, 2022b. Naringin [WWW Document]. URL

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442428> (accessed 5.31.22).

Rajah, M.M., Bernier, A., Buchrieser, J., Schwartz, O., 2022. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *J. Mol. Biol.* 434, 167280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167280>

Rebello, C.J., Beyl, R.A., Lertora, J.J.L., Greenway, F.L., Ravussin, E., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Kennedy, B.J., Castro, H.F., Campagna, S.R., Coulter, A.A., Redman, L.M., 2020. Safety and pharmacokinetics of naringenin: A randomized, controlled, single-ascending-dose clinical trial. *Diabetes Obes. Metab.* 22, 91–98. <https://doi.org/10.1111/dom.13868>

Rehman, M.F. ur, Fariha, C., Anwar, A., Shahzad, N., Ahmad, M., Mukhtar, S., Farhan Ul Haque, M., 2021. Novel coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A recent mini review. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 612–623. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.033>

Rolta, R., Salaria, D., Sharma, P., Sharma, B., Kumar, V., Rathi, B., Verma, M., Sourirajan, A., Baumler, D.J., Dev, K., 2021. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* Inhibit Spike Protein of SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor: In Silico Approach. *Curr. Pharmacol. Rep.* 7, 135–149. <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00259-4>

- Rosumeck, S., Nast, A., Dressler, C., 2018. Ivermectin and permethrin for treating scabies. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD012994. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012994>
- Salian, V.S., Wright, J.A., Vedell, P.T., Nair, S., Li, C., Kandimalla, M., Tang, X., Carmona Porquera, E.M., Kalari, K.R., Kandimalla, K.K., 2021. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol. Pharm.* 18, 754–771. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608>
- Saponaro, A., 2018. Isothermal Titration Calorimetry: A Biophysical Method to Characterize the Interaction between Label-free Biomolecules in Solution. *BIO-Protoc.* 8. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2957>
- Sauberan, J.B., Bradley, J.S., 2018. 292 - Antimicrobial Agents, in: Long, S.S., Prober, C.G., Fischer, M. (Eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*. Elsevier, pp. 1499-1531.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00292-9>
- Senthil Kumar, K.J., Gokila Vani, M., Wang, C.-S., Chen, C.-C., Chen, Y.-C., Lu, L.-P., Huang, C.-H., Lai, C.-S., Wang, S.-Y., 2020. Geranium and Lemon Essential Oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells. *Plants* 9, 770. <https://doi.org/10.3390/plants9060770>
- Shakhsi-Niaei, M., Soureshjani, E.H., Babaheydari, A.K., 2021. In Silico Comparison of Separate or Combinatorial Effects of Potential Inhibitors of the SARS-CoV-2 Binding Site of ACE2. *Iran. J. Public Health* 50, 1028–1036. <https://doi.org/10.18502/ijph.v50i5.6120>
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F., 2020. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- Siligardi, G., Hussain, R., Patching, S.G., Phillips-Jones, M.K., 2014. Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.019>
- Singh, S.K., Srivastav, S., Castellani, R.J., Plascencia-Villa, G., Perry, G., 2019. Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* 16, 666–674. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00767-8>
- Sinha, S.K., Shakya, A., Prasad, S.K., Singh, S., Gurav, N.S., Prasad, R.S., Gurav, S.S., 2020. An in-silico evaluation of different Saikosaponins for their potency against SARS-CoV-2 using NSP15 and fusion spike glycoprotein as targets. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1762741>
- Smith, M.D., Smith, J.C., 2020. Repurposing Therapeutics for COVID-19: Supercomputer-Based Docking to the SARS-CoV-2 Viral Spike Protein and Viral Spike Protein-Human ACE2 Interface 28.
- String consortium, 2022. *FURIN protein (human)* [WWW Document]. [Httpsstring-Dborg](https://string-db.org). URL <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bjxt3jAcuFUx> (accessed 4.9.22).

- Sun, X., Yang, X., Xue, P., Zhang, Z., Ren, G., 2019. Improved antibacterial effects of alkali-transformed saponin from quinoa husks against halitosis-related bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 46. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2455-2>
- Supasa, P., Zhou, D., Dejnirattisai, W., Liu, C., Mentzer, A.J., Ginn, H.M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H.M.E., Nutalai, R., Tuekprakhon, A., Wang, B., Paesen, G.C., Slon-Campos, J., López-Camacho, C., Hallis, B., Coombes, N., Bewley, K.R., Charlton, S., Walter, T.S., Barnes, E., Dunachie, S.J., Skelly, D., Lumley, S.F., Baker, N., Shaik, I., Humphries, H.E., Godwin, K., Gent, N., Sienkiewicz, A., Dold, C., Levin, R., Dong, T., Pollard, A.J., Knight, J.C., Klenerman, P., Crook, D., Lambe, T., Clutterbuck, E., Bibi, S., Flaxman, A., Bittaye, M., Belij-Rammerstorfer, S., Gilbert, S., Hall, D.R., Williams, M.A., Paterson, N.G., James, W., Carroll, M.W., Fry, E.E., Mongkolsapaya, J., Ren, J., Stuart, D.I., Screaton, G.R., 2021. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant by convalescent and vaccine sera. *Cell* 184, 2201-2211.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.033>
- Taco, V., 2022. Eco-friendly extraction of bioactive metabolites from Ecuadorian quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) by natural deep eutectic solvents (NADES). UMONS.
- Tang, T., Jaimes, J.A., Bidon, M.K., Straus, M.R., Daniel, S., Whittaker, G.R., 2021. Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike at the S1/S2 Boundary: Potential Role of Proteases beyond Furin. *ACS Infect. Dis.* 7, 264–272. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00701>
- Techno-Science, 2022. Plasma : définition et explications [WWW Document]. Techno-Sci. URL <https://www.techno-science.net/definition/3636.html> (accessed 4.9.22).
- Teilum, K., Kunze, M.B.A., Erlendsson, S., Kragelund, B.B., 2017. (S)Pinning down protein interactions by NMR. *Protein Sci.* 26, 436–451. <https://doi.org/10.1002/pro.3105>
- Thermo Fisher Scientific, 2022. Fluorescence SpectraViewer - Alexa Fluor 647 [WWW Document]. URL <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer?SID=srch-svtool&UID=21235p72#!/> (accessed 6.21.22).
- Thermo Fisher Scientific, 2020. Antibody Conjugate Purification Kit for 20–50 µg (A33087).
- Tutunchi, H., Naeini, F., Ostadrahimi, A., Hosseinzadeh-Attar, M.J., 2020. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. *Phytother. Res.* 10.1002/ptr.6781. <https://doi.org/10.1002/ptr.6781>
- van Breemen, R.B., Muchiri, R.N., Bates, T.A., Weinstein, J.B., Leier, H.C., Farley, S., Tafesse, F.G., 2022. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *J. Nat. Prod.* 85, 176–184. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00946>
- Vidal, 2022. STROMECTOL 3 mg cp [WWW Document]. VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/medicaments/stromectol-3-mg-cp-15621.html> (accessed 6.2.22).
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wang, D., Wang, X.-H., Yu, X., Cao, F., Cai, X., Chen, P., Li, M., Feng, Y., Li, H., Wang, X., 2021. Pharmacokinetics of Anthraquinones from Medicinal Plants. *Front. Pharmacol.* 12.

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., Xiao, G., 2020. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 30, 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>

Wang, N., Han, S., Liu, R., Meng, L., He, H., Zhang, Y., Wang, C., Lv, Y., Wang, J., Li, X., Ding, Y., Fu, J., Hou, Y., Lu, W., Ma, W., Zhan, Y., Dai, B., Zhang, J., Pan, X., Hu, S., Gao, J., Jia, Q., Zhang, L., Ge, S., Wang, S., Liang, P., Hu, T., Lu, J., Wang, X., Zhou, H., Ta, W., Wang, Y., Lu, S., He, L., 2020. Chloroquine and hydroxychloroquine as ACE2 blockers to inhibit viropexis of 2019-nCoV Spike pseudotyped virus. *Phytomedicine* 79, 153333. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153333>

Wang, X., Melino, G., Shi, Y., 2021. Actively or passively deacidified lysosomes push β -coronavirus egress. *Cell Death Dis.* 12, 235. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03501-5>

Weeramange, C.J., Fairlamb, M.S., Singh, D., Fenton, A.W., Swint-Kruse, L., 2020. The strengths and limitations of using biolayer interferometry to monitor equilibrium titrations of biomolecules. *Protein Sci.* 29, 1004–1020. <https://doi.org/10.1002/pro.3827>

Wiese, O., Zemlin, A.E., Pillay, T.S., 2021. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *J. Clin. Pathol.* 74, 285–290. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206954>

Willey, J.M., Prescott, L.M., Sandman, K.M., Wood, D.H., 2020. Prescott's microbiology.

Wilson, J.L., Scott, I.M., McMurry, J.L., 2010. Optical biosensing: Kinetics of protein A-IGG binding using biolayer interferometry. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 38, 400–407. <https://doi.org/10.1002/bmb.20442>

Wong, A., 2020. SPR Sensorgram Explained [WWW Document]. Affin. Instrum. URL <https://www.affiniteinstruments.com/post/spr-sensorgram-explained> (accessed 4.9.22).

World Health Organization, 2021. Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) : comment se transmet la COVID-19 ? [WWW Document]. URL <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> (accessed 4.9.22).

World Health Organization, 2020. WHO COVID-19 Dashboard. Geneva [WWW Document]. URL <https://covid19.who.int/table> (accessed 4.9.22).

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S., Goldsmith, J.A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B.S., McLellan, J.S., 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>

Xu, H., Liu, B., Xiao, Z., Zhou, M., Ge, L., Jia, F., Liu, Y., Jin, H., Zhu, X., Gao, J., Akhtar, J., Xiang, B., Tan, K., Wang, G., 2021. Computational and Experimental Studies Reveal That Thymoquinone Blocks the Entry of Coronaviruses Into In Vitro Cells. *Infect. Dis. Ther.* 10, 483–494. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00400-2>

Yang, D., Singh, A., Wu, H., Kroe-Barrett, R., 2016. Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics. *Anal. Biochem.* 508, 78–96. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.024>

- Yang, L.J., Chen, R.H., Hamdoun, S., Coghi, P., Ng, J.P.L., Zhang, D.W., Guo, X., Xia, C., Law, B.Y.K., Wong, V.K.W., 2021. Corilagin prevents SARS-CoV-2 infection by targeting RBD-ACE2 binding. *Phytomedicine* 87, 153591. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153591>
- Yang, Q., Hughes, T.A., Kelkar, A., Yu, X., Cheng, K., Park, S., Huang, W.-C., Lovell, J.F., Neelamegham, S., 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *eLife* 9, e61552. <https://doi.org/10.7554/eLife.61552>
- Yesudhas, D., Srivastava, A., Gromiha, M.M., 2021. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection* 49, 199–213. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01516-2>
- Zeng, M.-S., Yu, W.-D., Wang, H.-X., Liu, J.-Y., Xu, P.-P., 2021. A potential antiviral activity of Esculentoside A against binding interactions of SARS-COV-2 spike protein and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *Int. J. Biol. Macromol.* 183, 2248–2261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.017>
- Zhan, Y., Ta, W., Tang, W., Hua, R., Wang, J., Wang, C., Lu, W., 2021. Potential antiviral activity of isorhamnetin against SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus in vitro. *Drug Dev. Res.* 82, 1124–1130. <https://doi.org/10.1002/ddr.21815>
- Zhang, D., Lei, T., Lv, C., Zhao, H., Xu, H., Lu, J., 2017. Pharmacokinetic studies of active triterpenoid saponins and the total secondary saponin from *Anemone raddeana* Regel. *J. Chromatogr. B* 1044–1045, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.003>
- Zhang, H., Penninger, J.M., Li, Y., Zhong, N., Slutsky, A.S., 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 46, 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
- Zhang, J., Cai, Y., Xiao, T., Lu, J., Peng, H., Sterling, S.M., Walsh, R.M., Rits-Volloch, S., Zhu, H., Woosley, A.N., Yang, W., Sliz, P., Chen, B., 2021a. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. *Science* 372, 525–530. <https://doi.org/10.1126/science.abf2303>
- Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., Chen, B., 2021b. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr. Opin. Virol.* 50, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>
- Zhao, X., Chen, H., Wang, H., 2021. Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production. *Front. Mol. Biosci.* 8.

6 Annexes

6.1 Annexe 1 : Détails sur la Spike et les 2 sous-domaines de RBD

Le RBD est composée de 2 sous-domaines (Figure 4a, Figure 20) : l'un est un ensemble de feuillets β -antiparallèles recouvert par des hélices α , et l'autre est le motif de liaison au récepteur (RBM), une boucle enroulée autour du premier sous-domaine ; qui permet tous les points de contact avec ACE 2 (Jackson et al., 2022).

Le cœur du RBD (Figure 20) est composé de 5 feuillets β antiparallèles (β 1- β 4 et β 7) comprenant 3 ponts disulfure, formés grâce aux cystéines Cys336–Cys361, Cys379–Cys432 et Cys391–Cys525. Entre les feuillets β 4 et β 7, il y a le RBM qui est composé des feuillets β 5 et β 6 ainsi que des boucles et hélices α 4 et α 5. Nous retrouvons un dernier pont disulfure dans ce RBM formé entre les cystéines Cys480–Cys488 permettant une connexion dans la terminaison distale du RBM (Lan et al., 2020).

- Détails de l'étape de fusion directe lors de l'entrée du virion dans la cellule hôte

S1 se dissocie alors de la structure pour ainsi révéler S2 et passer de la conformation de pré-fusion en post-fusion. Dans celle-ci, le domaine transmembranaire et le peptide de fusion se retrouvent aux extrémités de S2 qui a maintenant une structure en forme d'aiguille composée de FP, HR1, HR2 (composé lui-même d'une hélice rigide et d'une boucle lui apportant de la flexibilité), et de TA (TM) qui est ancré dans la membrane du virion (Ke et al., 2020; Rajah et al., 2022; Zhang et al., 2021b). HR1 prend alors une forme hélicoïdale qui pousse le FP à rompre la membrane de la cellule hôte pour s'y ancrer. Ceci révèle sur HR1 3 régions hydrophobes qui vont permettre une interaction avec HR2 en formant un faisceau de 6 hélices, ressemblant à une épingle à cheveux. Cette interaction va rapprocher les membranes du virion et de la cellule et les faire entrer en fusion. S'en suit la formation d'un pore qui va s'agrandir pour permettre le passage du contenu viral dans le cytosol. CTD, de par sa région riche en cystines se situant dans la région proximale du cytoplasme, s'associe au cholestérol membranaire pour former des radeaux lipidiques (Rajah et al., 2022; Zhang et al., 2021b).

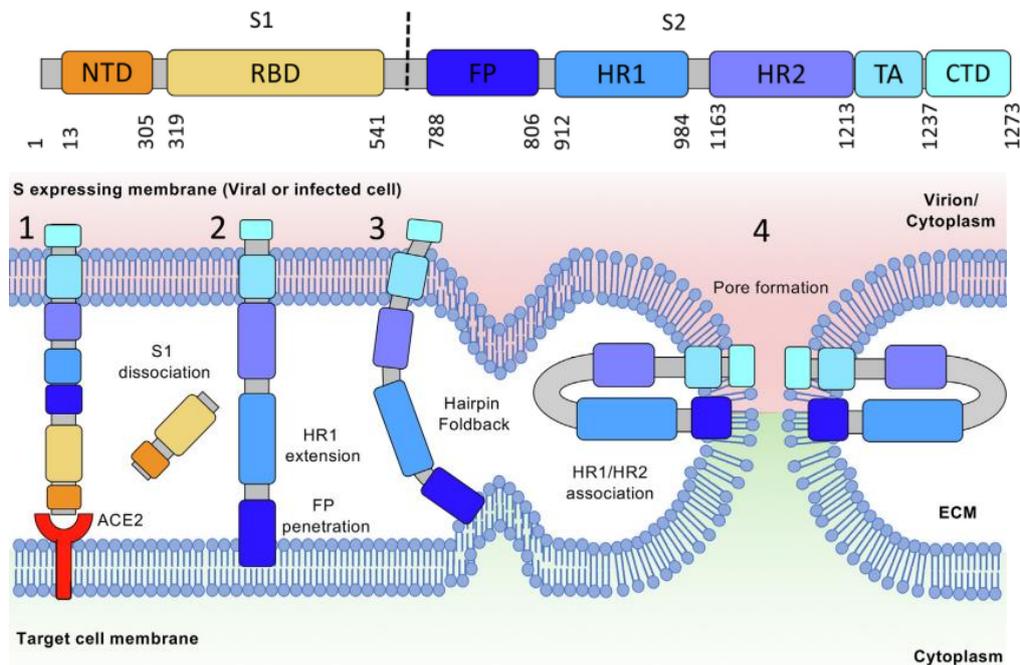


Figure 42 : « Mécanisme moléculaire de la fusion virus-cellule médiée par la protéine Spike (S). Au-dessus : Les sous domaine fonctionnels de la protéine S. Domaine N-terminal (NTD), Domaine de liaison au récepteur (RBD), peptide de fusion (FP), séquences de répétition d’heptapeptide (HR1&HR2), Ancre transmembranaire (TA), Domaine C-terminal (CTD). » (Rajah et al., 2022).

- La formation de syncytia

Spike permet aussi la formation de syncytia, ce qui permet au virus de se propager d’une cellule atteinte à une cellule saine adjacente (Figure 43). Après sa transcription, spike est transformée par la furine, transportée par le réseau Golgi-RE, insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et y est, en général, séquestrée par la protéine M après leur association. Le transport dans le réseau Golgi-RE est rendu possible grâce aux protéines de coque cytoplasmique 1 et 2 (COPI et COPII) permettant respectivement le transport du Golgi vers le RE (transport rétrograde), et le transport inverse (transport antérograde). En effet, S possède un site de liaison suboptimal permettant de lier COPI, dans sa queue cytoplasmique. La séquestration de S dans le RE conduit à des variations intracellulaires de calcium ainsi qu’à l’expression du canal ionique/scramblase TMEM16F qui fait bouger la phosphatidylsérine de la couche interne vers la couche externe de la bicouche de la membrane plasmique, ce qui promeut la fusion. Cependant, lors du transport dans le réseau Golgi-RE, et bien que la plupart des protéines S empruntent le transport rétrograde, certaines peuvent prendre l’antérograde. Elles seront alors transportées vers la membrane plasmique où elles s’associent avec le cholestérol pour induire la formation d’un syncytium après avoir interagi avec l’ACE2 d’une cellule adjacente, par les mêmes mécanismes. Ce transport antérograde est possible car le site de liaison de S à COPI est sub-optimal. Or, les sites de liaisons de COPI et COPII sont

structurellement proche ; ce manque d'affinité rend possible la liaison S-COPII et permet ainsi la migration de Spike sur la membrane plasmique. Les protéines S séquestrées dans le RE vont, elles, servir à la constitution du virion qui va subir une exocytose dépendante de la désacidification des lysosomes. (Rajah et al., 2022).

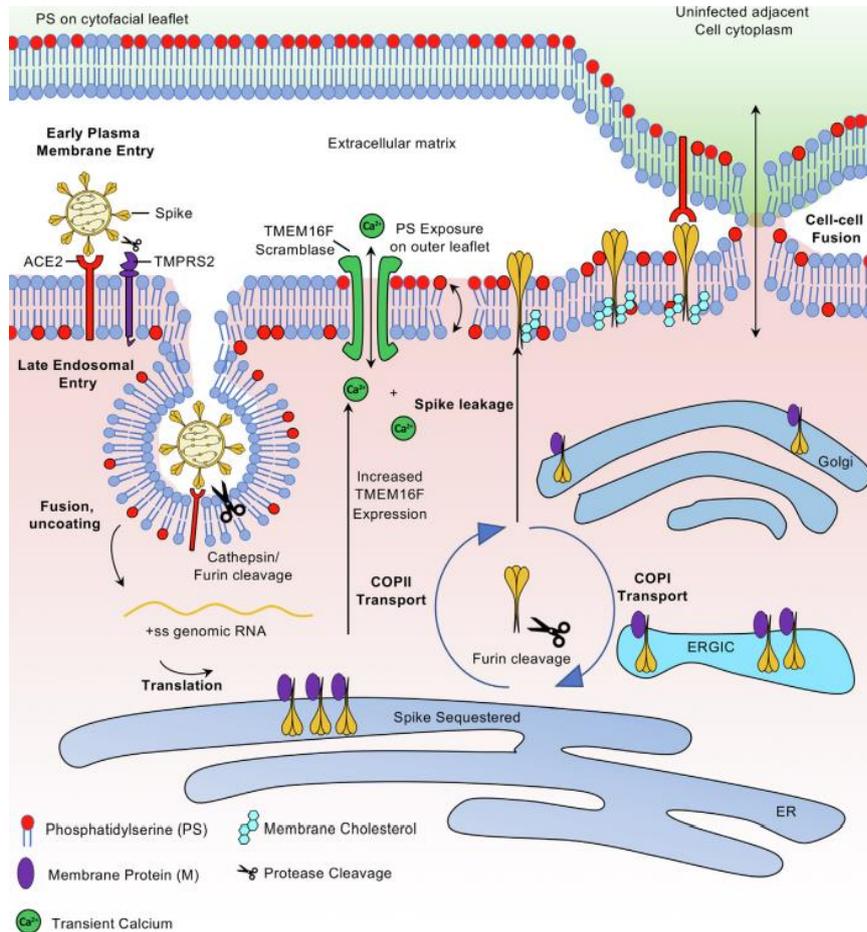


Figure 43 : Schéma représentant la formation d'un syncytium grâce à la protéine S du SARS-CoV-2. (Rajah et al., 2022).

6.2 Annexe 2 : l'ACE2

- L'expression pulmonaire et la détresse respiratoire

Lors de l'infection à SARS-CoV-2, les poumons sont les organes les plus vulnérables. Ceci s'explique par 2 faits : (i) Leur grande surface les rend plus sensibles à un virus inhalé. (ii) 83% des cellules exprimant ACE2 sont des cellules alvéolaires de type 2 de l'épithélium pulmonaire (AECII) (Zhang et al., 2020, p. 2). Ces cellules produisent du surfactant, un liquide permettant la bonne lubrification, nécessaire à la prévention d'un aplatissement alvéolaire. Lors de l'infection à SARS-CoV-2, les AECII sont détruites ce qui provoque une détresse respiratoire.

- La structure de ACE2

L'homologie avec la collectrine permet à ACE2 de jouer un rôle de chaperonne et d'ainsi réguler le transporteur d'acides aminés neutres B⁰AT1 dans l'intestin (Jackson et al., 2022; Wiese et al., 2021). Une forme soluble d'ACE 2, sans ancrage membranaire existe, également. L'ACE 2 est en fait clivée par ADAM (désintégrine et métalloprotéase) 10 et 17 entre les acides aminés 716 et 741. Cette forme est présente à de faibles taux dans la circulation sanguine et possède un temps de demi-vie très court (Wiese et al., 2021).

- L'orage de cytokines

SARS-CoV-2 va aussi activer la cascade du complément (Figure 44) et ainsi induire des dommages aux cellules endothéliales, une augmentation de la perméabilité membranaire, une extravasation leucocytaire, une activation de la cascade de coagulation et une activation plaquettaire. Les anaphylatoxines C5a et C3a vont également contribuer à la production d'IL-6 en activant les macrophages et l'inflammasome présent dans les cellules alvéolaires épithéliales (AEC), ce qui va contribuer à l'orage cytokinique. (Kanehisa Laboratories, 2021).

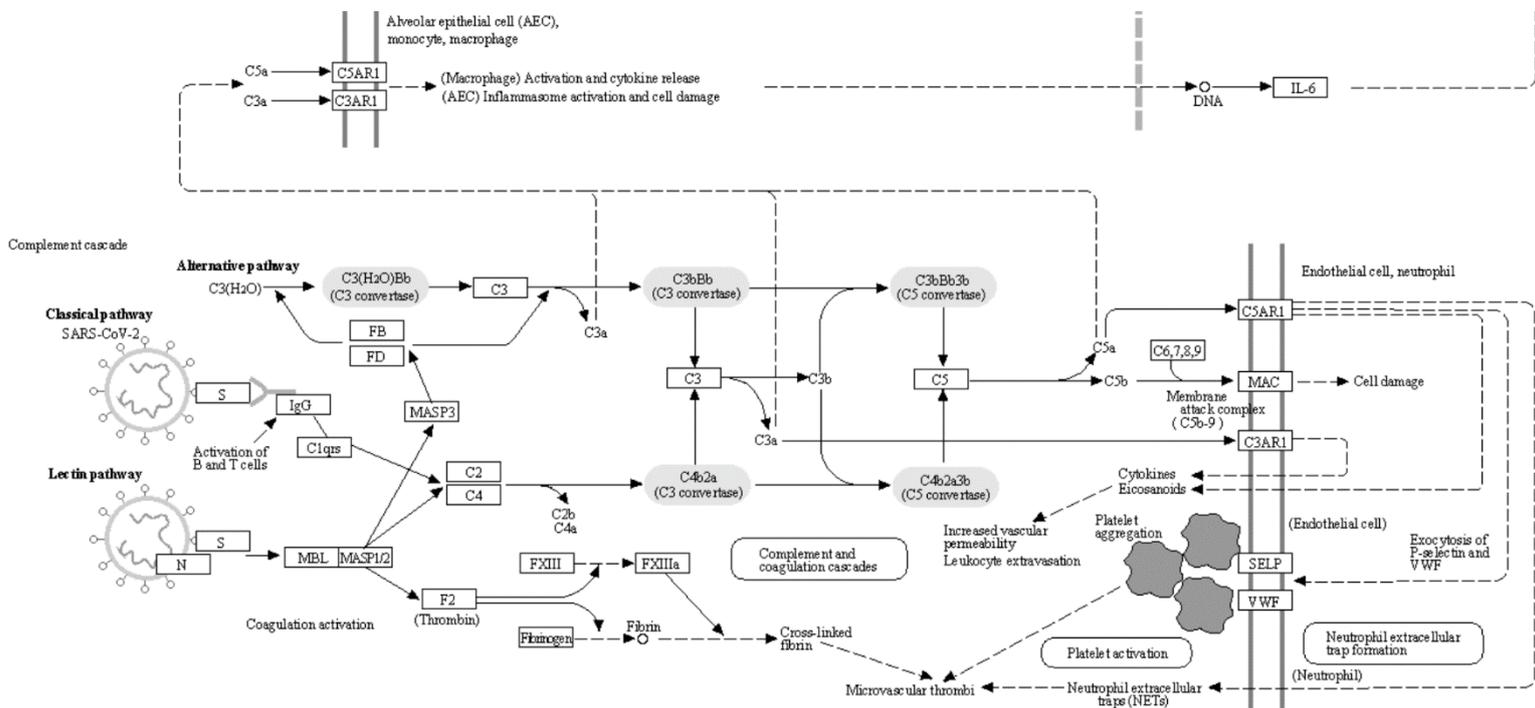


Figure 44 : Maladie à coronavirus – COVID-19 – Voies métaboliques de références. (Kanehisa Laboratories, 2021).

6.3 Annexe 3 : Les saponines de *Chenopodium quinoa* Willd

Les saponines issues de l'extrait d'enveloppes de graines du quinoa sont des bidesmosides. Il existe en effet plusieurs topologies de saponine (Figure 45) : monodesmoside (aglycone avec une chaîne d'oligosaccharide liée par une fonction acétal) ; bidesmosides (aglycone avec deux chaînes d'oligosaccharide liées par une fonction ester et une fonction acétale) ; macrocyclique (aglycone avec une chaîne polysaccharide liée à 2 endroits) (Colson, 2020). Les bidesmosides des enveloppes de graines du quinoa sont composés d'un aglycone de type β -amyrine (triterpénoïde) possédant un glucose en C28 ainsi qu'une chaîne oligosaccharide en C3 (Figure 45b). Cette chaîne de 2 à 3 oses est souvent constituée de xylose, arabinose, acide glucuronique, glucose et galactose (Colson, 2020; Taco, 2022).

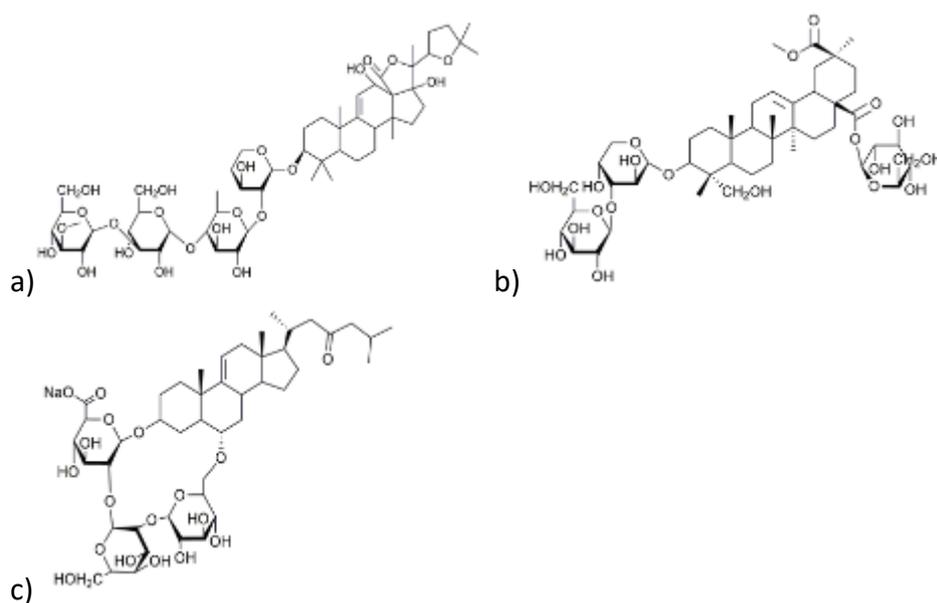


Figure 45 : Les 3 topologies de saponines : a) Monodesmoside (Desholothurine, *Holothuria forskali* Delle Chiaje). b) bidesmoside (Saponine B, *Chenopodium quinoa* Willd). c) Macrocyclique (Sepotoside A, *Echinaster sepositus* Retzius). (Colson, 2020)

Les principaux aglycones sont présentés dans la figure suivante :

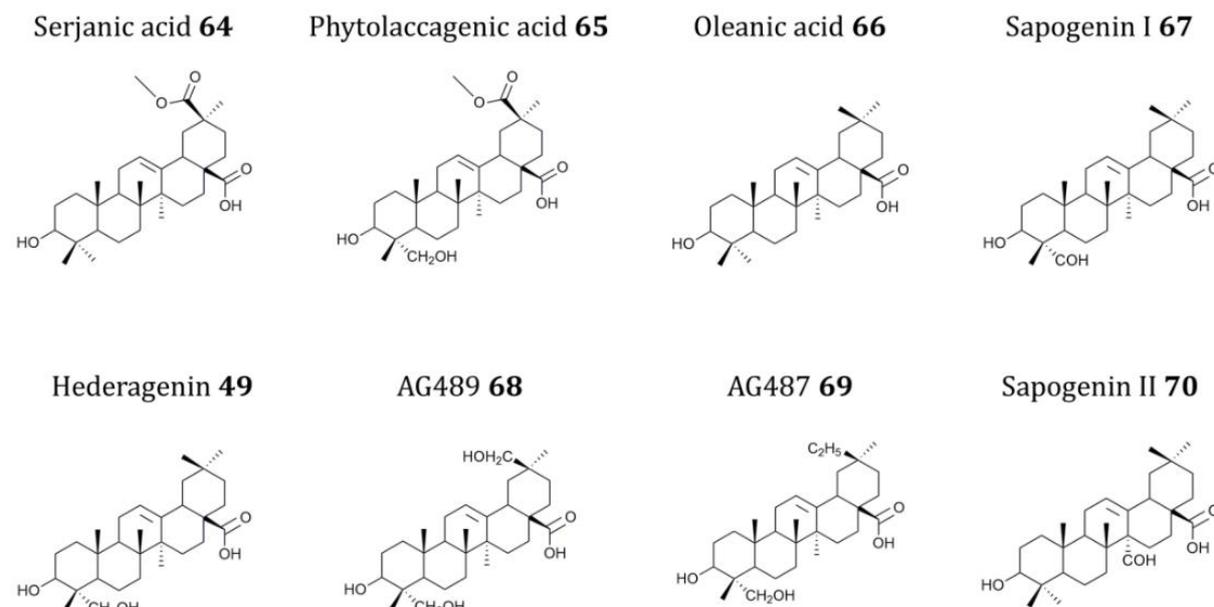


Figure 46 : Aglycones détectées dans l'extrait de *Chenopodium quinoa* Willd. D'après (Colson, 2020)

6.4 Annexe 4 : la structure du virion de SARS-CoV-2

Concernant la structure protéique du virion (Figure 47), chaque protéine structurale joue un rôle important. La liaison aux cellules de l'hôte se fait grâce à la protéine Spike (S). La protéine d'enveloppe (E) tient son rôle dans l'assemblage et la libération de virions, et joue un rôle dans la pathogénèse. La glycoprotéine de membrane (M) possède 3 domaines transmembranaires, et la protéine nucléocapside (N) en possède 2 qui peuvent fixer la protéine Nsp 3 pour aider la liaison du complexe réplication-transcription (RTC) au génome et ainsi assister la réplication. Elle permet également d'empêcher le système des ARN interférant (ARNi) de la cellule hôte d'agir en répresseur de ce système (Cui et al., 2015; Hozhabri et al., 2020; Rehman et al., 2021).

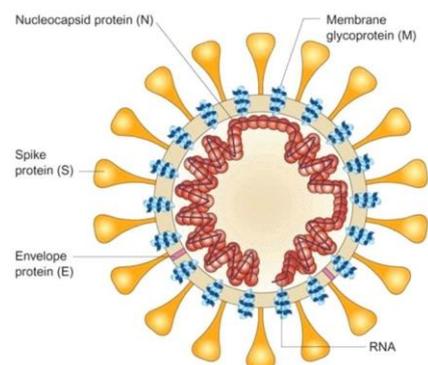


Figure 47 : Structure générale d'un coronavirus (virion). (Gupta and Birhman, 2020).

7 Grilles d'évaluation

Formulaire d'évaluation | Mémoires 20.....-20.... | Evalueur :

Nom et prénom de l'étudiant :

Grille n°1 : Production écrite – Lecteurs											Note attribuée
	2/20	6	8	10	12	14	16	18	20/20
Critères	Inacceptable		Commentaires			Satisfaisant			Très bien		Commentaires
Qualité formelle Table des matières Structure Orthographe/syntaxe	Non-respect de plus de deux critères					Non-respect d'un critère			Respect de tous les critères		
Bibliographie Quantité Qualité Référencement	Quantité insuffisante Sources non fiables Trop d'erreurs de référencement		Deux critères moyennement respectés			Un critère moyennement respecté			Les trois critères sont respectés		
Qualité contenu 1. Introduction 2. Objectif(s) du travail 3. Corps du sujet ou Partie expérimentale 4. Conclusion 5. Bibliographie Résumé	Majorité des parties mauvaises / Manque crucial de contenu		Deux à trois parties sont de moins bonne qualité / en dessous du niveau			Une à deux partie(s) de moins bonne qualité / une partie est en dessous du niveau			Toutes les parties sont de bonne qualité		
Rigueur scientifique	Erreur importante		Rigueur scientifique fort imprécise			Détails à améliorer au niveau de la rigueur scientifique			Rigueur scientifique respectée		
Point bonus	Pas d'originalité particulière					Originalité à souligner					

Grille n°2 : Défense orale – Membres du jury					Note attribuée						
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20/20
Critères	Inacceptable	Insuffisant	Satisfaisant	Très bien	Commentaires						
Support Lisibilité Illustrations Orthographe	Plus de deux critères ne sont pas respectés	Deux critères ne sont pas respectés	Un des critères n'est pas respecté	Tous les critères sont respectés							
Qualité oratoire fluidité, captive le jury	Difficulté de compréhension du discours / Lit son texte	Problème de voix mais discours relativement compréhensible/ Lit son texte	Discours fluide mais manque d'assurance	Discours fluide et captivant (bonnes constructions des phrases)							
Qualité du contenu liens entre l'écrit et l'oral MAIS sans redite/copier-coller du document écrit	Redite de l'écrit / pas de valeur ajoutée / Erreurs importantes dans la présentation	Liens insuffisants / erreurs importantes à légères dans la présentation	Liens intéressants erreurs légères dans la présentation	Liens intéressants et pertinents pour la présentation / Valeur ajoutée suite à l'écrit / Pas ou très peu d'erreurs dans la présentation							
Rigueur scientifique	La rigueur scientifique n'est pas suffisamment présente	La rigueur scientifique n'est que partielle	La rigueur scientifique est majoritairement présente	La rigueur scientifique est impeccable							
Réponses aux questions du jury /des professionnels	Réponses erronées ou erreur importante	Réponses majoritairement à compléter ou nuancer	Réponses majoritairement intéressantes	Réponses intéressantes et pertinentes							
Point bonus	Pas d'originalité particulière			Originalité à souligner							

Grille n°3 : Séance de questions réponses – Membres du jury					Note attribuée
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20				/20
Critères	Inacceptable	Insuffisant	Satisfaisant	Très bien	Commentaires
Réponses aux questions du jury /des professionnels	Réponses erronées ou erreur importante	Réponses majoritairement à compléter ou nuancer	Réponses majoritairement intéressantes	Réponses intéressantes et pertinentes	
<u>Point bonus</u>	Pas d'originalité particulière		Originalité à souligner		

Résultat final	
Y a-t-il une information importante que le promoteur souhaiterait partager avec le jury avant d'attribuer la note ?	
/20	Commentaires / décisions prises :