



**Mise au point d'un nouveau test antiviral *in vitro* contre le coronavirus HCoV-OC43
et évaluation de l'huile essentielle des bourgeons de *P. balsamifera***

par Laurie Girard

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du
grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en ressources renouvelables (biologie)**

Québec, Canada

© Laurie Girard, 2024

RÉSUMÉ

La capacité limitée de la prise en charge des maladies virales infectieuses incite de plus en plus la communauté scientifique à se pencher davantage vers les produits d'origine naturelle et vers leurs propriétés antivirales. Notamment, les huiles essentielles possèdent un potentiel intéressant en raison de leurs composantes bioactives. Il y a cependant un manque important de connaissances concernant leurs propriétés biologiques, particulièrement pour leur activité antivirale. Bien que les espèces appartenant au genre *Populus* soient utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs troubles et maladies dont les infections virales, l'activité antivirale de leurs huiles essentielles n'est que très peu étudiée. L'objectif principal était donc d'évaluer l'activité de l'huile essentielle des bourgeons de *Populus balsamifera* contre HCoV-OC43, et d'identifier le ou les composés responsables de cette activité. Pour ce faire, un test antiviral novateur a été développé afin d'identifier rapidement l'activité antivirale d'extraits et de composés actifs contre ce bêtacoronavirus. Premièrement, notre méthode a permis de démontrer l'efficacité de plusieurs molécules connues pour leurs propriétés antivirales telles que la chloroquine, l'hydroxychloroquine, le molnupiravir et la fluvoxamine. L'identification de molécules efficaces sur l'entrée et/ou la réplication du virus est également possible avec ce test. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *P. balsamifera* possède une activité antivirale significative contre HCoV-OC43. L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats montrent que les principaux composés de l'huile essentielle sont l' α -bisabolol (22,9%), l' α -eudesmol (7,7%), le δ -cadinène (5,9%), l' α -amorphène (5,6%) et le nérolidol (5,5%). L'activité antivirale des composés majoritaires, l' α -bisabolol et le nérolidol, a été évaluée. Les deux composés protègent les cellules pulmonaires humaines MRC-5 contre l'infection induite par HCoV-OC43, suggérant ainsi qu'ils sont responsables en partie de l'activité antivirale de l'huile essentielle de bourgeons de peuplier baumier. Pour conclure, les perspectives de cette recherche sont très intéressantes quant aux propriétés antivirales des produits issus de la forêt boréale. De plus, le test développé favorise l'identification d'agents antiviraux prometteurs. Finalement, il serait pertinent d'évaluer dans le futur l'efficacité de l'huile essentielle des bourgeons du peuplier baumier de même que ses composantes majoritaires contre le virus SARS-CoV-2 responsable de la COVID-19.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
REMERCIEMENTS.....	vii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1.....	1
Les virus.....	1
Les virus.....	1
Les coronavirus.....	3
Le SARS-CoV-2.....	4
Structure du SARS-CoV-2.....	5
Entrée virale	6
Réplication virale	8
Les antiviraux.....	9
Antiviraux contre le SARS-CoV-2.....	12
CHAPITRE 2.....	15
Les composés d'origine naturelle	15
Propriétés antivirales de composés d'origine naturelle	15
Huiles essentielles.....	16
Genre <i>Populus</i>	17
<i>Populus balsamifera</i>	18
Composition chimique de <i>P. balsamifera</i>	19
Activités biologiques de <i>P. balsamifera</i>	20
CHAPITRE 3.....	21
Les tests antiviraux.....	21
Tests antiviraux actuels.....	21
HCoV-OC43 et SARS-CoV-2.....	22
Objectifs de recherche.....	23

CHAPITRE 4.....	24
Antiviral activities of essential oil from <i>Populus balsamifera</i> L. buds against betacoronavirus HCoV-OC43 using a new sensitive assay	24
Résumé	24
Authors affiliations	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION.....	28
MATERIALS AND METHODS.....	29
Compounds.....	29
Cell lines	29
Virus amplification and purification.....	30
Screening for host cell selection	30
Determination of viral titer using cytotoxic assay	30
Evaluation of maximal tolerated concentration (MTC).....	32
Evaluation of antiviral activity.....	32
Determination of 50 % efficacy concentration (EC ₅₀).....	33
Chromatographic analyses	33
Statistical analyses	34
RESULTS AND DISCUSSION.....	35
Cell line screening and viral titer	35
Evaluation of antiviral activity of extracts and compounds.....	36
Chemical composition of <i>P. balsamifera</i>	41
Evaluation of antiviral activity in <i>P. balsamifera</i> and its main components	44
CONCLUSION	46
ACKNOWLEDGMENTS.....	47
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	48
RÉFÉRENCES	50

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Antiviral efficacy and MTC of positive controls against MRC-5 infection induced by HCoV-OC43.....	39
Table 2. Chemical composition of <i>Populus balsamifera</i> essential oil.....	43
Table 3. Antiviral efficacy and MTC of <i>Populus balsamifera</i> essential oil and main compounds against MRC-5 infection induced by HCoV-OC43.....	45

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Particule virale de SARS-CoV-2 (a) et son génome (b).....	6
Figure 2. Deux voies d'entrée virale du SARS-CoV-2 : endocytose médiée par les récepteurs (<i>endosomal entry</i>) et fusion membranaire (<i>cell surface entry</i>).....	7
Figure 3. Cycle de réplication virale du SARS-CoV-2.....	9
Figure 4. Cytotoxicity induced by HCoV-OC43 viral infection against human lung cells WI-38, IMR-90 and MRC-5 and human colon cells HCT-8	36
Figure 5. Protective activity of positive control on MRC-5 cells lines infected by growing concentrations of HCoV-OC43.....	37
Figure 6. Infected cells treated at different chloroquine concentrations, ranging from 0.04 µg/mL to 1.3 µg/mL.....	40
Figure 7. Linear regression obtained using AUC _E calculated from the results represented at Figure 6	41
Figure 8. Antiviral activity of <i>P. balsamifera</i> essential oil (A) and main compound α-bisabolol (B).....	45

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Jean Legault pour son aide précieuse et ses conseils qu'il a pu m'apporter tout au long de ma maîtrise, son temps qu'il m'a alloué, son soutien ainsi que toutes les démarches qu'il a faites pour me permettre d'avoir accès à du financement. Un merci tout particulier à Héloïse Côté qui, depuis que j'ai commencé mes projets de recherche, m'a toujours été d'une très grande aide, et ce, sans compter tout le temps qu'elle a pu me consacrer. Un gros merci à Catherine Dussault pour m'avoir aidé à terminer les résultats à obtenir en laboratoire en lien avec le test antiviral élaboré. Je souhaite également remercier Karl pour sa contribution et son aide en informatique-statistique. Je continue à dire que ses *templates* sont incroyables ! Je remercie toute l'équipe du laboratoire, j'ai passé de supers moments en votre compagnie, de même que j'ai vraiment apprécié tout votre support. C'est l'une des raisons pour laquelle je suis heureuse de poursuivre au doctorat avec toute l'équipe.

Je tiens aussi à remercier mes co-directeurs André Pichette et Lionel Ripoll pour leur contribution à ma maîtrise. Merci à Serge Lavoie pour ses conseils concernant l'analyse par chromatographie. Un gros merci à ma famille et mes amis, particulièrement mes parents et Frédérique Tremblay qui m'ont toujours encouragé et supporté dans mon cheminement scolaire. Un dernier merci à l'organisme Mitacs pour avoir subventionné mon projet de recherche.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE 1

Les virus

Les virus

Les virus sont des agents infectieux et parasites intracellulaires obligatoires, c'est-à-dire qu'ils nécessitent un hôte afin de se répliquer (Payne 2022). Bien qu'il soit clair qu'ils ne sont pas considérés comme des cellules, il existe toutefois un débat à savoir s'ils sont vivants ou non (Yolles et Frieden 2022). Selon les différentes sources, la réponse varie en fonction de la définition de l'état « d'être en vie » qui n'est elle-même pas réellement définie (Koonin et Starokadomskyy 2016). Le concept de vie le plus accepté est défini par la NASA comme étant un « système chimique autosuffisant capable d'évolution darwinienne » (Prosdocimi et de Farias 2021). Ainsi, les arguments qui défendent l'hypothèse selon laquelle les virus sont vivants reposent d'abord sur leur capacité à évoluer. Ils modifient leur génome rapidement afin de s'adapter à leur hôte ainsi qu'à leur environnement. De plus, ils possèdent un cycle de vie qui leur permet de se reproduire malgré le fait qu'il n'est pas autonome (Payne 2022). Ils sont également composés de plusieurs éléments retrouvés dans les cellules tels que des acides nucléiques, des lipides, des sucres et des protéines (Payne 2022). Par contre, les principes qui défendent que les virus ne soient pas vivants sont leur incapacité à se reproduire sans la présence d'un hôte cellulaire et leur métabolisme inexistant (Koonin et Starokadomskyy 2016; Sumbria *et al.* 2020; Payne 2022).

Les virus sont omniprésents dans la nature et se retrouvent dans tous les organismes vivants, qu'ils soient terrestres ou marins. Leur présence joue un rôle important pour les écosystèmes. Par exemple, ils sont suspectés d'être les principaux responsables de la mortalité bactérienne. Ils impactent ainsi les cycles biogéochimiques tels que les cycles du carbone et des nutriments (Suttle 2005; Weitz et Wilhelm 2012; Gao *et al.* 2022; Cai *et al.* 2023). Leur réservoir génétique est également très diversifié, ils contribuent à la diversité et à l'évolution de leurs hôtes en interagissant avec eux. Ils affectent notamment le métabolisme de leurs hôtes par le biais de processus tels que le transfert horizontal de gènes, la sélection de gènes de résistance et la reprogrammation du métabolisme (Zhang *et al.* 2021d; Cai *et al.* 2023). Dans l'océan, en plus de réguler

les cycles biogéochimiques marins, ils y façonnent la structure et la fonction des communautés microbiennes (Zhang *et al.* 2021d). Ils sont aussi à l'origine de plusieurs maladies infectant les organismes supérieurs marins, ce qui affecte tout autant ces communautés (Suttle 2005). Sur le plan terrestre, ils affectent les organismes qui s'y trouvent en impactant entre autres la dynamique d'invasion des différentes espèces. À titre d'exemple, ils peuvent empêcher les espèces exotiques de s'établir et causer l'effondrement de celles-ci (Costa *et al.* 2012; Faillace *et al.* 2017). Les virus possèdent également la capacité à réduire le « fitness » de leurs hôtes, c'est-à-dire leur capacité à survivre et à se reproduire dans leur environnement (Orr 2009). Ils sont en mesure d'influencer les interactions interspécifiques et la composition des communautés, voire même réduire la taille d'une population (Faillace *et al.* 2017). Sur le plan individuel, mis à part le fait qu'ils peuvent être responsables de maladies et de mortalité, ils constituent aussi le microbiome et servent de barrière contre de potentiels pathogènes chez l'humain (Abeles et Pride 2014). Leurs impacts sont donc majeurs pour l'ensemble des espèces qu'ils infectent ainsi que pour leur environnement. Ils parasitent les organismes de pratiquement tous les règnes et écosystèmes (Payne 2022) et peuvent même infecter d'autres virus (virophages) et bactéries (bactériophages) (Fischer 2020).

La structure des virus est constituée d'un génome contenu dans une capsidie formée de protéines. Dans certains cas, la capsidie est protégée par une enveloppe faite d'une bicouche lipidique (Payne 2022). En plus d'une fonction de protection, celle-ci assure la diffusion du génome viral dans les cellules hôtes (Payne 2022). Le génome est formé d'ADN ou d'ARN simple ou double brin(s) sous forme de plasmide (Koonin et Starokadomskyy 2016). Les virus sont par conséquent classifiés selon leurs caractéristiques phénotypiques tels que leur morphologie, leur composition chimique, leur mode de répliation et leurs hôtes (Moreira et López-García 2009). C'est l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) qui se charge de leur classification. À l'inverse des autres types de classifications biologiques, l'ICTV classe les virus en considérant et en approuvant la création de nouveaux taxons de virus (Lefkowitz *et al.* 2018). La classification des virus aide à prendre des décisions

éclairées concernant les stratégies de prévention et de traitement pour les différentes populations affectées.

Les coronavirus

Les coronavirus sont des virus à ARN simple brin positif non segmenté et enveloppés qui appartiennent à l'ordre des *Nidovirales* et à la famille des *Coronaviridae* (Weiss et Navas-Martin 2005). Leur nom provient de leur morphologie unique en forme de couronne, qui est formée par les protéines *spike* (S) présentes sur leur enveloppe (Li *et al.* 2006; Burrell *et al.* 2017b). Les protéines S contrôlent l'entrée virale avec deux domaines : S1 et S2. Le premier est associé à la fonction de liaison aux récepteurs des cellules hôtes tandis que le second permet la fusion des membranes cellulaire et virale. Les sites du domaine de liaison au récepteur (*receptor binding domain*; RBD) varient selon chaque virus. Ils peuvent être retrouvés dans le domaine N-terminal (*N-terminal domain*; NTD) et/ou le domaine C (*C-domain*) (Millet et Whittaker 2015; Hasöksüz *et al.* 2020). Les coronavirus sont divisés en quatre genres : *alpha-*, *béta-*, *gamma-* et *deltacoronavirus* (Hulswit *et al.* 2016; Burrell *et al.* 2017b). Les *alpha-* et les *bétacoronavirus* sont tous deux issus du réservoir génétique viral des chauves-souris, alors que les *gamma-* et les *deltacoronavirus* proviennent des oiseaux et des porcs (Kofi Ayittey *et al.* 2020). Les coronavirus sont responsables de l'infection du système respiratoire, du foie, du système gastro-intestinal et du système nerveux central chez les humains et de nombreux autres animaux, notamment les chats, les souris, les rats, les chauves-souris et le bétail. C'est principalement le système respiratoire qui est affecté par des symptômes tels que la toux sèche, la fièvre et des difficultés respiratoires (Weiss et Navas-Martin 2005; Abate *et al.* 2020).

Jusqu'à présent, un total de 7 coronavirus humains a pu être identifié : HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E, *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV), SARS-CoV et SARS-CoV-2 (Kesheh *et al.* 2022). Les HCoV- sont responsables de maladies respiratoires endémiques et saisonnières dont la sévérité varie de légère à modérée, et ce, selon les saisons et les années. Pour leur part, MERS-CoV et SARS-CoV sont endémiques alors que SARS-CoV-2 est pandémique (Kesheh *et al.* 2022). Nouvellement apparus depuis les années 2000, ces trois coronavirus de provenance animale possèdent un taux de mortalité significativement

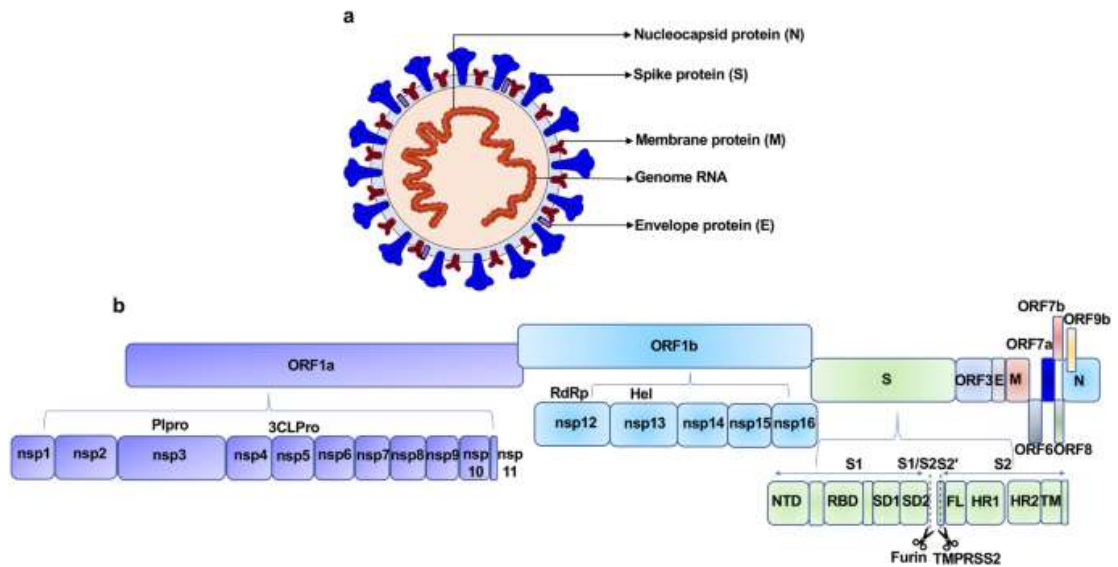
plus élevé que les autres, soit d'environ 34,0 %, 9,7 % et 2,0 % (mortalité surestimée) respectivement pour le MERS-CoV, SARS-CoV et SARS-CoV-2 (Peiris 2016; Petersen *et al.* 2020; Heidari Nia *et al.* 2022; Kesheh *et al.* 2022; Lamers et Haagmans 2022; Msemburi *et al.* 2023). Généralement, les coronavirus HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 infectent les voies respiratoires supérieures, causant ainsi les symptômes du rhume. Le MERS-CoV, le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 peuvent quant à eux aussi infecter les voies respiratoires inférieures (Lamers et Haagmans 2022).

Le SARS-CoV-2

Chez les individus infectés par le SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), la sévérité de la maladie (COVID-19) peut varier de légère à sévère selon plusieurs facteurs qui peuvent aggraver la condition du patient comme l'asthme, les maladies cérébrovasculaires, les maladies rénales chroniques, les maladies cardiovasculaires, les tumeurs malignes, le diabète, l'hypertension, l'âge, le sexe et les antécédents de tabagisme (Abate *et al.* 2020; Liu *et al.* 2020; Mukherjee et Pahan 2021; Yin *et al.* 2021). La majorité des cas de COVID-19 se manifestent de manière légère ou modérée par les symptômes tels que la toux, la fièvre et la fatigue. Cependant, certaines personnes peuvent développer le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Yin *et al.* 2021; Lamers et Haagmans 2022). Il s'agit d'une affection pulmonaire potentiellement mortelle (taux de mortalité de 30 – 40 %) caractérisée par l'apparition d'œdème pulmonaire non cardiogénique et par l'hypoxémie. Cette incapacité des poumons à fournir suffisamment d'oxygène exige par conséquent un support respiratoire (Matthay *et al.* 2019). Il a été suggéré que le développement de la forme sévère de la COVID-19 pourrait être associé à la surproduction de cytokines pro-inflammatoires (*cytokine storm*) et de chimiokines. En effet, un taux élevé de celles-ci contribue à l'apparition du SDRA (Del Valle *et al.* 2020; Diao *et al.* 2020; Cappanera *et al.* 2021; Jiang *et al.* 2022; Yang *et al.* 2022; Zanza *et al.* 2022). D'autre part, l'une des principales caractéristiques qui diffère entre le SARS-CoV-2 et les autres coronavirus est sa virulence et son taux de mutation plus élevé (Abdelrahman *et al.* 2020; Petersen *et al.* 2020).

Structure du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 est un bêta-coronavirus à ARN simple brin et à polarité positive dont les séquences nucléotidiques sont partagées à 79 % avec celles du SARS-CoV, ce qui suggère une appartenance à la même espèce (Zhou *et al.* 2020; Jackson *et al.* 2022; Kesheh *et al.* 2022; Lamers et Haagmans 2022). De plus, les sites RBD des deux virus se trouvent à l'extrémité C de la sous-unité S1 (Hasöksüz *et al.* 2020). Malgré les différentes hypothèses expliquant l'origine de ce virus, il est pour l'instant suggéré que ce virus provient de multiples évènements zoonotiques (Alwine James *et al.* 2023). En effet, la diversité génomique des lignées virales datant de la période antérieure à février 2020 indique qu'il n'y aurait probablement pas qu'un seul animal vecteur de la maladie infectieuse. La chauve-souris est fortement soupçonnée d'être responsable de l'une de ces souches (Pekar *et al.* 2022). D'autres animaux tels que le pangolin, le hamster, le vison et le chevreuil peuvent également être l'hôte de ce coronavirus. L'origine exacte du SARS-CoV-2 reste pour l'instant inconnue (Kesheh *et al.* 2022; Pekar *et al.* 2022; Temmam *et al.* 2022; Chen *et al.* 2024). Ce virus est composé de trois types de protéines incluant les structurales, les non structurales (NSPs) et les accessoires. Les protéines non structurales forment une grande partie du complexe de réplication et de transcription, alors que les protéines accessoires sont impliquées principalement dans la réplication virale (Lamers et Haagmans 2022). Le virion du SARS-CoV-2 (Figure 1a) est la forme virale complète et infectieuse du virus lorsqu'il se trouve à l'extérieure de la cellule hôte (Burrell *et al.* 2017a). Il est pour sa part formé de protéines structurales qui forment une nucléocapside (protéine N), une membrane, une enveloppe et des protéines S (Jackson *et al.* 2022; Lamers et Haagmans 2022). La protéine S est caractéristique des coronavirus puisqu'elle est responsable de l'apparence de couronne (*crown-like*) et joue d'ailleurs un rôle important dans l'infection des cellules hôtes (Gitman *et al.* 2021). C'est effectivement cette glycoprotéine qui assure à la fois l'attachement et la fusion avec la cellule hôte grâce à ses deux domaines S1 et S2 (Jackson *et al.* 2022). Le premier contrôle l'entrée virale à partir du RBD qui permet la liaison au récepteur *angiotensin-converting enzyme-2* (ACE2). Le second domaine permet la fusion entre la membrane virale et celle de l'hôte (Gitman *et al.* 2021; Jackson *et al.* 2022; Lamers et Haagmans 2022).



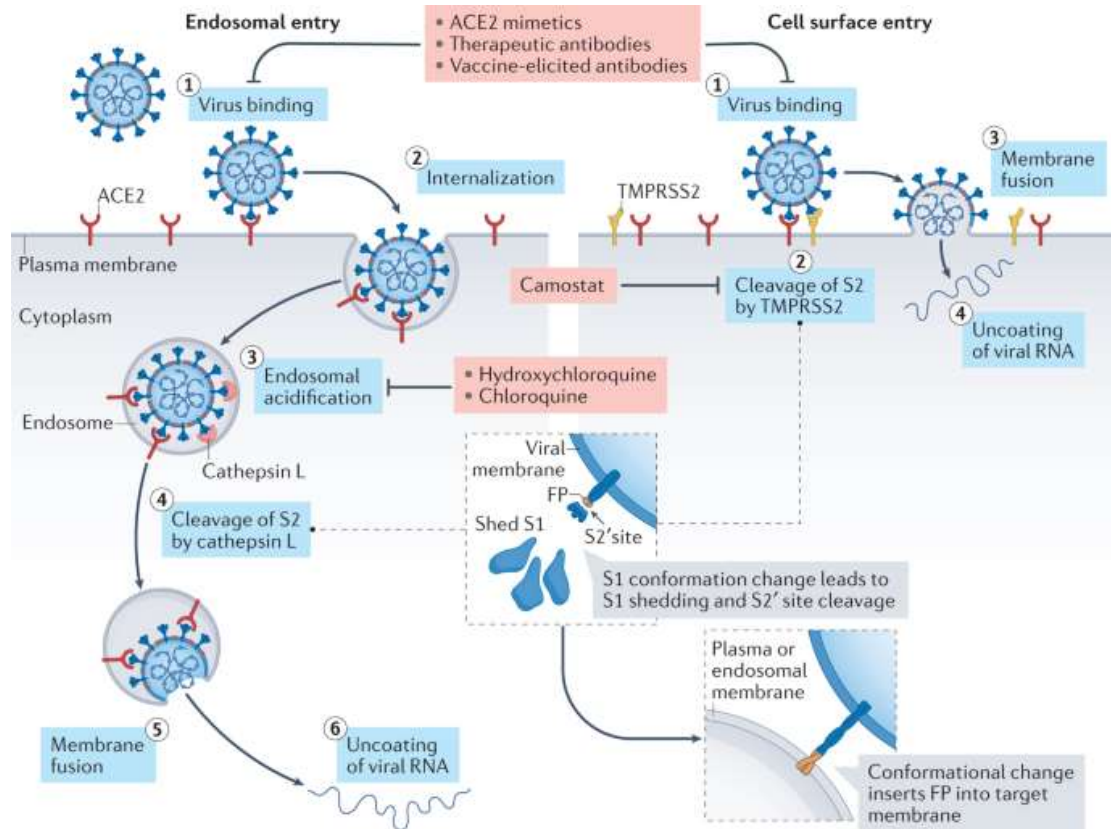
Tirée de : Zhang *et al.* (2021b)(CC BY).

Figure 1. Particule virale de SARS-CoV-2 (a) et son génome (b).

Entrée virale

L'entrée virale (Figure 2) est possible grâce à deux voies, l'une par endocytose médiée par les récepteurs (indirecte ou entrée endosomale) et l'autre par fusion membranaire (directe ou entrée par surface cellulaire). Selon les différentes sources, le nom de ces deux voies peut changer, mais le principe reste le même (Pišlar *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2021; Jackson *et al.* 2022). Dans les deux cas, l'infection débute par la liaison de la protéine virale S au récepteur ACE2 (Figure 1b). L'affinité entre le récepteur ACE2 et la protéine S est 10 fois supérieure pour le SARS-CoV-2 que pour le SARS-CoV (Citarella *et al.* 2021). Cette liaison a pour effet d'induire dans le domaine S1 des changements de conformation, ce qui expose alors le site de clivage S2' du domaine S2 qui permet la fusion membranaire. La voie suivie dépend de la protéase par laquelle est clivée le site S2'. Dans la voie indirecte, le virus est internalisé par endocytose dans les endolysosomes lorsqu'il y a une expression insuffisante de la sérine protéase transmembranaire 2 (TMPRSS2) par la cellule hôte ou qu'un complexe virus-ACE2 ne parvient pas à se lier à TMPRSS2. Il y a par la suite le clivage du site S2' par des cathepsines telles que la cathepsine L qui se fait dans l'environnement acide des endolysosomes. Le clivage de ce site entraîne un autre changement de conformation qui initie la fusion entre la membrane virale et celle de l'endolysosome. Il se forme

ainsi un pore de fusion par lequel l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte pour être par la suite répliqué. Dans la voie directe, dès qu'il y a formation du complexe virus-ACE2, il y a plutôt le préclivage du site S1/S2 à la surface cellulaire par la furine. La furine est une protéase qui amorce l'activation de la protéine S en permettant le clivage direct du site S2' par TMPRSS2. La voie directe est possible uniquement lorsque ces deux protéases sont présentes en quantité suffisante (Peacock *et al.* 2021; Rahbar Saadat *et al.* 2021). Cela active le domaine S2 et initie la fusion entre la membrane virale et celle de la cellule. La formation du pore de fusion est immédiatement réalisée, permettant par conséquent la libération de l'ARN viral dans la cellule hôte pour poursuivre avec la réplication virale (Pišlar *et al.* 2020; Jackson *et al.* 2022; Lamers et Haagmans 2022).

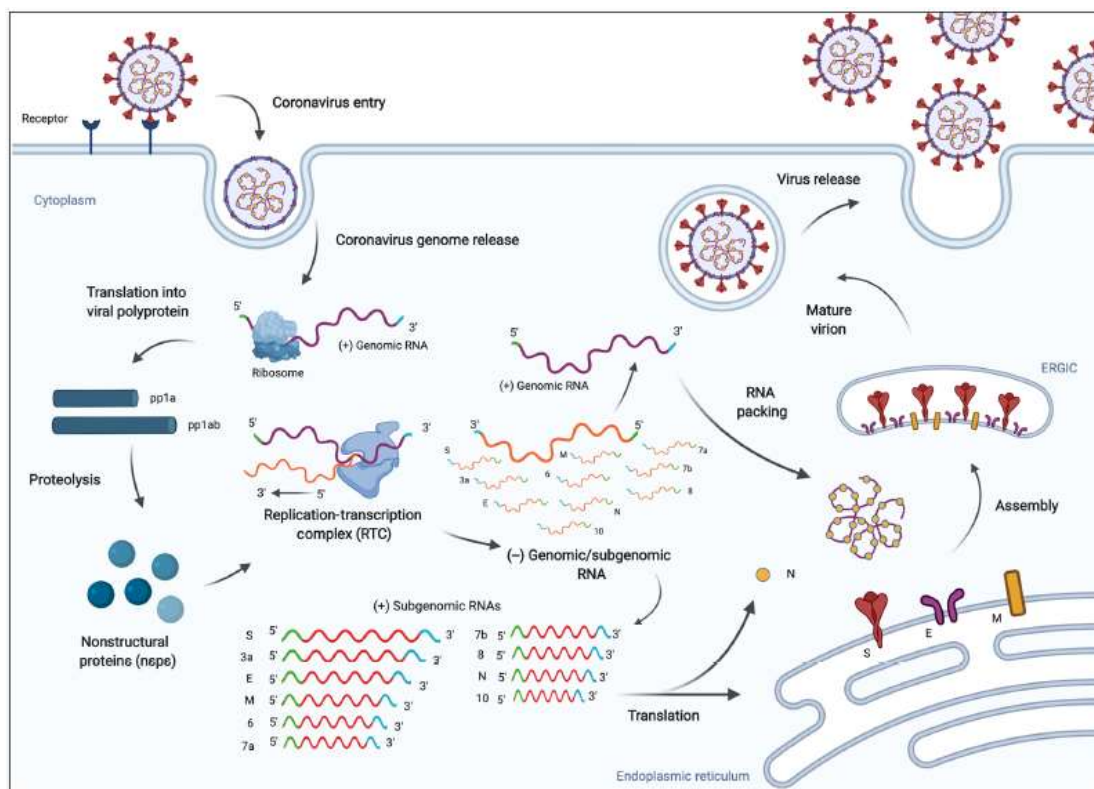


Tirée de (avec autorisation): Jackson *et al.* (2022).

Figure 2. Deux voies d'entrée virale du SARS-CoV-2: endocytose médiée par les récepteurs (*endosomal entry*) et fusion membranaire (*cell surface entry*).

Réplication virale

La réplication virale débute lorsque l'ARN viral simple brin positif libéré est déroulé dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 3). Le génome est alors traduit en larges polyprotéines, pp1a et pp1b, afin de créer un environnement adapté à la synthèse d'ARN (Lebeau *et al.* 2020; Zafferani *et al.* 2021). Celles-ci sont clivées en NSPs par la *main protease* (Mpro), aussi appelée *3C-like protease* (3CL^{Pro}), et par la *papain-like protease* (PLpro) via protéolyse (Malik 2020; Citarella *et al.* 2021; Zafferani *et al.* 2021). Ce sont deux protéases qui jouent un rôle majeur dans la réplication et la transcription virales ainsi que dans le développement des particules virales. Elles sont d'ailleurs des cibles importantes pour le développement d'antiviraux (Jeong *et al.* 2020; McClain et Vabret 2020; Prajapati *et al.* 2022). Plusieurs des NSPs formées interagissent avec la *RNA-dependant RNA polymerase* (RdRp) pour constituer le complexe réplacase-transcriptase (RTC) qui fournit un environnement adapté à la synthèse d'ARN génomique. Ce complexe est également responsable de la réplication virale et de la transcription des ARNs sous-génomiques qui codent par la suite les protéines structurales et autres protéines accessoires (Jeong *et al.* 2020; Lebeau *et al.* 2020; Malik 2020). Ces protéines sont ensuite transloquées dans le compartiment intermédiaire Golgi avec l'ARN génomique pour l'assemblage des virions. Enfin, ces derniers sont évacués de la cellule hôte par exocytose afin d'infecter d'autres cellules non infectées (Jeong *et al.* 2020).



Tirée de : Zafferani *et al.* (2021) (CC BY-NC).

Figure 3. Cycle de réplication virale du SARS-CoV-2.

Les antiviraux

Parmi les traitements possibles chez l'humain, il y a principalement les vaccins et les antiviraux (Datta *et al.* 2015; Payne 2022). Brièvement, les vaccins améliorent l'immunité à une infection virale alors que les antiviraux sont des médicaments spécifiquement employés pour traiter l'infection (Romanowski 2013). Les antiviraux peuvent être classifiés selon leur nature chimique, leurs cibles ou leurs modes d'action contre des protéines virales spécifiques (Li *et al.* 2021). Depuis l'approbation du premier antiviral en 1963, l'idoxuridine (De Clercq et Li 2016), plus de 100 composés antiviraux ou combinaisons ont été approuvés pour le traitement de 9 maladies infectieuses humaines (cytomégalovirus (CMV), virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), de l'herpès simplex (VHS), de l'influenza et de la variole humaine, virus respiratoire syncytial (VRS) et virus varicelle-zona (VZV)) (Romanowski 2013; Li *et al.* 2021). D'autre part, parmi les 12 nouveaux antiviraux approuvés entre 2012 et 2017, 8 d'entre eux sont utilisés

pour le traitement du VHC et 2 d'entre eux pour traiter le VIH (Mercorelli *et al.* 2018). À cela s'ajoutent maintenant les nouveaux traitements contre les coronavirus (Li *et al.* 2023). Cependant, même s'il y a plus de 200 virus connus qui sont responsables d'infections virales chez l'humain, il n'y a pas de traitement spécifique pour la plupart de ces infections (Woolhouse *et al.* 2012; De Clercq et Li 2016). Bref, le développement d'antiviraux est très lent, laborieux et entravé par de nombreux obstacles (Bryan-Marrugo *et al.* 2015). Plusieurs facteurs expliquent cette grande problématique : 1) les limitations de systèmes *in vitro* et *in vivo* pour l'expérimentation ; 2) le manque de méthodes systémiques et structurées pour le développement de nouveaux antiviraux ; 3) la faible quantité de nouvelles molécules candidates actives qui sont découvertes ; 4) le mince équilibre entre la toxicité cellulaire et l'efficacité de la molécule ; 5) la difficulté à cibler le virus sans affecter négativement les cellules hôtes ; 6) l'induction rapide de résistance au médicament et 7) l'aspect dispendieux des recherches sur de potentiels antiviraux (Romanowski 2013; Bryan-Marrugo *et al.* 2015; Pardi et Weissman 2020).

Par conséquent, il n'y a que très peu de recherches concluantes sur le développement d'antiviraux spécifiques aux autres virus. Cela est d'autant plus vrai en considérant que celles-ci sont principalement faites sur le VIH, car cet agent pathogène infecte de façon persistante plusieurs millions d'individus et raccourcit sérieusement la longévité chez les patients non traités (survie médiane de 8 à 10 ans) (Sabin 2013; Center for Disease Control and Prevention 2014; Richman et Nathanson 2016). Les virus tels que Zika, Ebola et MERS-CoV qui sont encore responsables d'épidémies alarmantes se voient ainsi négligés dans le développement d'antiviraux (Mercorelli *et al.* 2018). Pour ce qui est des virus dont il est possible de traiter avec des antiviraux, soit ceux précédemment cités, ces traitements ne sont pas pour autant entièrement efficaces (Bryan-Marrugo *et al.* 2015). Il est par exemple possible de contrôler une infection au VIH chez un individu de 20 ans et d'augmenter son espérance de vie d'environ 50 ans. Toutefois, même si le traitement permet de supprimer la réplication virale, il n'éradique pas les réservoirs viraux, à savoir les cellules infectées qui ne produisent pas activement de nouvelles particules virales (Patterson *et al.* 2015; Richman et Nathanson 2016; Xiao *et al.* 2019; Ahlenstiel *et al.* 2020). De même, le principal traitement utilisé chez les

patients infectés au CMV, le ganciclovir, est virostatique. Il empêche donc la réplication virale mais n'élimine pas les cellules infectées latentes (Krishna *et al.* 2019), ce qui implique une adhésion à long terme à la médication (Soriano *et al.* 2022). En plus de cela, il y a la résistance thérapeutique qui se manifeste régulièrement (Tan 2014; Hofmann *et al.* 2021). Ainsi, un patient atteint du CMV devra non seulement être traité à vie, mais devra aussi s'attendre à devoir changer de médication. Même constat avec le VHB et le VHS, les antiviraux actuellement disponibles sont virostatiques (Soriano *et al.* 2022) et induisent une résistance (Ghany et Doo 2009). Le VHC est pour sa part entièrement curable (Walker et Grakoui 2015), mais l'accessibilité au traitement est limitée en raison de son coût élevé (Baumert *et al.* 2019; Sandmann *et al.* 2019). Le manque important d'agents antiviraux est donc alarmant, et ce, même pour les virus traitables.

Jusqu'à présent, les principaux antiviraux élaborés depuis la découverte de l'idoxuridine sont des analogues de nucléosides qui sont utilisés pour prévenir la réplication virale (De Clercq et Field 2006; Geraghty *et al.* 2021; Abdullah Al Awadh 2022). Cependant, ces analogues ont un taux de dégradation rapide qui peut affecter leur potentiel antiviral. Ils ont en plus une faible biodisponibilité orale occasionnée par une haute polarité et une faible perméabilité intestinale (Li *et al.* 2008; Eyer *et al.* 2018). D'autre part, les inhibiteurs de la transcriptase inverse (ITI) constituent également une classe importante d'antiviraux grâce à leur capacité à inhiber la réplication virale (Waller et Sampson 2018). Il en existe deux types principaux : les nucléosides ITI et les non-nucléosides ITI. Une résistance croisée (*cross-resistance*) a souvent été observée chez ces types d'antiviraux (Asahchop Eugene *et al.* 2012) de même qu'individuellement (Soriano et Mendoza 2002). Les inhibiteurs de protéases ainsi que les inhibiteurs d'intégrases sont d'autres classes d'antiviraux qui sont aujourd'hui utilisés pour bloquer la réplication virale en ciblant des enzymes clés de ce mécanisme (Patick et Potts 1998; Dubey *et al.* 2007). Bien qu'il semble y avoir moins de résistance que les non-nucléosides ITI, ils peuvent occasionner des effets secondaires sérieux tels que la dyslipidémie, l'insulino-résistance, la lipodystrophie, les maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (inhibiteurs de protéases), la rhabdomyolyse, les désordres métaboliques, les symptômes neuropsychiatriques

(inhibiteurs d'intégrases), etc. (Lv *et al.* 2015; Kolakowska *et al.* 2019). Dans l'ensemble, les antiviraux actuels ont souvent une efficacité limitée, doivent être combinés à d'autres médicaments, rencontrent de la résistance ou de la résistance croisée et peuvent causer des effets indésirables importants (Asahchop Eugene *et al.* 2012; Ben-Shabat *et al.* 2020). Ces limitations ainsi que le manque d'antiviraux expliquent la pertinence et l'intérêt grandissant de se pencher sur des options alternatives pour le traitement des virus, tout particulièrement depuis l'émergence du SARS-CoV-2.

Antiviraux contre le SARS-CoV-2

Actuellement, aucun agent antiviral ne permet de traiter la forme sévère de la COVID-19. Parmi les antiviraux autorisés tels que le Paxlovid (nirmatrelvir/ritonavir, Pfizer Inc.), le molnupiravir (MK-4482 ou Lagevrio, Ridgeback Biotherapeutics et Merck & Co., Inc.) et la fluvoxamine (Luvox, Solvay Pharmaceuticals Inc.), ceux-ci ne sont efficaces que pour traiter les patients avec les formes légère à modérée (Jayk Bernal *et al.* 2021; Chaplin 2022; Lee *et al.* 2022). Des essais cliniques ont montré que le molnupiravir et le Paxlovid pris oralement permettent de réduire les risques d'hospitalisation ou de décès de 50 % (Merck Sharp & Dohme LLC ; Eloy *et al.* 2021; Jayk Bernal *et al.* 2021) et de 89 % respectivement (Pfizer Inc. ; Wen *et al.* 2022). Cependant, le Paxlovid n'est pas admissible à tous en raison de sa composition en ritonavir. Cet antirétroviral est un inhibiteur de la cytochrome P450 (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4) qui comporte une interaction médicamenteuse majeure en raison de son action inhibitrice sur plusieurs enzymes. Cela peut par conséquent entraîner des effets indésirables majeurs chez les individus qui prennent certaines classes de médicaments dont entre autres les antithrombotiques et les statines (Foisy *et al.* 2008; Hossain *et al.* 2017; Ross *et al.* 2022). Conséquemment, les individus appartenant aux classes d'âge les plus à risque de développer la forme sévère de la maladie se voient majoritairement restreints (Heskin *et al.* 2022). Autrement, la composition antivirale du Paxlovid, le nirmatrelvir, possède un effet inhibiteur *in vitro* sur la protéase Mpro du SARS-CoV-2 ($IC_{50} = 0.019 \mu M$). Sa composition en ritonavir sert uniquement à accroître l'activité du nirmatrelvir contre la réplication du virus (Saravolatz *et al.* 2023). Concernant le molnupiravir, les résultats

in vitro réalisés sur des cellules pulmonaires humaines Calu-3 infectées par le SARS-CoV-2, montrent une inhibition de la réplication virale ($IC_{50} = 0.08 - 0.4 \mu M$) (Singla et Goyal 2022; Zhao *et al.* 2022b). Pour ce qui est de la fluvoxamine, même si cet antidépresseur a pu être associé à la réduction du taux d'hospitalisation, elle comporte aussi des risques d'interactions médicamenteuses avec plusieurs médicaments (Iga 2015; Lee *et al.* 2022). Une inhibition de l'activité antivirale est obtenue *in vitro* ($IC_{50} = 10 \mu M$) lorsque des cellules de reins humains HEK293T infectées au SARS-CoV-2 sont traitées à la fluvoxamine (Fred *et al.* 2022). Il a été suggéré que la fluvoxamine agit sur l'entrée et la réplication du virus (Hashimoto *et al.* 2022). Concernant le remdésivir, premier antiviral autorisé dans le traitement de la COVID-19, il reste encore incertain si celui-ci est efficace chez les patients ayant développé les formes modérées à sévères en raison de résultats contradictoires des études réalisées à ce jour (Singh *et al.* 2020; Frediansyah *et al.* 2021; Olender *et al.* 2021; Singh *et al.* 2021; Gottlieb *et al.* 2022a). Dans les études plus prometteuses, certaines montrent une amélioration clinique, un risque d'hospitalisation ou de mortalité réduit ainsi qu'un temps de récupération plus court lorsque les patients sont traités avec le remdésivir dans les 10 jours suivant l'apparition des symptômes (Beigel *et al.* 2020; Frediansyah *et al.* 2021; Gottlieb *et al.* 2022b). Dans les cas contraires, aucun bénéfice au niveau de la mortalité n'est observé (Singh *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020; Singh *et al.* 2021). Toutefois, le remdésivir inhibe potentiellement la réplication virale *in vitro* sur des cellules de reins du singe vert (Vero E6) ($IC_{50} = 8 \mu m$) (McAuley *et al.* 2022). Aussi, contrairement aux trois médicaments précédents, le remdésivir doit être administré par voie intraveineuse et est onéreux, ce qui le rend moins accessible pour les patients infectés (Singh *et al.* 2020; Vangeel *et al.* 2022). Bref, il y a un besoin évident de développer de nouveaux antiviraux pour traiter les patients atteints de la COVID-19, et ce, tout particulièrement chez ceux ayant développé la forme sévère de la maladie. Cela est d'autant plus vrai en prenant en considération le très haut taux de mutation des virus qui leur permet de développer en un court laps de temps de la résistance aux antiviraux (Bryan-Marrugo *et al.* 2015). Il est par conséquent primordial d'accroître le nombre d'antiviraux efficaces, accessibles et abordables, mais aussi, d'en développer qui sont efficaces pour toutes les formes de la maladie. Cette situation a par le fait même suscité

un intérêt grandissant pour l'utilisation de produits naturels comme agents antiviraux (Nadjib 2020; Ali *et al.* 2022).

CHAPITRE 2

Les composés d'origine naturelle

Propriétés antivirales de composés d'origine naturelle

Depuis des milliers d'années, les plantes sont utilisées pour leurs bienfaits médicaux (Pan *et al.* 2014). Une étude archéologique suggère que l'herboristerie, une médecine traditionnelle qui utilise les plantes et leurs extractions, existait il y a de cela 60 000 ans en Iraq (Leroi-Gourhan 1975; Pan *et al.* 2014). En effet, jusqu'à l'arrivée de la médecine moderne (début du 19^e siècle), les plantes et les herbes sont employées pour traiter la maladie chez l'Homme et pour conserver une bonne santé (Pan *et al.* 2014; Yuan *et al.* 2016). Cependant, l'avènement de la médecine moderne entrave leur utilisation médicinale en raison du manque de preuves scientifiques. Il y a depuis quelques années un nouvel intérêt à se réorienter vers les plantes et herbes médicinales en raison du manque de traitement efficace pour plusieurs maladies. Cela emmène un regain vers la médication naturelle et le développement de produits d'origines naturelles (Pan *et al.* 2014; Ali *et al.* 2022). Leurs nombreuses propriétés biologiques telles que antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antidiabétiques, anticancéreuses, antifongiques, anti-hyperlipidiques et antivirales sont effectivement très intéressantes pour le développement de nouveaux traitements (Radha et Laxmipriya 2015; Akram *et al.* 2018; Ben-Shabat *et al.* 2020). D'autant plus que parmi les 500 000 plantes actuellement identifiées, il est estimé qu'approximativement 1 à 10 % uniquement d'entre elles ont pu voir leurs propriétés biologiques analysées. Il y a ainsi un très grand potentiel à exploiter pour l'identification de nouvelles molécules bioactives provenant des plantes non étudiées. De plus, l'analyse des plantes étudiées n'est pas toujours complète, ce qui limite aussi les composés bioactifs découverts jusqu'à ce jour (Godlewska *et al.* 2022). L'effet synergétique des plantes est un autre aspect qui requiert beaucoup plus de recherches en considérant l'énorme potentiel de l'action combinée de plusieurs composés (Vaou *et al.* 2022). À titre d'exemple, le β -caryophyllène possède un effet potentialisateur sur l'activité anticancéreuse de l' α -humulène, de l'isocaryophyllène et du paclitaxel (Legault et Pichette 2007).

Concernant les propriétés antivirales des composés d'origine naturelle, il y a de plus en plus d'études faites sur diverses plantes, herbes et algues qui démontrent une activité

antivirale contre plusieurs virus (Shalaby 2011; Akram *et al.* 2018; Ben-Shabat *et al.* 2020; Bachar *et al.* 2021; Pradhan *et al.* 2022). La grande variété de structure des composés d'origine naturelle suggère que plusieurs de ces molécules pourraient avoir des propriétés antivirales (Lavoie *et al.* 2017; Akram *et al.* 2018; Atanasov *et al.* 2021). Le curcuma est un exemple de produits d'origine naturelle qui contient une importante teneur en composés bioactifs. Sa composante majoritaire (2 à 5 %), la curcumine, a entre autres démontré un potentiel antiviral contre plusieurs virus tels que le VHS et le VRS (Eke-Okoro *et al.* 2018; Mathew et Hsu 2018; Hussain *et al.* 2022). En plus de cette propriété biologique, ils améliorent le système immunitaire des individus (Akram *et al.* 2018). Il y a également un certain nombre d'essais cliniques qui sont réalisés, mais ceux-ci manquent cependant souvent de rigueur et sont peu nombreux (Paller *et al.* 2016; Alam *et al.* 2021; Nile et Kai 2021). Le Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi) vise d'ailleurs à développer la recherche sur les antiviraux d'origine naturelle en raison de leurs activités prometteuses. Entre autres, plusieurs études réalisées au laboratoire LASEVE portent sur le virus Herpès simplex de type 1 (VHS-1) et divers composés potentiellement bioactifs contre ce virus. Par exemple, il a pu être déterminé via un test par réduction des plages de lyse que *Cornus canadensis* et *Limonium densiflorum* possèdent une activité antivirale contre VHS-1 et que *L. densiflorum* est aussi actif contre le virus H1N1 (Medini *et al.* 2014; Lavoie *et al.* 2017). Il a également pu être montré que *C. canadensis* est actif contre l'influenza (Côté 2011). L'activité de l'extraction de jeunes feuilles de *Citrus aurantium* contre VHS-1 a aussi été démontrée dans l'étude de Mejri *et al.* (2024). En outre, un intérêt est porté sur le potentiel antiviral des huiles essentielles.

Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont obtenues par l'extraction de composantes volatiles des plantes dont notamment des terpènes, des terpénoïdes, des benzénoïdes et des phénylpropanoïdes, tous des composés aromatiques qui possèdent une grande variété d'activités biologiques. Leurs composantes volatiles actives sont responsables de leurs nombreuses activités biologiques telles qu'antibactérienne, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antioxydante, antinociceptive, antifongique, antivirale, antiseptique,

antimutagénique, etc. (Bakkali *et al.* 2008; Adorjan et Buchbauer 2010; Masyita *et al.* 2022). Elles sont utilisées depuis le Moyen Âge pour leurs applications multiples en médecine, en cosmétique et aujourd'hui particulièrement dans les domaines pharmaceutiques, sanitaires, cosmétiques, agricoles et alimentaires (Bakkali *et al.* 2008). Parmi les 3000 HE ayant été identifiées, approximativement 300 d'entre elles sont employées pour des fins commerciales (Hou *et al.* 2022). Dans la nature, les HE servent de protection pour les plantes en tant qu'antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides en plus de repousser les herbivores (Bakkali *et al.* 2008; Adorjan et Buchbauer 2010; Masyita *et al.* 2022).

Les HE sont hydrophobes et sont solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales (Dhifi *et al.* 2016). Chez les bactéries, cette caractéristique d'hydrophobicité permet aux HE de s'introduire dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne, ce qui perturbe alors celle-ci et la rend plus perméable (Burt 2004; Calo *et al.* 2015). Cela résulte chez certaines bactéries Gram positives et Gram négatives en leur inhibition (Calo *et al.* 2015). En outre, il est probable que les propriétés hydrophobes des HE interfèrent également avec les protéines des membranes virales qui assurent leur liaison avec la cellule hôte (Nadjib 2020). Plusieurs molécules bioactives contenues dans les HE participent également à leur activité antivirale contre une variété de virus (virus à ARN et à ADN, virus à enveloppe, influenza et SARS-CoV-2) (Mieres-Castro *et al.* 2021). Notamment, des monoterpènes telles que le 1,8-cinéole, le *p*-cymène, l' α -pinène, le γ -terpinène, l' α -terpinéol et le terpinène-4-ol, de même que des sesquiterpènes comme le β -caryophyllène et le germacrène D, sont des molécules actives contre certains virus et sont retrouvées dans diverses HE (Bezić *et al.* 2011; Mieres-Castro *et al.* 2021).

Genre *Populus*

Les arbres appartenant au genre *Populus* incluent 29 espèces. La plupart sont présentes en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. Ces plantes à croissance rapide sont très adaptables (Stanciauskaite *et al.* 2021a; Guleria *et al.* 2022). Les peupliers sont exploités pour la production d'énergie, la fabrication des pâtes et papiers, les produits du bois et le contrôle de l'érosion des sols (Guleria *et al.* 2022). D'autre part, la médecine traditionnelle s'intéresse grandement aux peupliers en raison de leurs

nombreuses propriétés biologiques (Stanciauskaite *et al.* 2021a; Guleria *et al.* 2022). Les peupliers et leurs organes (bourgeons, écorce, feuilles et brindilles) sont connus pour leurs activités anti-inflammatoire, antioxydante, anti-rhumatique, antiseptique, antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse, anti-obésité, antidiabétique, astringente, diurétique, neuroprotectrice, etc. (Van Hoof *et al.* 1980; Stanciauskaite *et al.* 2021a; Guleria *et al.* 2022). Parmi ces propriétés biologiques, il y a par exemple l'étude de Gezici *et al.* (2017) qui suggère que l'HE obtenue à partir des feuilles et des fleurs de *P. alba* présente des activités *in vitro* antiproliférative et cytotoxique ainsi que des propriétés potentiellement antioxydantes. Haouat *et al.* (2013) ont pour leur part démontré que cette même espèce de peuplier possède une activité *in vitro* antimycobactérienne contre *M. smegmatis*, *M. aurum* et *M. bovis*. Une activité neuroprotectrice *in vitro* a également été observée chez des isolats obtenus de la résine de *P. euphratica* (Liu *et al.* 2019). L'étude de Van Hoof *et al.* (1980) a montré une activité antivirale de certains peupliers, notamment *P. nigra*, contre des virus tels que le poliovirus, le virus de la rougeole, et de l'herpès. De plus, Van Hoof *et al.* (1989) ont observé chez des extractions de cultivars de peupliers, une activité antivirale contre le poliovirus et le virus de la forêt de Semliki. Toutefois, malgré les propriétés biologiques intéressantes du genre *Populus*, la littérature est toutefois limitée (Guleria *et al.* 2022). De plus, la composition chimique des peupliers a été peu étudiée, ce qui limite la découverte de nouvelles molécules bioactives (Guleria *et al.* 2022).

Populus balsamifera

Le peuplier baumier (*Populus balsamifera* L.) est une espèce qui est présente dans les forêts boréales et mixtes au Canada ainsi que dans le nord des États-Unis. *P. balsamifera* appartient à la famille des *Salicaceae* (Piochon-Gauthier *et al.* 2014). Il s'agit de l'une des espèces de peupliers les plus répandues en Amérique du Nord. Typique au genre *Populus*, les barrières reproductives du peuplier baumier sont faibles de sorte que dans une population naturelle de cet arbre, plus de la moitié sont des hybrides (72 %) (Meirmans *et al.* 2017). Traditionnellement, cette plante est utilisée par les Amérindiens pour le traitement de plusieurs maladies et troubles dont le psoriasis, l'eczéma et d'autres types de problèmes de peau, les troubles intestinaux, les blessures, les maux de tête, les problèmes respiratoires, la grippe et le rhume (Holloway

et Alexander 1990; Moerman 2009; Simard *et al.* 2015; Bélanger *et al.* 2020; Guleria *et al.* 2022). Le peuplier baumier est ainsi utilisé sans risque depuis plusieurs générations par les peuples autochtones en Amérique du Nord (Moerman 2009; Harbilas *et al.* 2012).

Composition chimique de *P. balsamifera*

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier selon plusieurs facteurs dont le climat, la composition du sol, l'organe duquel provient l'extrait, l'âge et le stade du cycle végétatif de la plante au moment de l'extraction (Bakkali *et al.* 2008; Sharmeen *et al.* 2021). Par exemple, les bourgeons d'automne de *P. balsamifera* contiennent une plus forte teneur en HE et sont plus riches en (+)- α -bisabolol, l'une des composantes majeures retrouvées chez les bourgeons du peuplier baumier qui est en partie responsable de l'effet cytotoxique de l'HE (Piochon-Gauthier *et al.* 2014). Puisque les bourgeons provenant des espèces appartenant au genre *Populus* forment une source riche en huiles essentielles (Schepetkin *et al.* 2022), il s'agit du principal organe étudié et exploité pour l'extraction d'HE chez *P. balsamifera*. Notamment, l'analyse de la composition chimique de l'HE des bourgeons du peuplier baumier réalisée par les travaux de Piochon-Gauthier *et al.* (2014) a révélé qu'elle contient surtout des sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, α -bisabolol et *trans*-nérolidol) et des monoterpènes (α -Pinène). Isidorov et Vinogorova (2003) ont pour leur part principalement identifié des sesquiterpènes (guaïol, bulnesol and α -eudesmol) et des n-alkanes. Parmi ces molécules, l'(+)- α -bisabolol et le *trans*-nérolidol sont les deux composantes majeures retrouvées dans cette HE, alors que dans la nature, l'isomère (+)- α -bisabolol est rarement retrouvé chez les plantes (Piochon-Gauthier *et al.* 2014; Schepetkin *et al.* 2022). Concernant l'analyse phytochimique d'extraits des bourgeons de *P. balsamifera*, plusieurs familles de molécules potentiellement actives ont été identifiées telles que des n-alkanes, des acides gras, des terpènes, des phénols, des flavonoïdes, des chalcones, des carbohydrates et des prostaglandines (Lavoie *et al.* 2013).

Activités biologiques de *P. balsamifera*

Les études réalisées sur les activités biologiques de *P. balsamifera* sont peu nombreuses (Stanciauskaite *et al.* 2021b). Il a malgré tout pu être démontré certaines propriétés expliquées par la présence de plusieurs composantes actives. Les balsacones, des dérivés de dihydrochalcones isolées à partir des bourgeons du peuplier baumier, possèdent une activité antibactérienne *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* (Lavoie *et al.* 2013). Il a en outre pu être observé des potentiels anti-psoriasique, anti-inflammatoire et antioxydant (Bélanger *et al.* 2020). *P. balsamifera* a également démontré des activités anti-obésité et antidiabétique *in vitro* et chez des modèles de souris (Harbilas *et al.* 2012; Guleria *et al.* 2022). Les extraits de bourgeons provenant de cet arbre possèdent aussi une activité antioxydante *in vitro* (Stanciauskaite *et al.* 2021b). À notre connaissance, l'activité de *P. balsamifera* n'a jamais été étudiée.

CHAPITRE 3

Les tests antiviraux

Tests antiviraux actuels

Il existe plusieurs types de tests antiviraux pour évaluer l'activité antivirale d'une molécule contre un virus. Parmi ceux-ci, le test par réduction de plages de lyse est fréquemment employé (Landry *et al.* 2000). Il détermine la capacité d'une molécule étudiée à inhiber la formation de plages de lyse cellulaire induite par l'infection virale (Lavoie *et al.* 2017). Il y a aussi les tests qui utilisent l'effet cytopathique afin de mesurer la protection contre la dégénérescence cellulaire induite par le virus. Des sondes telles que le rouge neutre, le sel de tétrazolium et les luciférases sont utilisées lors de ce type de test. De plus, la méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) est aussi utilisée pour détecter la présence d'antigènes viraux ou d'anticorps afin de vérifier l'efficacité d'agents antiviraux à prévenir la réplication virale (Schöler *et al.* 2020). Un autre test appelé « réplicon viral » consiste à identifier des inhibiteurs en utilisant un fragment modifié du génome viral capable de se répliquer sans produire de particules virales infectieuses (He *et al.* 2021). Le test antiviral à gène rapporteur est une autre technique qui se résume à mesurer l'expression d'un gène rapporteur : lorsqu'un composé inhibe la réplication virale, l'expression du gène rapporteur se voit elle aussi inhibée, ce qui permet d'évaluer l'activité antivirale (Green *et al.* 2008). Le test de réduction du rendement viral vérifie quant à lui l'aptitude d'un composé à réduire la quantité de virus répliqué dans une culture cellulaire. Il existe d'autres techniques pour vérifier l'effet antiviral d'une molécule dont les tests basés sur la PCR et les tests d'héماغglutination. Il est à mentionner que les méthodes utilisées telles que les tests d'effet cytopathique, le test ELISA, le test de réplicon viral et le test à gène rapporteur sont souvent combinées avec le criblage à haut débit (*high throughput screening*) (Li *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011; Islam *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2021c). Bien qu'il existe plusieurs tests antiviraux, il est possible de rencontrer certaines difficultés, comme un manque de fiabilité, de standardisation, de rapidité et/ou de simplicité. De plus, certains tests ne sont pas toujours applicables à tous les virus (Langford *et al.* 1981; Schmidtke *et al.* 2001). Par exemple, le test de réduction des plages de lyse n'est pas utilisable avec le virus HCoV-OC43 (Langford *et al.* 1981;

Savoie et Lippé 2022). C'est d'ailleurs ce qui a mené notre laboratoire (LASEVE) au développement d'un nouveau test antiviral.

HCoV-OC43 et SARS-CoV-2

HCoV-OC43 est un bêtacoronavirus qui infecte surtout les voies respiratoires supérieures chez l'humain. Avec HCoV-229E, il fait partie des premiers coronavirus humains à être découverts dans les années 60 (Woo *et al.* 2009). Il est présumé que les bovins sont l'hôte intermédiaire (Jevšnik Virant *et al.* 2021). Il est responsable de 15 à 30 % des cas de rhumes saisonniers et endémiques chez l'adulte et la sévérité des symptômes y étant associés varie de légers à modérés (Liu *et al.* 2021a). HCoV-OC43 peut cependant occasionner dans certains cas des maladies graves des voies respiratoires inférieures telles que la bronchite et la pneumonie, ce qui peut parfois être mortel (Wang *et al.* 2022). Ce virus a aussi été associé avec des conditions neurologiques rares dont l'encéphalomyélite aiguë disséminée chez les enfants (Beidas et Chehadéh 2018; Wang *et al.* 2022). Parmi les 4 coronavirus humains endémiques, il s'agit de celui qui est le plus retrouvé à travers les populations. Sa protéine S est également constituée de deux sous-unités fonctionnelles : S1 et S2. Celles-ci médient respectivement la liaison à la cellule hôte et la fusion entre les membranes (Wang *et al.* 2022). HCoV-OC43 est constitué en plus d'une enveloppe, d'une membrane, d'une protéine N et de deux protéines accessoires (NS2a et NS5a) (Beidas et Chehadéh 2018). Ce bêtacoronavirus a été sélectionné en raison de ses similitudes avec le SARS-CoV-2 qui nécessite un laboratoire de niveau de confinement 3 (NC3) (Zhang *et al.* 2021a). Pour sa part, HCoV-OC43 peut être manipulé dans un laboratoire NC2, ce qui limite les coûts et les mesures de sécurité supplémentaires qui viennent avec les laboratoires NC3. Ces deux bêtacoronavirus se transmettent par aérosols et par gouttelettes respiratoires de même qu'ils sont relativement résistants aux désinfectants (Schirtzinger *et al.* 2022). Un taux d'identité allant jusqu'à 30,5 – 34,8 % des protéines NP et S a pu être observé entre SARS-CoV-2 et HCoV-OC43 (Bates *et al.* 2021; Tamminen *et al.* 2021). Il existe probablement une réactivité croisée entre les deux coronavirus (Tamminen *et al.* 2021) et tous deux possèdent un site de clivage furine, protéase essentielle à la voie directe de l'entrée virale (Liu *et al.* 2021b). Leurs similitudes suggèrent qu'un antiviral efficace contre SARS-CoV-2 serait aussi actif

contre HCoV-OC43 et inversement. Le molnupiravir est d'ailleurs efficace non seulement contre SARS-CoV-2, mais aussi contre la réplication *in vitro* d'HCoV-OC43 (Li *et al.* 2022b). Le nirmatrelvir, l'une des deux composantes du Paxlovid, inactive la Mpro impliquée dans la réplication virale du SARS-CoV-2 et dans celle d'HCoV-OC43 (Chen *et al.* 2022). Le remdésivir est également efficace contre la réplication virale *in vitro* des deux coronavirus (Brown *et al.* 2019; Negru *et al.* 2022).

Objectifs de recherche

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'activité antivirale de l'huile essentielle des bourgeons de *Populus balsamifera* contre le bêtacoronavirus HCoV-OC43 et d'en identifier le ou les composés responsables.

Pour atteindre cet objectif, les quatre objectifs spécifiques suivants ont été réalisés :

- 1) Développer un nouveau test pour évaluer l'activité antivirale d'extraits et de composés contre HCoV-OC43;
- 2) Évaluer l'activité antivirale de l'huile essentielle des bourgeons de *P. balsamifera* avec le nouveau test;
- 3) Analyser la composition chimique de l'HE des bourgeons de *P. balsamifera* et
- 4) Évaluer l'activité antivirale des composantes majoritaires de l'huile essentielle étudiée.

CHAPITRE 4

Antiviral activities of essential oil from *Populus balsamifera* L. buds against betacoronavirus HCoV-OC43 using a new sensitive assay

Résumé

La grande diversité de propriétés biologiques retrouvées chez les huiles essentielles demeure encore aujourd'hui peu exploitée puisqu'elle demeure largement sous-étudiée. On observe également un manque de connaissances en ce qui concerne leur potentiel antiviral, notamment chez les espèces du genre *Populus*. L'objectif de cette recherche visait donc à évaluer l'activité antivirale de l'huile essentielle des bourgeons de *Populus balsamifera* L. contre le bêtacoronavirus HCoV-OC43 et à d'identifier le ou les composés qui en sont responsables. Un nouveau test a été développé pour évaluer l'activité antivirale de l'huile essentielle et des composés majoritaires contre ce coronavirus humain. À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer l'activité antivirale de l'huile essentielle des bourgeons de peuplier baumier. L'efficacité observée chez cette espèce et deux de ses composantes majoritaires, l' α -bisabolol et le nérolidol, suggère d'ailleurs un potentiel antiviral contre le SARS-CoV-2 qui possède plusieurs similarités avec HCoV-OC43. Ces résultats favorisent ainsi la valorisation des produits naturels d'origine boréale. Le journal PLOS ONE est visé pour la publication de ce manuscrit.

Antiviral activities of essential oil from *Populus balsamifera* L. buds against betacoronavirus HCoV-OC43 using a new sensitive assay

Laurie Girard^{1,2}, Héloïse Côté ^{1,2}, André Pichette^{1,2}, Lionel Ripoll^{1,2} and Jean Legault^{1,2*}

Authors affiliations

¹Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec   Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC, Canada, G7H 2B1

²Centre de recherche sur la bor alie (CREB), Département des Sciences Fondamentales, Universit  du Québec   Chicoutimi, 555 boulevard de l'Universit , Chicoutimi, QC, Canada, G7H 2B1

*Correspondence: lgirard27@etu.uqac.ca (L.G.); hcote@etu.uqac.ca (H.C.); apichett@uqac.ca (A.P.); lripoll@uqac.ca (L.R.); jlegault@uqac.ca (J.L.).

ABSTRACT

Background

Essential oils are volatile compounds extracted from plants by distillation and contain a high concentration of numerous bioactive components. Consequently, they exhibit an abundant array of biological properties including antibacterial, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antifungal and antiviral. However, there is still an evident lack of documentation on their properties, mostly on their antiviral activities. Even if species from the *Populus* genus was traditionally used for treatment of viral infections, there is no current study on the antiviral potential of *Populus balsamifera* L. essential oil.

Aim

In this study, the antiviral activity of the essential oil of *P. balsamifera* buds and its main components is evaluated *in vitro* against HCoV-OC43, a betacoronavirus that mostly infects the human upper respiratory tract. For the purpose of this study, a new antiviral assay is developed.

Methods

The assay was done using human lung fibroblasts (MRC-5) and can be realised on a total of 4 days: 1 day of cell growth and 3 days of infection. Results are obtained from a resazurin reduction test. Gas chromatography analyses were performed to identify and quantify the major components of *Populus balsamifera*.

Findings

The essential oil from boreal origins showed high antiviral activity against the betacoronavirus ($EC_{50} = 3.7 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$), as well as its major components, α -bisabolol ($EC_{50} = 2.9 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$) and nerolidol ($EC_{50} = 2.6 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$), which suggest that *Populus balsamifera* EO antiviral properties might be explained in part by these compounds.

Conclusions

Essential oil of *P. balsamifera* buds and its main components, α -bisabolol and nerolidol, are all efficient *in vitro* against HCoV-OC43. This is the first study to examine antiviral activity of *P. balsamifera* against a virus. Considering the similarities between HCoV-OC43 and SARS-CoV-2, this suggests that these molecules could also be effective against the virus responsible of COVID-19.

Key words: *Populus balsamifera* L., HCoV-OC43, SARS-CoV-2, antiviral activity, antiviral assay, viral entry, viral replication, MRC-5

INTRODUCTION

Essential oils (EO) are obtained by the extraction of volatile components of plants such as terpenes, terpenoids, benzenoids and phenylpropanoids. These active components are responsible for their numerous biological activities (Bakkali *et al.* 2008; Masyita *et al.* 2022). Regarding their antiviral properties, it has been shown that some EOs are effective against viruses such as the avian influenza A virus (H5N1), human herpes virus (HSV), human immunodeficiency virus (HIV) and SARS-CoV (Loizzo *et al.* 2008; Čavar Zeljković *et al.* 2022). Despite their apparent usefulness, essential oils from boreal plants are still understudied and overlooked (Poaty *et al.* 2015), mostly for their antiviral activity that is poorly documented. With the lack of antiviral agents that has been highly emphasized during the COVID-19 pandemic, this has prompted the scientific community to broaden horizons regarding the identification and the development of new antiviral drugs. EOs have thus drawn significant attention from researchers for their potential in treating the disease caused by SARS-CoV-2 (Iqhrammullah *et al.* 2023).

Populus balsamifera L. (*P. balsamifera*), also known as balsam poplar, is part of the *Salicaceae* family. This boreal plant is commonly found in Canada and in the North of the United States (Marie-Victorin *et al.* 1995). It was traditionally used by Native Americans for the treatment of diseases and troubles like psoriasis, eczema and other skin problems, intestinal disorders, injuries, headaches, respiratory problems, flu and colds (Holloway et Alexander 1990; Moerman 2009; Simard *et al.* 2015; Bélanger *et al.* 2020; Guleria *et al.* 2022). Regarding the literature, studies realised on balsam poplar are few, but some demonstrated certain biological activities such as anti-psoriatic, anti-inflammatory, antioxidant (Bélanger *et al.* 2020), antibacterial (Lavoie *et al.* 2013), anti-obesity and anti-diabetic (Harbilas *et al.* 2012; Guleria *et al.* 2022). There is however no antiviral activity that has been reported from this species.

In this study, a new sensitive antiviral assay is first developed to evaluate the *in vitro* antiviral activity of the EO of *P. balsamifera* buds against HCoV-OC43, a human coronavirus that shares similarities with SARS-CoV-2. The chemical composition of the EO is then characterised by GC analyses and the antiviral activity of its main components is subsequently assessed with the developed assay.

MATERIALS AND METHODS

Compounds

Chloroquine phosphate (PHR1258) and molnupiravir (SML2873, EIDD-2801) were purchased from MilliporeSigma (MA, USA). Fluvoxamine maleate (F0858) and hydroxychloroquine sulfate (H1306) were supplied by Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) while ivermectin (J62777.MD) was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc (MA, USA). The EO of *P. balsamifera* buds (Lot: B-POBA-CAN-05-E) was purchased from Aliksir (Grondines, QC, CA). The solvent used for ivermectin, molnupiravir and the EO of *P. balsamifera* was dimethyl sulfoxide (DMSO). Water was used to dissolve chloroquine phosphate, fluvoxamine maleate and hydroxychloroquine sulfate.

Cell lines

Human lung fibroblasts MRC-5 (CCL-171), IMR-90 (CCL-186) and WI-38 (CCL-75), African Green Monkey kidney epithelial Vero-E6 (CCL-81) and human colorectal adenocarcinoma HCT-8 (CCL-244) were obtained by the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). MRC-5 are largely used in scientific literature, notably for virology research and vaccine production (Trabelsi *et al.* 2012; Hafidh *et al.* 2015) while Vero are commonly used in molecular, microbiological and cellular research, especially with SARS-CoV-2 (Hafidh *et al.* 2015; Takayama 2020). HCT-8 cells were used for viral replication of HCoV-OC43 (VR-1558) as recommended by ATCC. All cell lines were grown in a humidified atmosphere at 37 °C in 5 % CO₂. The three human lung cell lines along with Vero-E6 cells were maintained in Minimum Essential Medium Eagle (MEM, 220-005-XK, Wisent Bioproducts Inc., CA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) and 0.001 % sodium pyruvate (SH3023901, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). The culture medium used for the growth of HCT-8 was RPMI-1640 (250-010-XK, Wisent Bioproducts Inc., CA) supplemented with 1 % penicillin-streptomycin and 0.001 % sodium pyruvate.

Virus amplification and purification

For virus amplification, a monolayer of HCT-8 cells was incubated for 1 day in a T25 flask to attain a minimum of 80 % confluence. A total of 1 mL of virus (volume initially obtained from ATCC) was directly added onto the monolayer and allowed to adsorb for 1 to 2 hours at 33°C and 5 % CO₂ conditions. Subsequently, 5 mL of RPMI-1640 medium containing 2% FBS was added, and the cells were incubated for 4 to 6 days under the same atmospheric conditions until the cytopathic effect on the cell monolayer reached 80 %. The supernatant and HCT-8 cells were transferred into 50 mL centrifuge tubes, which were then centrifuged at 3000 rpm (Beckman Coulter, rotor: S4180) for 30 minutes at 4°C. The supernatant was subsequently poured into sterile 500 mL bottles and kept on ice. The pellet was resuspended with 5 to 10 mL of HBSS medium and transferred to a 50 mL tube to undergo 3 freeze-thaw cycles. They were afterward centrifuged for 20 minutes under the same conditions. The supernatant was added to the remaining content in the sterile bottles for aliquoting into high-speed centrifugation bottles. The aliquoted samples were then subjected to centrifugation at 15,900 rpm (Beckman Coulter, rotor: JA-20) for 2 hours and 40 minutes at 4°C under vacuum. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 5 mL of HBSS. Finally, aliquots of 300 to 500 µL were prepared in cryotubes and frozen at -80°C.

Screening for host cell selection

To determine which cell line to use in the antiviral assay, a cell line screening was realised. A total of 4 different types of cells were hence seeded into 96-well microplate at a density of 1×10^4 cells/well: HCT-8, WI-38, IMR-90 and MRC-5. Prior to use, cells were allowed to attach for 24 hours in order to obtain a confluence of at least 90 %. Cells were then infected with a growing gradient of HCoV-OC43 for 3 days at 37 °C and 5 % CO₂ conditions. For viral infection, the medium used for each cell line was instead supplemented with 2 % FBS. The cell line with which the best dose-response curve was obtained was selected to perform the complete antiviral assay.

Determination of viral titer using cytotoxic assay

The proper viral dilution to be used for antiviral potency assay needs to be determined by viral titration on MRC-5 monolayers. Viral curve to be used in every subsequent

assay would have the maximal concentration causing near 90 % cell mortality with a concentration causing no mortality. The critical concentrations required for the next calculation steps being the IC₅₀ (the viral concentration where 50% cell survival is observed) and the nearby concentrations.

Subsequently for every tested compound, antiviral assay will have a whole triplicate dedicated to this viral dose-response. Briefly, the first step was hence to seed 96-well microplates with 100 µL of MRC-5 previously selected (density of 1 X 10⁴ cells/well) and to incubate them at 37 °C with 5 % of CO₂ for 24 hours. The following step was to test at different viral concentrations (1:2 dilutions) the purified HCoV-OC43 previously obtained in aliquots. A concentrated viral dilution (directly coming from the purified virus) underwent 1:2 dilutions in order to obtain a dose-response curve. If needed, the virus was either further diluted or was subjected to an increase in its concentration. Once the dose-response curve was achieved, the viral concentration from which the 1:2 dilutions were executed was then used for the antiviral assay. Thus, in the antiviral assay, the 96-well microplates seeded with MRC-5 (1 X 10⁴ cells/well) would be infected starting from the concentrated viral dilution, and from this, 1:2 viral dilutions would be performed. There was consequently a total of seven viral concentrations. They allowed the obtention of the viral dose-response curve. In the 96-well microplates, each well contained 50 µL of the corresponding viral concentration and 50 µL of MEM 2% FBS. In the viral titer as well as in antiviral assays, fetal bovine serum was reduced to 2 %. The 96-well microplates were incubated for 3 days at 37 °C with 5 % CO₂. The antiviral properties were assessed after 3 days of infection using the resazurin test (O'Brien *et al.* 2000). Therefore, wells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and overlaid with 100 µL of resazurin 50 µg/mL. An automated Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Mildford, MA, USA) was used to measure the fluorescence. The excitation wavelengths and the emission wavelengths used were respectively of 530 nm and 590 nm. From the fluorescence was calculated the cell survival that allowed the obtention of the dose-response curve. In addition, an area under the curve (AUC) was then assessed from the cell survival. AUC is calculated over five viral concentrations: the concentration nearest to the viral IC₅₀, with two concentrations over the IC₅₀ and two below. Given the potential variations in

virulence between virus batches, this approach reduces test variability by ensuring standardized conditions. The area under the curve calculation is the summation of the cell survival against these five viral concentrations. An inactive compound would have the same AUC as the viral curve. A 100% protection compound (5 x 100 % survival) would result in an AUC of 500 (the hypothetical maximal AUC). Triplicates were achieved for each viral titer.

Evaluation of maximal tolerated concentration (MTC)

Before compounds can be tested for their antiviral activity, the maximal concentration causing less than 20% mortality needs to be determined on the same cell line. To determine the MTC, cells were first seeded onto 96-well microplates with 100 μ L of MEM at a density of 1×10^4 cells/well. Prior to use, cells were allowed to attach for 24 hours under the same conditions to obtain a minimum of 90 % cell confluence. The cells were then treated with each compound dissolved in their respective solvent. To avoid solvent toxicity, the final concentration of every solvent in the culture medium was inferior to 0.25 % (v/v). A 1:2 dilution was applied for each compound and triplicates were performed. The cytotoxicity was assessed after 3 days of incubation using the resazurin reduction test. The MTC was expressed as the concentration that allows cell survival by $\geq 80\%$.

Evaluation of antiviral activity

To assess antiviral activity of essential oil and compounds, the 96-well microplates were plated with 1×10^4 cells/well and incubated 24 hours at 37 °C with 5 % CO₂. After 24 hours, a fixed concentration equivalent to the MTC of essential oil and compounds was added in each well. For every assay, control wells were realised: 1) only cells and culture medium; 2) cells with essential oil or compounds and 3) a sample solution with only resazurin (resazurin blank). Then, the virus was added at the same concentrations from the viral titer to get a viral dose-response curve. A standard curve only with the growing viral gradient without any compound (viral curve) was realised for comparison with cell survival with treatment (triplicates). Each well thereby contained 50 μ L of treatment and 50 μ L of viral concentration. For the viral curve, treatment was replaced with 50 μ L of MEM 2% FBS. After 3 days of incubation, wells

were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and overlaid with 100 μ L of resazurin 50 μ g/mL (R7017, MilliporeSigma). A fluorescence reading was subsequently performed after 1 hour of incubation. The difference of cell survival between treated cells and non-treated cells was determined. Thus, the survival of cells treated with the different compounds was compared with the standard viral curve. An inactive extract or compound would result in a dose-response similar to the viral curve. In contrast, an extract or compound providing total protection against the virus would result in a horizontal line. The AUC was calculated from the average cell survival summation, then a ratio was obtained by dividing the AUC of the treated cells by the AUC of the viral curve.

Determination of 50 % efficacy concentration (EC_{50})

To determine the fifty percent efficacy concentration value (EC_{50}), a gradient of concentrations, all inferior to the safe concentration (MTC), will be tested against viral infection. Each concentration being tested individually against the whole viral titration gradient, thereby generating dose-response curves for each concentration with different viral concentrations as processing with AUC determination. From these concentration curves, AUC was calculated. Subsequently, the effective area under the curve (AUC_E) was determined by subtracting the viral curve AUC to each concentration AUC. The outcomes were presented as the percentage disparity observed between each individual compound AUC_E with maximal theoretical AUC_E (see determination of viral titer section). All dose-response results between the viral curve and the first concentration that obtained 100 % viral protection (to avoid repetitions) were retained for analysis. These AUC_E are plotted on a graph, with Log concentrations on horizontal X-axis and AUC_E on vertical Y-axis, to compute the linear regression necessary for EC_{50} calculation.

Chromatographic analyses

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) were used to identify and quantify the components of the selected EO respectively. Chromatographic analyses were run on an Agilent 689N GC (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a non-polar DB-5

column and two flame ionization detectors (FIDs). The oils were injected in an undried and undiluted state (0.1 μL injection volume, split 1:235). The temperature program began at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min, then rose 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ up to 210 $^{\circ}\text{C}$ and was afterward held at 210 $^{\circ}\text{C}$ for 13 min. The EO samples were also injected into an Agilent 7890A GC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to an Agilent 5975C InertXL EI-CI MSD with Triple-Axis Detector, equipped with a DB-5MS column using the same temperature program that was just described and a split of 1:235. In order to identify the compounds, the Kovats retention index was calculated by even-numbered C8 to C29 alkane standards from Wiley 6N, MS databases (NIST014). Quantification was derived from the FID response on the DB-5 column without any correction factor. Only components with an abundance upper to 0.5 % were analysed.

Statistical analyses

Statistics were realised with SigmaStat (Systat Software Inc, California, USA). A two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak multiple comparison test was executed on the AUC of Figures 4 and 5. For Tables 1 and 3, a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak multiple comparison test was performed on the AUC to compare the compounds with the viral curve. Differences were significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

HCoV-OC43 is a betacoronavirus that primarily infects the upper respiratory tract in humans but can also infect the lower one, thus leading to serious consequences such as bronchitis and pneumonia (Beidas et Chehadeh 2018; Wang *et al.* 2022). Among human endemic coronaviruses, HCoV-OC43 is the most frequently found across populations (Wang *et al.* 2022). For the purpose of this study, HCoV-OC43 has been selected for its accessibility and its similarities with SARS-CoV-2. While SARS-CoV-2 can only be handled in a biosafety level 3 (BSL-3) laboratory, HCoV-OC43 is a BSL-2 laboratory virus (Schirtzinger *et al.* 2022). Both viruses infect the human respiratory tract and are related genetically (Schirtzinger *et al.* 2022). A high structural conservation in S2 and N terminal domains was observed between SARS-CoV-2 and HCoV-OC43 (Crowley *et al.* 2022). There is likewise cross-reactivity between these two beta-coronaviruses (Zedan et Nasrallah 2021; Crowley *et al.* 2022). Antiviral properties against HCoV-OC43 could hence be potentially effective against SARS-CoV-2. Molnupiravir and remdesivir are indeed effective not only against SARS-CoV-2, but also against *in vitro* viral replication of HCoV-OC43 (Brown *et al.* 2019; Li *et al.* 2022b; Negru *et al.* 2022).

Cell line screening and viral titer

To determine most sensitive cell line to viral cytotoxicity, various dilutions of HCoV-OC43 were tested on human colon cell lines HCT-8 and on three human lung fibroblast cell lines, including WI-38, IMR-90 and MRC-5 (Figure 4). All tested cell cultures could be infected with the virus but displayed different growth patterns after infection. The human lung fibroblasts (WI-38, IMR-90 and MRC-5) exhibited more cellular death than the human colorectal adenocarcinoma (HCT-8), which was anticipated since HCoV-OC43 typically infect the human respiratory tract (Lamers et Haagmans 2022). Among all, MRC-5 cells showed the strongest mortality following infection by the virus. In addition, this cell line is the only one that obtained a clear dose-response curve that is required for viral titer. Here, the viral dilution of 1 was considered as the viral concentrated dilution, from which the 1:2 dilutions were starting. This viral concentrated dilution was the one that was used subsequently in the assay. Due to the selectivity of HCoV-OC43 for MRC-5, they were hence selected to perform the

antiviral assay. MRC-5 are commonly used in virology for the infection by HCoV-OC43 (Kim *et al.* 2019; Min *et al.* 2020).

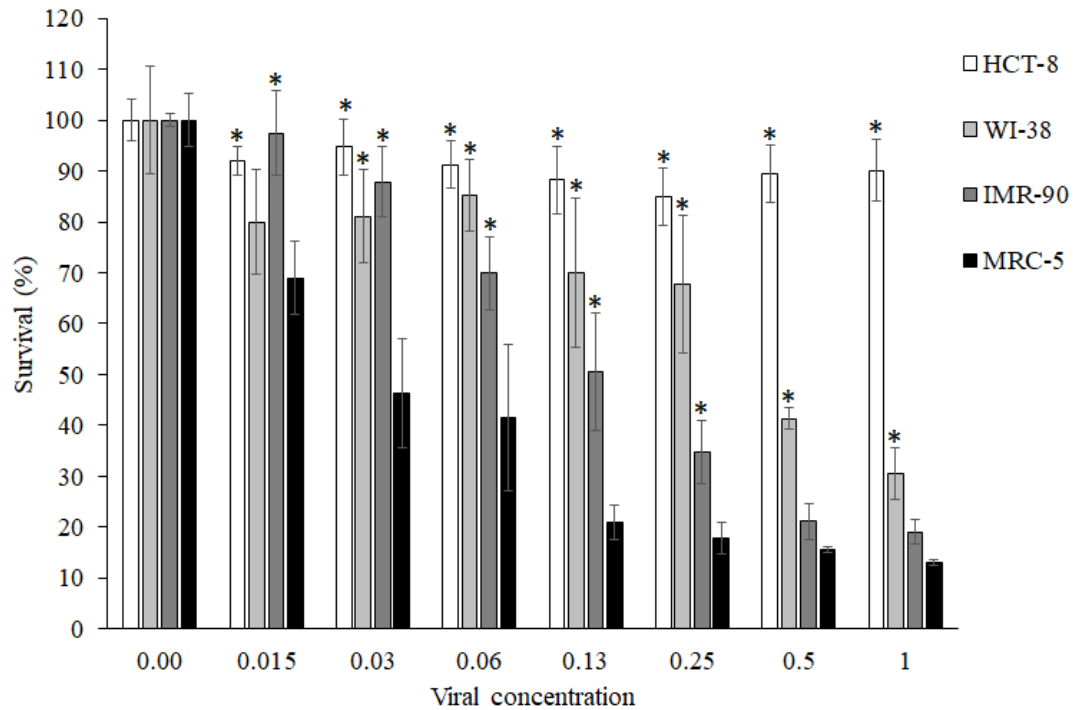


Figure 4. Cytotoxicity induced by HCoV-OC43 viral infection against human lung cells WI-38, IMR-90 and MRC-5 and human colon cells HCT-8. For all data, $n \geq 3$. *Significantly different from MRC-5 cells ($p < 0.05$).

Evaluation of antiviral activity of extracts and compounds

Screening of antiviral activity in positive controls was realised with the new sensitive assay at their respective MTC determined beforehand (Figure 5). The assay is based on the protective effect of the potential antiviral agents against viral infection induced on cell culture. It hence allows the identification of compounds active on viral entry, viral replication, or both. To develop the antiviral assay, a total of five (5) compounds were selected as positive controls according to their known activity and mode of action against SARS-CoV-2: 1) chloroquine, an antimalarial agent, can prevent the replication of the coronavirus in Vero E6 cells (Zhao *et al.* 2022a) and presumably inhibits viral entry by interfering with ACE2 (Malik *et al.* 2022; Ribaudó *et al.* 2022); 2) hydroxychloroquine, the less toxic derivative of chloroquine, acts on the virus entry by its *in vitro* action on ACE2 (Malik *et al.* 2022; Yuan *et al.* 2022) and also on viral

replication (Ni *et al.* 2022); 3) molnupiravir (EIDD-2801), a new antiviral prodrug of beta-D-N4-hydroxycytidine (NHC) that inhibits the replication of SARS-CoV-2 and many several other RNA viruses (Li *et al.* 2022a; Yip *et al.* 2022); 4) fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor that is thought to possibly act on both the entry and the replication of the coronavirus (Hashimoto *et al.* 2022; Reis *et al.* 2022a) and 5) ivermectin, an anti-parasitic agent that showed *in vitro* action on SARS-CoV-2 replication in the study of Caly *et al.* (2020) and docking to ACE2 and TMPRSS2 in *in silico* studies (Lehrer et Rheinstein 2020; Eweas *et al.* 2021; Saha et Raihan 2021).

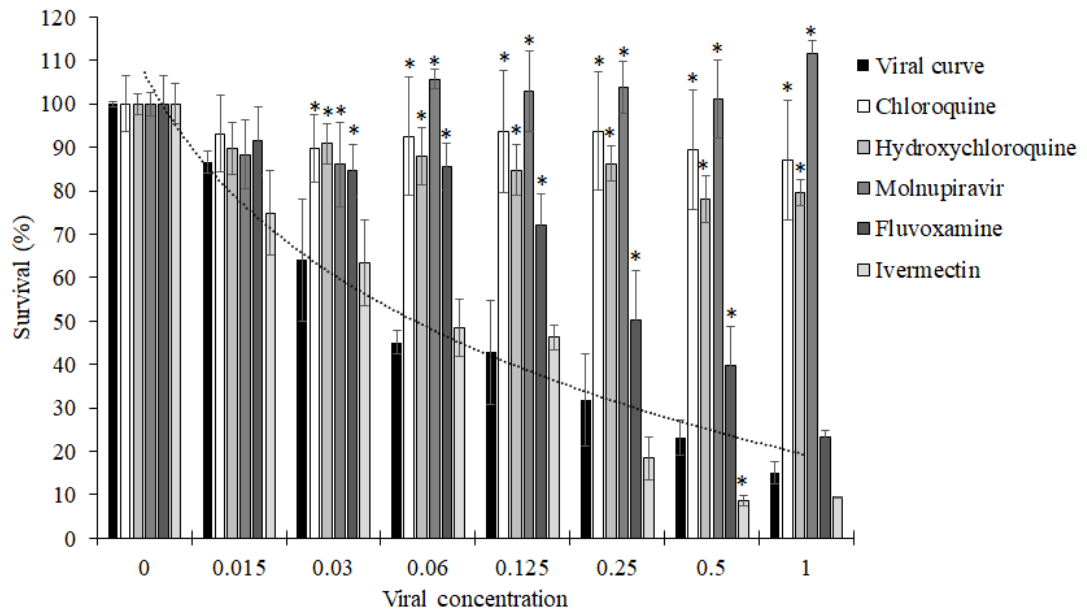


Figure 5. Protective activity of positive control on MRC-5 cells lines infected by growing concentrations of HCoV-OC43. Negative control is represented by untreated cells (viral curve). For all data, $n \geq 3$. *Significantly different from viral curve ($p < 0.05$).

Overall, chloroquine, hydroxychloroquine, molnupiravir and fluvoxamine exhibited a significant protection for MRC-5 cells against HCoV-OC43 when tested at their MTC. No significant antiviral activity was observed for ivermectin. Their respective AUC and ratio are shown in Table 1 where these values express the protection acquired by each treatment. A ratio equivalent to 1 is indicative of no antiviral activity, while a higher ratio superior to 1 suggests an effect against the virus. Each positive control was tested at their individual MTC and compared with a viral curve. When comparing their

ratio calculated from their given AUC, chloroquine, hydroxychloroquine and molnupiravir show a similar efficacy to protect MRC-5 from HCoV-OC43 infection (ratios of 2.47, 1.99 and 1.98 respectively). Findings are consistent with literature since chloroquine and hydroxychloroquine are both known for their *in vitro* antiviral activity against SARS-CoV-2 (Malik *et al.* 2022; Ni *et al.* 2022; Ribaudó *et al.* 2022; Yuan *et al.* 2022). Since SARS-CoV-2 and HCoV-OC43 have some similarities, it is possible to presume that if an antiviral activity is identified against one of the two viruses, it is probable that a similar activity would be observed against the other virus. There are effectively studies that demonstrated an antiviral activity against HCoV-OC43 while treating different cell lines with chloroquine (Keyaerts *et al.* 2009; Song *et al.* 2022). While there seems to be no study on the possible antiviral activity of hydroxychloroquine against HCoV-OC43, the activity here observed from this drug makes sense, since it is a derivative of chloroquine and it already exhibited clear *in vitro* antiviral properties against SARS-CoV-2 (Malik *et al.* 2022; Ni *et al.* 2022; Yuan *et al.* 2022). Molnupiravir, like chloroquine, proved to be active against both viruses *in vitro* (Wang *et al.* 2021). As for fluvoxamine, it is effective, but not as much (ratio = 1.52). While there are very few evidences of its confirmed or supposed *in vitro* antiviral effect on the COVID-19 virus (Fred *et al.* 2022; Hashimoto *et al.* 2022), there seems to be no study that tested its action on HCoV-OC43. Results obtained for ivermectin revealed a lack of efficiency (ratio = 0.89) in the protection of MRC-5 cells against HCoV-OC43, which is not surprising since its antiviral properties against coronaviruses, particularly in the treatment of SARS-CoV-2, are unclear or non-efficacious in most studies (Abd-Elsalam *et al.* 2021; Deng *et al.* 2021; López-Medina *et al.* 2021; Okumuş *et al.* 2021; Reis *et al.* 2022b). This hence contrast with Caly *et al.* (2020) that demonstrated *in vitro* activity against SARS-CoV-2.

Table 1. Antiviral efficacy and MTC of positive controls against MRC-5 infection induced by HCoV-OC43.

	Chloroquine	Hydroxychloroquine	Molnupiravir	Fluvoxamine	Ivermectin
AUC (Viral curve)	196 ± 23	221 ± 45	246 ± 64	219 ± 34	207 ± 42
MTC (µg/ml)	1.25	1.6	12.5	12.5	12.5
AUC (MTC)	485 ± 31*	440 ± 25*	487 ± 33*	332 ± 31*	185 ± 18
Ratio	2.47	1.99	1.98	1.52	0.89
EC ₅₀ (µg/ml)	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.5 ± 0.1	N/A	N/A

Data are representative of three different experiments.

*Significantly different from respective viral curve for each treatment ($p < 0.05$).

N/A = not applicable.

Positive controls, once evaluated as active against the studied virus, were tested at different concentrations in order to calculate their EC₅₀. Results with chloroquine dose-response curve is presented in Figure 6. Cells were treated with decreasing concentrations (1:2 dilutions) of chloroquine to obtain an EC₅₀ (Table 1). This value was calculated from the linear regression performed with the AUC_E of each concentration to which cells were treated with chloroquine (Figure 7). The same procedures were realised for other positive controls. As for chloroquine, hydroxychloroquine and molnupiravir, respective EC₅₀ values of 0.12 ± 0.01 µg/mL, 0.21 ± 0.02 µg/mL and 0.5 ± 0.1 µg/mL were obtained, which confirmed the results previously obtained with the ratios. Thus, these values further confirm that these three compounds are efficient against HCoV-OC43. Chloroquine and hydroxychloroquine seem to be more active than molnupiravir, but subsequent studies highlight *in vivo* toxicity (Della Porta *et al.* 2020).

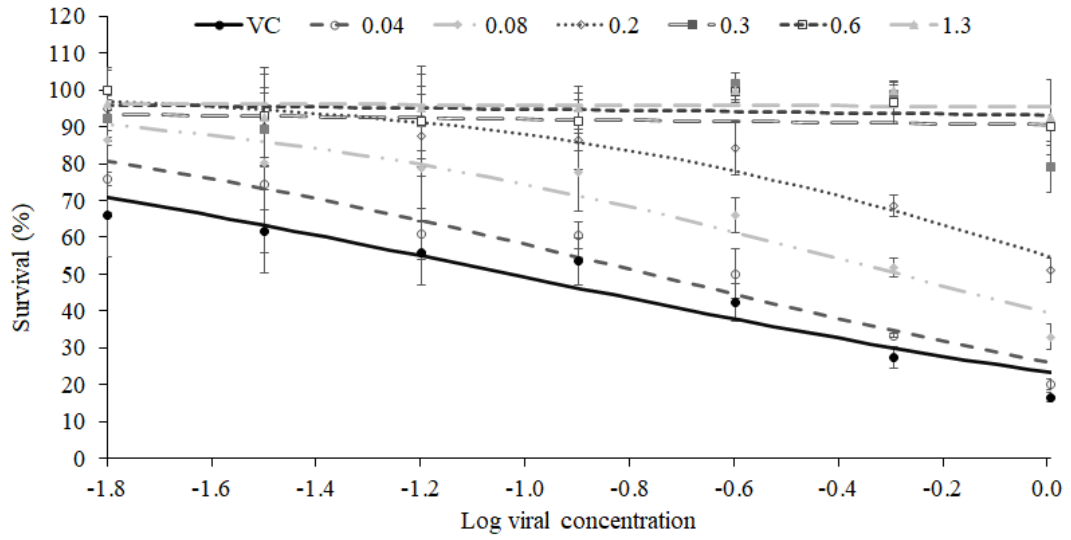


Figure 6. Infected cells treated at different chloroquine concentrations, ranging from 0.04 $\mu\text{g/mL}$ to 1.3 $\mu\text{g/mL}$. Control is represented by the viral curve. All data ≥ 3 . *Significantly different from control ($p < 0.05$).

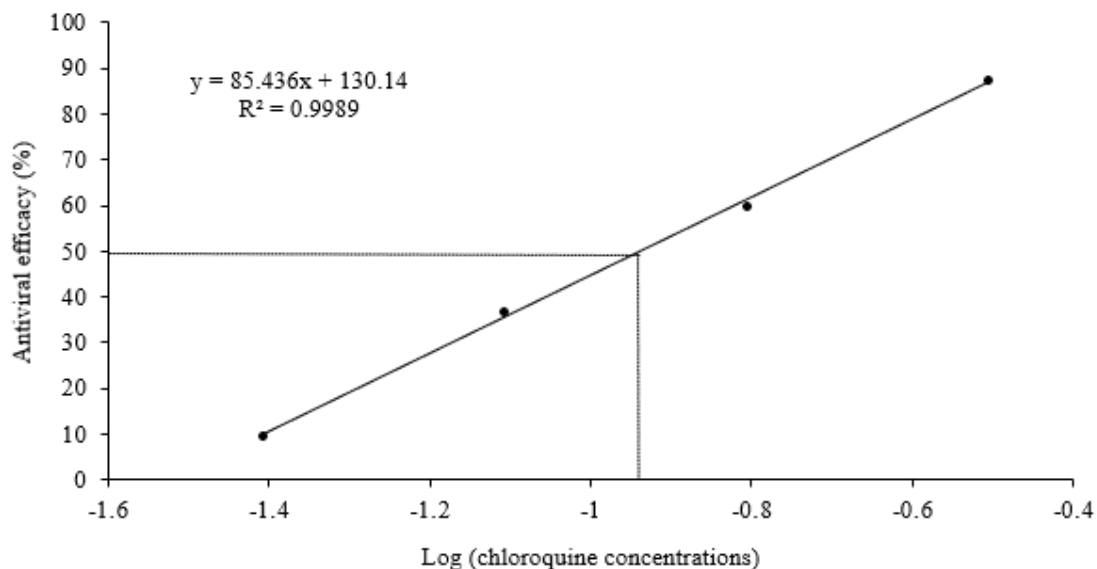


Figure 7. Linear regression obtained using AUC_E calculated from the results represented at Figure 6. Only concentrations of chloroquine ranging from 0.04 $\mu\text{g/mL}$ to 0.3 $\mu\text{g/mL}$ were retained. The EC_{50} value was determined from the equation of the linear regression. Data are representative of three different experiments.

Chemical composition of *P. balsamifera*

Twenty-eight components found in *P. balsamifera* with an abundance of at least 0.5 % were identified by GC-MS and GC-FID analyses and confirmed with Kovats index (Table 3). The identified components represent a total of 83.3 % of the EO. With an abundance of 22.9 %, α -bisabolol is by far the major component, as obtained in the study of Piochon-Gauthier *et al.* (2014). This sesquiterpene alcohol already exhibits many pharmaceutical properties such as anti-inflammatory, anti-bacterial and anticancer (Kamatou et Viljoen 2010; Piochon-Gauthier *et al.* 2014). It has been noted that sesquiterpene-rich EOs, among others α -bisabolol, have a potential antiviral activity against cucumber mosaic virus (Dunkić *et al.* 2013). There is hence a possibility that this sesquiterpene alcohol might partially explain the antiviral activity of *P. balsamifera* against HCoV-OC43. The second, third and fourth major components are α -eudesmol (7.7 %), δ -cadinene (5.9 %) and α -amorphene (5.6 %) respectively. They are all found in a relatively high abundance in literature (Isidorov et Vinogorova 2003; Piochon-Gauthier *et al.* 2014) and showed potent antiviral activity against SARS-CoV-2 in *in silico* studies as they exhibited promising outcomes in the

docking of essential proteins for the COVID-19 virus (My *et al.* 2020; Amparo *et al.* 2021; Habibzadeh et Zohalinezhad 2022). There is however an evident lack of documentation on antimicrobial properties of these three compounds and mostly, not enough studies on the antiviral activities of the major components identified. Nerolidol and γ -cadinene are the fifth (4.3 %) and the sixth (3.4 %) major components respectively. *In silico* studies suggested a potential effect on SARS-CoV-2 for nerolidol and γ -cadinene (da Silva *et al.* 2020; Habibzadeh et Zohalinezhad 2022). Variations in major components identified in *P. balsamifera* EO between this study and others is to be expected as many factors influence the chemical composition of the extraction of an EO such as the origin of the plant's organ, the climate, the soil composition and the plant age (Bakkali *et al.* 2008; Masyita *et al.* 2022).

Table 2. Chemical composition of *Populus balsamifera* essential oil.

Identified components			Relative concentration (%)
Ri ^a	Name	Identification ^b	
1023	1,8-Cineole	MS, RI	1.48
1392	Ylangene	MS, RI	0.77
1433	<i>Trans</i> - α -Bergamotene	MS, RI	2.15
1440	<i>Trans</i> - β -Farnesene	MS, RI	1.71
1475	4- <i>epi</i> - α -acoradiene	MS, RI	0.87
1474	γ -Amorphene	MS, RI	1.06
1479	α -Amorphene	MS, RI	5.60
1472	Curcumene	MS, RI	2.21
1491	β -Cadinene	MS, RI	0.67
1494	γ -Muurolene	MS, RI	1.37
1490	α -Muurolene	MS, RI	1.82
1505	δ -Cadinene	MS, RI	5.88
1500	β -Bisabolene	MS, RI	0.83
1505	γ -Cadinene	MS, RI	3.43
1535	Selina-3,7(11)-diene	MS, RI	2.93
1548	α -Copaen-11-ol	MS, RI	0.64
1539	α -Calacorene	MS, RI	1.10
1506	<i>Cis</i> - α -Bisabolene	MS, RI	2.27
1545	Nerolidol	MS, RI	5.52
1595	α -Cedrol	MS, RI	2.97
1596	Fokienol	MS, RI	0.50
1628	Agarospinol	MS, RI	0.72
1627	γ -Eudesmol	MS, RI	3.07
1628	<i>Trans</i> -Cadinol	MS, RI	1.01
1644	β -Eudesmol	MS, RI	1.27
1643	α -Eudesmol	MS, RI	7.67
1653	β -Bisabolol	MS, RI	0.84
1683	α -Bisabolol	MS, RI	22.91
Total identified (%) ^a			83.28

^aRetention indices on apolar DB-5 column.

^bMS: identification by GC-MS; RI: components were identified by comparison of GC retention indices relative to retention times of alkanes (C8 – C29) and compared with MS databases. Components ≤ 0.5 % are not reported.

Evaluation of antiviral activity in *P. balsamifera* and its main components

The screening of *P. balsamifera* EO, α -bisabolol and nerolidol was realised using the new antiviral assay (Figure 8). EO and compounds are tested at their respective MTC determined beforehand while also testing at lesser concentrations in order to obtain their EC₅₀ values (Table 3). Chloroquine is used as positive control (EC₅₀ = 0.10 ± 0.01 µg/mL; ratio = 2.6). *P. balsamifera* EO shows an inhibitory effect on the virus (EC₅₀ = 3.7 ± 0.2 µg/mL; ratio = 2.1). These results provide evidence of *P. balsamifera* EO capacity to inhibit HCoV-OC43. Van Hoof *et al.* (1980) observed the inhibition of some viruses like measles and herpes by other species belonging to the genus *Populus*. This mean that there is an evident potential for poplar species extracts to inhibit different viruses. Main component α -bisabolol also showed a significant antiviral activity against the virus (EC₅₀ = 2.9 ± 0.2 µg/mL; ratio = 2.2). Nerolidol, another major component of the EO also exhibited an antiviral effect on HCoV-OC43 (EC₅₀ = 2.6 ± 0.2 µg/mL; ratio = 2.0). Both α -bisabolol and nerolidol are thus probably responsible in part for most of *P. balsamifera* EO antiviral properties. However, its protective effect against the coronavirus may also be explained by other molecules found in this EO such as α -eudesmol, δ -cadinene and α -amorphene that are all suspected of being potential inhibitors of SARS-CoV-2 in docking studies (My *et al.* 2020; Amparo *et al.* 2021; Habibzadeh et Zohalinezhad 2022).

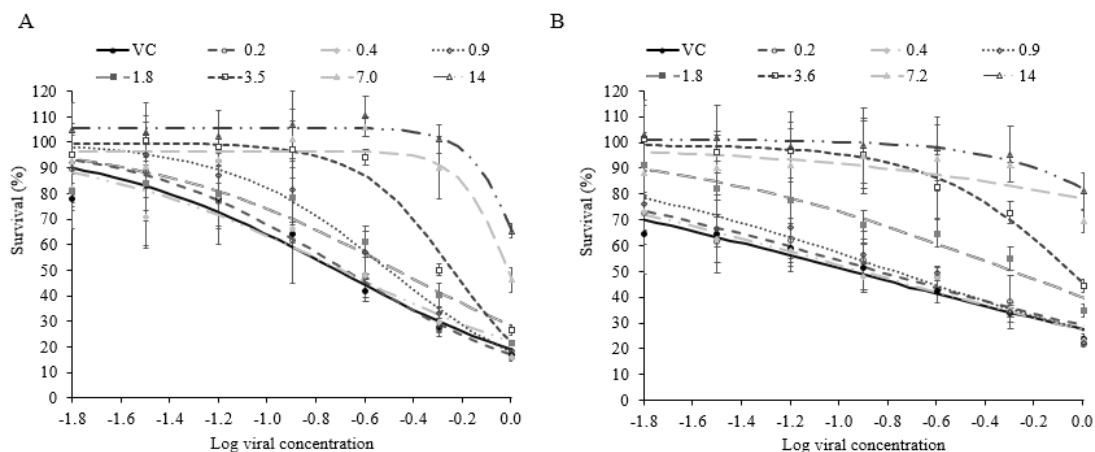


Figure 8. Antiviral activity of *P. balsamifera* essential oil (A) and main compound α -bisabolol (B). Concentrations ranged between 0.2 $\mu\text{g/mL}$ to 14 $\mu\text{g/mL}$ for both molecules. Control is represented by the viral curve. All data ≥ 3 . *Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table 3. Antiviral efficacy and MTC of *Populus balsamifera* essential oil and main compounds against MRC-5 infection induced by HCoV-OC43.

	Essential oil	α -Bisabolol	Nerolidol	Chloroquine (positive control)
AUC (Viral curve)	229 \pm 24	211 \pm 24	237 \pm 28	192 \pm 51
MTC ($\mu\text{g/ml}$)	14	14	55	0.625
AUC (MTC)	486 \pm 34*	471 \pm 41*	474 \pm 28 *	510 \pm 9*
Ratio	2.1	2.2	2.0	2.6
EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	3.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2	0.10 \pm 0.01

Data are representative of three different experiments.

*Significantly different from respective viral curve for each treatment ($p < 0.05$).

CONCLUSION

In this study, the antiviral activity was observed for the first time in *P. balsamifera* essential oil. Our findings showed that the EO extracted from its buds possess the capacity to protect human lung cells from getting infected with HCoV-OC43. The analysis of its chemical composition, realised by gas chromatography, allowed the identification of its main components. Among these, it was revealed that α -bisabolol and nerolidol also exhibit antiviral activity against the betacoronavirus. The evaluation of their antiviral properties was done using a new sensitive assay developed for coronaviruses. This assay can also be used for other viruses such as herpes and influenza viruses. In addition, it allows the identification of compounds that are active on viral entry, viral replication, or both. It would thus be of greatest interest to test the other major components of the balsam poplar EO in order to obtain a more thorough understanding of this plant's capacity to inhibit HCoV-OC43. This could also benefit scientific literature since it severely lacks information about the possible antiviral activities of EOs and their components. This study highlights the great potential of the biological properties found in plants and that should be further investigated. At last, taking into account the similarities between SARS-CoV-2 and HCoV-OC43 as well as the efficacy of certain drugs against both viruses, it is relevant to believe that this EO and its main components could display significant activity against the virus responsible of the COVID-19. It would hence be pertinent to verify this hypothesis in subsequent studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help and suggestions with the biological assay.

Author contributions: Conceptualization, L.G., J.L. and H.C.; data curation, L.G. and H.C.; formal analysis, L.G. and H.C.; funding acquisition, L.R., J.L., and A.P.; investigation, L.G.; methodology, L.G. and H.C.; project administration, L.R., J.L. and A.P.; resources, J.L. and A.P.; supervision, J.L. and A.P.; validation, J.L. and H.C.; visualization, L.G. and J.L.; Writing – Original draft, L.G. and J.L.; Writing – review & editing, L.G., J.L., H.C., L.R. and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les composés retrouvés dans les huiles essentielles confèrent à ces dernières de nombreuses propriétés biologiques. Ils sont cependant que peu exploités en raison du manque de connaissances scientifiques à leur sujet. Leurs capacités antivirales sont notamment peu étudiées. Par exemple, bien que les espèces de peupliers étaient autrefois fréquemment utilisées par les peuples autochtones pour traiter certaines infections virales, leur potentiel antiviral est sous-documenté dans la littérature scientifique. Dans le cadre de ce projet de recherche, le principal objectif, qui était d'évaluer l'activité antivirale de l'huile essentielle des bourgeons du peuplier baumier et de ses composantes majoritaires contre HCoV-OC43, a pu être atteint grâce au développement d'un nouveau test antiviral.

Les résultats de cette étude présentent d'intéressantes perspectives. Premièrement, l'identification d'une HE active contre HCoV-OC43 peut avoir des répercussions intéressantes. Entre autres, comme il y a un nombre très limité de recherches réalisées sur les propriétés biologiques de l'HE des bourgeons de *P. balsamifera*, les résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise sont donc les premiers à démontrer une activité antivirale *in vitro* contre le virus HCoV-OC43. Cela va de même pour l' α -bisabolol et le nérolidol qui ont tous deux montré un effet protecteur sur une lignée de cellules pulmonaires humaines contre le coronavirus. Les résultats obtenus mettent ainsi davantage l'accent sur les vertus intéressantes qu'offrent l'HE du peuplier baumier et ses composantes majoritaires. Dans cette étude, ce sont les produits naturels issus de la forêt boréale qui sont valorisés. Cela contribue donc à la documentation des nombreuses propriétés biologiques des plantes et de leurs HE.

Deuxièmement, un nouveau test antiviral fiable et efficace permettant l'identification rapide de nouveaux agents antiviraux a pu être développé. Celui-ci est basé sur l'effet protecteur de molécules contre l'infection d'un virus sur une lignée cellulaire. Il permet donc de cribler l'activité antivirale de composés et extraits actifs contre l'entrée et/ou la réplication du virus. Le test a pu démontrer son efficacité sur des molécules actives connues comme la chloroquine, l'hydroxychloroquine, le molnupiravir et la fluvoxamine. Ensuite, bien qu'initialement le test a été utilisé pour évaluer l'activité antivirale sur le coronavirus HCoV-OC43, il est également possible de tester sur

d'autres virus. D'ailleurs, notre laboratoire (LASEVE) a mis au point un test similaire pour évaluer l'activité sur les virus de l'herpès et de l'influenza. Ce test pourrait donc être employé pour cribler l'activité antivirale sur davantage de virus. De plus, notre test peut également s'adapter à différentes lignées cellulaires. Une concordance entre la lignée cellulaire et le virus d'intérêt permet de favoriser la cohérence entre des résultats obtenus *in vitro* et ceux observés lors d'études *in vivo* et lors d'essais cliniques.

Pour conclure, il serait pertinent d'explorer davantage les propriétés biologiques des plantes et de leurs composés. Leurs activités antivirales sont d'autant plus intéressantes en raison de la gestion thérapeutique limitée des maladies infectieuses virales. Comme perspectives futures à ce projet, l'activité antivirale des autres composantes majoritaires identifiées lors de cette recherche (α -eudesmol, δ -cadinène, α -amorphène et γ -cadinène) pourrait être évaluée contre HCoV-OC43. Effectivement, l' α -bisabolol et le nérolidol ne sont probablement pas les seules composantes à expliquer l'efficacité de l'HE des bourgeons de *P. balsamifera*. Enfin, il serait aussi intéressant d'évaluer l'HE du peuplier baumier ainsi que ses composantes majoritaires contre le SARS-CoV-2 dans un laboratoire NC3. En effet, les similitudes entre ces deux bêtacoronavirus de même que l'efficacité commune retrouvée chez certaines molécules telles que la chloroquine, soulèvent l'hypothèse d'une activité contre le virus responsable de la COVID-19.

RÉFÉRENCES

- Abate SM, Ahmed Ali S, Mantfardo B et Basu B. 2020. Rate of Intensive Care Unit admission and outcomes among patients with coronavirus: A systematic review and Meta-analysis. *PLOS ONE*, 15 : e0235653.
- Abd-Elsalam S, Noor RA, Badawi R, Khalaf M, Esmail ES, Soliman S, Abd El Ghafar MS, Elbahnasawy M, Moustafa EF, Hassany SM, Medhat MA, Ramadan HK-A, Eldeen MAS, Alboraie M, Cordie A et Esmat G. 2021. Clinical study evaluating the efficacy of ivermectin in COVID-19 treatment: A randomized controlled study. *Journal of Medical Virology*, 93 : 5833-5838.
- Abdelrahman Z, Li M et Wang X. 2020. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front Immunol*, 11 : 552909.
- Abdullah Al Awadh A. 2022. Nucleotide and nucleoside-based drugs: past, present, and future. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29 : 103481.
- Abeles SR et Pride DT. 2014. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *Journal of Molecular Biology*, 426 : 3892-3906.
- Adorjan B et Buchbauer G. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25 : 407-426.
- Ahlenstiel CL, Symonds G, Kent SJ et Kelleher AD. 2020. Block and lock HIV cure strategies to control the latent reservoir. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10 : 424.
- Akram M, Tahir IM, Shah SMA, Mahmood Z, Altaf A, Ahmad K, Munir N, Daniyal M, Nasir S et Mehboob H. 2018. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 32 : 811-822.
- Alam S, Sarker MMR, Afrin S, Richi FT, Zhao C, Zhou J-R et Mohamed IN. 2021. Traditional herbal medicines, bioactive metabolites, and plant products against COVID-19: update on clinical trials and mechanism of actions. *Frontiers in Pharmacology*, 12 : 671498.
- Ali S, Alam M, Khatoon F, Fatima U, Elsbali AM, Adnan M, Islam A, Hassan MI, Snoussi M et De Feo V. 2022. Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147 : 112658.
- Alwine James C, Casadevall A, Enquist Lynn W, Goodrum Felicia D et Imperiale Michael J. 2023. A Critical Analysis of the Evidence for the SARS-CoV-2 Origin Hypotheses. *Journal of Virology*, 97 : e00365-00323.

Amparo TR, Seibert JB, Silveira BM, Costa FSF, Almeida TC, Braga SFP, da Silva GN, dos Santos ODH et de Souza GHB. 2021. Brazilian essential oils as source for the discovery of new anti-COVID-19 drug: a review guided by in silico study. *Phytochemistry Reviews*, 20 : 1013-1032.

Asahchop Eugene L, Wainberg Mark A, Sloan Richard D et Tremblay Cécile L. 2012. Antiviral drug resistance and the need for development of new hiv-1 reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 : 5000-5008.

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, Barreca D, Weckwerth W, Bauer R, Bayer EA, Majeed M, Bishayee A, Bochkov V, Bonn GK, Braidly N, Bucar F, Cifuentes A, D'Onofrio G, Bodkin M, Diederich M, Dinkova-Kostova AT, Efferth T, El Bairi K, Arkells N, Fan T-P, Fiebich BL, Freissmuth M, Georgiev MI, Gibbons S, Godfrey KM, Gruber CW, Heer J, Huber LA, Ibanez E, Kijjoo A, Kiss AK, Lu A, Macias FA, Miller MJS, Mocan A, Müller R, Nicoletti F, Perry G, Pittalà V, Rastrelli L, Ristow M, Russo GL, Silva AS, Schuster D, Sheridan H, Skalicka-Woźniak K, Skaltsounis L, Sobarzo-Sánchez E, Bredt DS, Stuppner H, Sureda A, Tzvetkov NT, Vacca RA, Aggarwal BB, Battino M, Giampieri F, Wink M, Wolfender J-L, Xiao J, Yeung AWK, Lizard G, Popp MA, Heinrich M, Berindan-Neagoe I, Stadler M, Daglia M, Verpoorte R, Supuran CT et the International Natural Product Sciences T. 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 : 200-216.

Bachar SC, Mazumder K, Bachar R, Aktar A et Al Mahtab M. 2021. A review of medicinal plants with antiviral activity available in Bangladesh and mechanistic insight into their bioactive metabolites on SARS-CoV-2, HIV and HBV. *Frontiers in Pharmacology*, 12.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 446-475.

Bates TA, Weinstein JB, Farley S, Leier HC, Messer WB et Tafesse FG. 2021. Cross-reactivity of SARS-CoV structural protein antibodies against SARS-CoV-2. *Cell Reports*, 34 : 108737.

Baumert TF, Berg T, Lim JK et Nelson DR. 2019. Status of direct-acting antiviral therapy for hepatitis c virus infection and remaining challenges. *Gastroenterology*, 156 : 431-445.

Beidas M et Chehadeh W. 2018. Effect of human coronavirus oc43 structural and accessory proteins on the transcriptional activation of antiviral response elements. *Intervirology*, 61 : 30-35.

Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Luetkemeyer A, Kline S, Lopez de Castilla D, Finberg RW, Dierberg K, Tapson V, Hsieh L, Patterson TF, Paredes R, Sweeney DA, Short WR, Touloumi G, Lye DC, Ohmagari N, Oh M-D, Ruiz-Palacios GM, Benfield T, Fätkenheuer G, Kortepeter MG, Atmar RL, Creech CB, Lundgren J, Babiker AG, Pett S, Neaton JD, Burgess TH, Bonnett T, Green M, Makowski M, Osinusi A, Nayak S, Lane HC et Members A-SG. 2020. Remdesivir for the

treatment of COVID-19 - final report. The New England journal of medicine, 383 : 1813-1826.

Bélangier A, Grenier A, Simard F, Gendreau I, Pichette A, Legault J et Pouliot R. 2020. Dihydrochalcone derivatives from populus *balsamifera* l. Buds for the treatment of psoriasis. International Journal of Molecular Sciences, 21.

Ben-Shabat S, Yarmolinsky L, Porat D et Dahan A. 2020. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. Drug Delivery Translational Research, 10 : 354-367.

Bezić N, Vuko E, Dunkić V, Ruščić M, Blažević I et Burčul F. 2011. Antiphytoviral activity of sesquiterpene-rich essential oils from four croatian *Teucrium* species. Molecules (Basel, Switzerland), 16 : 8119-8129. doi: 10.3390/molecules16098119.

Brown AJ, Won JJ, Graham RL, Dinnon KH, 3rd, Sims AC, Feng JY, Cihlar T, Denison MR, Baric RS et Sheahan TP. 2019. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. Antiviral research, 169 : 104541.

Bryan-Marrugo OL, Ramos-Jiménez J, Barrera-Saldaña H, Rojas-Martínez A, Vidaltamayo R et Rivas-Estilla AM. 2015. History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. Medicina Universitaria, 17 : 165-174.

Burrell C, Howard C et Murphy F. 2017a. Virion structure and composition. Dans :, p. 27-37.

Burrell CJ, Howard CR et Murphy FA. 2017b. Coronaviruses. Fenner and White's Medical Virology : 437-446.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94 : 223-253.

Cai L, Weinbauer MG, Xie L et Zhang R. 2023. The smallest in the deepest: the enigmatic role of viruses in the deep biosphere. National Science Review, 10 : nwad009.

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA et Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control, 54 : 111-119.

Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA et Wagstaff KM. 2020. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. Antiviral research, 178 : 104787.

Cappanera S, Palumbo M, Kwan SH, Priante G, Martella LA, Saraca LM, Sicari F, Vernelli C, Di Giuli C, Andreani P, Mariottini A, Francucci M, Sensi E, Costantini M, Bruzzone P, D'Andrea V, Gioia S, Cirocchi R et Tiri B. 2021. When does the cytokine storm begin in COVID-19 patients? A quick score to recognize it. Journal of Clinical Medicine, 10.

Ćavar Zeljković S, Schadich E, Džubák P, Hajdúch M et Tarkowski P. 2022. Antiviral activity of selected lamiaceae essential oils and their monoterpenes against SARS-CoV-2. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

Center for Disease Control and Prevention. 2014 (mis à jour le 16 mars 2020). HIV Care saves lives. Consulté le 7 novembre 2023, <https://www.cdc.gov/vitalsigns/hiv-aids-medical-care/index.html>

Chaplin S. 2022. Paxlovid: antiviral combination for the treatment of COVID-19. *Prescriber*, 33 : 31-33.

Chen W, Liang B, Wu X, Li L, Wang C et Xing D. 2022. Advances and challenges in using nirmatrelvir and its derivatives against SARS-CoV-2 infection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.

Chen X, Kalyar F, Chughtai AA et MacIntyre CR. 2024. Use of a risk assessment tool to determine the origin of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Risk Analysis*, n/a.

Citarella A, Scala A, Piperno A et Micale N. 2021. SARS-CoV-2 M(pro): A potential target for peptidomimetics and small-molecule inhibitors. *Biomolecules*, 11 : 607.

Costa L, Faustino MAF, Neves MGPMS, Cunha Â et Almeida A. 2012. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 4 : 1034-1074. doi : 10.3390/v4071034.

Côté I. 2011. Évaluation de l'activité antivirale de cinq espèces végétales de la forêt boréale contre les virus influenza de type A et l'herpès simplex de type I. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, 79 p.

Crowley AR, Natarajan H, Hederman AP, Bobak CA, Weiner JA, Wieland-Alter W, Lee J, Bloch EM, Tobian AAR, Redd AD, Blankson JN, Wolf D, Goetghebuer T, Marchant A, Connor RI, Wright PF et Ackerman ME. 2022. Boosting of cross-reactive antibodies to endemic coronaviruses by SARS-CoV-2 infection but not vaccination with stabilized spike. *Elife*, 11.

da Silva JKR, Figueiredo PL, Byler KG et Setzer WN. 2020. Essential oils as antiviral agents, potential of essential oils to treat SARS-CoV-2 infection: An in-silico investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. doi : 10.3390/ijms21103426.

Datta S, Budhaliya R, Das B, Chatterjee S, Vanlalhmua et Veer V. 2015. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World Journal of Virology*, 4 : 265-276.

De Clercq E et Field HJ. 2006. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology*, 147 : 1-11.

De Clercq E et Li G. 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29 : 695-747.

Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, Lavin Y, Swartz TH, Madduri D, Stock A, Marron TU, Xie H, Patel M, Tuballes K, Van Oekelen O, Rahman A, Kovatch P, Aberg JA, Schadt E, Jagannath S, Mazumdar M, Charney AW, Firpo-Betancourt A, Mendu DR, Jhang J, Reich D, Sigel K, Cordon-Cardo C, Feldmann M, Parekh S, Merad M et Gnjatic S. 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, 26 : 1636-1643.

Della Porta A, Bornstein K, Coye A, Montrief T, Long B et Parris MA. 2020. Acute chloroquine and hydroxychloroquine toxicity: A review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med*, 38 : 2209-2217.

Deng J, Zhou F, Ali S, Heybati K, Hou W, Huang E et Wong CY. 2021. Efficacy and safety of ivermectin for the treatment of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 114 : 721-732.

Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N et Mnif W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3. doi : 10.3390/medicines3040025.

Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, Chen L, Li M, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Feng Z, Zhang Y, Wu Y et Chen Y. 2020. Reduction and functional exhaustion of t cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Frontiers Immunology*, 11 : 827.

Dubey S, Satyanarayana YD et Lavania H. 2007. Development of integrase inhibitors for treatment of AIDS: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 : 1159-1168.

Dunkić V, Vuko E, Bezić N, Kremer D et Ruščić M. 2013. Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. *Chemistry Biodiversity*, 10 : 1894-1902.

Eke-Okoro UJ, Raffa RB, Pergolizzi Jr JV, Breve F, Taylor Jr R et the NRG. 2018. Curcumin in turmeric: Basic and clinical evidence for a potential role in analgesia. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 43 : 460-466.

Eloy P, Le Grand R, Malvy D et Guedj J. 2021. Combined treatment of molnupiravir and favipiravir against SARS-CoV-2 infection: One + zero equals two? *EBioMedicine*, 74.

Eweas AF, Alhossary AA et Abdel-Moneim AS. 2021. Molecular docking reveals ivermectin and remdesivir as potential repurposed drugs against SARS-CoV-2. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Eyer L, Nencka R, de Clercq E, Seley-Radtke K et Růžek D. 2018. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 26 : 2040206618761299.

- Faillace CA, Lorusso NS et Duffy S. 2017. Overlooking the smallest matter: viruses impact biological invasions. *Ecology Letters*, 20 : 524-538.
- Fischer MG. 2020. The Virophage Family Lavidaviridae. *Current Issues in Molecular Biology*, 40 : 1-24. doi : 10.21775/cimb.040.001.
- Foisy MM, Yakiwchuk EM et Hughes CA. 2008. Induction effects of ritonavir: Implications for drug interactions. *Annals of Pharmacotherapy*, 42 : 1048-1059.
- Fred SM, Kuivanen S, Ugurlu H, Casarotto PC, Levanov L, Saksela K, Vapalahti O et Castrén E. 2022. Antidepressant and antipsychotic drugs reduce viral infection by SARS-CoV-2 and fluoxetine shows antiviral activity against the novel variants in vitro. *Frontiers in Pharmacology*, 12 : 755600.
- Frediansyah A, Nainu F, Dhama K, Mudatsir M et Harapan H. 2021. Remdesivir and its antiviral activity against COVID-19: A systematic review. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 9 : 123-127.
- Gao Y, Lu Y, Dungait JAJ, Liu J, Lin S, Jia J et Yu G. 2022. The “regulator” function of viruses on ecosystem carbon cycling in the anthropocene. *Frontiers in Public Health*, 10.
- Geraghty RJ, Aliota MT et Bonnac LF. 2021. Broad-spectrum antiviral strategies and nucleoside analogues. *Viruses*, 13 : 667.
- Gezici S, Sekeroglu N et Kijjoa A. 2017. In vitro anticancer activity and antioxidant properties of essential oils from *Populus alba L.* and *Rosmarinus officinalis L.* from South Eastern Anatolia of Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol 51 (3), p S498-S503.
- Ghany MG et Doo EC. 2009. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*, 49 : S174-184.
- Gitman MR, Shaban MV, Paniz-Mondolfi AE et Sordillo EM. 2021. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 pneumonia. *Diagnostics*, 11. doi : 10.3390/diagnostics11071270.
- Godlewska K, Pacyga P, Szumny A, Szymczycha-Madeja A, Welna M et Michalak I. 2022. Methods for rapid screening of biologically active compounds present in plant-based extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27. doi : 10.3390/molecules27207094.
- Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, Oguchi G, Ryan P, Nielsen BU, Brown M, Hidalgo A, Sachdeva Y, Mittal S, Osiyemi O, Skarbinski J, Juneja K, Hyland RH, Osinusi A, Chen S, Camus G, Abdelghany M, Davies S, Behenna-Renton N, Duff F, Marty FM, Katz MJ, Ginde AA, Brown SM, Schiffer JT et Hill JA. 2022a. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *The New England journal of medicine*, 386 : 305-315.

Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, Oguchi G, Ryan P, Nielsen BU, Brown M, Hidalgo A, Sachdeva Y, Mittal S, Osiyemi O, Skarbinski J, Juneja K, Hyland RH, Osinusi A, Chen S, Camus G, Abdelghany M, Davies S, Behenna-Renton N, Duff F, Marty FM, Katz MJ, Ginde AA, Brown SM, Schiffer JT, Hill JA et Investigators G-U-. 2022b. Early remdesivir to prevent progression to severe COVID-19 in outpatients. *The New England journal of medicine*, 386 : 305-315.

Green N, Ott RD, Isaacs RJ et Fang H. 2008. Cell-based assays to identify inhibitors of viral disease. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3 : 671-676.

Guleria I, Kumari A, Lacaille-Dubois M-A, Nishant, Kumar V, Saini AK, Dhatwalia J et Lal S. 2022. A review on the genus *Populus*: a potential source of biologically active compounds. *Phytochemistry Reviews*, 21 : 987-1046.

Habibzadeh S et Zohalinezhad ME. 2022. Evaluation of the inhibitory activities of *ferula gummosa* bioactive compounds against the druggable targets of SARS-CoV-2: Molecular docking simulation. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12 : 6382-6392.

Hafidh RR, Abdulmir AS, Abu Bakar F, Sekawi Z, Jahansheri F et Jalilian FA. 2015. Novel antiviral activity of mung bean sprouts against respiratory syncytial virus and herpes simplex virus -1: an in vitro study on virally infected Vero and MRC-5 cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15 : 179.

Haouat AC, El Guendouzi S, Haggoud A, David S, Sqalli H, Ibnsouda S et Iraqui M. 2013. Antimycobacterial activity of *Populus alba* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 : 1015-1021.

Harbilas D, Brault A, Vallerand D, Martineau LC, Saleem A, Arnason JT, Musallam L et Haddad PS. 2012. *Populus balsamifera L.* (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*, 141 : 1012-1020.

Hashimoto Y, Suzuki T et Hashimoto K. 2022. Mechanisms of action of fluvoxamine for COVID-19: a historical review. *Molecular Psychiatry*, 27 : 1898-1907.

Hasöksüz M, Kiliç S et Saraç F. 2020. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish journal of medical sciences*, 50 : 549-556.

He X, Quan S, Xu M, Rodriguez S, Goh SL, Wei J, Fridman A, Koeplinger KA, Carroll SS, Grobler JA, Espeseth AS, Olsen DB, Hazuda DJ et Wang D. 2021. Generation of SARS-CoV-2 reporter replicon for high-throughput antiviral screening and testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 : e2025866118.

Heidari Nia M, Rokni M, Mirinejad S, Kargar M, Rahdar S, Sargazi S, Sarhadi M et Saravani R. 2022. Association of polymorphisms in tumor necrosis factors with SARS-CoV-2 infection and mortality rate: A case-control study and in silico analyses. *Journal of Medical Virology*, 94 : 1502-1512.

- Heskin J, Pallett SJC, Mughal N, Davies GW, Moore LSP, Rayment M et Jones R. 2022. Caution required with use of ritonavir-boosted PF-07321332 in COVID-19 management (Letter). *The Lancet*, 399 : 21-22.
- Hofmann E, Sidler D, Dahdal S, Bittel P, Suter-Riniker F, Manuel O, Walti LN et Hirzel C. 2021. Emergence of letermovir resistance in solid organ transplant recipients with ganciclovir resistant cytomegalovirus infection: A case series and review of the literature. *Transplant Infectious Disease*, 23 : e13515.
- Holloway PS et Alexander G. 1990. Ethnobotany of the Fort Yukon Region, Alaska. *Economic botany*, 44 : 214-225.
- Hossain MA, Tran T, Chen T, Mikus G et Greenblatt DJ. 2017. Inhibition of human cytochromes P450 in vitro by ritonavir and cobicistat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 : 1786-1793.
- Hou T, Sana SS, Li H, Xing Y, Nanda A, Netala VR et Zhang Z. 2022. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 47 : 101716.
- Hulswit RJG, de Haan CAM et Bosch BJ. 2016. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Advances in virus research*, 96 : 29-57.
- Hussain Y, Alam W, Ullah H, Dacrema M, Daglia M, Khan H et Arciola CR. 2022. Antimicrobial potential of curcumin: therapeutic potential and challenges to clinical applications. *Antibiotics*, 11 : 322.
- Iga K. 2015. Use of three-compartment physiologically based pharmacokinetic modeling to predict hepatic blood levels of fluvoxamine relevant for drug–drug interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 : 1478-1491.
- Iqhrammullah M, Rizki DR, Purnama A, Duta TF, Harapan H, Idroes R et Ginting B. 2023. Antiviral molecular targets of essential oils against SARS-CoV-2: A systematic review. *Scientia Pharmaceutica*, 91.
- Isidorov VA et Vinogorova VT. 2003. GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *populus balsamifera* and *populus nigra*. 58 : 355-360.
- Islam MK, Baudin M, Eriksson J, Öberg C, Habjan M, Weber F, Överby AK, Ahlm C et Evander M. 2016. High-throughput screening using a whole-cell virus replication reporter gene assay to identify inhibitory compounds against rift valley fever virus infection. *Journal of Biomolecular Screening*, 21 : 354-362.
- Jackson CB, Farzan M, Chen B et Choe H. 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23 : 3-20.

Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, Martín-Quirós A, Caraco Y, Williams-Diaz A, Brown ML, Du J, Pedley A, Assaid C, Strizki J, Grobler JA, Shamsuddin HH, Tipping R, Wan H, Paschke A, Butterton JR, Johnson MG et De Anda C. 2021. Molnupiravir for oral treatment of COVID-19 in nonhospitalized patients. *New England Journal of Medicine*.

Jeong GU, Song H, Yoon GY, Kim D et Kwon Y-C. 2020. Therapeutic strategies against COVID-19 and structural characterization of SARS-CoV-2: A review. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Jevšnik Virant M, Černe D, Petrovec M, Paller T et Toplak I. 2021. Genetic Characterisation and Comparison of Three Human Coronaviruses (HKU1, OC43, 229E) from Patients and Bovine Coronavirus (BCoV) from Cattle with Respiratory Disease in Slovenia. *Viruses*, 13.

Jiang Y, Rubin L, Peng T, Liu L, Xing X, Lazarovici P et Zheng W. 2022. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. *International journal of biological sciences*, 18 : 459-472.

Kamatou GPP et Viljoen AM. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 : 1-7.

Kesheh MM, Hosseini P, Soltani S et Zandi M. 2022. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. *Reviews in Medical Virology*, 32 : e2282.

Keyaerts E, Li S, Vijgen L, Rysman E, Verbeeck J, Van Ranst M et Maes P. 2009. Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 : 3416-3421.

Kim DE, Min JS, Jang MS, Lee JY, Shin YS, Park CM, Song JH, Kim HR, Kim S, Jin Y-H et Kwon S. 2019. Natural Bis-Benzylisoquinoline Alkaloids-Tetrandrine, Fangchinoline, and Cepharanthine, Inhibit Human Coronavirus OC43 Infection of MRC-5 Human Lung Cells. *Biomolecules*, 9. doi : 10.3390/biom9110696.

Kofi Ayittey F, Dzuovor C, Kormla Ayittey M, Bennita Chiwero N et Habib A. 2020. Updates on Wuhan 2019 novel coronavirus epidemic. *Journal of Medical Virology*, 92 : 403-407.

Kolakowska A, Maresca AF, Collins IJ et Cailhol J. 2019. Update on adverse effects of HIV integrase inhibitors. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 11 : 372-387.

Koonin EV et Starokadomskyy P. 2016. Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 59 : 125-134.

Krishna BA, Wills MR et Sinclair JH. 2019. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *British Medical Bulletin*, 131 : 5-17.

Lamers MM et Haagmans BL. 2022. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20 : 270-284.

Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, Chou S, Drew WL, Erice A, Gilliam B, Lurain N, Manischewitz J, Miner R, Nokta M, Reichelderfer P, Spector S, Weinberg A, Yen-Lieberman B et Crumpacker C. 2000. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 44 : 688-692.

Langford MP, Weigent DA, Stanton GJ et Baron S. 1981. Virus plaque-reduction assay for interferon: Microplaque and regular macroplaque reduction assays. Dans : *Methods in Enzymology*. Academic Press, p. 339-346.

Lavoie S, Legault J, Simard F, Chiasson É et Pichette A. 2013. New antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*. *Tetrahedron Letters*, 54 : 1631-1633.

Lavoie S, Côté I, Pichette A, Gauthier C, Ouellet M, Nagau-Lavoie F, Mshvildadze V et Legault J. 2017. Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of extracts from *Cornus canadensis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 : 123.

Lebeau G, Vagner D, Frumence É, Ah-Pine F, Guillot X, Nobécourt E, Raffray L et Gasque P. 2020. Deciphering SARS-CoV-2 virologic and immunologic features. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 : 5932.

Lee TC, Vigod S, Bortolussi-Courval É, Hanula R, Boulware DR, Lenze EJ, Reiersen AM et McDonald EG. 2022. Fluvoxamine for outpatient management of COVID-19 to prevent hospitalization: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Network Open*, 5 : e226269-e226269.

Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG et Smith DB. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46 : D708-D717.

Legault J et Pichette A. 2007. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59 : 1643-1647.

Lehrer S et Rheinstein PH. 2020. Ivermectin docks to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain attached to ACE2. *In Vivo*, 34 : 3023.

Leroi-Gourhan A. 1975. The flowers found with Shanidar IV, a neanderthal burial in Iraq. *Science*, 190 : 562-564.

- Li F, Maag H et Alfredson T. 2008. Prodrugs of nucleoside analogues for improved oral absorption and tissue targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 : 1109-1134.
- Li G, Jing X et Zhang P. 2021. Antiviral classification. *Encyclopedia of Virology* : 121-130.
- Li P, Wang Y, Lavrijsen M, Lamers MM, de Vries AC, Rottier RJ, Bruno MJ, Peppelenbosch MP, Haagmans BL et Pan Q. 2022a. SARS-CoV-2 Omicron variant is highly sensitive to molnupiravir, nirmatrelvir, and the combination. *Cell Research*, 32 : 322-324.
- Li P, Wang Y, Lamers MM, Lavrijsen M, Iriondo C, de Vries AC, Rottier RJ, Peppelenbosch MP, Haagmans BL et Pan Q. 2022b. Recapitulating infection, thermal sensitivity and antiviral treatment of seasonal coronaviruses in human airway organoids. *EBioMedicine*, 81 : 104132.
- Li Q, Maddox C, Rasmussen L, Hobrath JV et White LE. 2009. Assay development and high-throughput antiviral drug screening against Bluetongue virus. *Antiviral research*, 83 : 267-273.
- Li W, Wong S-K, Li F, Kuhn Jens H, Huang IC, Choe H et Farzan M. 2006. Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: Insight from ACE2-S-protein interactions. *Journal of Virology*, 80 : 4211-4219.
- Li Y, Huo S, Yin Z, Tian Z, Huang F, Liu P, Liu Y et Yu F. 2023. The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs. *mBio*, 14 : e01273-01223.
- Liu DX, Liang JQ et Fung TS. 2021a. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology* : 428-440.
- Liu W, Tao Z-W, Wang L, Yuan M-L, Liu K, Zhou L, Wei S, Deng Y, Liu J, Liu H-G, Yang M et Hu Y. 2020. Analysis of factors associated with disease outcomes in hospitalized patients with 2019 novel coronavirus disease. *Chinese Medical Journal*, 133.
- Liu X, Wu Q et Zhang Z. 2021b. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front Microbiol*, 12 : 649314.
- Liu Y-Y, Huang D-L, Dong Y, Qin D-P, Yan Y-M et Cheng Y-X. 2019. Neuroprotective norsesquiterpenoids and triterpenoids from *Populus euphratica* resins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24. doi : 10.3390/molecules24234379.
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lampronti I, Gambari R, Cinatl J et Doerr HW. 2008. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven lebanon species. *Chemistry & Biodiversity*, 5 : 461-470.
- López-Medina E, López P, Hurtado IC, Dávalos DM, Ramirez O, Martínez E, Díazgranados JA, Oñate JM, Chavarriaga H, Herrera S, Parra B, Libreros G, Jaramillo R, Avendaño AC, Toro DF, Torres M, Lesmes MC, Rios CA et Caicedo I. 2021. Effect of Ivermectin on Time

to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 325 : 1426-1435.

Lv Z, Chu Y et Wang Y. 2015. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl)*, 7 : 95-104.

Malik P, Jain S, Jain P, Kumawat J, Dwivedi J et Kishore D. 2022. A comprehensive update on the structure and synthesis of potential drug targets for combating the coronavirus pandemic caused by SARS-CoV-2. *Archiv der Pharmazie*, 355 : 2100382.

Malik YA. 2020. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, 42 : 3-11.

Marie-Victorin F, Rouleau E et Brouillet L. 1995. Flore Laurentienne. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran TB, Nainu F et Simal-Gandara J. 2022. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X*, 13 : 100217.

Mathew D et Hsu W-L. 2018. Antiviral potential of curcumin. *Journal of functional foods*, 40 : 692-699.

Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, Herridge M, Randolph AG et Calfee CS. 2019. Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 : 18.

McAuley AJ, Jansen van Vuren P, Mohammed M-U-R, Faheem, Goldie S, Riddell S, Gödde NJ, Styles IK, Bruce MP, Chahal S, Keating S, Blasdell KR, Tachedjian M, O'Brien CM, Singanallur NB, Viana JN, Vashi AV, Kirkpatrick CM, MacRaild CA, Shah RM, Vincan E, Athan E, Creek DJ, Trevaskis NL, Murugesan S, Kumar A et Vasani SS. 2022. Use of human lung tissue models for screening of drugs against SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, 14. doi : 10.3390/v14112417.

McClain CB et Vabret N. 2020. SARS-CoV-2: the many pros of targeting PLpro. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 : 223.

Medini F, Legault J, Pichette A, Abdely C et Ksouri R. 2014. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. *South African Journal of Botany*, 92 : 65-72.

Meirmans PG, Godbout J, Lamothe M, Thompson SL et Isabel N. 2017. History rather than hybridization determines population structure and adaptation in *Populus balsamifera*. *Journal of Evolutionary Biology*, 30 : 2044-2058.

Mejri H, Aidi Wannes W, Mahjoub FH, Hammami M, Dussault C, Legault J et Saidani-Tounsi M. 2024. Potential bio-functional *properties of Citrus aurantium* L. leaf: chemical composition, antiviral activity on herpes simplex virus type-1, antiproliferative effects on human lung and colon cancer cells and oxidative protection. *International Journal of Environmental Health Research*, 34 : 1113-1123.

Merck Sharp & Dohme LLC. Efficacy and safety of molnupiravir (MK-4482) in non-hospitalized adult participants with COVID-19 (MK-4482-002) (NCT04575597). <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04575597>.

Mercorelli B, Palù G et Loregian A. 2018. Drug repurposing for viral infectious diseases: How far are we? *Trends in Microbiology*, 26 : 865-876.

Mieres-Castro D, Ahmar S, Shabbir R et Mora-Poblete F. 2021. Antiviral activities of *Eucalyptus* essential oils: Their effectiveness as therapeutic targets against human viruses. *Pharmaceuticals*, 14. doi : 10.3390/ph14121210.

Millet JK et Whittaker GR. 2015. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus research*, 202 : 120-134.

Min JS, Kim DE, Jin Y-H et Kwon S. 2020. Kurarinone inhibits HCoV-OC43 infection by impairing the virus-induced autophagic flux in MRC-5 human lung cells. *Journal of Clinical Medicine*, 9.

Moerman DE. 2009. Native american medicinal plants: An ethnobotanical dictionary. Timber Press Inc., Oregon, USA, 799 p.

Moreira D et López-García P. 2009. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nature Reviews Microbiology*, 7 : 306-311.

Msemburi W, Karlinsky A, Knutson V, Aleshin-Guendel S, Chatterji S et Wakefield J. 2023. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. *Nature*, 613 : 130-137.

Mukherjee S et Pahan K. 2021. Is COVID-19 Gender-sensitive? *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 16 : 38-47.

My TTA, Loan HTP, Hai NTT, Hieu LT, Hoa TT, Thuy BTP, Quang DT, Triet NT, Anh TTV, Dieu NTX, Trung NT, Hue NV, Tat PV, Tung VT et Nhung NTA. 2020. Evaluation of the inhibitory activities of COVID-19 of melaleuca cajuputi oil using docking simulation. *ChemistrySelect*, 5 : 6312-6320.

Nadjib BM. 2020. Effective antiviral activity of essential oils and their characteristic terpenes against coronaviruses: An update. *Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology*, 8 : 1138.

Negru PA, Radu A-F, Vesa CM, Behl T, Abdel-Daim MM, Nechifor AC, Endres L, Stoicescu M, Pasca B, Tit DM et Bungau SG. 2022. Therapeutic dilemmas in addressing SARS-CoV-2 infection: Favipiravir versus Remdesivir. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147 : 112700.

Ni Y, Liao J, Qian Z, Wu C, Zhang X, Zhang J, Xie Y et Jiang S. 2022. Synthesis and evaluation of enantiomers of hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 53 : 116523.

Nile SH et Kai G. 2021. Recent clinical trials on natural products and traditional chinese medicine combating the COVID-19. *Indian Journal of Microbiology*, 61 : 10-15.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267 : 5421-5426.

Okumuş N, Demirtürk N, Çetinkaya RA, Güner R, Avcı İY, Orhan S, Konya P, Şaylan B, Karalezli A, Yamanel L, Kayaaslan B, Yılmaz G, Savaşçı Ü, Eser F et Taşkın G. 2021. Evaluation of the effectiveness and safety of adding ivermectin to treatment in severe COVID-19 patients. *BMC Infectious Diseases*, 21 : 411.

Olender SA, Perez KK, Go AS, Balani B, Price-Haywood EG, Shah NS, Wang S, Walunas TL, Swaminathan S, Slim J, Chin B, De Wit S, Ali SM, Soriano Viladomiu A, Robinson P, Gottlieb RL, Tsang TYO, Lee IH, Hu H, Haubrich RH, Chokkalingam AP, Lin L, Zhong L, Bekele BN, Mera-Giler R, Phulpin C, Edgar H, Gallant J, Diaz-Cuervo H, Smith LE, Osinusi AO, Brainard DM, Bernardino JI, Gs Us et Investigators GSUS. 2021. Remdesivir for Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) versus a cohort receiving standard of care. *Clinical Infectious Diseases*, 73 : e4166-e4174.

Orr HA. 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*, 10 : 531-539.

Paller CJ, Denmeade SR et Carducci MA. 2016. Challenges of conducting clinical trials of natural products to combat cancer. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 14 : 447-455.

Pan SY, Litscher G, Gao SH, Zhou SF, Yu ZL, Chen HQ, Zhang SF, Tang MK, Sun JN et Ko KM. 2014. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014 : 525340.

Pardi N et Weissman D. 2020. Development of vaccines and antivirals for combating viral pandemics. *Nature Biomedical Engineering*, 4 : 1128-1133.

Patick AK et Potts KE. 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 : 614-627.

Patterson S, Cescon A, Samji H, Chan K, Zhang W, Raboud J, Burchell AN, Cooper C, Klein MB, Rourke SB, Loutfy MR, Machouf N, Montaner JS, Tsoukas C et Hogg RS. 2015. Life expectancy of HIV-positive individuals on combination antiretroviral therapy in Canada. *BMC Infectious Diseases*, 15 : 274.

Payne S. 2022. *Viruses: From understanding to investigation*. Academic Press, Massachusetts, USA.

Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, Kugathasan R, Penn R, Brown JC, Sanchez-David RY, Braga L, Williamson MK, Hassard JA, Staller E, Hanley B, Osborn M, Giacca M, Davidson AD, Matthews DA et Barclay WS. 2021. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology*, 6 : 899-909.

Peiris JSM. 2016. Coronaviruses. Dans : *Clinical Virology*. p. 1243-1265.

Pekar JE, Magee A, Parker E, Moshiri N, Izhikevich K, Havens JL, Gangavarapu K, Malpica Serrano LM, Crits-Christoph A, Matteson NL, Zeller M, Levy JI, Wang JC, Hughes S, Lee J, Park H, Park M-S, Ching Zi Yan K, Lin RTP, Mat Isa MN, Noor YM, Vasylyeva TI, Garry RF, Holmes EC, Rambaut A, Suchard MA, Andersen KG, Worobey M et Wertheim JO. 2022. The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. *Science*, 377 : 960-966.

Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, Storgaard M, Al Khalili S et Simonsen L. 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *The Lancet Infectious Diseases*, 20 : e238-e244.

Pfizer Inc. EPIC-HR: Study of oral PF-07321332/Ritonavir compared with placebo in nonhospitalized high risk adults with COVID-19 (NCT04960202). <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04960202>.

Piochon-Gauthier M, Legault J, Sylvestre M et Pichette A. 2014. The essential oil of *Populus balsamifera* buds: its chemical composition and cytotoxic activity. *Natural Product Communications*, 9 : 257-260.

Pišlar A, Mitrović A, Sabotič J, Pečar Fonović U, Perišić Nanut M, Jakoš T, Senjor E et Kos J. 2020. The role of cysteine peptidases in coronavirus cell entry and replication: The therapeutic potential of cathepsin inhibitors. *PLOS Pathogens*, 16 : e1009013.

Poaty B, Lahlah J, Porqueres F et Bouafif H. 2015. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31 : 907-919.

Pradhan B, Nayak R, Patra S, Bhuyan PP, Dash SR, Ki JS, Adhikary SP, Ragusa A et Jena M. 2022. Cyanobacteria and algae-derived bioactive metabolites as antiviral agents: Evidence, mode of action, and scope for further expansion; a comprehensive review in light of the SARS-CoV-2 outbreak. *Antioxidants (Basel)*, 11.

Prajapati J, Patel R, Rao P, Saraf M, Rawal R et Goswami D. 2022. Perceiving SARS-CoV-2 Mpro and PLpro dual inhibitors from pool of recognized antiviral compounds of endophytic microbes: an in silico simulation study. *Structural Chemistry*, 33 : 1619-1643.

Prosdocimi F et de Farias ST. 2021. Life and living beings under the perspective of organic macrocodes. *Biosystems*, 206 : 104445.

Radha MH et Laxmipriya NP. 2015. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5 : 21-26.

Rahbar Saadat Y, Hosseiniyan Khatibi SM, Zununi Vahed S et Ardalan M. 2021. Host serine proteases: A potential targeted therapy for COVID-19 and influenza. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8.

Reis G, dos Santos Moreira-Silva EA, Silva DCM, Thabane L, Milagres AC, Ferreira TS, dos Santos CVQ, de Souza Campos VH, Nogueira AMR, de Almeida APFG, Callegari ED, de Figueiredo Neto AD, Savassi LCM, Simplicio MIC, Ribeiro LB, Oliveira R, Harari O, Forrest JI, Ruton H, Sprague S, McKay P, Glushchenko AV, Rayner CR, Lenze EJ, Reiersen AM, Guyatt GH et Mills EJ. 2022a. Effect of early treatment with fluvoxamine on risk of emergency care and hospitalisation among patients with COVID-19: the TOGETHER randomised, platform clinical trial. *The Lancet Global Health*, 10 : e42-e51.

Reis G, Silva EASM, Silva DCM, Thabane L, Milagres AC, Ferreira TS, dos Santos CVQ, Campos VHS, Nogueira AMR, de Almeida APFG, Callegari ED, Neto ADF, Savassi LCM, Simplicio MIC, Ribeiro LB, Oliveira R, Harari O, Forrest JI, Ruton H, Sprague S, McKay P, Guo CM, Rowland-Yeo K, Guyatt GH, Boulware DR, Rayner CR et Mills EJ. 2022b. Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 386 : 1721-1731.

Ribaud G, Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, Mastinu A, Memo M, Wong VKW et Gianoncelli A. 2022. Computational and experimental insights on the interaction of artemisinin, dihydroartemisinin and chloroquine with SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD). *Natural Product Research*, 36 : 5358-5363.

Richman D et Nathanson N. 2016. Antiviral therapy. Dans :, p. 271-287.

Romanowski V. 2013. Current issues in molecular virology: Viral genetics and biotechnological applications. Intechopen, Vienne, Autriche.

Ross SB, Bortolussi-Courval É, Hanula R, Lee TC, Goodwin Wilson M et McDonald EG. 2022. Drug interactions with nirmatrelvir-ritonavir in older adults using multiple medications. *JAMA Network Open*, 5 : e2220184-e2220184.

Sabin CA. 2013. Do people with HIV infection have a normal life expectancy in the era of combination antiretroviral therapy? *BMC Med*, 11 : 251.

- Saha JK et Raihan MJ. 2021. The binding mechanism of ivermectin and levosalbutamol with spike protein of SARS-CoV-2. *Structural Chemistry*, 32 : 1985-1992.
- Sandmann L, Schulte B, Manns MP et Maasoumy B. 2019. Treatment of chronic hepatitis C: Efficacy, side effects and complications. *Visceral Medicine*, 35 : 161-170.
- Saravolatz LD, Depcinski S et Sharma M. 2023. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: oral Coronavirus Disease 2019 antiviral drugs. *Clinical Infectious Diseases*, 76 : 165-171.
- Savoie C et Lippé R. 2022. Optimizing human coronavirus OC43 growth and titration. *PeerJ*, 10 : e13721.
- Schepetkin IA, Özek G, Özek T, Kirpotina LN, Kokorina PI, Khlebnikov AI et Quinn MT. 2022. Neutrophil immunomodulatory activity of nerolidol, a major component of essential oils from *populus balsamifera* buds and propolis. *Plants*, 11.
- Schirtzinger EE, Kim Y et Davis AS. 2022. Improving human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) research comparability in studies using HCoV-OC43 as a surrogate for SARS-CoV-2. *Journal of virological methods*, 299 : 114317.
- Schmidtke M, Schnittler U, Jahn B, Dahse HM et Stelzner A. 2001. A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and herpes simplex virus type 1. *Journal of virological methods*, 95 : 133-143.
- Schöler L, Le-Trilling VTK, Eilbrecht M, Mennerich D, Anastasiou OE, Krawczyk A, Herrmann A, Dittmer U et Trilling M. 2020. A novel in-cell ELISA assay allows rapid and automated quantification of SARS-CoV-2 to analyze neutralizing antibodies and antiviral compounds. *Frontiers in Immunology*, 11 : 573526.
- Shalaby EA. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior*, 6 : 1338-1350.
- Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G et Maggi F. 2021. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26. doi : 10.3390/molecules26030666.
- Simard F, Gauthier C, Chiasson É, Lavoie S, Mshvildadze V, Legault J et Pichette A. 2015. Antibacterial Balsacones J–M, Hydroxycinnamoylated Dihydrochalcones from *Populus balsamifera* buds. *Journal of natural products*, 78 : 1147-1153.
- Singh AK, Singh A, Singh R et Misra A. 2020. Remdesivir in COVID-19: A critical review of pharmacology, pre-clinical and clinical studies. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14 : 641-648.

Singh S, Khera D, Chugh A, Khera PS et Chugh VK. 2021. Efficacy and safety of remdesivir in COVID-19 caused by SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 11 : e048416.

Singla S et Goyal S. 2022. Antiviral activity of molnupiravir against COVID-19: a schematic review of evidences. *Bulletin of the National Research Centre*, 46 : 62.

Song Y, Deng Y, Wang H, Bei Z, Gu H, Zhao H, Wang H, Zhang D, Xu L, Wang B, Li Y et Wang H. 2022. Naphthoquinone: A potent broad-spectrum anti-coronavirus drug in vitro. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27.

Soriano V et Mendoza Cd. 2002. Genetic mechanisms of resistance to NRTI and NNRTI. *HIV Clinical Trials*, 3 : 237-248.

Soriano V, Alvarez C, Edagwa B, de Mendoza C, Montoya N, Treviño A et Gendelman H. 2022. Ultra-long-acting (XLA) antivirals for chronic viral hepatitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 114 : 45-50.

Stanciauskaite M, Marksa M, Babickaite L, Majiene D et Ramanauskiene K. 2021a. Comparison of ethanolic and aqueous *populus balsamifera l.* Bud extracts by different extraction methods: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14.

Stanciauskaite M, Marksa M, Liaudanskas M, Ivanauskas L, Ivaskiene M et Ramanauskiene K. 2021b. Extracts of poplar buds (*populus balsamifera l.*, *populus nigra l.*) and *lithuanian propolis*: Comparison of their composition and biological activities. *Plants*, 10.

Sumbria D, Berber E, Mathayan M et Rouse BT. 2020. Virus infections and host metabolism- can we manage the interactions? *Frontiers in Immunology*, 11 : 594963.

Suttle CA. 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437 : 356-361.

Takayama K. 2020. In Vitro and animal models for SARS-CoV-2 research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41 : 513-517.

Tamminen K, Salminen M et Blazevic V. 2021. Seroprevalence and SARS-CoV-2 cross-reactivity of endemic coronavirus OC43 and 229E antibodies in Finnish children and adults. *Clinical Immunology*, 229 : 108782.

Tan BH. 2014. Cytomegalovirus treatment. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 6 : 256-270.

Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, Douangboubpha B, Karami Y, Chrétien D, Sanamxay D, Xayaphet V, Paphaphanh P, Lacoste V, Somlor S, Lakeomany K, Phommavanh N, Pérot P, Dehan O, Amara F, Donati F, Bigot T, Nilges M, Rey FA, van der Werf S, Brey PT et Eloit M. 2022. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature*, 604 : 330-336.

Trabelsi K, Majoul S, Rourou S et Kallel H. 2012. Development of a measles vaccine production process in MRC-5 cells grown on Cytodex1 microcarriers and in a stirred bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 : 1031-1040.

Van Hoof L, Vanden Berghe DA et Vlietinck AJ. 1980. Screening of poplar trees for antibacterial, antifungal and antiviral activity. *Biologia Plantarum*, 22 : 265-273.

Van Hoof L, Totté J, Corthout J, Pieters LA, Mertens F, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ, Dommissie R et Esmans E. 1989. Plant antiviral agents, VI. Isolation of antiviral phenolic glucosides from *Populus* cultivar Beaupre by droplet counter-current chromatography. *Journal of natural products*, 52 : 875-878.

Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, André E, Leyssen P, Neyts J et Jochmans D. 2022. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral research*, 198 : 105252.

Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou CC, Tsakris Z, Rozos G, Tsigalou C et Bezirtzoglou E. 2022. Interactions between medical plant-derived bioactive compounds: Focus on antimicrobial combination effects. *Antibiotics (Basel)*, 11.

Walker CM et Grakoui A. 2015. Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection? *Current Opinion in Immunology*, 35 : 137-143.

Waller DG et Sampson AP. 2018. 51 - Chemotherapy of infections. Dans : Waller DG et Sampson AP édés. *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*. Elsevier, p. 581-629.

Wang C, Hesketh EL, Shamorkina TM, Li W, Franken PJ, Drabek D, van Haperen R, Townend S, van Kuppeveld FJM, Grosveld F, Ranson NA, Snijder J, de Groot RJ, Hurdiss DL et Bosch B-J. 2022. Antigenic structure of the human coronavirus OC43 spike reveals exposed and occluded neutralizing epitopes. *Nature Communications*, 13 : 2921.

Wang Y, Li P, Solanki K, Li Y, Ma Z, Peppelenbosch MP, Baig MS et Pan Q. 2021. Viral polymerase binding and broad-spectrum antiviral activity of molnupiravir against human seasonal coronaviruses. *Virology*, 564 : 33-38.

Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, Fu S, Gao L, Cheng Z, Lu Q, Hu Y, Luo G, Wang K, Lu Y, Li H, Wang S, Ruan S, Yang C, Mei C, Wang Y, Ding D, Wu F, Tang X, Ye X, Ye Y, Liu B, Yang J, Yin W, Wang A, Fan G, Zhou F, Liu Z, Gu X, Xu J, Shang L, Zhang Y, Cao L, Guo T, Wan Y, Qin H, Jiang Y, Jaki T, Hayden FG, Horby PW, Cao B et Wang C. 2020. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*, 395 : 1569-1578.

Weiss SR et Navas-Martin S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 69 : 635-664.

Weitz JS et Wilhelm SW. 2012. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *F1000 Biology Reports*, 4 : 17.

Wen W, Chen C, Tang J, Wang C, Zhou M, Cheng Y, Zhou X, Wu Q, Zhang X, Feng Z, Wang M et Mao Q. 2022. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. *Annals of Medicine*, 54 : 516-523.

Woo PCY, Lau SKP, Yip CCY, Huang Y et Yuen K-Y. 2009. More and more coronaviruses: human coronavirus HKU1. *Viruses*, 1 : 57-71. doi : 10.3390/v1010057.

Woolhouse M, Scott F, Hudson Z, Howey R et Chase-Topping M. 2012. Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 : 2864-2871.

Xiao Q, Guo D et Chen S. 2019. Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9 : 69.

Yang M, Lin C, Wang Y, Chen K, Han Y, Zhang H et Li W. 2022. Cytokine storm promoting T cell exhaustion in severe COVID-19 revealed by single cell sequencing data analysis. *Precision Clinical Medicine*, 5 : pbac014.

Yin T, Li Y, Ying Y et Luo Z. 2021. Prevalence of comorbidity in Chinese patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis of risk factors. *BMC Infectious Diseases*, 21 : 200.

Yip AJW, Low ZY, Chow VTK et Lal SK. 2022. Repurposing molnupiravir for COVID-19: The mechanisms of antiviral activity. *Viruses*, 14 : 1345.

Yolles M et Frieden R. 2022. Viruses as living systems-a metacybernetic view. *Systems*, 10. doi : 10.3390/systems10030070.

Yuan H, Ma Q, Ye L et Piao G. 2016. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21 : 559.

Yuan Z, Pavel MA, Wang H, Kwachukwu JC, Mediouni S, Jablonski JA, Nettles KW, Reddy CB, Valente ST et Hansen SB. 2022. Hydroxychloroquine blocks SARS-CoV-2 entry into the endocytic pathway in mammalian cell culture. *Communications Biology*, 5 : 958.

Zafferani M, Haddad C, Luo L, Davila-Calderon J, Chiu L-Y, Mugisha CS, Monaghan AG, Kennedy AA, Yesselman JD, Gifford RJ, Tai AW, Kutluay SB, Li M-L, Brewer G, Tolbert

BS et Hargrove AE. 2021. Amilorides inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro by targeting RNA structures. *Science Advances*, 7 : eabl6096.

Zanza C, Romenskaya T, Manetti AC, Franceschi F, La Russa R, Bertozzi G, Maiese A, Savioli G, Volonnino G et Longhitano Y. 2022. Cytokine storm in COVID-19: immunopathogenesis and therapy. *Medicina*, 58.

Zedan HT et Nasrallah GK. 2021. Is preexisting immunity to seasonal coronaviruses limited to cross-reactivity with SARS-CoV-2? A seroprevalence cross-sectional study in north-eastern France. *EBioMedicine*, 71.

Zhang Q-Y, Deng C-L, Liu J, Li J-Q, Zhang H-Q, Li N, Zhang Y-N, Li X-D, Zhang B, Xu Y et Ye H-Q. 2021a. SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening. *The Journal of general virology*, 102 : 001583.

Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q et Yu F. 2021b. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6 : 233.

Zhang Q, Liu Z, Mi Z, Li X, Jia P, Zhou J, Yin X, You X, Yu L, Guo F, Ma J, Liang C et Cen S. 2011. High-throughput assay to identify inhibitors of Vpu-mediated down-regulation of cell surface BST-2. *Antiviral research*, 91 : 321-329.

Zhang QY, Deng CL, Liu J, Li JQ, Zhang HQ, Li N, Zhang YN, Li XD, Zhang B, Xu Y et Ye HQ. 2021c. SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening. *Journal of General Virology*, 102.

Zhang Z, Qin F, Chen F, Chu X, Luo H, Zhang R, Du S, Tian Z et Zhao Y. 2021d. Culturing novel and abundant pelagiphages in the ocean. *Environmental Microbiology*, 23 : 1145-1161.

Zhao H, Lu L, Peng Z, Chen L-L, Meng X, Zhang C, Ip JD, Chan W-M, Chu AW-H, Chan K-H, Jin D-Y, Chen H, Yuen K-Y et To KK-W. 2022a. SARS-CoV-2 Omicron variant shows less efficient replication and fusion activity when compared with Delta variant in TMPRSS2-expressed cells. *Emerging Microbes & Infections*, 11 : 277-283.

Zhao L, Li S et Zhong W. 2022b. Mechanism of action of small-molecule agents in ongoing clinical trials for SARS-CoV-2: A review. *Frontiers in Immunology*, 13 : 840639.

Zhao M-M, Yang W-L, Yang F-Y, Zhang L, Huang W-J, Hou W, Fan C-F, Jin R-H, Feng Y-M, Wang Y-C et Yang J-K. 2021. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6 : 134.

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F et

Shi Z-L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579 : 270-273.