



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale
- Pas de Modification 4.0 France (CC BY-NC-ND 4.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°21

THESE

Pour le DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 06 février 2024

Par

Mme CHAMBON Marion

Née le 24 février 1996 à Saint-Étienne (42)

**POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DES PLANTES MÉDICINALES DANS
LA LUTTE CONTRE LE SARS-COV-2 :
ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE *Clausena harmandiana*.**

JURY

Présidente :

Pr Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Professeure des Universités,
pharmacienne

Directeur de thèse :

Dr Marc LITAUDON, pharmacien, Directeur adjoint de l'ICSN-CNRS

Tuteur pédagogique :

Dr Serge MICHALET, Maître de Conférences des Universités, pharmacien

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Président de l'Université	Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique et de la Commission Recherche	Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
Vice-Présidente de la Commission Formation	Christophe VITON
Vice-Président Relations Hospitalo-Universitaires	Jean François MORNEX
Directeur général des services	Pierre ROLLAND

SECTEUR SANTÉ

Doyen de l'UFR de Médecine Lyon-Est	Gilles RODE
Doyen de l'UFR de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Philippe PAPAREL
Doyen de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Claude DUSSART
Doyen de l'UFR d'Odontologie	Jean-Christophe MAURIN
Directeur de l'Institut des Sciences & Techniques de Réadaptation (ISTR)	Jacques LUAUTÉ
Présidente du Comité de Coordination des Études Médicales	Carole BURILLON

SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Directrice de l'UFR Biosciences	Kathrin GIESELER
Directeur de l'UFR Faculté des Sciences	Bruno ANDRIOLETTI
Directeur de l'UFR Sciences & Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Guillaume BODET
Directeur de Polytech Lyon	Emmanuel PERRIN
Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie Lyon 1 (IUT)	Michel MASSENZIO
Directeur de l'Institut des Science Financière & Assurances (ISFA)	Nicolas LEBOISNE
Directeur de l'Observatoire de Lyon	Bruno GUIDERDONI
Directeur de l'Institut National Supérieur du Professorat & de l'Éducation (INSPÉ)	Pierre CHAREYRON
Directrice du Département-composante Génie Électrique & des Procédés (GEP)	Rosaria FERRIGNO
Directrice du Département-composante Informatique	Saida BOUAZAK BRONDEL
Directeur du Département-composante Mécanique	Marc BUFFAT

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES ISPB

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

- **CHIMIE ANALYTIQUE**

Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU-HDR)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)
Guillaume PLET (ATER)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Madame Maryem RHANOUI (MCU)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (PU)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH-HDR)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
 Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
 Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
 Madame Amanda GARRIDO (MCU)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
 Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
 Monsieur François HALLE (MCU)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
 Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
 Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
 Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
 Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
 Madame Delphine HOEGY (MCU-PH)
 Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
 Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Madame Francesca ANGILERI (MCU)
Monsieur David BARTHELEMY(AHU)

- **PHYSIOLOGIE**

Madame Elise BELAIDI (PU)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (PU-PH)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Romain GARREAU (AHU)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Monsieur Vincent LESCURE (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Hortense PRELY (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH-HDR)
Madame Anaïs NOMBEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Monsieur Alexandre GAYMARD (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)
Madame Floriane LAUMAY (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (PR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU-HDR)
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Jordan TEOLI (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
PHU : Praticien hospitalo-universitaire
MCU : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches
AHU : Assistant Hospitalier Universitaire
ATER : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

Remerciements

En concluant mes études de pharmacie par cette thèse, je me dois de remercier toutes les personnes m'ayant accompagné dans mon parcours. Merci à tous pour votre contribution.

Pour cet article scientifique inclus dans mon manuscrit,

Je tiens tout d'abord à remercier **Marc Litaudon**, qui m'a permis de prendre part à ces travaux de recherche lors de mon stage de Master 2. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci encore d'avoir accepté quelques années après d'être mon **directeur de thèse** et de m'avoir encadré dans la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite grandement remercier **Cécile Apel** pour son encadrement et son enseignement lors de ce stage ainsi que pour la poursuite des travaux jusqu'à leur publication.

Ainsi, je remercie également les **co-auteurs** de cet article scientifique pour leur contribution dans cette étude : Charline **Herrscher**, Dana **Al Halabi** Nathan **François**, Sandrine **Belouzard**, Stéphanie **Boutet**, Van Cuong **Pham**, Thi Mai Huong **Doan**, Karin **Séron**, Patrick **Mavingui**, et Chaker **El Kalamouni**.

Pour ma 6^{ème} année d'étude,

Je remercie le corps enseignant du Master 2 Sciences du Médicament de l'**université de Nantes** parcours Polymères et principes actifs d'origine naturelle (PAON) pour leur enseignement.

Ayant effectué mon stage de Master 2 à l'**Institut de Chimie des Substances Naturelles** (ICSN), je voudrais remercier à nouveau les membres de l'équipe « Métabolites de plantes : Isolement, Synthèse et Bioactivité » pour leur accueil, leur soutien et leurs présences agréables au quotidien.

Pour mes années d'étude à l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologique,

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du corps enseignant de l'ISPB qui m'ont transmis leur connaissance, leur savoir-faire et leur savoir-être.

Je remercie en particulier **Marie-Geneviève Dijoux-Franca** de me faire l'honneur d'être **présidente de jury** et de juger mon travail.

Je tiens également à adresser ma reconnaissance à **Serge Michalet**, tuteur pédagogique de cette thèse, pour son accompagnement et ses conseils avisés tout au long de mon parcours universitaire.

Merci également aux professionnels qui ont encadré mes stages universitaires, hospitaliers et officinaux : Thierry **Lomberget** (ISPB), François **Parant** (Hospices Civiles de Lyon), Yann **Barguil** (Médipole Dumbéa), Bruno **Neyret** (Pharmacie Neyret-Fauriel), Carole **Perret** et Rémi **Campredon** (Pharmacie Bonneterre).

À mes amies de la faculté,

Priscillia, Lison, Camille, Fanny, Manel vous avez rendu ces années inoubliables ! Merci à vous pour les fous rires que vous m'avez procurés, les moments de bonheur quotidiens, les repas au RU, cafés et goûtés partagés, le ski pharma... Votre soutien lors des partiels à beaucoup compté. Je suis heureuse et chanceuse de vous savoir mes amies à jamais.

À ceux avec qui j'ai habité, et qui m'ont aidé d'une autre manière,

Dolores, Thierry et Lisa ; Luc, Paul, Joad, Selim et William ; Nora, Kanchan, Vincent ; Patou et Cécile.

Merci à vous tous pour votre aide, vos encouragements, et pour avoir fait, des jours passés ensemble, des jours heureux.

Mes sincères remerciements, **Luc**, pour ton soutien dans ces derniers moments de rédaction intensif. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés.

Pour finir, À ma famille,

À mon papa **Éric** et ma maman **Alice**, votre contribution, de nature diverse, est infinie : une aide financière dans les moments difficiles, de bons repas faits maison pour changer du RU, une oreille à l'écoute et toujours de bons conseils. Vous avez été un soutien sans faille tout au long de mes études. Comment vous exprimer toute ma gratitude et vous rendre tout ce que vous m'avez donné ? En terminant mes études, et dans la suite de mon parcours professionnel, j'espère pouvoir vous rendre fier. Je vous aime.

Ma **Niki** adoré, je te suis tellement reconnaissante pour ta contribution et pour tous tes encouragements, et ce, depuis la PACES. Ton aide précieuse a beaucoup compté, encore merci.

Je tiens à remercier mon papi **Lazare** et ma mamie **Clo** pour leur aide et leur amour inconditionnel. Faire votre fierté me rend très heureuse et me pousse chaque jour à donner le meilleur de moi-même.

Merci à mes frères **Maxime** et **Hugo** et à **Emma**, ma meilleure sœur, qui relie toujours volontiers tous mes écrits. Je te remercie pour ton aide et tes conseils dans la rédaction de ce manuscrit mais aussi pour la joie que tu m'apportes depuis toujours.

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :



- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Table des matières

1. Introduction bibliographique	13
1.1. Coronavirus et pandémie de COVID-19	13
1.1.1. La COVID-19 : une maladie émergente à coronavirus	13
1.1.2. Cycle de vie du virus	13
1.1.3. Traitements anti-SARS-CoV-2	15
1.2. Les substances naturelles végétales, une source d'antiviraux	16
1.2.1. Exemples de plantes étudiées	17
1.2.2. Criblage d'extraits végétaux	17
1.3. <i>Clausena harmandiana</i>	18
1.3.1. Description botanique et usages traditionnels	18
1.3.2. Phytochimie et pharmacologie	19
1.4. Les réseaux moléculaires	22
2. Publication d'un article scientifique	24
2.1. Présentation	24
2.2. Résumé	25
2.3. Manuscrit de l'article	25
3. Discussion	41
4. Conclusion générale	45
5. Références bibliographiques	47
6. Annexes	50

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
APA : accès et partage des avantages
ARN : acide ribonucléique
ACE2 : enzyme de conversion de l'angiotensine 2
CBDA : acide cannabidiolique
CBGA : acide cannabigerolique
CBD : cannabidiol
CC₅₀ : concentration permettant d'avoir 50% de cytotoxicité
CDCl₃ : Chloroforme deutéré
CI₅₀ : concentration permettant d'avoir 50% d'inhibition
CIIL : centre d'infection et d'immunité de Lille
CNRS : centre national de la recherche scientifique
CoV : coronavirus
COVID-19 : maladie liée au coronavirus 2019
CMV : cytomégalovirus humain
DROM-COM : départements-régions d'outre-mer et collectivités d'outre-mer
ES : electrospray
EtOH : éthanol
GA : acides ginkgoliques
GNPS : global natural product social molecular networking
HAS : haute autorité de santé
HCoV : coronavirus humain
HPLC : chromatographie liquide haute performance
ICSN : institut de chimie des substances naturelles
IJPB : institut Jean-Pierre Bourgin
INRAE : institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
LC-MS² : chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem
MERS-CoV : coronavirus associé au syndrome respiratoire du Moyen-Orient
Mpro : main protéase
MTS : test de cytotoxicité utilisant des sels de tetrazolum
ORF : phase ouverte de lecture (open reading frame)
PIMIT : unité mixte processus infectieux en milieu insulaire tropical
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RMN : résonance magnétique nucléaire
RSA : relation structure/activité
SARS-CoV : coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère
TMPRSS2 : sérine protéase transmembranaire
VAST : académie de science et technologie du Vietnam
VHS-1 : virus de l'herpès simplex 1
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
3CLpro : protéase 3-chymotrypsine-like

Liste des figures

Figure 1 : Le cycle de vie du SARS-CoV-2

Figure 2 : Photos de *C. harmandiana*

Figure 3 : Carbazoles identifiées chez *C. harmandiana*

Figure 4 : Alcaloïdes et carbazoles identifiés chez *C. harmandiana*

Figure 5 : Coumarines identifiées chez *C. harmandiana*

Figure 6 : Phénylpropanoïdes identifiés chez *C. harmandiana*

Figure 7 : Schéma illustrant la priorisation des produits naturels bioactifs à l'aide de réseaux moléculaires multi-informationnels

Figure 8 : Exemples de cycles phénoliques constituant les lipides phénoliques

Liste des annexes

Annexe 1 : Chromatogramme HPLC préparative de la fraction permettant d'isoler les composés 1-3

Annexe 2 : Spectre de masse en ES⁺ du composé 1

Annexe 3 : RMN ¹H du composé 1 avec zoom sur la partie aromatique (CDCl₃, 300MHz)

Annexe 4 : RMN ¹³C du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)

Annexe 5 : RMN HSQC édité du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)

Annexe 6 : RMN COSY du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)

Annexe 7 : RMN HMBC du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)

Annexe 8 : Structure des ester de Mosher et modèle pour détermination de la configuration

1. Introduction bibliographique

1.1. Coronavirus et pandémie de COVID-19

1.1.1. La COVID-19 : une maladie émergente à coronavirus

Les coronavirus humains ((HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1) sont des pathogènes communs, saisonniers, qui infectent uniquement l'Homme au niveau des voies respiratoires hautes et provoquent des symptômes semblables à ceux d'un rhume (1). D'autres coronavirus, initialement propres au réservoir animal, ont été transmis à l'Homme. C'est le cas du coronavirus associé au syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et de celui associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) qui ont engendré des épidémies dans les années 2000 (1). En décembre 2019, un nouveau coronavirus, le SARS-CoV-2 a émergé à Wuhan en Chine. Le génome du SARS-CoV-2 possède des similarités de séquences avec le SARS-CoV (79%) et le MERS-CoV (50%) (2), mais plus encore avec des coronavirus retrouvés chez la chauve-souris (96%) et le pangolin (92%) (3). Ces éléments semblent indiquer une origine animale du SARS-CoV-2 mais le réservoir hôte et les potentiels hôtes intermédiaires n'ont pas été clairement identifiés. Le SARS-CoV-2 fut à l'origine de la COVID-19, maladie liée au coronavirus 2019. En raison de sa très forte contagiosité, il a engendré une pandémie. Selon l'agence nationale Santé Publique France, on dénombre un total de 767 518 723 cas dans le monde, dont 6 947 192 décès en juin 2023 (4).

Les manifestations cliniques diffèrent selon l'âge. Les symptômes les plus communs sont la fièvre, la toux sèche, la myalgie, la fatigue, la dyspnée, l'anosmie (perte de l'odorat) et l'agueusie (perte du goût). On remarque parfois des augmentations des expectorations, des maux de tête, de l'hémoptysie (crachement de sang) ou encore de la diarrhée (2). Dans certains cas, les patients sont atteints de pneumonie, d'infections secondaires, d'événements cardiovasculaires et de syndrome de détresse respiratoire aiguë qui peuvent être fatales en particulier chez les plus de 45 ans ou en cas de comorbidités tel que l'obésité (5). La rapide réplication du virus dans les poumons engendre une forte réponse immunitaire, notamment une tempête de cytokines, responsable des syndromes de détresses respiratoires aiguës et des défaillances respiratoires (3). De nombreuses infections sont également asymptomatiques (3).

1.1.2. SARS-CoV-2 : cycle de vie du virus

Les coronavirus sont une famille de virus enveloppés à ARN monocaténaire (sens positif). Le génome du SARS-CoV-2 code pour des protéines structurales, qui vont composer la membrane, la nucléocapside, l'enveloppe, les glycoprotéines spike, des protéines non

structurales (polyméras) qui lui permettent de se répliquer au sein d'un organisme et des protéines accessoires (5). Ces dernières ne sont pas indispensables à la réplication, mais elles possèdent souvent des activités d'évasion immunitaire. L'étude du cycle de vie du virus dans l'organisme aide à la compréhension de la physiopathologie et met en évidence de potentielles cibles thérapeutiques (Figure 1).

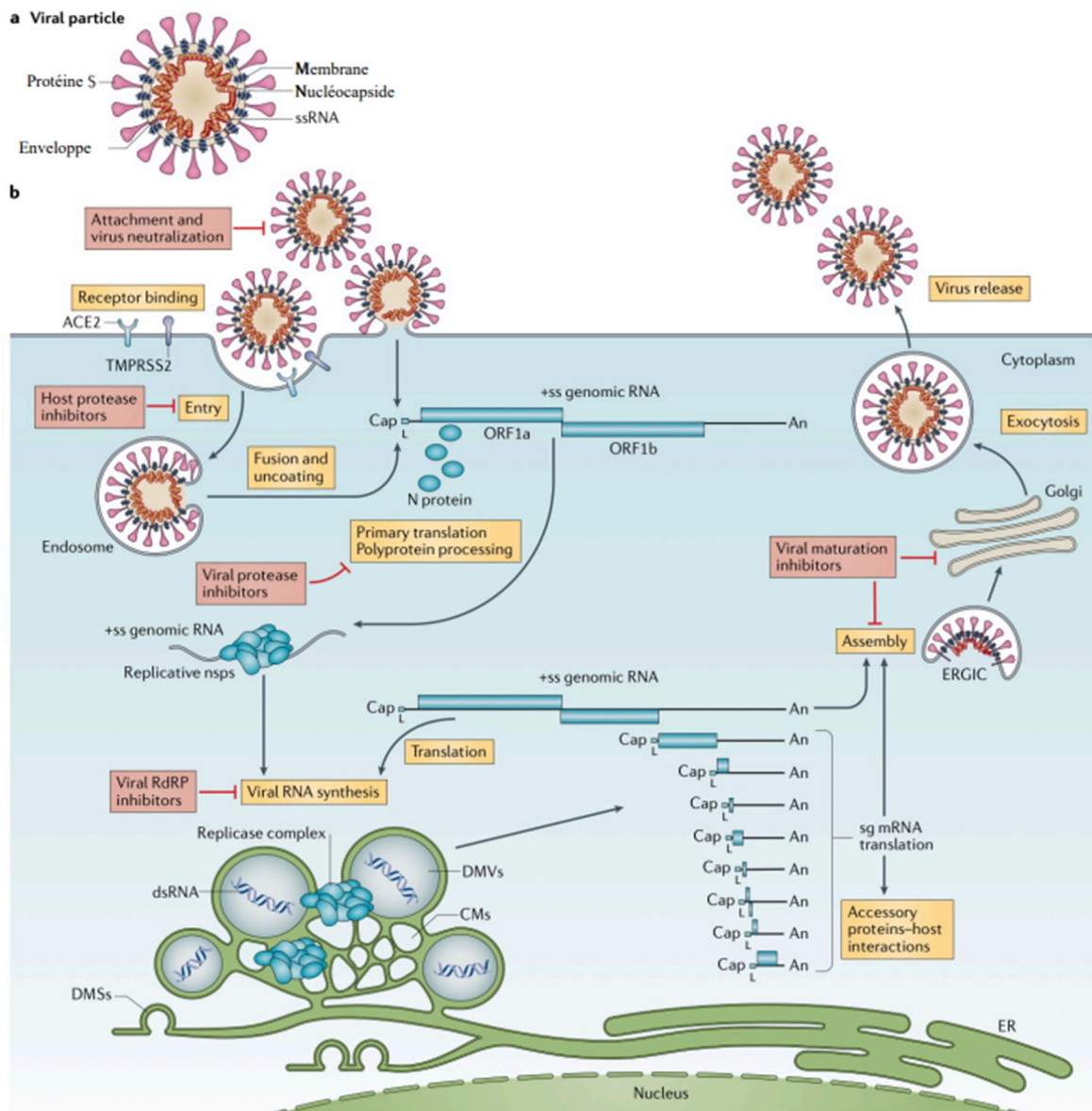


Figure 1 : Cycle de vie du SARS-CoV-2 (V'kovski et al., 2021).

Encadré en jaune, les différentes étapes. Liaison au récepteur ACE2, entrée, libération du génome, transcription et synthèse d'ARN viral, assemblage de la particule virale, exocytose et libération. Encadré en rouge, les voies d'inhibition possibles.

Dans un premier temps, le virus s'attache à la cellule hôte, grâce aux glycoprotéines spike présentes sur l'enveloppe. Cette protéine est composée de deux sous-unités : S1 qui

possède le domaine de liaison au récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) et S2, transmembranaire, qui permet la fusion des membranes (6). Pour cela, la protéine spike doit être clivée afin d'activer la sous-unité S2. Le SARS-CoV-2, comparé aux autres coronavirus, possède une séquence d'acides aminés basiques à la jonction de S1 et S2 qui favorise son clivage par la sérine protéase transmembranaire TMPRSS2 ou par une furine protéase (3). Ce clivage peut également être effectué par d'autres protéases, les cathepsins B et L (CatB/L) qui permettraient d'internaliser la particule virale par endocytose. La TMPRSS2 est plus fortement exprimée dans certains tissus et co-exprimée avec ACE2 notamment dans les cellules épithéliales nasales, dans les poumons et dans les bronches. Ce qui explique le tropisme du virus pour ces tissus (3). Généralement, les radeaux lipidiques présents sur la face externe de la membrane plasmique de la cellule hôte jouent un rôle important et sont impliqués à différents stades du cycle de vie du virus. Ils sont principalement composés de glycosphingolipides, de cholestérol, de glycosyl phosphatidyl inositol ancrés à une protéine. Dans le cas du SARS-CoV2, il semblerait que des microdomaines riches en cholestérol facilitent l'interaction entre les protéines S et ACE2 (7).

Une fois le virus internalisé par fusion des membranes, le génome viral est libéré afin d'être répliqué grâce à la protéase 3-chymotrypsine-like (3CLpro) aussi appelée main protéase (Mpro) et à l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Une fois toutes les composantes du virus synthétisées, elles sont assemblées. De nouvelles particules virales peuvent alors être libérées par exocytose (6). Afin de stopper la prolifération du virus, la recherche d'antiviraux tente d'interférer dans les étapes de ce cycle.

1.1.3. Traitements anti-SARS-CoV-2

Pour répondre à la pandémie mondiale de COVID-19, des moyens préventifs ont été mis en place tels que les gestes barrières, des périodes de confinements ou encore le télétravail afin de limiter la propagation du virus. Initialement, les anti-inflammatoires étaient utilisés afin d'éviter les réactions inflammatoires exacerbées, causées par la libération excessive et incontrôlée de cytokines (choc cytokinique) et engendrant par la suite des lésions pulmonaires aiguës (8). Des vaccins (Pfizer-BioNTech, Moderna, Astra Zeneca, Janssen, Novavax, Sanofi Pasteur) ont été développés en un temps record, afin d'immuniser les populations et de protéger les personnes les plus à risque : personnes âgées, obèses, immunodéprimées (9). Outre les vaccins classiques (vivants atténués, vivants inactivés) des vaccins innovants à ARN messenger ont été conçus et validés. Ceux-ci sont composés d'un ARNm synthétique qui permet, une fois dans l'organisme, de produire la protéine S déclenchant ainsi la réponse immunitaire.

Des traitements sont également nécessaires afin de prendre en charge les cas de COVID-19 potentiellement graves. À ce jour, en France les traitements antiviraux sont indiqués chez les patients à risque de développer des formes graves (immunodéprimées et plus de 65 ans) (10). Selon les recommandations de l’HAS (Haute Autorité de Santé), le Paxlovid est à utiliser en première intention (10). Il associe deux inhibiteurs de protéase, le ritonavir, utilisé initialement pour traiter les infections au VIH, et le nirmatrelvir qui agit plus spécifiquement sur le SARS-CoV-2 en inhibant la protéase 3CLpro. Il présente de nombreuses contre-indications en raison de sa puissante inhibition des cytochromes P450 3A4 pouvant induire des surdoses de certains médicaments en diminuant leur métabolisation/élimination (10). De plus, des études *in vitro* ont démontré que SARS-CoV-2 développe une résistance au nirmatrelvir (11). Le remdesivir est indiqué en deuxième intention (10). Ce pro médicament, analogue nucléotidique, initialement développé pour traiter le virus Ebola, agit sur la réplication du génome en inhibant la RdRp. Celui-ci présente de nombreux effets indésirables et des études *in vitro* ont montré l’évolution possible du SARS-CoV-2 vers une résistance au remdesivir (11). En dernier recours, le sotrovimab peut être employé (10). Cet anticorps monoclonal cible la protéine spike au niveau du domaine de liaison au récepteur (sous unité S1) afin d’inhiber l’entrée du virus dans la cellule. Néanmoins, ce traitement n’est pas efficace sur certains variants. En effet, selon des mécanismes de mutations, de substitutions et de recombinaison de son génome, le SARS-CoV-2 continue d’évoluer en différents variants avec des caractéristiques phénotypiques bien distinctes (transmissibilité, sévérité et évasion immunitaire) (11).

La recherche d’antiviraux se poursuit avec la nécessité d’anticiper l’apparition de résistances et de nouveaux variants et de proposer de nouveaux traitements sûrs et efficaces.

1.2. Les substances naturelles végétales, une source d’antiviraux

Depuis l’antiquité, les plantes sont utilisées par l’Homme à des fins médicinales. Celles-ci sont capables de synthétiser des métabolites spécialisés pouvant posséder des propriétés antivirales. Elles représentent donc une source directe de principes actifs et une source d’inspiration dans la confection de molécules par synthèse ou héli-synthèse, aboutissant à de nouveaux médicaments. L’oseltamivir (Tamiflu), un antiviral utilisé dans le traitement de la grippe, en est un bon exemple. En effet, celui est synthétisé à partir de l’acide shikimique naturel issue de l’anis étoilé (*Illicium verum*) (12). Cette matière première étant une ressource limitée, l’acide shikimique est également produit par fermentation afin de répondre à la demande mondiale (13).

La recherche de traitements du SARS-CoV-2 s'appuie également sur les plantes afin de mettre en évidence des antiviraux d'origine naturelle.

1.2.1. Exemples de plantes étudiés

Le *Cannabis sativa* L fait partie des plantes étudiées, notamment pour les cannabinoïdes qui le composent. L'acide cannabigerolique (CBGA), l'acide cannabidiolique (CBDA) et le CBDA méthyl ester, composés produits par héli-synthèse, ont montré une possible interaction avec la sous-unité S1 de la protéine spike, *in silico* par docking moléculaire (14,15). Des tests *in vitro* ont permis de montrer une inhibition de l'entrée du SARS-CoV-2 dans les cellules Vero E2 avec une CI_{50} de 37 $\mu\text{g/mL}$ pour CBGA et de 24 $\mu\text{g/mL}$ pour CBDA (14). Un test similaire effectué dans une seconde étude a lui révélé une CI_{50} de 42.7 $\mu\text{g/mL}$ pour CBDA et de 18.4 $\mu\text{g/mL}$ pour CBDA méthyl ester (15). Ce dernier composé présente une meilleure stabilité *in vitro* par rapport au CBDA qui, lui, subit une décarboxylation, produisant ainsi le cannabidiol (CBD). Il a été montré que le CBD inhibe indirectement la réplication du SARS-CoV-2. Ce composé agit sur la cellule hôte en induisant un stress du réticulum endoplasmique, bloquant ainsi la synthèse protéique (16).

De récentes études ont également mis en évidence, l'activité anti-SARS-CoV-2 de l'extrait éthanolique d'*Andrographis paniculata*, plante médicinale de la famille des Acanthaceae utilisée en médecine ayurvédique, et de son composé majoritaire, l'andrographolide, une lactone diterpénique. En effet, l'extrait EtOH et l'andrographolide ont montré une activité inhibitrice de la réplication virale dans les cellules épithéliales du poumon (Calu-3) avec des CI_{50} de, respectivement, 9.54 $\mu\text{g/mL}$ et 1.68 μM (17). Une étude antérieure avait aussi montré (i) *in silico*, l'interaction de cette molécule avec la protéase Mpro, et (ii) *in vitro*, l'activité inhibitrice du composé sur cette même protéine avec une CI_{50} de 5 μM (18). En Thaïlande, le traitement de patients covidés à un stade précoce et sans comorbidité par l'extrait de *A. paniculata* a été approuvé en 2021 (19). Des essais cliniques tentent d'évaluer l'efficacité de *A. paniculata* comme traitement de la COVID-19, mais les premiers résultats divergent (20,21).

1.2.2. Criblage d'extraits végétaux

À l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS), bon nombre de plantes médicinales sont également évalués pour leur potentiel thérapeutique contre les maladies infectieuses à l'aide de tests primaires antiviraux, antibactériens, antiparasitaires, Grâce aux partenariats développés avec certaines universités des DROM-COM ou de pays tiers riches en biodiversité tels que la Malaisie, le Vietnam ou Madagascar, l'ICSN mène depuis de

nombreuses années, des campagnes de bioprospection. Tout en respectant le protocole de Nagoya et APA sur l'accès aux ressources et au partage des avantages, ces collectes ont permis de constituer une collection de plus de 14 000 extraits issus d'environ 6 500 plantes. Un peu plus de 800 extraits acétate d'éthyle préparés à partir de différentes parties d'environ 400 espèces de Rutaceae et d'Annonaceae, ont été soumis au criblage primaire contre la réplication du coronavirus humain HCoV-229E par un test cellulaire *in vitro*. Ce virus, moins pathogène, sert de modèle infectieux et constitue le point de départ de l'étude sur des coronavirus plus virulents (SARS-CoV-2). Parmi les 824 extraits testés, onze étaient du genre *Clausena*, et seul l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *C. harmandiana* a révélé une puissante activité inhibitrice du HCoV-229E. Cet extrait a donc été sélectionné pour une étude chimique et biologique approfondie. C'est la première fois qu'une espèce du genre *Clausena* montre un potentiel antiviral contre un coronavirus, aucune revue de la littérature ne fait mention d'une telle activité.

1.3. *Clausena harmandiana*

1.3.1. Description botanique et usages traditionnels

Clausena harmandiana (Pierre) Pierre ex Guillaumin appartient à la famille des Rutaceae, ordre des Sapindales. Cet arbuste, de 1 à 1,5 m de haut, possède des feuilles persistantes imparipennées, aux folioles alternes ou opposées mesurant 5-14 cm de long et 5-8 cm de large (22) (Figure 2). Il forme des inflorescences terminales pubescentes, de 10-20 cm de long, très ramifiées avec des fleurs sessiles assez grandes (5-6 mm de diamètre). Ces fruits ovoïdes, d'un diamètre de 3 à 5 mm, deviennent rouges foncés à maturité et contiennent une ou deux graines (22). Ils sont comestibles, tout comme les feuilles (23). Cette espèce, qui a été récoltée dans le nord du Vietnam, est aussi largement répandue dans tout le Sud-Est asiatique.



Figure 2 : Photos de *C. harmandiana*

C. harmandiana, communément appelée « Song Fa », est utilisée dans la médecine traditionnelle Thaï sous forme de décoction de racines pour traiter les maux de tête, la fièvre, les douleurs à l'estomac et les flatulences (24). C'est une plante riche en huiles essentielles, qui est parfois utilisée comme insecticide.

1.3.2. Phytochimie et pharmacologie

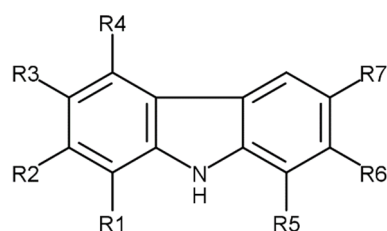
Les études phytochimiques menées sur les racines et brindilles de *C. harmandiana* indiquent la présence de composés coumariniques ou possédant un cycle carbazole. Ces deux familles chimiques sont connues pour leurs activités antioxydantes, anticancéreuses, antiparasitaires, antibactériennes, antifongiques et antivirales (24).

Les alcaloïdes à squelette carbazole se caractérisent par un squelette tricyclique aromatique avec en son centre un pyrrole et en périphérie deux cycles benzéniques (Figure 3). Cette famille de molécules possède des propriétés antivirales à l'encontre du cytomégalo virus humain, du virus de l'hépatite C, du virus de l'herpès simplex, du papillomavirus et du VIH (25). L'heptaphylline et la 7-méthoxyheptaphylline sont également étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses, et neuroprotectives (26). On retrouve également des carbazoles tétracycliques tels que les harmandianamines A et B, la clausevatine D, les clausamines A et B et la girinimbine (Figure 4).

Les coumarines sont des dérivés phénoliques à noyau benzo- α -pyrone (Figure 5). Plusieurs activités antivirales ont été observées contre les virus influenza, les virus de l'hépatite B et C, le VIH, l'entérovirus 71, le coxsackievirus A16, et les virus de la dengue et du chikungunya (27).

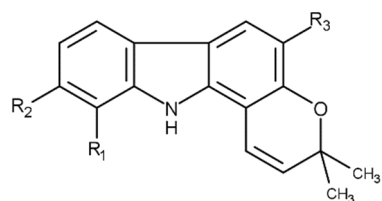
Des phénylpropanoïdes tels que l'harmandianone et le verimol B ont été retrouvés également dans les fruits (28) (Figure 6).

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles, riche en monoterpènes (terpinen-4-ol, α -sabinene, camphène) et en phénylpropènes (anethole), a montré des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (23,29). À l'exception d'une étude de la composition de son huile essentielle, aucuns travaux ne documentent la composition phytochimique des extraits de feuilles de *C. harmandiana*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Heptaphylline	prenyl	OH	CHO	H	H	H	H
7-methoxyheptaphylline	prenyl	OH	CHO	H	H	OCH ₃	H
7-hydroxyheptaphylline	prenyl	OH	CHO	H	H	OH	H
Heptazoline	prenyl	OH	CHO	H	OH	H	H
Clauraila A	OCH ₃	H	CHO	H	H	OCH ₃	H
Clausine C	H	H	COOCH ₃	H	H	OCH ₃	H
Clausine D	OH	H	CHO	prényl	H	H	H
Clausine E (Clauszoline I)	OH	H	COOCH ₃	H	H	H	H
Clausine F	OH	H	COOCH ₃	prényl	H	H	H
Clausine H	H	OCH ₃	COOCH ₃	H	H	OCH ₃	H
Clausine K (Clauszoline J)	H	OCH ₃	COOH	H	H	OCH ₃	H
Clausine L	H	OCH ₃	COOCH ₃	H	H	H	H
Clausine O	H	OH	CHO	H	H	OH	H
Clausine V	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H
Clausine Z	OH	H	CHO	H	H	H	OH
3-formyl-1-hydroxy-7-methoxycarbazole	OH	H	CHO	H	H	OCH ₃	H
Murrayanine	OCH ₃	H	CHO	H	H	H	H
O-demethylmurrayanine	OH	H	CHO	H	H	H	H
Lansine	H	OCH ₃	CHO	H	H	OCH ₃	H
Clauszoline K	H	H	CHO	H	H	OCH ₃	H
Clauszoline N	H	OH	CHO	H	H	H	OH
harmanmine D	OCH ₃	H	COOCH ₃	prényl	H	H	H
Methyl carbazole-3-carboxylate	H	H	COOCH ₃	H	H	H	H
Mukonal	H	OH	CHO	H	H	H	H
7-Methoxymukonal	H	OH	CHO	H	H	OCH ₃	H
Glycosinine	H	OCH ₃	CHO	H	H	H	H
Mukonine	OCH ₃	H	COOCH ₃	H	H	H	H
Mukonidine	H	OH	COOCH ₃	H	H	H	H

Figure 3 : Carbazoles identifiées chez *C. harmandiana*

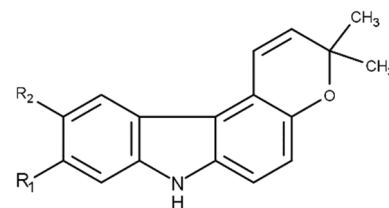


Girinimbine: $R_3 = \text{CH}_3$, ($R_1, R_2 = \text{H}$)

Clauraila B: $R_1 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$, ($R_2 = \text{H}$)

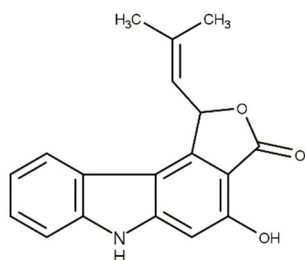
7-methoxymurrayanine: $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{CHO}$, ($R_1 = \text{H}$)

Clauraila E: $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CHO}$, ($R_1 = \text{H}$)

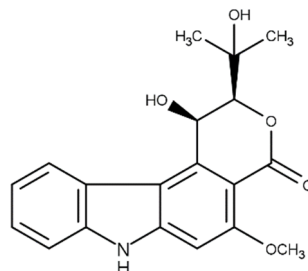


Clauraila C: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COOCH}_3$

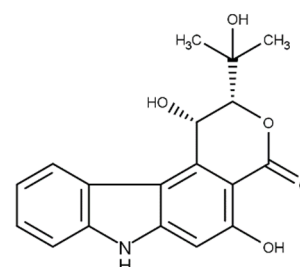
Clauraila D: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CHO}$



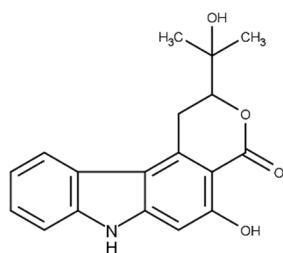
Harmandianamine A



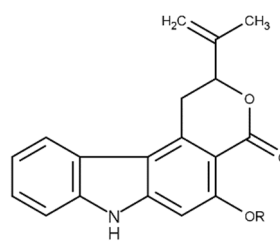
Harmandianamine B



Clausevatine E

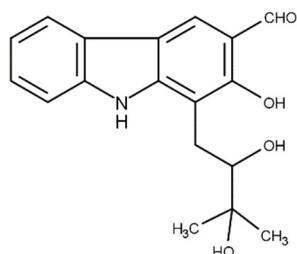


Clausevatine D

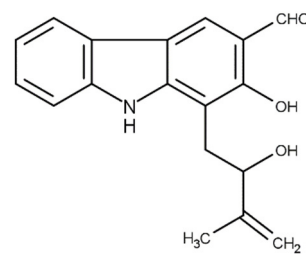


Clausamine A: $R = \text{H}$

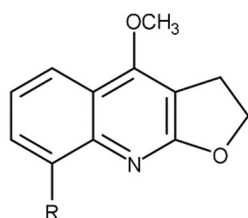
Clausamine B: $R = \text{CH}_3$



Harmandianamine C

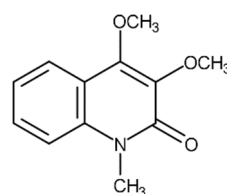


Clausine S

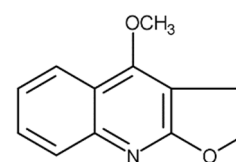


Decamine: $R = \text{H}$

γ -fagarine: $R = \text{OCH}_3$

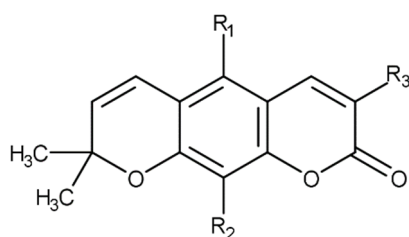


N-Methylswietenidine B



Dictamine

Figure 4 : Alcaloïdes et carbazoles identifiés chez *C. harmandiana*

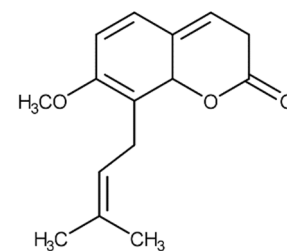


Xanthoxyletine: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

Dentatine: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = 1,1$ –diméthyl-2-propenyl, $R_3 = \text{H}$

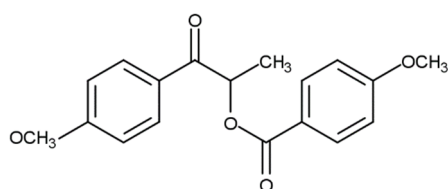
Nordentatine: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = 1,1$ –diméthyl-2-propenyl, $R_3 = \text{H}$

Clausarine: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = 1,1$ –diméthyl-2-propenyl

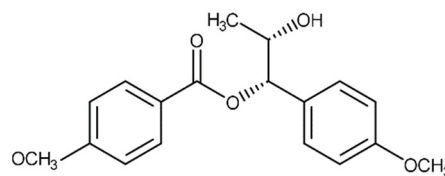


Osthole

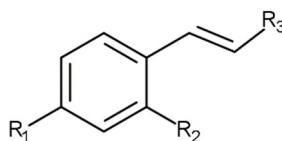
Figure 5 : Coumarines identifiées chez *C. harmandiana*



Harmandianone



Verimol B



(E)-3-(2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)propanoate: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{COOCH}_3$

(E)-methyl p-coumarate: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{COOCH}_3$

(E)-5-methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$

Figure 6 : Phénylpropanoïdes identifiés chez *C. harmandiana*

1.4. Réseaux moléculaires

Depuis 2016, une méthodologie nommée « Réseautage Moléculaire » ou « Molecular Networking » est employée pour investiguer le contenu moléculaire d'échantillons végétaux ou microbiens (30). La construction de réseaux moléculaires est une technique permettant d'avoir une vision d'ensemble du métabolome, de prioriser rapidement les molécules d'intérêt au sein du mélange et ainsi de cibler leur étude. Pour cela, des analyses LC-MS² sont réalisées en amont ou en parallèle du criblage primaire. La structure de la molécule dicte la manière dont elle se fragmente en MS². Deux molécules de structures similaires auront des spectres de fragmentation similaires. Les données issues des analyses LC-MS² sont ensuite prétraitées grâce au logiciel MZmine et un réseau est ensuite généré via les outils de la plateforme GNPS (30) ou du logiciel MetGem (31). En s'inspirant des constellations qui assemblent des groupes d'étoiles dans le ciel, des réseaux sont constitués de clusters d'ions, chaque ion étant représenté

par une perle (ou node). En réalité, un spectre de fragmentation MS² d'un ion parent détecté dans l'analyseur est associé à chaque node. Selon la valeur de cosine score, qui représente un indicateur de similarité structurale calculé entre deux nodes, des liens pourront être créés entre deux nodes s'ils présentent une structure semblable. Ainsi, des constellations (encore appelées clusters), que l'on peut assimiler à une classe chimique sont formées (30).

Dans cette étude, afin de comparer le contenu moléculaire des différentes espèces du genre *Clausena* criblées préalablement, un réseau moléculaire a été généré à l'aide des analyses de LC-MS² de 11 extraits différents. Étant donné qu'un seul des onze extraits avait montré une activité inhibitrice sur HCoV-229E, l'idée était de vérifier si un ou plusieurs clusters d'ions spécifiques étaient associés à cet extrait actif. Ainsi, selon la méthodologie proposée par Olivon et al (ACS Chem. Biol. 2017) un isolement « masse-guidé » des composés susceptibles d'être responsables de l'activité biologique observée a pu être réalisé (32) (Figure 7).

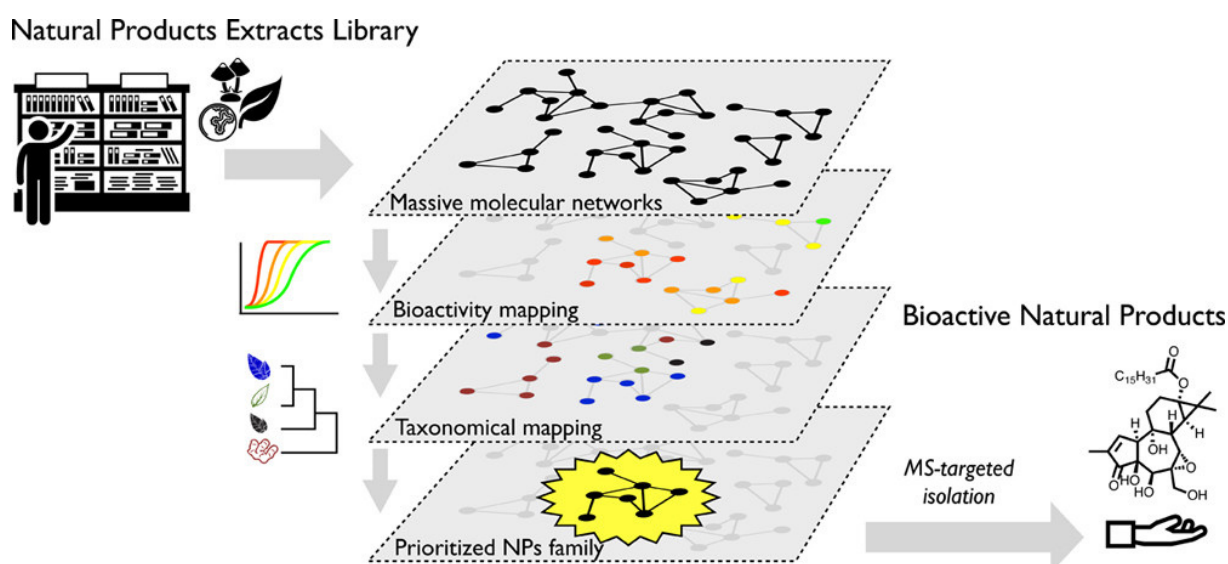
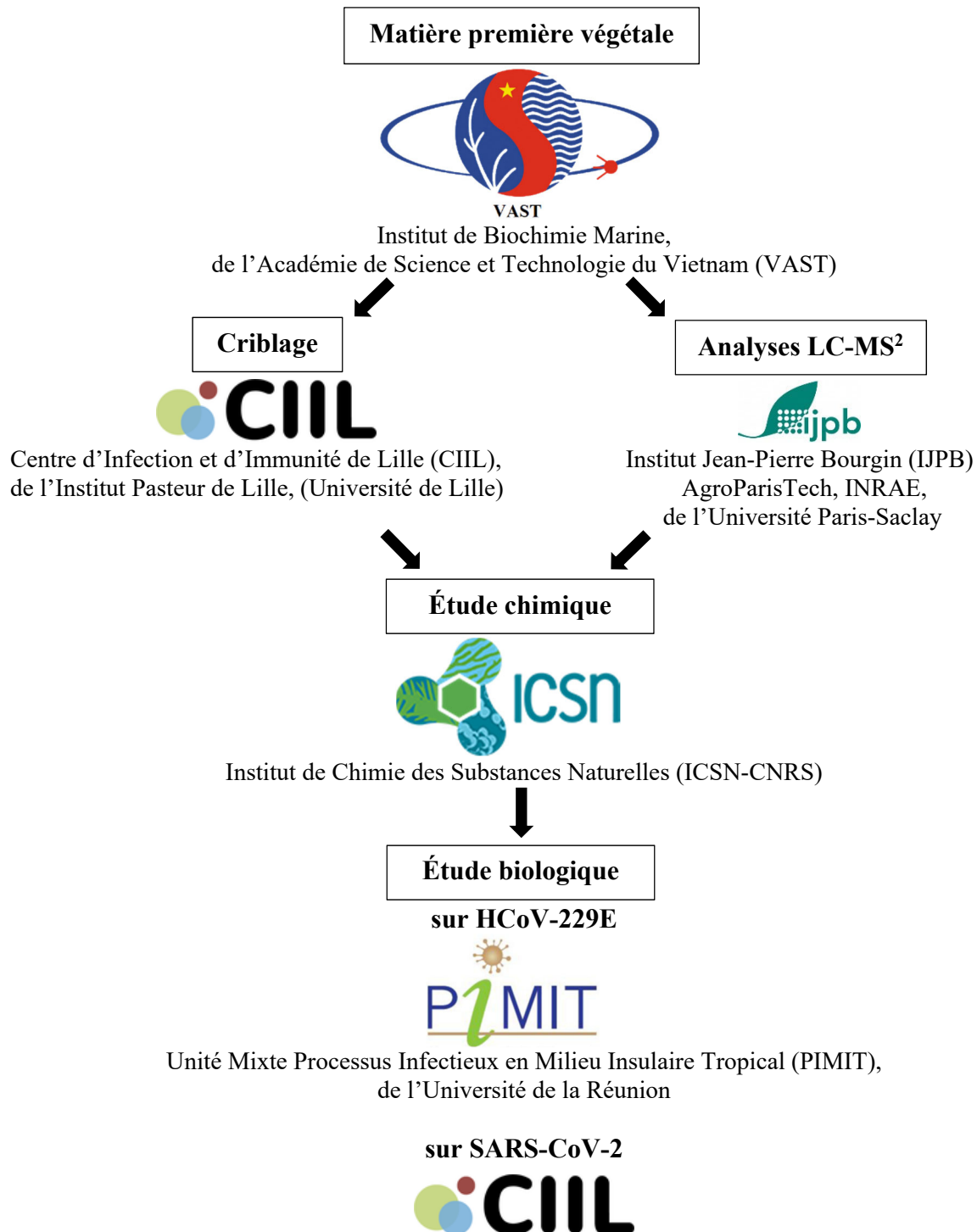


Figure 7 : Schéma illustrant la priorisation des produits naturels bioactifs à l'aide de réseaux moléculaires multi-informationnels (Olivon et al., ACS Chem. Biol. 2017)

2. Publication d'un article scientifique

2.1. Présentation

L'article scientifique intitulé « New Phenolic Lipids from the Leaves of *Clausena harmandiana* Inhibit SARS-CoV-2 Entry into Host Cells » été publié le 14 juillet 2023 dans le journal « Molecules ». Les résultats ainsi que les matériels et méthodes y sont détaillés. L'aboutissement des travaux menés est le fruit de la collaboration de divers partenaires :



2.2. Résumé

La pandémie de COVID-19, induite par la propagation du SARS-CoV-2, a souligné l'impérieuse nécessité de disposer d'antiviraux puissants contre les coronavirus. Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs du SARS-CoV-2, un criblage de 824 extraits préparés à partir de diverses parties de 400 espèces végétales appartenant aux familles des Rutaceae et des Annonaceae a été réalisé à l'aide d'un test cellulaire d'inhibition du HCoV-229E. En raison de son activité importante, l'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *Clausena harmandiana* a été sélectionné pour des investigations chimiques et biologiques plus approfondies. La construction d'un réseau moléculaire à partir des analyses LC-MS² des extraits acétate d'éthyle de *Clausena* spp. et le fractionnement « masse-guidé », ont abouti à l'isolement et à l'identification de trois lipides phénoliques non décrits (**1–3**). Leurs structures ont été déterminées par analyse spectroscopique. Les configurations absolues des composés **1** et **2** ont été déterminées par la méthode de Mosher. À notre connaissance, il s'agit de la première description de lipides phénoliques au sein du genre *Clausena*. Les tests MTS ont montré que les trois composés testés ont une cytotoxicité dose-dépendante avec une concentration cytotoxique à 50 % (CC₅₀) de 1.5, 0.5 et 0.9 µM pour **1**, **2** et **3**, respectivement. L'activité antivirale contre le SARS-CoV-2 a ensuite été montrée, avec des valeurs de CI₅₀ de 0,20 et 0,05 µM pour les composés **2** et **3**, respectivement. Le mécanisme d'action étudié plus en détail, a révélé que les composés **2** et **3** sont tous deux des inhibiteurs de l'entrée du coronavirus en agissant directement sur la particule virale. Les lipides phénoliques de *Clausena harmandiana* pourraient être une source de nouveaux agents antiviraux contre les coronavirus humains.

2.3. Manuscrit publié

Article

New Phenolic Lipids from the Leaves of *Clausena harmandiana* Inhibit SARS-CoV-2 Entry into Host Cells

Marion Chambon ¹, Charline Herrscher ², Dana Al Halabi ², Nathan François ³, Sandrine Belouard ³, Stéphanie Boutet ⁴, Van Cuong Pham ⁵, Thi Mai Huong Doan ⁵, Karin Séron ³, Patrick Mavingui ², Marc Litaudon ^{1,*}, Chaker El Kalamouni ^{2,*} and Cécile Apel ^{1,*}

- ¹ Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France; mllechambon@gmail.com
- ² Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Plateforme Technologique CYROI, 94791 Sainte Clotilde, France; herrscher.charline@gmail.com (C.H.); danahalabi2899@gmail.com (D.A.H.); patrick.mavingui@cnrs.fr (P.M.); herringcharline@gmail.com (C.H.); danahalabi2899@gmail.com (D.A.H.); patrick.mavingui@cnrs.fr (P.M.);
- ³ Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, CHU Lille, 59000 Lille, France; nathanfrancoislille@gmail.com (N.F.); sandrine.belouard@ibl.cnrs.fr (S.B.); karin.seron@cnrs.fr (K.S.)
- ⁴ Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France; stephanie.boutet@inrae.fr
- ⁵ Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet, CauGiay, Hanoi 10072, Vietnam; phamvc@yahoo.com (V.C.P.); doanthimaihuong0707@gmail.com (T.M.H.D.)
- * Correspondence: marc.litaudon@cnrs.fr (M.L.); chaker.el-kalamouni@univ-reunion.fr (C.E.K.); cecile.apel@cnrs.fr (C.A.)



Citation: Chambon, M.; Herrscher, C.; Al Halabi, D.; François, N.; Belouard, S.; Boutet, S.; Pham, V.C.; Doan, T.M.H.; Séron, K.; Mavingui, P.; et al. New Phenolic Lipids from the Leaves of *Clausena harmandiana* Inhibit SARS-CoV-2 Entry into Host Cells. *Molecules* **2023**, *28*, 5414. <https://doi.org/10.3390/molecules28145414>

Academic Editors: Irwin Rose Alencar Menezes, Henrique Douglas Melo Coutinho, Almir Gonçalves Wanderley and Jaime Ribeiro-Filho

Received: 31 May 2023
Revised: 11 July 2023
Accepted: 12 July 2023
Published: 14 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Induced by the spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the COVID-19 pandemic underlined the clear need for antivirals against coronaviruses. In an effort to identify new inhibitors of SARS-CoV-2, a screening of 824 extracts prepared from various parts of 400 plant species belonging to the Rutaceae and Annonaceae families was conducted using a cell-based HCoV-229E inhibition assay. Due to its significant activity, the ethyl acetate extract of the leaves of *Clausena harmandiana* was selected for further chemical and biological investigations. Mass spectrometry-guided fractionation afforded three undescribed phenolic lipids (1–3), whose structures were determined via spectroscopic analysis. The absolute configurations of 1 and 2 were determined by analyzing Mosher ester derivatives. The antiviral activity against SARS-CoV-2 was subsequently shown, with IC₅₀ values of 0.20 and 0.05 μM for 2 and 3, respectively. The mechanism of action was further assessed, showing that both 2 and 3 are inhibitors of coronavirus entry by acting directly on the viral particle. Phenolic lipids from *Clausena harmandiana* might be a source of new antiviral agents against human coronaviruses.

Keywords: *Clausena harmandiana*; phenolic lipids; antiviral activity; coronavirus

1. Introduction

In late 2019, a new coronavirus named SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2) emerged in Wuhan, China, causing a global pandemic. Those with COVID-19 present symptoms of viral pneumonia, and the virus can cause fatal respiratory illness [1]. This novel coronavirus disease spread rapidly around the world, affecting tens of millions of people. Although vaccines have been developed, safe and efficient antiviral treatments are still needed to control the emergence of such viruses.

Recently, with the aim of discovering new antiviral agents, we have developed a molecular networking-based strategy that revolves around deciphering the relationship between spectral networks and biological activities and further exploiting such a relationship to prioritize the isolation of bioactive natural products [2–4]. In the present study, this approach allowed us to target the isolation of specific compounds from the ethyl acetate

(EtOAc) extract of the leaves of *Clausena harmandiana* (associated with a strong inhibition of HCoV-229E replication).

Clausena harmandiana (Pierre) Pierre ex Guillaumin is a plant that belongs to the Rutaceae family and was harvested in north Vietnam. It is a small evergreen tree called “Song Fa” in Thai and is widely distributed in Southeast Asia. It is used in traditional medicines to relieve stomachache, headache, fever, eye-pain, and flatulence [5]. The major compounds found in its roots, root bark, stem bark, twigs, and fruit are carbazole alkaloids and coumarins [5]. Biological studies have shown that these types of molecules have antiviral properties against herpes simplex virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, human cytomegalovirus [6], influenza viruses, Enterovirus 71, coxsackievirus A16, dengue virus, and chikungunya virus [7]. They are also known for their cytotoxicity against several cancer cell lines [8] and their antibacterial, antifungal, and anti-malaria activity [9].

The present study describes the construction of a molecular network from LC-MS² analyses of EtOAc *Clausena* spp. extracts, as well as mass spectrometry (MS)-guided isolation, structure elucidation, and the cytotoxic and antiviral (HCoV-229E and SARS-CoV-2) activities of three phenolic lipids (1–3) newly described from *C. harmandiana*. To the best of our knowledge, this is the first report on the phenolic lipids found in the genus *Clausena*.

2. Results and Discussion

Within a project aiming to investigate the potential antiviral activity of medicinal plants belonging to the Rutaceae and Annonaceae families, a total of 824 EtOAc plant extracts previously filtered on polyamide cartridge were screened for the inhibition of Human alphacoronavirus (HCoV-229E) as a coronavirus model. Huh-7 cells and Huh-7-TMPRSS2 cells were infected with a recombinant molecular clone expressing the luciferase gene reporter HCoV-229E-Luc, which allowed for rapid screening of the several hundred plant extracts. The collection of Rutaceae evaluated included eleven extracts from different plant parts of three species of the genus *Clausena*. Of these, only the crude EtOAc extract of the leaves of *C. harmandiana* showed potent antiviral activity; therefore, the crude EtOAc extract was selected for further chemical and biological investigations.

All *Clausena* extracts were profiled by LC-HRESIMS² as previously described [2–4]. Briefly, the samples were analyzed using a data-dependent acquisition mode. The resulting spectral data were preprocessed via MZmine 2 [10] and structured into molecular networks [11] using Metgem [12] (Figure 1A). The color code indicates which extract(s) each ion comes from. A cluster quasi-specific to the leaf extract of *C. harmandiana* (Figure 1B, in red) was highlighted. As the only active extract, the compounds corresponding to these ions were most likely responsible for the antiviral activity. Therefore, they were subjected to targeted isolation. The EtOAc crude extract was first subjected to silica gel flash column chromatography, yielding 11 fractions (F1–F11); subsequently, the fractions were analyzed using LC-HRESIMS. F4 were shown to contain compounds corresponding to the cluster of interest and, with an IC₅₀ value of 0.06 µg/mL, displayed strong anti-HCoV-229E activity. From this fraction, C-18 column chromatography afforded the three undescribed phenolic lipids (referred to here as phenolic lipids 1–3, the structures of which are shown in Figure 2).

2.1. Structural Elucidation

Compound 1 was obtained as a gray amorphous powder. Its molecular formula was defined as C₂₄H₄₀O₃ by HRESIMS at *m/z* 359.2931 [M-H₂O + H]⁺ (Calcd. for [C₂₄H₃₉O₂]⁺, 359.2950), thus requiring five double bond equivalents. The ¹H-NMR spectrum of 1 (Table 1) showed aromatic resonances for a 1,2,4-trisubstituted benzene ring [δ_{H} 6.77 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.60 (1H, dd, *J* = 2.7, 8.5 Hz, H-5), 6.54 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-3)], resonances for a methyl group at δ_{H} 0.90 (triplet, CH₃-18'), a saturated carbon chain (δ_{H} 1.25–1.28), and two olefinic protons at δ_{H} 5.36, suggesting the presence of an unsaturated alkyl chain. Analysis of the ¹H-¹H COSY spectrum revealed structural fragments from C-1' to C-4' and C-12' to C-18' (Figure 3). The signal at δ_{H} 2.01 ppm corresponded to H-13' and H-16', the four protons adjacent to the double bond, and the signals observed as multiplets at

δ_{H} 2.75 and 3.96 were allocated to H₂-1' and H-2', respectively. The ¹³C-NMR spectrum (Table 1) of compound 1 combined with HSQC spectrum showed carbon resonances for three non-protonated carbons—C-2, C-4, and C-1—at δ_{C} 126.9, 149.4, and 149.6, respectively. This spectrum also showed six methines (δ_{C} 74.9, 115.1, 118.2, 118.4, 130.0, and 130.5), one methyl carbon at δ_{C} 14.2, and several methylenes at 23.0–30.0 ppm. Analysis of these data suggested that the structure of 1 had an aromatic ring substituted by two hydroxy groups and a linear alkyl side chain bearing one hydroxy group and one double bond.

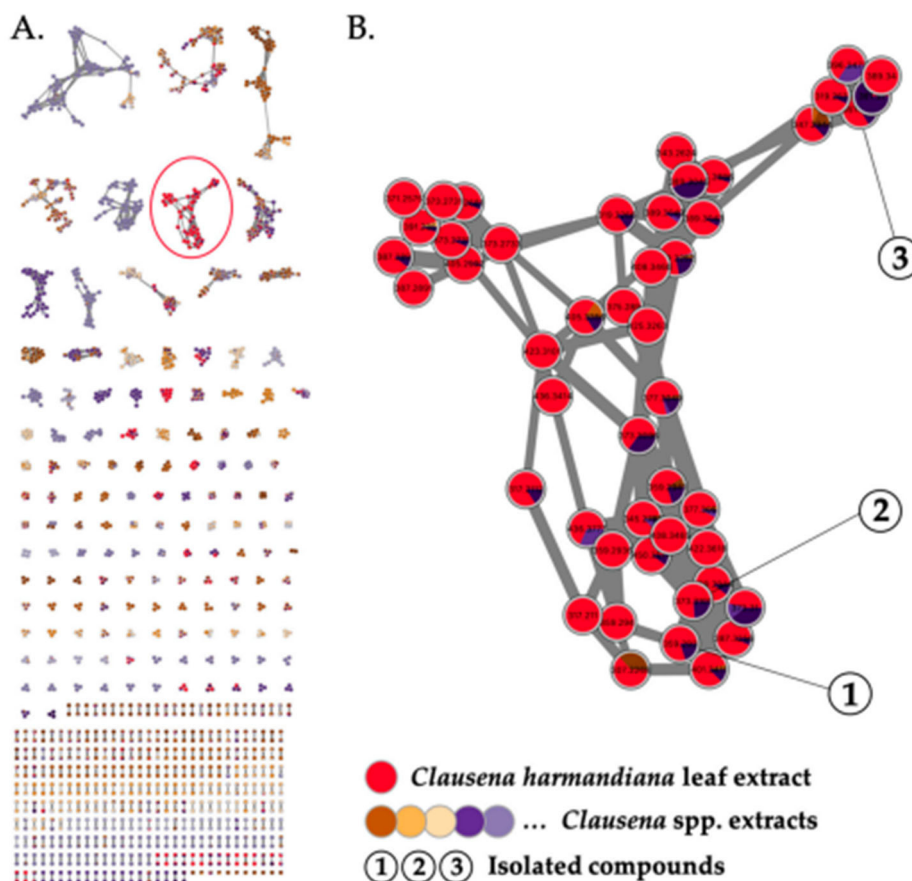


Figure 1. (A) Molecular network generated from LC-HRESIMS² analysis of 11 EtOAc *Clausena* spp. extracts (self-loop nodes were removed from the network). (B) Detection of a cluster of ions specific to the active leaf extract of *Clausena harmandiana* (in red). Targeted isolation of compounds 1–3.

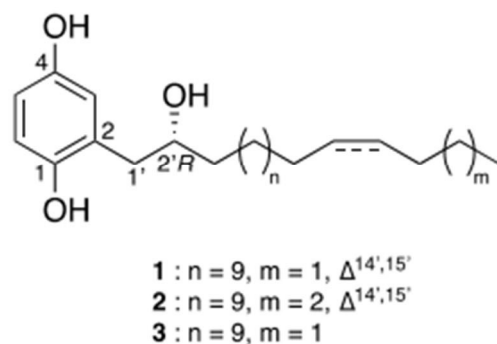
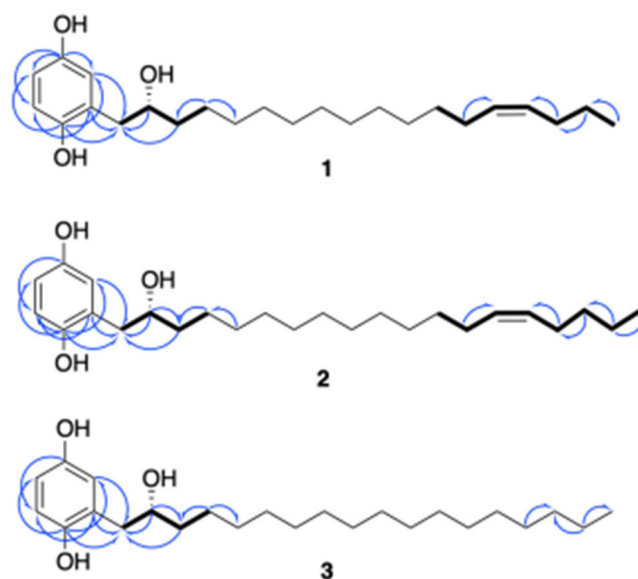


Figure 2. Chemical structures of phenolic lipids 1–3.

Table 1. ^1H NMR (300 MHz) and ^{13}C NMR (75 MHz) of compounds 1–3 in CDCl_3 (1 and 2) and acetone- d_6 (3).

No.	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1-OH	149.6	-	149.6	-	149.6	-
2	126.9	-	127.0	-	127.5	-
3	118.4	6.54 (d, $J = 2.7$)	118.4	6.54 (d, $J = 2.9$)	118.6	6.63 (d, $J = 2.7$)
4-OH	149.4	-	149.3	-	150.8	-
5	115.1	6.60 (dd, $J = 2.7, 8.5$)	115.1	6.61 (dd, $J = 2.9, 8.5$)	114.5	6.58 (dd, $J = 2.7, 8.5$)
6	118.2	6.77 (d, $J = 8.5$)	118.2	6.78 (d, $J = 8.5$)	117.3	6.67 (d, $J = 8.5$)
1'	39.2	2.75 (m)	39.2	2.75 (m)	39.8	2.75 (m)
2'	74.9	3.96 (m)	74.9	3.96 (m)	73.3	3.95 (m)
3'	37.3	1.50 (m)	37.3	1.50 (m)	37.6	1.52 (m)
4'	26.0	1.37 (m)	26.0	1.35 (m)	26.2	1.40 (m)
5'–12'	29.6–30.1	1.25–1.28	29.7–30.1	1.27–1.29	29.1–30.1	1.33
13'	27.6	2.01 (m)	27.3	2.02 (m)	30.1	1.33
14'	130.5	5.36 (t, $J = 5.4$)	130.2	5.35 (t, $J = 4.6$)	30.2	1.33
15'	130.0	5.36 (t, $J = 5.4$)	130.2	5.35 (t, $J = 4.6$)	30.2	1.33
16'	29.6	2.01 (m)	27.5	2.02 (m)	32.4	1.33
17'	23.2	1.37 (m)	32.3	1.32 (m)	23.1	1.33
18'	14.2	0.90 (t)	22.7	1.32 (m)	14.1	0.92 (t)
19'			14.3	0.90 (t)		

**Figure 3.** Key ^1H - ^1H COSY (in bold) and HMBC (blue arrows) correlations of compounds 1–3.

The positions of the three hydroxy groups at C-1, C-4, and C-2' and the double bond at C-14'/C-15' were confirmed by 2D NMR analyses (Figure 3). The para position of phenol groups was confirmed from the HMBC correlations from H-1' (δ_{H} 2.75) to C-3 (δ_{C} 118.4); and H-3 (δ_{H} 6.77) to C-1' (δ_{C} 39.2). In addition, the chemical shift values of the aromatic carbons are similar to those reported in the literature for close analogues [13]. The stereochemistry at the double bond between C-14' and C-15' was assigned as Z on the basis of allylic carbon resonances at δ_{C} 27.6 and 29.6 ppm (C-13' and C-16') [14] and to similar values of coupling constants of structurally close alkenylresorcinols [15].

Due to the specific rotation value of 0 for compound 1, we initially assumed that this compound could be a racemic mixture. However, it has been reported in the literature that choerosponols B and C, which possess similar planar structures and $[\alpha]_{\text{D}}$ values of 0, are

enantiomerically pure [16]. Thus, to establish the absolute configuration of compound **1**, Mosher ester derivatization experiments were performed [17]. The secondary alcohol was converted into the (*S*)- and (*R*)-MPTA esters (**1a** and **1b**) following the procedure described in Brel et al. [18]. Based on the $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$) values of both MPTA esters (Figure 4), the *R* absolute configuration of C-2' was determined.

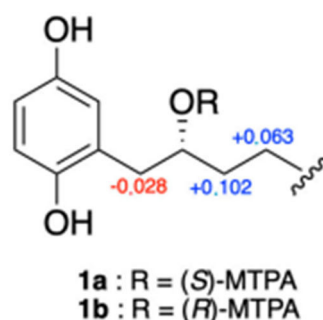


Figure 4. $\Delta\delta$ values (ppm) for (*S*)- and (*R*)-MPTA esters of compounds **1a** and **1b**.

Compound **2** possessed a molecular formula of $C_{25}H_{42}O_3$ as deduced from HRESIMS at m/z 373.3112 $[M-H_2O + H]^+$ (Calcd. for $[C_{24}H_{39}O_2]^+$, 373.3107). NMR data were almost the same to those of **1** but suggested the presence of one additional methylene. Indeed, the ^{13}C -NMR spectrum (Table 1) showed an extra carbon at 32.3 ppm. Its position was determined thanks to HMBC correlations (Figure 3) from H-17' (δ_H 1.32) to C-18' (δ_C 22.7) and C-16' (δ_C 27.5). As for compound **1**, the configuration of the double bond was assigned as *Z*, with allylic carbon at δ_C 27.3 and 27.5 (C-13' and C-16') and a coupling constant of 4.6 Hz. The analysis of the Mosher esters determined the absolute configuration of C-2' as *R*. The chemical shift differences $\Delta\delta_{S-R}$ of the neighboring protons were similar to those observed for compound **1** [H-1' (−0.027 ppm), H-3' (+0.131 ppm), H-4' (+0.064 ppm)]. This compound was assigned as (2'*R*)-2-[(14'*Z*)-2'-hydroxynonadec-14'-en-1'-yl]benzene-1,4-diol and is the *R* enantiomer of choerosponol B [16].

Compound **3**, (2'*R*)-(2-(2-hydroxyoctadecyl)benzene-1,4-diol), possessed the molecular formula of $C_{24}H_{42}O_3$, as deduced from conducting HRESIMS at m/z 361.3047 $[M-H_2O + H]^+$ (Calcd. for $[C_{24}H_{39}O_2]^+$, 361.3107). The NMR data of compound **3** were almost identical to those of **1** but without a double bond, as deduced from the absence of carbon around 130 ppm in the ^{13}C -NMR spectrum (Table 1). Based on biogenetic considerations, the (*R*) absolute configuration of C-2' was proposed, as for compounds **1** and **2**.

2.2. Cytotoxicity and H-CoV-229E Inhibition Assays

Compounds **1–3** were first evaluated for their cytotoxic activities against Huh7, a human hepatocyte cell line. All compounds showed cytotoxic activities in the micromolar range (CC_{50} between 0.5 and 1.3 μM) (Table 2). The maximum non-toxic concentration that provides more than 95% viability was 0.25 μM for all three tested compounds. This concentration was then used as the highest concentration for antiviral assays. Thus, to assess whether compounds **1–3** exert antiviral activity against HCoV-229E, Huh7 cells were infected with the recombinant molecular clone of HCoV-229E that expresses the luciferase (HCoV-229E-Luc) at the MOI of 0.5 in the presence of different concentrations (serial dilution starting from 0.25 μM) of each compound throughout the infection [19]. The results indicated that compound **1** showed no antiviral effect at non-cytotoxic doses, while compounds **2** and **3** exert dose-dependent antiviral activity at non-cytotoxic concentrations, with IC_{50} values of 0.1 and 0.05 μM , respectively, resulting in a selectivity index (SI) of 5 and 16 for **2** and **3**, respectively (Table 2).

Table 2. Cytotoxicity and antiviral activity against HCoV-229E of 1, 2, and 3.

Compound	CC ₅₀ (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	SI ^c
1	1.30 ± 0.10	na	-
2	0.50 ± 0.05	0.10 ± 0.03	5
3	0.80 ± 0.10	0.05 ± 0.04	16

Cytotoxic concentration (CC₅₀) and inhibitory concentration (IC₅₀) were obtained by performing nonlinear regression followed by the construction of the sigmoidal concentration–response curves from Figure 4. ^a Concentration inhibited cell viability by 50%; ^b Concentration inhibited infection by 50%; ^c Selectivity index (CC₅₀/IC₅₀). na: non active.

2.3. Cytotoxicity and SARS-CoV-2 Inhibition Assays

Prior to the assessment of their antiviral activity against SARS-CoV-2, the cytotoxicity of compounds 1–3 was determined against Vero-E6 cells (Figure 5A). MTS assays showed that all tested compounds exert similar dose-dependent cytotoxicity on Vero-E6 cells with 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) values of 1.5 ± 0.20, 0.5 ± 0.08, and 0.9 ± 0.20 μM for 1, 2, and 3, respectively (Figure 5A). Then, the antiviral activity of the three compounds was evaluated against SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. For this, Vero cells were infected with the pandemic strain of SARS-CoV-2 at an MOI of 0.1 for 48 h in the presence of different non-cytotoxic concentrations of the compounds (Figure 5B). The results showed that only 2 and 3 exert dose-dependent antiviral activity against SARS-CoV-2 at non cytotoxic concentrations (Figure 4B), with IC₅₀ values of 0.20 ± 0.06 and 0.05 ± 0.03 μM, respectively. The selectivity index (SI) values—2.5 and 18 for 2 and 3, respectively—are similar to those obtained with HCoV-229E. Taken together, these results showed that 3 is a strong inhibitor of SARS-CoV-2 infection.

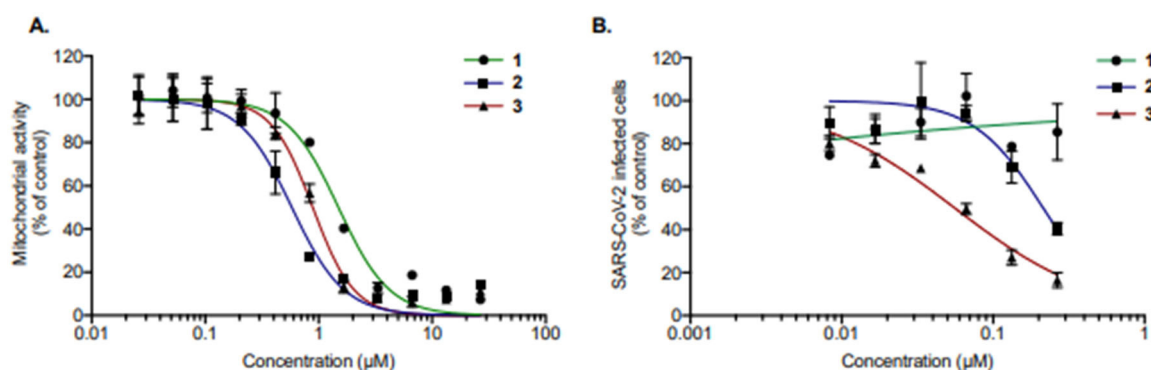


Figure 5. Compounds 2 and 3 exert antiviral activity against SARS-CoV-2 at non-cytotoxic concentrations. (A) Vero-E6 cells were treated with two-fold serial dilutions (25 to 0.02 μM) of 1, 2, or 3 for 48 h. Cell viability was evaluated through MTS assay. The results are means ± SD of three independent experiments and are expressed as relative value compared to the Mock-treated cells. (B) Vero-E6 cells were infected with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.1 in the presence of different non-cytotoxic concentrations (0.25 to 0.01 μM) of each compound for 48 h, after which cells were fixed for 20 min with 3.7% PFA. Cells were then rinsed with PBS and processed for flow cytometric assay. Data are expressed relative to the Vehicle. The results are expressed as means ± SD of the three independent experiments.

2.4. Characterization of the Antiviral Mechanism of Action of Compounds 2 and 3

To gain insights into the mechanism of action of 2 and 3 against coronaviruses, different experimental approaches were performed during HCoV-229E infection. Compounds were added at different stages of the viral replication cycle. To assess the impact on viral entry stage, HCoV-229E and compounds 2 and 3 were simultaneously co-added to the cells for 1 h (Figure 6A). Isoquercitrin (Q3G), which is known to inhibit the endocytic pathway [20], was used as a positive control [20], and compound 1 served as a negative control. To investigate whether 2 or 3 interfere with HCoV-229E replication, cells were first challenged

with HCoV-229E for 1 h and then treated with 2 or 3 (Figure 6A). Remdesivir, which is known to inhibit virus replication, was used as a positive control [21].

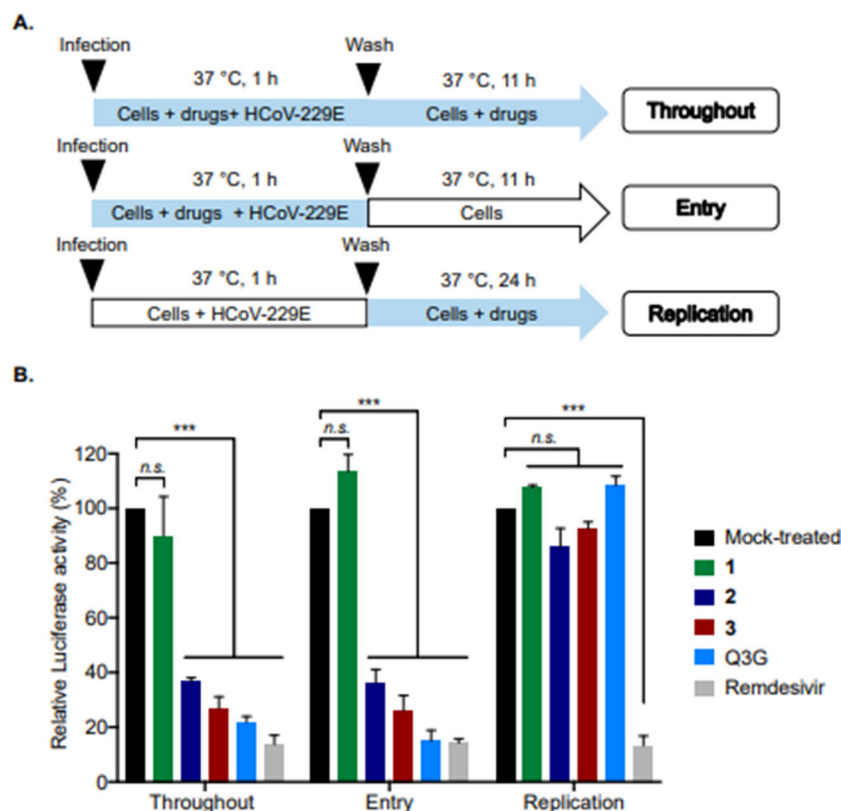


Figure 6. Compounds 2 and 3 inhibit HCoV-229E entry in human cells. (A) Schematic representation of time-of-drug addition approach performed to characterize the mechanism of action of compounds 2 and 3 (0.2 μM) in HCoV-229E-Luc-infected Huh7 cells. Q3G (25 μM) and Remdesivir (0.1 μM) were used as positive controls. Blue arrows indicate the presence of compounds. (B) Results of Luciferase activity in HCoV-229E-infected Huh7 cells under different conditions presented in panel A. The results are means \pm SD of the three independent experiments and are expressed as relative value compared to the Mock-treated cells (Black column). One-way ANOVA and Dunnett's test were used for statistical analysis (** $p < 0.001$; n.s. = not significant).

Our data showed that no inhibition of infection was observed when 2 or 3 were added after virus inoculation, suggesting that 2 and 3 do not affect the virus replication step, unlike remdesivir (positive control), which strongly inhibited viral replication (Figure 6B). In contrast, strong inhibition of infection was noticed when 2 and 3 were present during the virus entry step (Figure 6B), as well as the positive control Q3G. Taken together, these results suggest that 2 and 3 act as virus entry inhibitors.

To further elucidate the underlying mechanism of antiviral action, we investigated whether 2 and 3 target the virus or the cells. HCoV-229E particles were pre-incubated with 2 or 3 (0.2 μM) for 1 h and then diluted 20-fold prior to infection to reach a concentration of 0.01 μM for inoculation (Figure 7A), a concentration that does not inhibit HCoV-229E-Luc infection for both 2 and 3 (as shown above). Compound 1 was used as a negative control. In parallel, Huh7 cells were infected with HCoV-229E-Luc and subsequently treated with 0.2 and 0.01 μM of 2 or 3, serving as controls (Figure 7B). Phospholipase (PLA2), which is known to have broad-spectrum virucidal activity, was used as a positive control [22]. The results clearly indicated that when HCoV-229E-Luc was pre-incubated with 2 or 3 at a high concentration (0.2 μM) before infection at a low concentration (0.01 μM), the antiviral activity was much stronger than when infection was performed in the presence of 0.01 μM

of 2 or 3 without pre-incubation (Figure 7B). Compounds 2 and 3 were able to inhibit the infection up to 60 and 80%, respectively, as well as PLA2, which inhibited 90% of infection (Figure 7B). Taken together, these results suggest that 2 and 3 inhibit HCoV229E entry by acting directly on the viral particle.

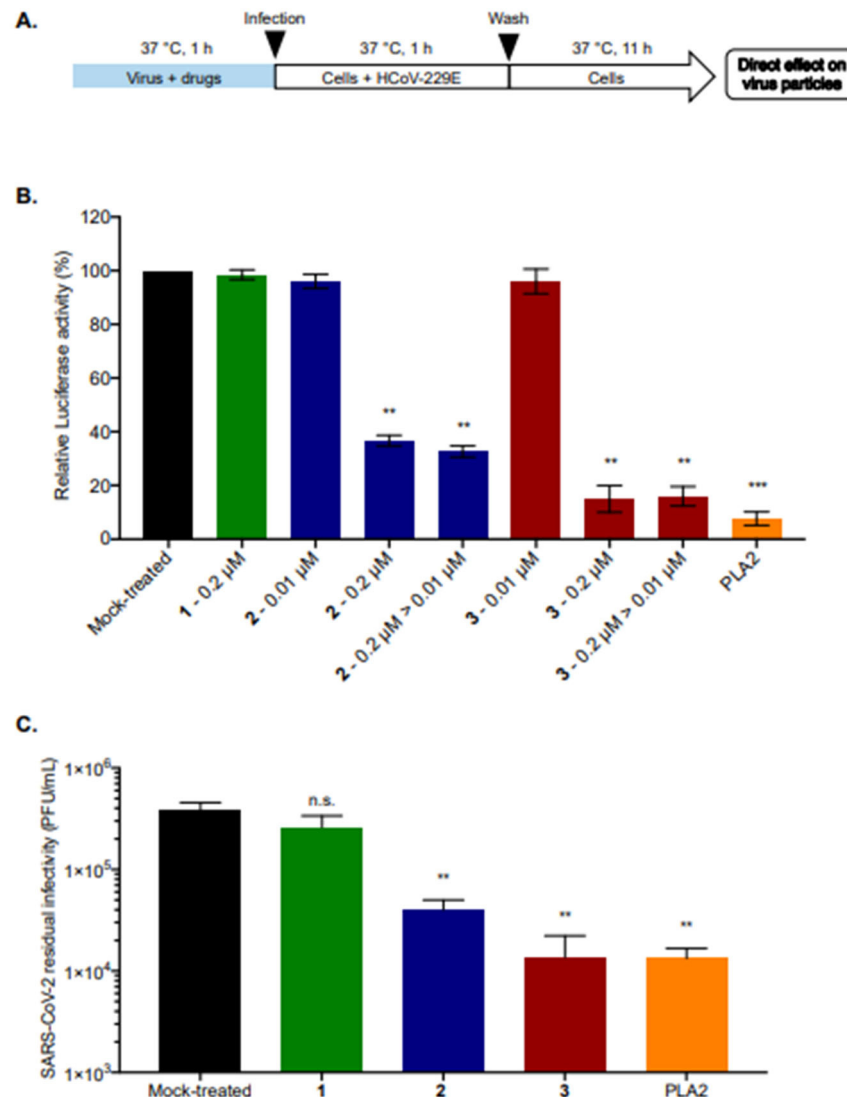


Figure 7. Compounds 2 and 3 inhibit viral entry by a direct action on the viral particle. (A) Schematic representation of free-virus particle assay to characterize the virucidal or virostatic effect of 2 and 3 (0.2 μ M) against HCoV-229E-Luc. PLA2 (5 μ g/mL) was used as a positive control. The amount of virus used for inoculation was identical for the different conditions; (B) Huh7 cells were infected with HCoV-229E-Luc in the presence of 0.2 or 0.01 μ M of 2 or 3 or with HCoV-229E-Luc previously treated with 0.2 μ M of 2 or 3 and then diluted 20 times, leading to a concentration of 0.01 μ M of 2 or 3 for the incubation period (0.2 μ M to 0.01 μ M: 0.2 μ M > 0.01 μ M). At 12 h post-infection, the cells were lysed, and Luciferase activity was quantified. (C) SARS-CoV-2 inoculum was pre-incubated for 1 h with 1, 2, or 3 (0.2 μ M) or 0.01% DMSO for the Mock-treated cells. PLA2 (5 μ g/mL) was used as a positive control; The residual of infectivity was titrated on Vero-E6 cells. The results are means \pm SD of three independent experiments and are expressed as relative value compared to the Mock-treated cells. One-way ANOVA and Dunnett's test were used for statistical analysis (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; n.s. = not significant).

To assess whether the antiviral activity of **2** and **3** against SARS-CoV-2 is also attributable to their ability to inhibit virus infectivity by acting directly on the virus particle, a residual infectivity assay was carried out. SARS-CoV-2 virus particles were incubated with **2** or **3** (0.2 μM). Compound **1** (0.2 μM) and PLA2 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as negative and positive controls, respectively. After 1 h of incubation, titration of residual infectivity showed that compounds **2** and **3** were able to decrease viral progeny up to 1 log as well as the positive control. Compound **3** appears to be the most effective at a non-cytotoxic dose of 0.2 μM , where the molecule is able to significantly inhibit SARS-CoV-2 infectivity by more than 1 log. These results suggest that compounds **2** and **3** possess antiviral activity against SARS-CoV-2 by acting directly on the virus particle.

From a structural standpoint, compounds **1–3** are monosubstituted hydroquinone and belong to a large family of phenolic lipids. They are structurally very similar to choerosponols B and C isolated from *Choerospondias axillaris*, an Anacardiaceae native to Nepal [16]. They all possess a C-2' hydroxylated unsaturated (**1** and **2**) or saturated (**3**) alkyl side chain, which only differs in the number of carbons: 18 for **1** and **3**; 19 for **2**. As choerosponols and with IC_{50} values in the micromolar range, compounds **1–3** exhibited strong cytotoxic activities on different cell lines. In contrast, only compounds **2** and **3** exert strong antiviral activities against HCoV-229E and SARS-CoV-2 viruses; compound **1** shows no antiviral activity. While the presence of a double bond in the C-14' position of the alkyl side chain of compound **1** could explain the activity difference between compounds **1** and **3**, it cannot explain the difference regarding compound **2**, which only possesses an additional methylene group on the alkyl chain. Therefore, the discrepancy between the antiviral activity of **1** and **2** is difficult to explain rationally, and further studies are needed to explain it better.

Multi-informative molecular networks, which compare taxonomically related samples, are a highly useful approach for highlighting a chemical family of interest within a bioactive extract. In the present study, we used molecular networks in conjunction with biological data, which enabled us to directly target the isolation of two compounds with strong antiviral activities.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

The leaves of *Clausena harmandiana* were collected in Hòa Bình, Mai Châu, Vietnam, in April 1996 and identified by Dr. Nguyen Cuong. A voucher specimen (VN-0081) was deposited at the Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi.

3.2. Phytochemical Analysis—General Experimental Procedures

Optical rotations were measured at 24 °C on an MCP 300 polarimeter (Anton Paar, Les Ulis, France). UV spectra were recorded using a Varian Cary 100 UV-vis spectrophotometer. IR spectra were recorded using a PerkinElmer BX FT-IR spectrometer. All NMR spectra were recorded using a 300 MHz instrument (Avance 300, Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts (relative to CDCl_3 or acetone for **3**) are in ppm, and coupling constants (J) are in Hz. The multiplicity of signals is reported as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; m, multiplet. HR-ESI-MS were run on an ESI-TOF spectrometer (LCT, Waters, Guyancourt, France). Nucleodur analytical and preparative C-18 columns (250 mm \times 4.6 mm and 250 mm \times 21 mm; 5 μm Macherey-Nagel, Hoerd, France), were used for preparative HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a sample manager (Waters 2767), a column fluidics organizer, a binary pump (Waters 2525), a UV-Vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. A prepacked puriFlash (Intershim, Montluçon, France) silica cartridge was used for flash chromatography using a Combiflash Rf 200i (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA). For thin-layer chromatography (TLC), pre-coated

silica gel 60 F254 (0.25 mm, Merck, Saint Quentin Fallavier, France) plates were used. All other chemicals and solvents were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

3.3. Extraction and Isolation

Dried leaves of *C. harmandiana* (150 g) were extracted with EtOAc (3 × 200 mL, 1 h each at room temperature). The EtOAc solutions were combined and evaporated to dryness under reduced pressure to give a crude residue (1.2 g). This residue was subjected to flash chromatography over silica gel and eluted with a gradient of Heptane-EtOAc (90:10 to 0:100) then EtOAc-MeOH (95:5 to 80:20) to yield 11 fractions (F1–F11). F4 (151 mg) was further purified by preparative HPLC (C-18 column, Nucleodur, 250 mm × 21 mm, 5 μm, CH₃CN-H₂O 90:10 + 0.1% formic acid at 21 mL/min) to yield compounds **1** (34.0 mg; *t_R* 13.6 min), **2** (63.3 mg; *t_R* 17.4 min), and **3** (10.6 mg; *t_R* 23.4 min).

3.3.1. (2′. R)-2-[(14′Z)-2′-Hydroxyoctadec-14′-en-1′-yl]benzene-1,4-diol (**1**)

Gray amorphous powder. $[\alpha]_D^{24} \pm 0.0$ (c 1, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 294 nm (3.7), 202 nm (4.5); IR ν_{\max} 3190, 2919, 1458, 1195, 1012, 812, and 722 cm⁻¹. HRESIMS *m/z*: 359.2931 [M-H₂O + H]⁺ (Calcd. for C₂₄H₃₉O₂⁺, 359.2950). ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz); see Table 1.

3.3.2. (2′. R)-2-[(14′Z)-2′-Hydroxynonadec-14′-en-1′-yl]benzene-1,4-diol (**2**)

Beige amorphous powder. $[\alpha]_D^{24} \pm 0.0$ (c 1, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 293 nm (3.1), 201 nm (3.9); IR ν_{\max} 3355, 2920, 1451, 1197, 1101, 814, and 721 cm⁻¹. HRESIMS *m/z*: 373.3112 [M-H₂O + H]⁺ (Calcd. for C₂₅H₄₁O₂⁺, 373.3107). ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz); see Table 1.

3.3.3. (2′. R)-2-(2-Hydroxyoctadecyl)benzene-1,4-diol (**3**)

Beige amorphous powder. $[\alpha]_D^{24} + 2.0$ (c 1, acetone); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ), 294 nm (3.5), 202 nm (4.3); IR ν_{\max} 3181, 2918, 1463, 1206, 1101, 822, and 719 cm⁻¹. HRESIMS *m/z*: 361.3047 [M-H₂O + H]⁺ (Calcd. for C₂₄H₄₁O₂⁺, 361.3107). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz) and ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz); see Table 1.

3.4. Preparation of (S)-MTPA and (R)-MTPA Esters of **1** and **2**

In an NMR sample tube, 1.0 mg of dimethylaminopyridine (DMAP) was added to 1.0 mg of compound **1** or **2**. Additionally, 9 μL of pyridine-*d*₅ and 600 μL of CDCl₃ were added to the mixtures. Then, (R)-MTPA chloride (5 μL, 27 μmol) was added. The resultant reaction mixtures were stirred at RT for 2 h to produce (S)-MTPA esters **1a** and **2a**. The identical procedure was carried out to obtain the (R)-MTPA esters **1b** and **2b** from (S)-MTPA chloride.

(S)-MTPA Ester (**1a**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.91 (3H, t, H-18′), 1.34 (2H, m, H-17′), 2.02 (4H, m, H-13′, H-16′), 1.27 (16H, m, H-5′-12′), 5.36 (2H, m, H-14′, H-15′), 2.67 (2H, m, H-1′), 5.21 (1H, m, H-2′), 1.46 (2H, m, H-3′), 1.21 (2H, m, H-4′), 3.25, 3.43 (3H, s, MTPA-OCH₃).

(R)-MTPA Ester (**1b**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.91 (3H, t, H-18′), 1.34 (2H, m, H-17′), 2.02 (4H, m, H-13′, H-16′), 1.27 (16H, m, H-5′-12′), 5.37 (2H, m, H-14′, H-15′), 2.70 (2H, m, H-1′), 5.22 (1H, m, H-2′), 1.35 (2H, m, H-3′), 1.15 (2H, m, H-4′), 3.26, 3.43 (3H, s, MTPA-OCH₃).

(S)-MTPA Ester (**2a**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.82 (3H, t, H-19′), 1.25 (4H, m, H-17′, H-18′), 1.95 (4H, m, H-13′, H-16′), 1.19 (16H, m, H-5′-12′), 5.28 (2H, m, H-14′, H-15′), 2.58 (2H, m, H-1′), 5.13 (1H, m, H-2′), 1.37 (2H, m, H-3′), 1.13 (2H, m, H-4′), 3.17, 3.34 (3H, s, MTPA-OCH₃).

(R)-MTPA Ester (**2b**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.82 (3H, t, H-19′), 1.25 (4H, m, H-17′, H-18′), 1.95 (4H, m, H-13′, H-16′), 1.19 (16H, m, H-5′-12′), 5.28 (2H, m, H-14′, H-15′), 2.61 (2H, m, H-1′), 5.14 (1H, m, H-2′), 1.24 (2H, m, H-3′), 1.07 (2H, m, H-4′), 3.17, 3.34 (3H, s, MTPA-OCH₃).

3.5. Data-Dependent LC-ESI-HRMS² Analysis

LC analyses were performed using a Thermo Ultimate 3000 system equipped with a Cortecs C₁₈ column (2.1 × 100 mm; 2.7 μm, Waters). The mobile phase consisted of water-acetonitrile (H₂O-CH₃CN) acidified with 0.1% formic acid (90:10) held for 2 min, then a gradient from 90:10 to 0:100 in 20 min held at 0:100 for 8 min at a flow rate of 600 μL·min⁻¹. The temperature of the column oven was set to 40 °C, and the injection volume was set to 5 μL. LC-ESI-HRMS² analyses were achieved by coupling the LC system to an Impact II Bruker quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an ESI dual source (operating in the positive-ion mode). Source parameters were set as follows: end plate offset—350 V, capillary voltage—4500 V, nebulizer pressure—60 psi, drying gas flow rate—10 L·min⁻¹, drying gas temperature—240 °C. MS scans were operated in full-scan mode from *m/z* 100 to 1400 (at 6 Hz). MS¹ scan was followed by MS² scans of the five most intense ions above an absolute threshold of 2000 counts. Selected parent ions were fragmented with a collision energy fixed at 30 eV and using an *m/z* dependent isolation window of 2–4 amu. The mass accuracy was guaranteed via an injection of a calibration solution from sodium formate clusters with external (at the beginning of each run) and internal (segment 0.1 at 0.4 min of each sample) calibration by a High Precision Calibration (HPC) equation with a maximum mass delta of 1 ppm and 7 as the minimal number of calibration points. LC-UV and MS data acquisition and processing were performed using DataAnalysis 4.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.6. MZmine 2 Pre-Processing

The MS² data files were converted from the .d Agilent standard data format to the .mzXML format using MSConvert software (part of the ProteoWizard package (Palo Alto, CA, USA, v3)) [23]. The .d Bruker data files were converted to .mzXML format using DataAnalysis 4.4 software. All .mzXML were then processed using MZmine 2 v53 [10]. Mass detection was conducted using a noise level of 400 counts for MS and 0 count for MSMS dimension. The ADAP chromatogram builder was used with a minimum group size of scans of 4, a group intensity threshold of 3000, a minimum highest intensity of 4000, and an *m/z* tolerance of 15 ppm [24]. The ADAP wavelets deconvolution algorithm was used with the following standard settings: S/N threshold = 8, minimum feature height = 3000, coefficient/area threshold = 10, peak duration range—0.02–1.0 min, RT wavelet range—0.01–0.07. Isotopologues were grouped using the isotopic peaks grouper algorithm, with an *m/z* tolerance of 15 ppm and an RT tolerance of 0.1 min. MS² scans were paired using an *m/z* tolerance range of 0.025 Da and RT tolerance range of 0.1 min. Peak alignment was performed using the join aligner module (*m/z* tolerance = 15 ppm, weight for *m/z* = 1, weight for RT = 1, absolute RT tolerance = 0.1 min). The peak list was gap-filled with the peak finder module (*m/z* tolerance = 5 ppm and RT tolerance = 0.05 min). Eventually, the .mgf spectral data file and its corresponding .csv metadata file (containing RT and peak areas) were exported using the dedicated “Export to GNPS-FBMN” built-in module [11,25].

3.7. Molecular Network Analysis

The two files mentioned above were imported into MetGem 1.3.6. [12]. MS² spectra were window-filtered by choosing only the top ten peaks within the ±50 Da window throughout the spectrum. The data were filtered by removing all peaks in the ±5 Da range around the precursor *m/z*. The *m/z* tolerance window used to find the matching peaks was set to 0.02 Da, and cosine scores were kept under consideration for spectra sharing at least 4 matching peaks. The network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.8. Further edges between two nodes were kept in the network only if each of the nodes appeared in each other’s respective top 10 most similar nodes.

3.8. Cells and Culture Conditions

Human-derived hepatoma cells, Huh7 (ATCC, PTA-8561) cells, and Vero-E6 cells were grown in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM, PAN Biotech, Aidenbach,

Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, and 0.1% amphotericin B (PAN Biotech). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ incubator.

3.9. Viruses

Recombinant HCoV-229E-Luc expressing the luciferase gene was kindly provided by V. Thiel [26]. SARS-CoV-2 virus was isolated in 2020 from a nasopharyngeal swab of a COVID-19 PCR-positive patient in Reunion Island [27]. SARS-CoV-2 was propagated on Vero-E6 cells.

3.10. Chemicals and Antibody

Q3G, PLA2 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Remdesivir was purchased from Invivogen (Toulouse, France). All stock solutions were prepared in sterile dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich). Monoclonal human igG1 antibody SARS-CoV-2 spike (clone H4) was purchased from Invivogen (Toulouse, France).

3.11. Cytotoxic Assays

The cytotoxicity of isolated phytocompounds were determined using an MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Charbonnières-les-Bains, France). A total of 2×10^4 Huh7 and Vero-E6 cells were seeded on a 96-well plate and incubated with a serial dilution of phytocompounds. Forty-eight hours after treatment, the MTS test was performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance was assessed at 490 nm, and the percentage of viable cells was calculated. Dose-response curves were established on Prism GraphPad to calculate the concentration causing death in 50% of the cells (CC₅₀).

3.12. HCoV-229E-Luc Infection Inhibition Assays (Screening of 824 Plant Extracts)

HCoV-229E-Luc was mixed with the plant extracts at three different concentrations (25, 10 and 2.5 µg/mL) for 10 min. Huh-7 cells and Huh-7 cells transduced with a lentiviral vector expressing the TMPRSS2 protease gene (Huh-7-TMPRSS2 cells) were infected with HCoV-229E-Luc at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 in a final volume of 50 µL for 1 h at 37 °C in the presence of the plant extracts. The virus was removed and replaced with culture medium containing the extracts for 6 h at 37 °C. Cells were lysed in 20 µL of Renilla lysis buffer (Promega), and luciferase activity was quantified in a Tristar LB 941 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using a Renilla luciferase assay system (Promega), as recommended by the manufacturer.

3.13. HCoV-229E-Luc Infection Inhibition Assays (Evaluation of Fractions and Pure Compounds)

Huh7 cells were treated with different concentrations of fractions or compounds diluted in the culture medium and inoculated with HCoV-229E at a MOI of 0.5 in a final volume of 100 µL. At 12 h post-infection, the medium was removed, and the cells were lysed in 40 µL of Renilla luciferase buffer (Promega, E2810). Luminescence was measured using the FLUOstar Omega spectrophotometer and by following the manufacturer's instructions.

3.14. SARS-CoV-2 Infection Inhibition Assays

Vero-E6 cells were seeded in 24-well plates overnight before inoculation with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.1 in the presence of 1–3 at different concentrations for 48 h at 37 °C. Vero-E6 cells were trypsinized and fixed for 20 min with 3.7% PFA. The cells were then rinsed with PBS and processed for flow cytometric assay, Cytotflex (Beckman, Villepinte, France), as previously described using monoclonal human igG1 antibody SARS-CoV-2 spike (clone H4) for 1 h, followed by a Goat anti-Human IgG Cross-Adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), for the detection

of infected cells. The percentage of infected cells was assessed using Cytexpert software (version 9.00, La Jolla, CA, USA).

3.15. Virucidal Assay against SARS-CoV-2

Moreover, 25×10^4 PFU of SARS-CoV-2 were pre-incubated with the drugs in DMEM at 37 °C for 1 h; DMSO (0.01%) was used as vehicle control. After pre-incubation, the mixture was diluted (serial tenfold dilution) and used to infect a monolayer of Vero-E6 cells. After incubation at 37 °C for 1 h, the infected cells were covered with 300 µL of medium containing 1.0% carboxymethylcellulose (CMC) with DMEM + 5% FBS. The cells were incubated at 37 °C for 3 days. Finally, the Vero-E6 cells were fixed with 3.7% PFA and stained with Crystal violet. Plaques were counted and compared to the control.

3.16. Statistical Analysis and IC_{50} and CC_{50} Determination

Both the Cytotoxic concentrations (CC_{50}) and inhibitory concentrations (IC_{50}) were obtained by performing nonlinear regression followed by the construction of sigmoidal concentration–response curves. The results are means \pm SD of at least three independent experiments performed in triplicate and are expressed as relative value compared to untreated infected cells (Mock-treated). Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism software (version 9.0; La Jolla, CA, USA). Significance levels are shown in the figures as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s. = not significant.

Author Contributions: Conceptualization, K.S., C.E.K., M.L. and C.A.; methodology, K.S., C.E.K., M.L. and C.A.; validation, C.E.K. and C.A.; formal analysis, M.C., C.H., D.A.H., N.F., S.B. (Sandrine Belouard), K.S., S.B. (Stéphanie Boutet), C.E.K., M.L. and C.A.; investigation, M.C., C.H., D.A.H., N.F., S.B. (Sandrine Belouard), V.C.P., T.M.H.D., K.S., P.M., S.B. (Stéphanie Boutet), C.E.K., M.L. and C.A.; investigation, resources, V.C.P. and T.M.H.D.; writing—original draft preparation, M.C., C.E.K., M.L. and C.A.; writing—review and editing, C.E.K., M.L. and C.A.; supervision, C.E.K., M.L. and C.A.; project administration, C.E.K., M.L. and C.A.; funding acquisition, P.M. and M.L.; investigation, P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University Paris-Saclay grant managed by Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-IDEX-0003-02 (10-LABX-0033)) and by a grant from POE FEDER 2014-20 of the Conseil Régional de La Réunion (TFORCE-COVIR, N°20201437-0027601). This work has also benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms funded by Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The LC-HRESIMS² data are not yet publicly available due to their use in other ongoing research projects.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the International Associated Laboratory (LIA: NAT-PROCHEMLAB), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, ICSN, France), and the Vietnam Academy of Science and Technology (Institute of Marine Biochemistry, VAST, Vietnam).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 141–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Olivon, F.; Allard, P.M.; Koval, A.; Righi, D.; Genta-Jouve, G.; Neyts, J.; Apel, C.; Pannecouque, C.; Nothias, L.F.; Cachet, X.; et al. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-Informational Molecular Networks. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2644–2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Olivon, F.; Apel, C.; Retailleau, P.; Allard, P.M.; Wolfender, J.L.; Touboul, D.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Desrat, S. Searching for Original Products by Molecular Networking: Detection, Isolation and Total Synthesis of Chloroaustralasines. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 2171–2178. [[CrossRef](#)]
4. Olivon, F.; Remy, S.; Grelier, G.; Apel, C.; Eydoux, C.; Guillemot, J.C.; Neyts, J.; Delang, L.; Touboul, D.; Roussi, F.; et al. Antiviral Compounds from *Codiaeum peltatum* Targeted by a Multi-informative Molecular Networks Approach. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 330–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jantamat, P.; Weerapreeyakul, N.; Puthongking, P. Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Coumarins and Carbazole Alkaloids from *Clausena harmandiana*. *Molecules* **2019**, *24*, 3385. [[CrossRef](#)]
6. Caruso, A.; Ceramella, J.; Iacopetta, D.; Saturnino, C.; Mauro, M.V.; Bruno, R.; Aquaro, S.; Sinicropi, M.S. Carbazole Derivatives as Antiviral Agents: An Overview. *Molecules* **2019**, *24*, 1912. [[CrossRef](#)]
7. Mishra, S.; Pandey, A.; Manvati, S. Coumarin: An emerging antiviral agent. *Heliyon* **2020**, *6*, e03217. [[CrossRef](#)]
8. Songsiang, U.; Thongthoom, T.; Boonyarat, C.; Yenjai, C. Claurailas A–D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 208–212. [[CrossRef](#)]
9. Arbab, I.A.; Abdul, A.B.; Aspollah, M.; Abdelwahab, S.I.; Ibrahim, M.Y.; Ali, Z. A review of traditional uses, phytochemical and pharmacological aspects of selected members of *Clausena* genus (Rutaceae). *J. Med. Plant. Res.* **2012**, *6*, 5107–5118.
10. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Oresic, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 395. [[CrossRef](#)]
11. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Olivon, F.; Elie, N.; Grelier, G.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Touboul, D. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 13900–13908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Groweiss, A.; Cardellina, J.H.; Pannell, L.K.; Uyakul, D.; Kashman, Y.; Boyd, M.R. Novel cytotoxic, alkylated hydroquinones from *Lannea velutischi*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 116–121. [[CrossRef](#)]
14. Rossi, R.; Carpita, A.; Quirici, M.G.; Veracini, C.A. Insect pheromone components: Use of ^{13}C NMR spectroscopy for assigning the configuration of C=C double bonds of monoenic or dienic pheromone components and for quantitative determination of Z/E mixtures. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 639–644. [[CrossRef](#)]
15. Fürstner, A.; Seidel, G. Shortcut Syntheses of Naturally Occurring 5-Alkylresorcinols with DNA-Cleaving Properties. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2332–2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kil, Y.S.; Risinger, A.L.; Petersen, C.L.; Liang, H.; Grkovic, T.; O’Keefe, B.R.; Mooberry, S.L.; Cichewicz, R.H. Using the Cancer Dependency Map to Identify the Mechanism of Action of a Cytotoxic Alkenyl Derivative from the Fruit of *Choerospondias axillaris*. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 584–592. [[CrossRef](#)]
17. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. High-field FT NMR application of Mosher’s method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096. [[CrossRef](#)]
18. Brél, O.; Touré, S.; Levasseur, M.; Lechat, C.; Pellissier, L.; Wolfender, J.L.; Van-Elslande, E.; Litaudon, M.; Dusfour, I.; Stien, D.; et al. Paeciloretin Derivatives as Potent Antimicrobial Agents from *Isaria farinosa*. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 2915–2922. [[CrossRef](#)]
19. Meunier, T.; Desmarests, L.; Bordage, S.; Bamba, M.; Hervouet, K.; Rouillé, Y.; François, N.; Decossas, M.; Sencio, V.; Trottein, F.; et al. A Photoactivable Natural Product with Broad Antiviral Activity against Enveloped Viruses, Including Highly Pathogenic Coronaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2022**, *66*, e0158121. [[CrossRef](#)]
20. Gaudry, A.; Bos, S.; Viranaicken, W.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; Gadea, G.; Desprès, P.; El-Kalamouni, C. The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1093. [[CrossRef](#)]
21. Parang, K.; El-Sayed, N.S.; Kazeminy, A.J.; Tiwari, R.K. Comparative Antiviral Activity of Remdesivir and Anti-HIV Nucleoside Analogs against Human Coronavirus 229E (HCoV-229E). *Molecules* **2020**, *25*, 2343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chen, M.; Aoki-Utsubo, C.; Kameoka, M.; Deng, L.; Terada, Y.; Kamitani, W.; Sato, K.; Koyanagi, Y.; Hijikata, M.; Shindo, K.; et al. Broad-spectrum antiviral agents: Secreted phospholipase A(2) targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 918–920. [[CrossRef](#)]
24. Myers, O.D.; Sumner, S.J.; Li, S.; Barnes, S.; Du, X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 8696–8703. [[CrossRef](#)]

25. Nothias, L.F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 905–908. [[CrossRef](#)]
26. Van den Worm, S.H.; Eriksson, K.K.; Zevenhoven, J.C.; Weber, F.; Züst, R.; Kuri, T.; Dijkman, R.; Chang, G.; Siddell, S.G.; Snijder, E.J.; et al. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32857. [[CrossRef](#)]
27. Wilkinson, D.A.; Mercier, A.; Turpin, M.; Simbi, M.A.; Turpin, J.; Lebarbenchon, C.; Cesari, M.; Jaffar-Bandjee, M.C.; Josset, L.; Yemadje-Menudier, L.; et al. Genomic evolution of SARS-CoV-2 in Reunion Island. *Infect. Genet. Evol.* **2022**, *106*, 105381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3. Discussion

L'étude de *Clausena harmandiana* a été entreprise suite aux résultats du criblage biologique contre le HCoV-229E d'un ensemble d'extraits végétaux sélectionnés en fonction de leur appartenance aux familles des Rutaceae et Annonaceae. Le criblage est une méthode permettant de réaliser rapidement un grand nombre de tests d'activité *in vitro* et de mettre en évidence les échantillons prometteurs.

Les réseaux moléculaires multi-informatifs, en conjonction avec des données biologiques, ont permis de cibler directement l'isolement de composés ayant de fortes activités antivirales. En effet, en comparant des échantillons taxonomiquement apparentés, cette approche permet de mettre en évidence une famille chimique d'intérêt au sein d'un extrait bioactif à un stade précoce de l'étude. Les réseaux moléculaires multi-informatifs constituent donc un puissant outil bio-informatique qui montre la richesse des extraits et qui permet de faire ressortir des familles de molécules d'intérêt. L'annotation du réseau donne une première idée des types structuraux présents si les spectres de MS² sont disponibles dans les bases de données.

Différentes techniques chromatographiques ont par la suite été employées afin de fractionner et purifier les extraits selon une procédure masse-guidée. Cette méthode a permis d'accélérer le processus d'isolement en ciblant directement les fractions composées des ions présents dans les clusters d'intérêt. Ainsi, les trois composés purifiés ont été obtenus dans des quantités suffisantes pour la suite des tests analytiques et biologiques.

L'identification structurale a permis de mettre en évidence trois composés qui n'avaient jamais été décrits auparavant. Les composés **1** à **3** possèdent tous une chaîne latérale alkyle hydroxylée en C-2' insaturée (**1** et **2**) ou saturée (**3**), et qui diffère par le nombre de carbones : 18 pour **1** et **3** ; 19 pour **2**. Ce sont des hydroquinones monosubstituées qui appartiennent à la grande famille des lipides phénoliques.

Les lipides phénoliques sont des dérivés de mono- et dihydroxybenzène (phénol, résorcinol et hydroquinone) associés à une longue chaîne aliphatique (figure 8). La présence de régions hydrophiles (phénol) et hydrophobes (chaîne alkyl) distinctes dans ces molécules leur confère un fort caractère amphiphile. Ces composés peuvent interagir de manière non spécifique avec les membranes et les domaines hydrophobes des protéines. En effet, ils ont la capacité de s'incorporer aux bicouches phospholipidiques et ainsi de faire varier leurs fonctions biologiques et leurs propriétés biophysiques (fluidité, mobilité, perméabilité). Ils démontrent également la

capacité de s'auto-agrégérer spontanément et de former des micelles et structures liposomales (33,34).

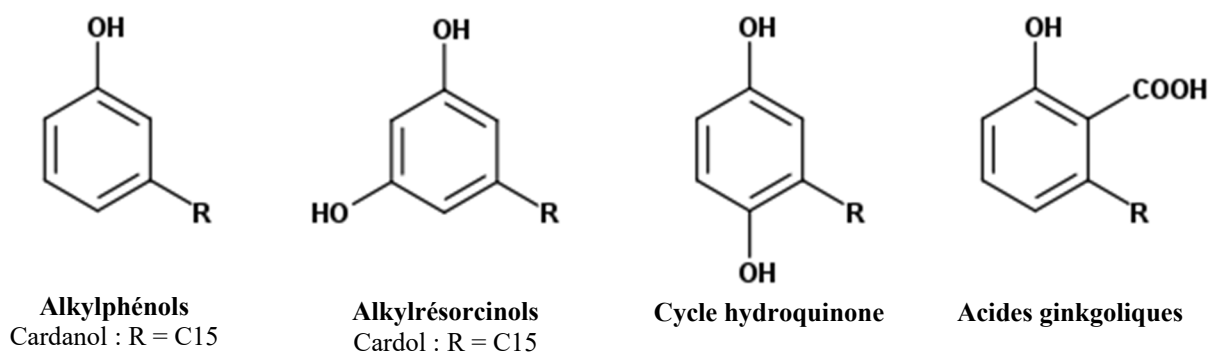


Figure 8 : Exemples de cycles phénoliques constituant les lipides phénoliques

Les lipides phénoliques possèdent des activités biologiques cytotoxiques, anticancéreuses et antioxydantes. En effet, le cycle phénolique en fait de potentiels protecteurs du stress oxydatif de par leur capacité à empêcher les ions métaux d'initier l'oxydation, à réduire les radicaux libres et à inhiber diverses enzymes pro-oxydantes. Les lipides phénoliques inhibent également la croissance des bactéries, des champignons, des protozoaires et des parasites (33,34).

Les lipides phénoliques (**1-3**) isolés de *C. harmandiana* possèdent des propriétés cytotoxiques sur les cellules Huh7 avec des CC_{50} de 1.3, 0.5 et 0.8 μM , respectivement, et sur les cellules Vero E6 avec des CC_{50} de 1.5, 0.5 et 0.9 μM , respectivement. Le composé **1** ne montre aucune activité antivirale. En revanche, les composés **2** et **3** exercent de fortes activités antivirales contre le virus HCoV-229E avec des CI_{50} de 0.10 et 0.05 μM , respectivement, et contre le SARS-CoV-2 avec des CI_{50} de 0.20 et 0.05 μM , respectivement. Le composé **3** présente donc le meilleur indice de sélectivité. Plus celui-ci est élevé, plus la marge thérapeutique est importante.

Une comparaison de la structure des composés permet de discuter de potentielles relations structure/activité (RSA). La présence d'une double liaison en position C-14 de la chaîne latérale alkyle du composé **1** pourrait expliquer la différence d'activité entre les composés **1** et **3**. Mais elle ne peut pas expliquer la différence concernant le composé **2**, qui ne possède qu'un groupe méthylène supplémentaire sur la chaîne alkyle. Par conséquent, l'écart entre l'activité antivirale des composés **1** et **2** est difficile à expliquer rationnellement. D'autres études sont nécessaires pour mieux expliquer ces relations structure/activité. Des composés

similaires pourraient être synthétisés en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle, le nombre d'insaturations ou encore la position des groupements hydroxyles. Les tests biologiques menés sur cette nouvelle série de molécules pourraient expliciter les RSA et permettre l'identification de composés plus puissants ou plus sélectifs.

L'étude du mécanisme d'action des composés **2** et **3** a montré qu'ils n'affectent pas la réplication intracellulaire du HCoV-229E mais qu'ils inhibent l'entrée du virus dans la cellule. En pré-incubant HCoV-229E avec ces composés, l'activité antivirale s'est révélée plus élevée. Il est donc proposé que les composés **2** et **3** ciblent directement la particule virale et non la cellule hôte. L'inhibition de l'entrée du virus dans la cellule est considérée comme une stratégie efficace pour prévenir et traiter la COVID-19. Sachant que les lipides phénoliques ont la capacité d'interagir avec les membranes et d'affecter la structure et l'activité protéique grâce à leurs propriétés amphiphiles, différentes hypothèses peuvent être émises. L'incorporation des composés **2** et **3** au sein de l'enveloppe virale modifierait sa composition, impactant ainsi ses propriétés biologiques et biophysiques, ce qui limiterait l'entrée du virus dans la cellule. Les composés **2** et **3** pourraient également agir sur la protéine S et potentiellement empêcher son clivage ou son interaction avec les récepteurs ACE2 de la cellule hôte. D'autres tests sont donc nécessaires pour préciser le mécanisme d'action de ces lipides phénoliques. Afin d'étudier les interactions des composés avec différentes cibles de la particule virale, des études *in silico* comme le docking moléculaire pourraient aussi être envisagées

D'autres études, réalisées elles sur l'extrait de feuilles de *Ginkgo biloba*, ont montré l'intérêt des lipides phénoliques comme composés antiviraux et notamment anti-SARS-CoV-2. Parmi les composés majoritaires présents dans cet extrait, on retrouve les acides ginkgoliques (GA) (figure 8), des lipides phénoliques semblables aux acides anacardiques des Anacardiaceae et Myristicaceae. Ces composés ont révélé une activité inhibitrice de la protéase 3CLpro de l'ordre du micromolaire, notamment le GA C15:0, possédant une chaîne alkyle saturée à 15 carbones ($CI_{50} = 0.70 \mu\text{M}$). Parmi les cibles thérapeutiques identifiées pour le traitement de la COVID-19, la 3CLpro est une enzyme clé responsable de la réplication du coronavirus. Une analyse de modélisation moléculaire a mis en évidence les interactions possibles de cette molécule au sein de la protéase (35). Les GA sont également connus pour leur activité anti-tumorale, antibactérienne et antivirale. Les tests effectués sur le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1), le cytomegalovirus humain (CMV), le virus Zika., le VIH, le virus Ebola, le virus influenza A et le virus d'Epstein Barr indiquent que les GA agissent comme inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule (36). L'inhibition est conservée chez ces virus enveloppés qui n'ont pas

de glycoprotéines homologues et qui utilisent des récepteurs d'entrée différents. Ainsi les GA semblent bloquer la fusion des virus enveloppés avec la cellule hôte selon un mécanisme d'action commun. Des tests complémentaires effectués sur VHS-1 et CMV suggèrent un possible mécanisme secondaire ciblant la synthèse des protéines et de l'ADN (36). Ses résultats sont cohérents avec l'étude de Xiong et al. (35) qui identifie les GA comme inhibiteurs de la réplication via la protéase 3CLpro mais aussi avec la présente étude qui révèle l'activité inhibitrice d'entrée du virus dans la cellule d'autres lipides phénoliques.

Compte tenu de l'effet important des GA sur l'infection virale, même après le début de l'infection, ils peuvent potentiellement être utilisés pour traiter les infections aiguës. De plus, la présence de nombreux flavonoïdes et terpènes, aux propriétés anti-inflammatoires, conforte l'idée d'évaluer l'intérêt de l'extrait de *G. biloba* dans le traitement de la COVID-19 (37,38).

4. Conclusion générale

THESE SOUTENUE PAR Mme CHAMBON Marion

La pandémie de COVID-19, induite par la propagation du SARS-CoV-2, a souligné la nécessité de disposer d'antiviraux puissants contre les coronavirus. Les plantes, utilisées par l'Homme à des fins médicinales depuis l'antiquité, sont une source d'inspiration dans la conception de nouveaux médicaments.

En raison de son importante activité antivirale sur HCoV-229E, l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Clausena harmandiana* a été sélectionné pour une étude chimique et biologique approfondie. La construction d'un réseau moléculaire, à partir des analyses des extraits de *Clausena* spp. par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem, a permis de cibler des composés susceptibles d'être responsables de l'activité biologique observée. Le fractionnement guidé par la spectrométrie de masse, a été réalisé par chromatographie flash sur gel de silice suivie de chromatographie liquide haute performance préparative sur colonne de phase inverse. Il a permis d'obtenir trois lipides phénoliques non décrits dans la littérature (**1 - 3**). Leurs structures ont été identifiées par analyse spectroscopique et les configurations absolues des composés **1** et **2** ont été déterminées par la méthode de Mosher.

La cytotoxicité des trois composés a été évaluée sur cellules de foie humain (Huh7) indiquant une CC_{50} allant de 0.5 à 1.3 μM . À des doses non cytotoxiques, les composés **2** et **3** exercent une activité antivirale dose-dépendante sur HCoV-229E avec des valeurs de CI_{50} de 0.1 et 0.05 μM , respectivement, tandis que le composé **1** n'a montré aucun effet antiviral. L'activité antivirale contre le SARS-CoV-2 a ensuite été démontrée sur cellule Vero-E6 à des doses non cytotoxiques, avec des valeurs de CI_{50} de 0.20 et 0.05 μM pour **2** et **3**, respectivement.

Le mécanisme d'action a été investigué plus en détail, en ajoutant les composés à différents stades du cycle de la réplication virale. Les composés **2** et **3** n'affectent pas l'étape intracellulaire de réplication du HCoV-229E et semblent agir comme des inhibiteurs d'entrée du virus. Les mécanismes sous-jacents de l'action antivirale ont été recherchés afin de déterminer si les composés ciblent le virus ou les cellules. Les composés **2** et **3** révèlent une activité antivirale significativement plus élevée lorsque les particules virales du HCoV-229E ont été pré-incubées avec les composés. L'infectiosité de SARS-CoV-2 a également été évaluée avec pré-incubation du virus en présence des composés **2** et **3**, et montre à nouveau que tous deux sont des inhibiteurs de l'entrée du coronavirus en agissant directement sur la particule

virale.

Cette étude met en évidence l'intérêt des lipides phénoliques de *Clausena harmandiana* comme une source de nouveaux agents antiviraux contre les coronavirus humains.

D'autres études sont nécessaires pour mieux expliquer les relations structure/activité et les mécanismes d'actions des lipides phénoliques.


Le Président de la thèse,
Nom : Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 12/01/2024
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature :



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,
Professeur C. DUSSART



P/O Le Directeur et par délégation
Le Directeur adjoint
Lars Petter JORDHEIM

5. Références bibliographiques

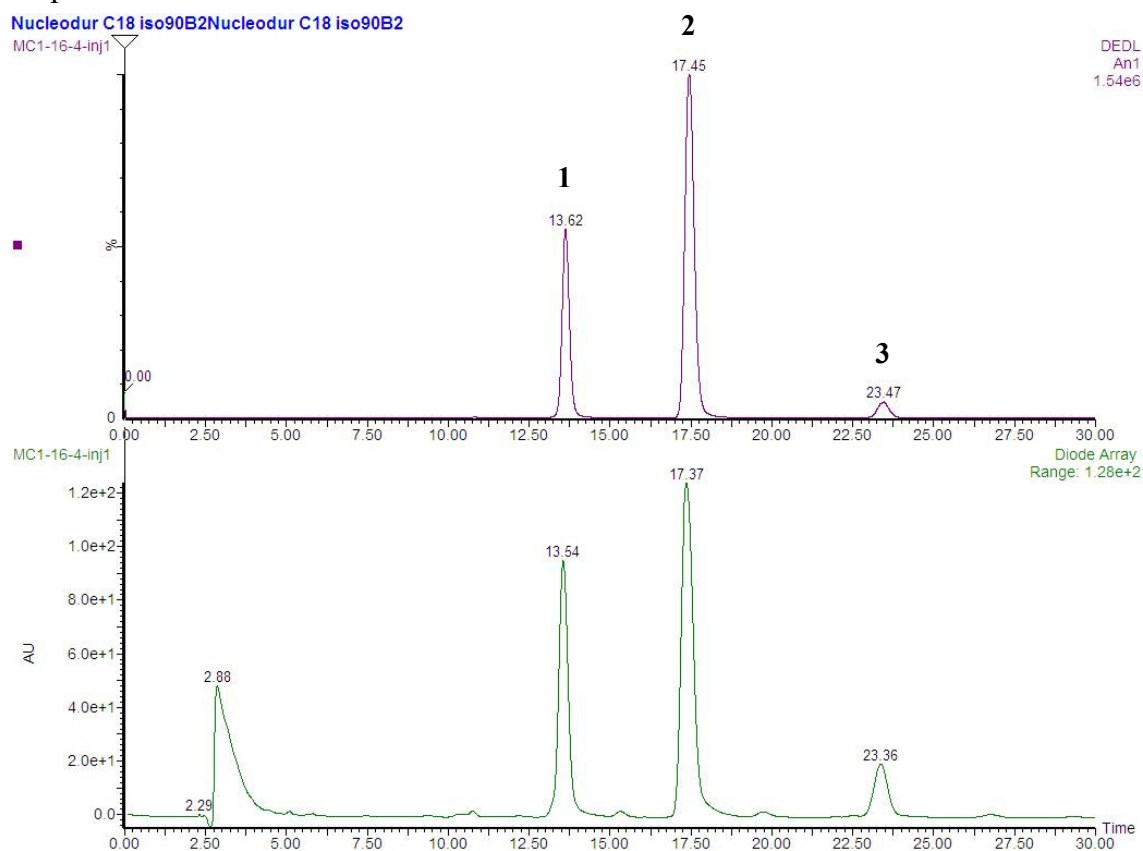
1. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270-84.
2. Izda V, Jeffries MA, Sawalha AH. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. *Clin Immunol.* 2021;222:108634.
3. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology.* 2021;19(3):141.
4. Santé publique France. Coronavirus: chiffres clés et évolution de la Covid-19 en France et dans le monde. [En ligne]. 2023 [cité le 17 oct 2023]. Disponible: <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-clés-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde>
5. Huang J, Song W, Huang H, Sun Q. Pharmacological Therapeutics Targeting RNA-Dependent RNA Polymerase, Proteinase and Spike Protein: From Mechanistic Studies to Clinical Trials for COVID-19. *J Clin Med.* 2020;9(4):1131.
6. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-70.
7. Kiani AK, Dhuli K, Anpilogov K, Bressan S, Dautaj A, Dundar M, et al. Natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 endocytosis: A promising approach against COVID-19. *Acta Biomed.* 2020;91 Suppl 13: Se2020008.
8. Moutaouakkil Y, Tadlaoui Y, Latt EEV, Atbib Y, Cherrah Y, Bennana A, et al. Les anti-inflammatoires et SARS-CoV-2 (COVID-19). *Douleurs : Évaluation - Diagnostic - Traitement.* 2020;21(2):47-51.
9. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Vaccins contre le Covid-19 disponibles en France. [En ligne]. 2022 [cité le 20 nov 2023]. Disponible: <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/covid-19-vaccins/covid-19-vaccins-autorises>
10. Haute Autorité de Santé (HAS). Traitement de la Covid-19: Réponses rapides dans le cadre du Covid-19. [En ligne]. 2023 [cité le 20 nov 2023]. Disponible: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3447571/fr/traitement-de-la-covid-19
11. Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe K, Simmonds P, Stilianakis NI, et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(6):361-79.
12. Wikipédia. Synthèse totale de l'oseltamivir. [En ligne]. 2023 [cité le 2 janv 2024]. Disponible: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Synth%C3%A8se_totale_de_l%27oseltamivir&oldid=205167796
13. Usine Nouvelle . Sanofi-Aventis va produire la matière première du Tamiflu de Roche. [En ligne]. 2006 [cité le 2 janv 2024]; Disponible: <https://www.usinenouvelle.com/article/sanofi-aventis-va-produire-la-matiere-premiere-du-tamiflu-de-roche.N12930>

14. van Breemen RB, Muchiri RN, Bates TA, Weinstein JB, Leier HC, Farley S, et al. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *J Nat Prod.* 2022;85(1):176-84.
15. Tamburello M, Salamone S, Anceschi L, Governa P, Brighenti V, Morellini A, et al. Antiviral Activity of Cannabidiolic Acid and Its Methyl Ester against SARS-CoV-2. *J Nat Prod.* 2023;86(7):1698-707.
16. Nguyen LC, Yang D, Nicolaescu V, Best TJ, Gula H, Saxena D, et al. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Sci Adv.* 2022;8(8):eabi6110.
17. Sangiamsuntorn K, Suksatu A, Pewkliang Y, Thongsri P, Kanjanasirirat P, Manopwisedjaroen S, et al. Anti-SARS-CoV-2 Activity of *Andrographis paniculata* Extract and Its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives. *J Nat Prod.* 2021;84(4):1261-70.
18. Shi TH, Huang YL, Chen CC, Pi WC, Hsu YL, Lo LC, et al. Andrographolide and its fluorescent derivative inhibit the main proteases of 2019-nCoV and SARS-CoV through covalent linkage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;533(3):467-73.
19. Yearsley C. Thailand approves asian herb *Andrographis* to treat COVID-19. *HerbalGram.* 2021;129:35-7.
20. Siripongboonsitti T, Ungtrakul T, Tawinprai K, Auewarakul C, Chartisathian W, Jansala T, et al. Efficacy of *Andrographis paniculata* extract treatment in mild to moderate COVID-19 patients being treated with favipiravir: A double-blind, randomized, placebo-controlled study (APFaVi trial). *Phytomedicine.* 2023;119:155018.
21. Shanker K, Rangnekar H, Wele A, Soni P, Gaikwad P, Pal A, et al. A randomized controlled pilot study of add-on therapy of CIM-MEG19 (standardized *Andrographis paniculata* formulation) in mild to moderate COVID-19. *Phytomed Plus.* 2023;3(1):100398.
22. University of Californy, College of Natural and Agricultural Sciences. Givaudan citrus variety collection at UCR: *Clausena harmandiana*. [En ligne]. 2022 [cité le 20 nov 2023]. Disponible: <https://citrusvariety.ucr.edu/crc4034>
23. Tanruean K, Poolprasert P, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S. Phytochemical Analysis and Evaluation of Antioxidant and Biological Activities of Extracts from Three Clauseneae Plants in Northern Thailand. *Plants (Basel).* 2021;10(1):117.
24. Jantamat P, Weerapreeyakul N, Puthongking P. Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Coumarins and Carbazole Alkaloids from *Clausena harmandiana*. *Molecules.* 2019;24(18):3385.
25. Caruso A, Ceramella J, Iacopetta D, Saturnino C, Mauro MV, Bruno R, et al. Carbazole Derivatives as Antiviral Agents: An Overview. *Molecules.* 2019;24(10):1912.
26. Boonyarat C, Tantiwatcharakunthon M, Takomthong P, Yenjai C, Hayakawa Y, Dejkriengkraikul P, et al. Neuroprotective and anticancer effects of

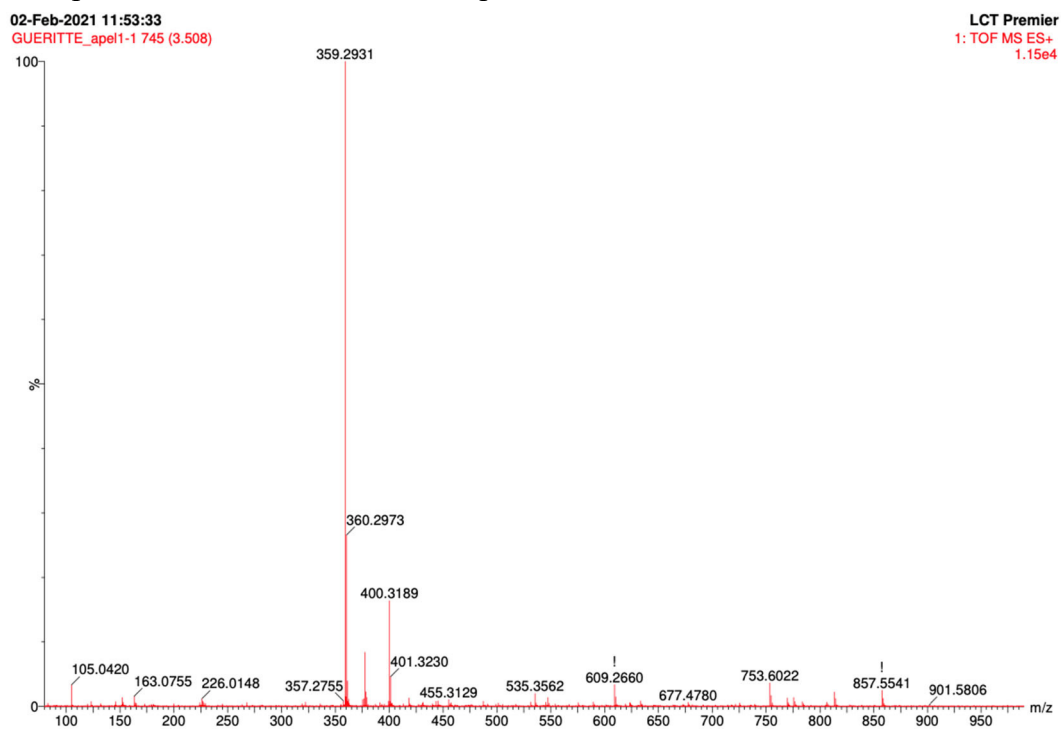
- 7-Methoxyheptaphylline via the TAK1 pathway. *Oncol Rep.* 2023;49(1):15.
27. Mishra S, Pandey A, Manvati S. Coumarin: An emerging antiviral agent. *Heliyon.* 2020;6(1):e03217.
 28. Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Arch Pharm Res.* 2010;33(5):675-80.
 29. Athipornchai A, Kumpang R, Semsri S. Potential Biological Activities of *Clausena* Essential Oils for the Treatment of Diabetes. *J Oleo Sci.* 2021;70(11):1669-76.
 30. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):828-37.
 31. Olivon F, Elie N, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal Chem.* 4 2018;90(23):13900-8.
 32. Olivon F, Allard PM, Koval A, Righi D, Genta-Jouve G, Neyts J, et al. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks. *ACS Chem Biol.* 2017;12(10):2644-51.
 33. Kozubek A, Tyman JHP. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chem Rev.* 1999;99(1):1-26.
 34. Stasiuk M, Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(6):841-60.
 35. Xiong Y, Zhu GH, Wang HN, Hu Q, Chen LL, Guan XQ, et al. Discovery of naturally occurring inhibitors against SARS-CoV-2 3CLpro from *Ginkgo biloba* leaves via large-scale screening. *Fitoterapia.* 2021;152:104909.
 36. Borenstein R, Hanson BA, Markosyan RM, Gallo ES, Narasipura SD, Bhutta M, et al. Ginkgolic acid inhibits fusion of enveloped viruses. *Sci Rep.* 2020;10:4746.
 37. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Kaushik A, Kujawska M, Batiha GES. *Ginkgo biloba* in the management of the COVID-19 severity. *Arch Pharm (Weinheim).* 2022;355(10):e2200188.
 38. Ibrahim MA, Ramadan HH, Mohammed RN. Evidence that *Ginkgo Biloba* could use in the influenza and coronavirus COVID-19 infections. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2021;32(3):131-43.

6. Annexes

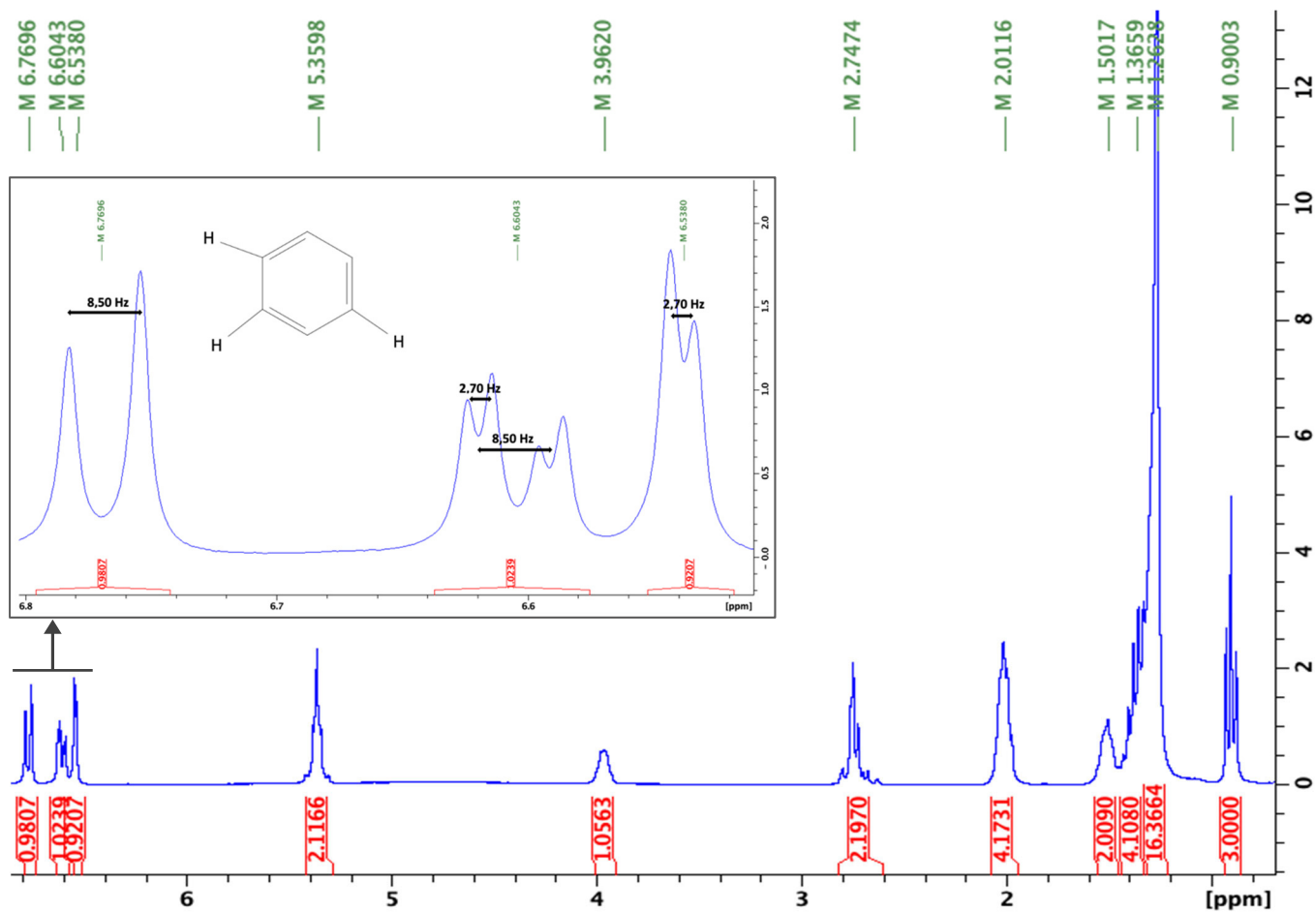
Annexe 1 : Chromatogramme HPLC préparative de la fraction permettant d'isoler les composés 1-3



Annexe 2 : Spectre de masse en ES+ du composé 1

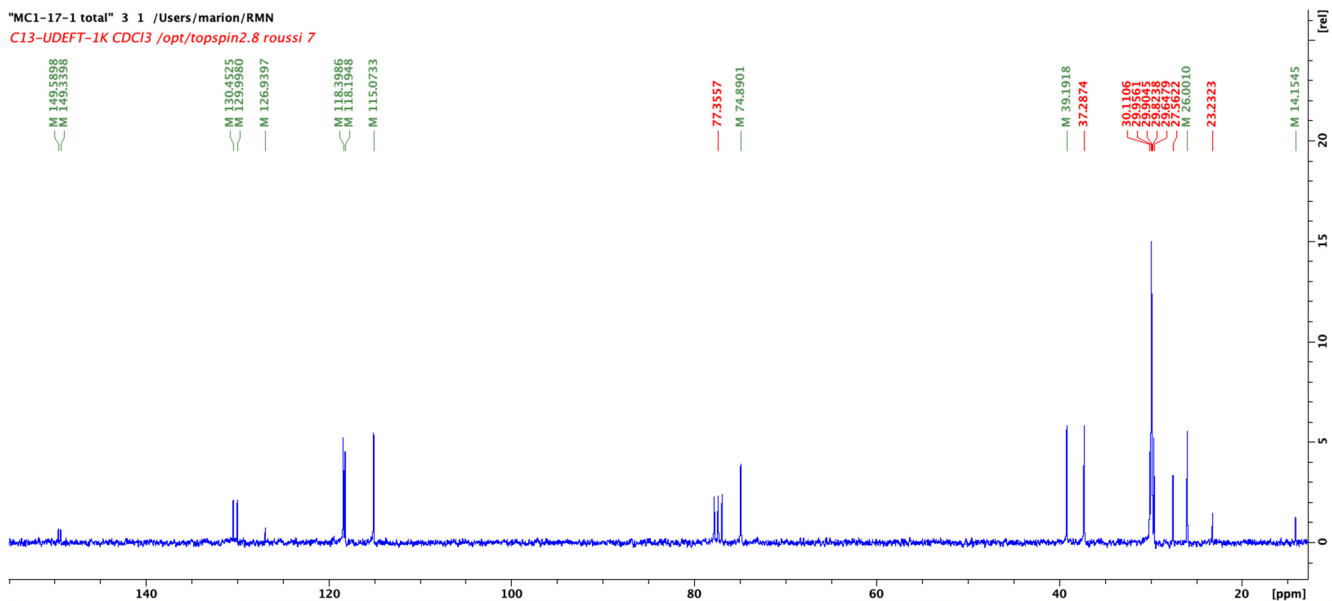


Annexe 3 : RMN ¹H du composé 1 avec zoom sur la partie aromatique (CDCl₃, 300MHz)

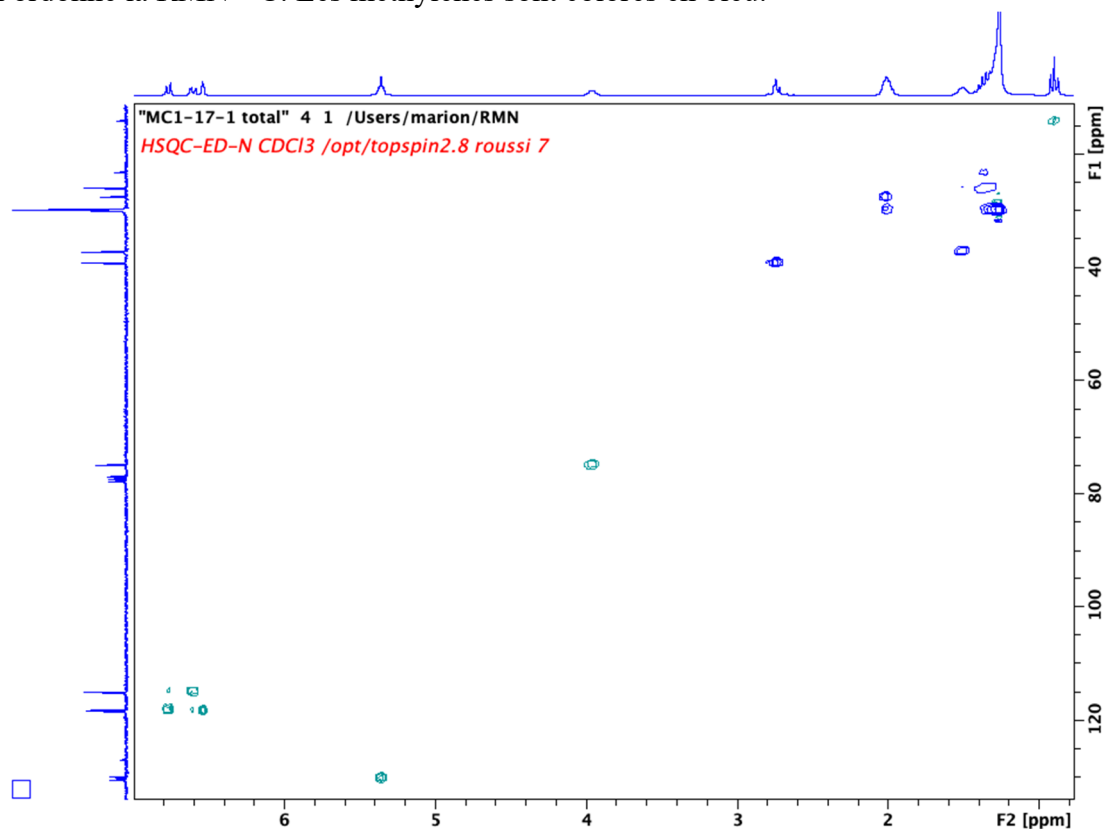


Annexe 4 : RMN ¹³C du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)

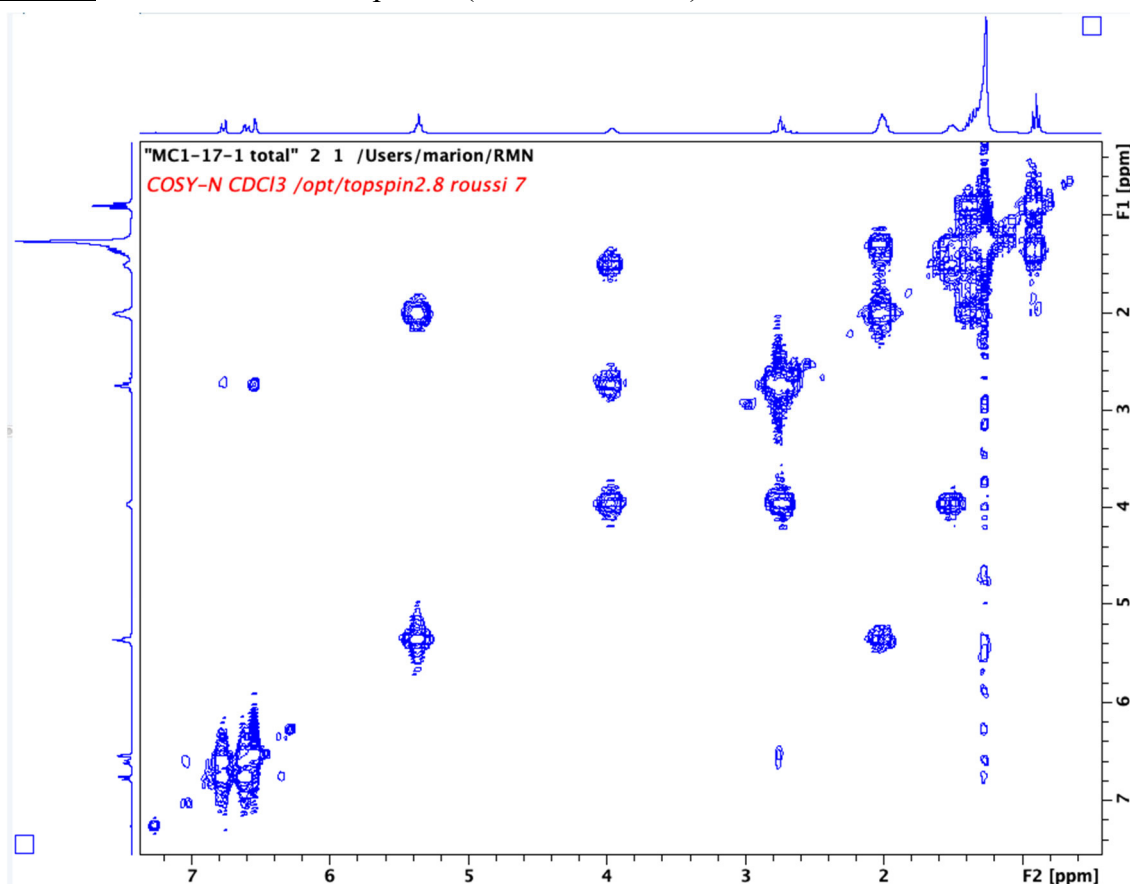
"MCI-17-1 total" 3 1 /Users/marion/RMN
 C13-UDEFT-1K CDCl3 /opt/topspin2.8 roussi 7



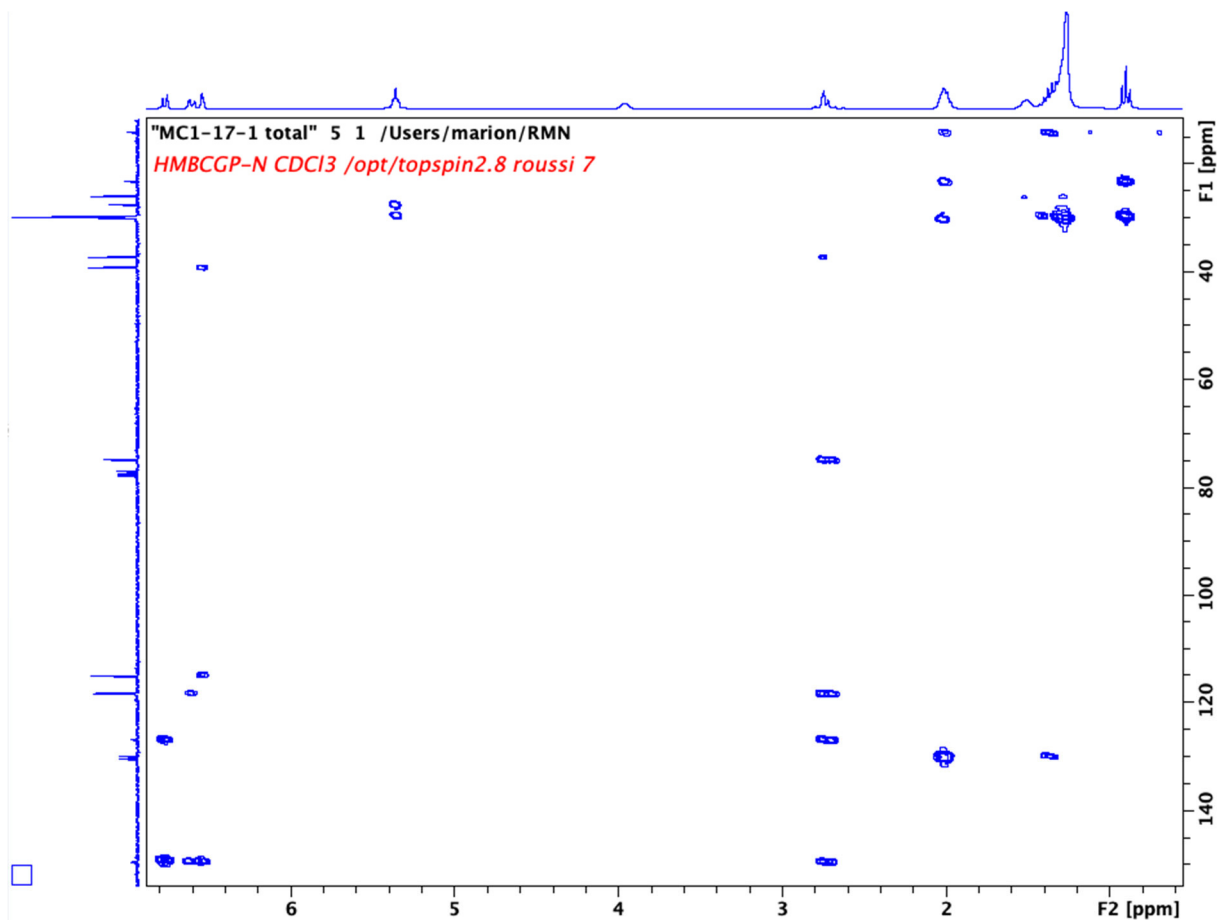
Annexe 5 : RMN HSQC édité du composé **1** (CDCl₃, 300MHz), avec en abscisse la RMN ¹H et en ordonné la RMN ¹³C. Les méthylènes sont colorés en bleu.



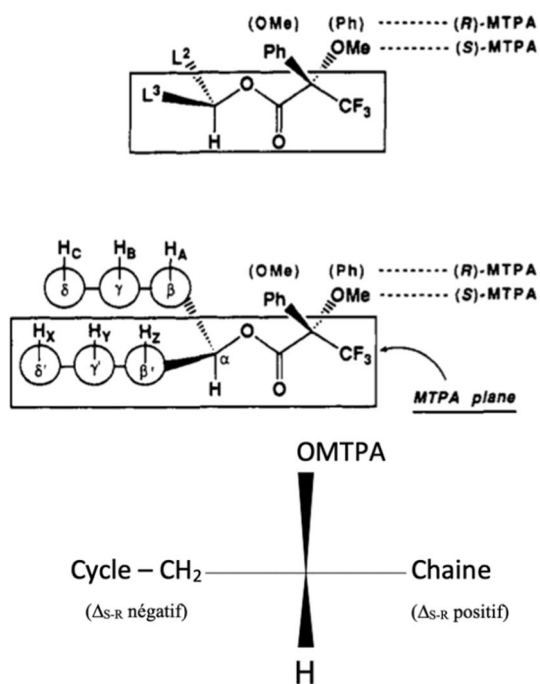
Annexe 6 : RMN COSY du composé **1** (CDCl₃, 300MHz)



Annexe 7 : RMN HMBC du composé 1 (CDCl₃, 300MHz)



Annexe 8 : Structure des ester de Mosher et modèle pour détermination de la configuration



L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

CHAMBON Marion

**Potentiel thérapeutique des plantes médicinales dans la lutte contre le SARS-CoV-2 :
Étude chimique et biologique de *Clausena harmandiana*.**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2024, 55 p.

RESUME

La pandémie de COVID-19, induite par la propagation du SARS-CoV-2, a souligné la nécessité de disposer d'antiviraux puissants contre les coronavirus. Les plantes, utilisées par l'Homme à des fins médicinales depuis l'antiquité, sont une source d'inspiration dans la conception de nouveaux médicaments.

Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs du SARS-CoV-2, un criblage de 824 extraits végétaux, appartenant aux familles des Rutaceae et des Annonaceae, a été réalisé à l'aide d'un test cellulaire d'inhibition du HCoV-229E. En raison de son activité importante, l'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *Clausena harmandiana* a été sélectionnée pour des investigations chimiques et biologiques.

La construction d'un réseau moléculaire, à partir des analyses LC-MS² des extraits de *Clausena* spp. et le fractionnement « masse-guidé », ont abouti à l'isolement et à l'identification de trois lipides phénoliques non décrits (**1-3**). Leurs structures ont été déterminées par analyse spectroscopique. Les configurations absolues des composés **1** et **2** ont été déterminées par la méthode de Mosher. À notre connaissance, il s'agit de la première description de lipides phénoliques au sein du genre *Clausena*.

Les tests de cytotoxicité ont montré que les trois composés testés ont une cytotoxicité dose-dépendante avec une concentration cytotoxique à 50 % de 1.5, 0.5 et 0.9 μM pour **1**, **2** et **3**, respectivement. L'activité antivirale contre le SARS-CoV-2 a ensuite été montrée, avec une concentration inhibitrice à 50 % de 0,20 et 0,05 μM pour les composés **2** et **3**, respectivement. Le mécanisme d'action étudié plus en détail, a révélé que les composés **2** et **3** sont tous deux des inhibiteurs de l'entrée du coronavirus en agissant directement sur la particule virale.

Les relations structure/activité des composés **1-3** sont discutés ainsi que les propriétés physico-chimiques et biologiques des lipides phénoliques.

Les lipides phénoliques de *Clausena harmandiana* pourraient donc être une source de nouveaux agents antiviraux contre les coronavirus humains.

MOTS CLES

COVID-19
SARS-CoV-2
Antiviraux

Clausena harmandiana
Lipides phénoliques

JURY

Pr Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Professeur des Universités, pharmacienne

Dr Marc LITAUDON, pharmacien, Directeur adjoint de l'ICSN-CNRS

Dr Serge MICHALET, Maître de Conférences des Universités, pharmacien

DATE DE SOUTENANCE

06 février 2024

CONTACT

Tuteur pédagogique : serge.michalet@univ-lyon1.fr